

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL
EXTRACTO COMPLETO DE SÁBILA (*Aloe vera*)**

ANNE JOHANA ORDOÑEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
PROGRAMA DE BIOLOGIA
UNIDAD DE TOXICOLOGIA GENETICA Y CITOGNETICA
POPAYAN
2007**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO DEL
EXTRACTO COMPLETO DE SÁBILA (*Aloe vera*)**

ANNE JOHANA ORDOÑEZ

Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de Bióloga

Director

Magíster. SILVIO M. CARVAJAL V.

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION
PROGRAMA DE BIOLOGIA
UNIDAD DE TOXICOLOGIA GENETICA Y CITOGENETICA
POPAYAN
2007**

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. JUSTIFICACION.....	6
4. OBJETIVOS.....	9
5. ANTECEDENTES.....	10
6. MARCO TEORICO.....	14
6.1 ALOE VERA.....	14
6.1.1 Origen del <i>Aloe vera</i>	14
6.1.2 Descripción de la planta.....	14
6.1.3 Clasificación del <i>Aloe vera</i>	14
6.1.4 Características del <i>Aloe vera</i>	15
6.1.5 Principios activos del <i>Aloe vera</i>	15
6.1.6 Aplicaciones del <i>Aloe vera</i>	17
6.2 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD.....	17

6.2.1 Índice mitótico.....	17
6.3 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD.....	18
6.3.1 Alteraciones cromosómicas.....	18
7. METODOLOGIA.....	20
7.1 OBTENCION DEL EXTRACTO.....	20
7.2 OBTENCION DE LA SOLUCION DE TRABAJO.....	20
7.3 SIEMBRA Y COSECHA DE LINFOCITOS HUMANOS.....	20
7.3.1 Siembra de linfocitos humanos.....	20
7.3.2 cosecha de linfocitos humanos.....	20
7.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	21
7.4.1 Citotoxicidad.....	21
7.4.2 Genotoxicidad.....	21
7.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO.....	22
7.5.1 Citotoxicidad.....	22
7.5.2 Genotoxicidad.....	22
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
8.1 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD.....	25

8.2 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD.....	29
9. CONCLUSIONES.....	36
10. SUGERENCIAS.....	37
11. BIBLIOGRAFIA.....	38

LISTA DE CUADROS Y TABLAS

	Pág.
Cuadro1. Principios activos del <i>Aloe vera</i>	15
Tabla 1. Índice mitótico (%).....	24
Tabla 2. Alteraciones cromosomicas (%).....	30

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Protocolo para determinar citotoxicidad.....	21
Figura 2. Protocolo para determinar genotoxicidad.....	21
Figura 3. Gráfico del índice mitótico versus concentraciones.....	25
Figura 4. Metafasas registradas en los cultivos <i>in vitro</i> de linfocitos humanos, tratados con diferentes concentraciones del extracto de <i>Aloe vera</i>	26
Figura 5. Alteraciones cromosómicas registradas en las tres concentraciones del extracto y control negativo.....	31

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son parte importante del desarrollo y crecimiento humano a través de la historia, utilizadas como parte vital de la alimentación, construcción de viviendas, fabricación de utensilios, herramientas de trabajo, haciendo parte de rituales religiosos y para la cura de enfermedades.

El uso de las plantas para curar, se pone de manifiesto por la existencia de herbarios desde la época de los sumerios, los asirios, los babilonios y los fenicios. El Papiro de Ebers (1700 a.C.), con más de 20 m de longitud, encontrado en las ruinas de Luxor, expone el uso medicinal de 700 plantas, como el ajo y la adormidera. En China y el resto de Asia, el uso de plantas para tratar enfermedades se remota a más de 10.000 años. Sin embargo, fueron griegos y romanos los primeros en sistematizar en Occidente, a través de sus escritos, el estudio de las plantas medicinales (Serra y Lluís, 1998).

A través del ensayo y error se ha establecido la eficacia de muchas plantas que contienen, en alguna de sus partes, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes producen efectos curativos en muchas de las enfermedades del hombre y de los animales. Se calcula en unas 260.000 las especies de plantas que se conocen en la actualidad, de las que el 10% se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recogidas en los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas. Evidentemente, sobre todo en las regiones ecuatoriales, la proporción de especies medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que ni siquiera se conoce la totalidad de la flora (Geocities, 2006).

No obstante, ciertas plantas medicinales no han mostrado las propiedades que les atribuyen la medicina popular, e incluso han resultado ser nocivas, (Petkov, 1979). Este es el caso de *Piper auritum* H.B.K, cuyas hojas se usan como “emoliente” y para aliviar el dolor de cabeza, su zumo usado tópicamente o por vía oral como antídoto en las mordeduras de serpientes, atribuyéndole también otras propiedades curativas. Esta planta fue sometida a pruebas citotóxicas y genotóxicas, identificándose una citotoxicidad aguda en pruebas *in vitro* pero no *in vivo*. Este es uno de los varios casos acerca de plantas que actualmente siguen siendo utilizadas sin ninguna cautela o precaución. Esto señala la importancia de la evaluación farmacológica y toxicológica de diferentes especies de plantas, tanto para comprobar los efectos descritos en la literatura, como para encontrar nuevas especies con propiedades curativas y un mínimo de efectos tóxicos para el hombre (Blanco et al, 2006).

También se determinó citotoxicidad en algunas plantas usadas tradicionalmente en La Habana Cuba, y que Colombia son comúnmente utilizadas; este estudio fue realizado debido a que se registraron casos de intoxicación, por el consumo

indiscriminado de las siguientes plantas: *Caléndula officinalis* L, *Psidium guajava* L, *Eucalyptus ssp*, *Phyllanthus orbicularis*. Los resultados alcanzados con las plantas en el ensayo de citotoxicidad evidenciaron una disminución en la viabilidad celular en la medida en que aumentaba la concentración de cada extracto vegetal. El extracto de *Eucalyptus ssp*. mostró una menor toxicidad en las células, seguido de *Psidium guajava* L., *P. orbicularis* y finalmente, *Caléndula officinalis*, que tuvo una toxicidad mucho mayor que los extractos anteriores, efecto que pudiera atribuírsele a la presencia de flavonoles (Salazar I, 2001).

La sábila o *Aloe vera*, también es utilizada tradicionalmente para uso medicinal y cosmetológico, la cual ha despertado gran interés en la comunidad científica para identificación y análisis de sus componentes activos, para el desarrollo de fármacos para el tratamiento o cura de enfermedades, minimizando al límite posibles tóxicas presentes en *Aloe vera*, importante para el desarrollo de productos aptos para el consumo humano, que incremente el bienestar del individuo y disminuya los riesgos de contraer enfermedades (Vega et al, 2005). Aloe-emodin es una hidroxiantraquinona presente en las hojas del *Aloe vera*, que induce selectivamente apoptosis en células tumorales sin efectos tóxicos apreciables en células normales aledañas, pues se ha comprobado que este componente bioactivo tiene actividad anticancerígena específica, pues reduce el crecimiento de células tumorales que albergan el gen mutante p53 (Pecere T et al, 2000 y 2003). De igual forma, el acemannan, el barbaloin con efectos similares al aloe-emodin, enzimas como la catalasa, hormonas, minerales, vitaminas y otros azúcares son analizados, para conocer los efectos que generan en el ser humano, y su modo de acción, ya sea para alertar acerca del consumo indiscriminado de esta planta o, por lo contrario, optar por la obtención de drogas para el tratamiento de enfermedades y para el desarrollo de productos alimenticios (Vuorelaa et al, 2004).

En este proyecto se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, con el fin de comprobar o refutar sus poderosos efectos, ya sea para prevenir el uso indiscriminado de esta planta, o para dejar una expectación más acerca del estudio de sus efectos sobre modelos biológicos como los linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

De aquí la importancia del estudio y análisis de las plantas para determinar su potencial benéfico o tóxico para el ser humano; las pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad, importantes para determinar el efecto generado por distintos agentes físicos, químicos, y biológicos, en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos con *Aloe vera*, fue utilizada para determinar el efecto producido por el extracto de *Aloe vera* la cual es comúnmente utilizada para el tratamiento de varias enfermedades o como complemento alimenticio (Vuorelaa et al, 2004).

Para esta prueba se utilizaron, como modelo biológico los linfocitos humanos cultivados *in vitro* para el registro del índice mitótico y las alteraciones cromosómicas como

biomarcadores de efecto citototóxico y genotóxico respectivamente, utilizados para el análisis del extracto de *Aloe vera*.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han encontrado más efectos benéficos en el *Aloe vera* que nocivos o tóxicos, quizá dependiendo en parte de los modelos biológicos utilizados en los estudios realizados para el análisis completo de esta planta (corteza y cristales) y de sus componentes obtenidos individualmente, lo cual se convirtió en el objetivo de este estudio que analizó el gel (cristales) de *Aloe vera* en forma de extracto completo sobre cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, debido a la falta de registros que muestren los efectos producidos por el extracto de *Aloe vera* en este modelo biológico.

Se han detectado casos de intoxicación por el consumo de un producto comercial de *Aloe vera* gel, el cual se vende como complemento alimenticio debido a que contiene cantidades de minerales, aminoácidos, vitaminas, e hidratos de carbono encargados de regular diferentes funciones del sistema inmune (Lachenmeie et al, 2006). Por esta razón se analizó a profundidad sus componentes individualmente, y efectivamente se identificaron moléculas con actividades tóxicas que reducen el crecimiento de células normales y tumorales *in vitro*; la presencia de sabia amarilla es la que altera el crecimiento de las células la cual es rica en antraquinonas, que ocasionan irritación en la piel, y es mutagénico para la salmonela (Chapman, 1995; O'Brien, 1991). En pruebas *in vivo* con ratones, se detectó actividad carcinogénica de este compuesto llamado emodin, que es transformado en aloe-emodin, por procesos de oxidación en el intestino (Wiilfle et al, 1990)

De esta manera se han detectado otros componentes de bajo peso molecular con actividades toxicológicas en el gel del *Aloe vera*, como la fracción de bajo peso molecular (LMWF), con efectos similares al aloe-emodin. Esta sustancia fue probada en monocapas de fibroblastos de gallina, induciendo rupturas de uniones intracelulares, separación de células, y formación de brechas (*gaps*) en células libres de la monocapa de fibroblastos. (Avila et al, 1997).

Las plantas evaluadas por los investigadores para determinar sus propiedades, poseen tanto tóxicas que pueden contribuir al desarrollo de medicamentos para el tratamiento o cura de enfermedades, como sustancias que perjudican indirectamente actividades vitales del organismo. Por esta razón, hoy se trata al máximo de eliminar de los productos naturales comercializados para el consumo, ciertos compuestos que deterioren la salud humana.

La sábila (*Aloe vera*) es una planta utilizada comúnmente por las personas para el tratamiento de diferentes enfermedades, como la diabetes, la cual reduce rápidamente los niveles de azúcar en la sangre producido por algunos polisacáridos presentes en la planta y

un aumento significativo de la insulina en ratones diabéticos, los cuales fueron inyectados con el extracto de *Aloe vera* (Beppu et al, 1993). También es utilizada para el tratamiento de la artritis, posee componentes anti-inflamatorios algunos ya identificados como agentes moduladores y mediadores de vías bioquímicas: aminas vaso-activas, bradiquinasas, prostaglandinas, proteínas, péptidos, enzimas degradantes, y manosa 6-fosfato (Davis et al, 1994). Se ha identificado un polisacárido del gel de *Aloe vera*, con actividades anti-cancerígenas, *in vitro* e *in vivo*, llamado acemannan. La inyección en ratones con acemannan inhibió el crecimiento de células tumorales de ratón, disminuyendo la mortalidad de estos modelos experimentales en un 40%. Este estudio no es el único que ha comprobado la propiedad atribuida a este polisacárido que actúa modulando la respuesta inmune que desencadena una activación de macrófagos y producción de citoquinas (Merriam et al, 1996).

Actualmente existen un sin número de productos a base de *Aloe vera* para el tratamiento de enfermedades, suministros alimenticios, productos de belleza, entre otros, los cuales no están exentos de componentes tóxicos, como aloin que es un precursor de aloe –emodin y barbaloin, el cual debe estar contenido en un máximo de 0.1mg/ml en estos productos, que legalmente hoy están vigilados por el Control Oficial de Alimentos en Estados Unidos (Lachenmeie et al, 2006).

Estos componentes no son las únicas moléculas que se encuentran en el *Aloe vera* con estas características, existen más polisacáridos que tienen funciones parecidas, que modulan funciones inmunológicas y controlan algunos mecanismos importantes en el ser humano; otras suministran nutrientes, y otras proporcionan suplementos alimenticios que mejoran la calidad de vida. Muchas de las funciones de las moléculas de *Aloe vera* ya han sido determinadas. Al igual que el modo de acción de algunos de sus componentes tóxicos que sin duda, por su frecuente consumo, se convierten en agentes potencialmente cancerígenos.

Aloe vera tiene un sin número de componentes importantes para la cura de muchas enfermedades, pero como cualquier planta, *Aloe vera* posee moléculas que afectan directa o indirectamente al ser humano que, implícitamente pueden estar deteriorando su salud, por esta razón el interés de la comunidad científica es buscar metabolitos secundarios presentes en las plantas para la elaboración de fármacos, y de moléculas que alteran el funcionamiento normal de las personas para advertir de los riesgos que se corren al consumir las plantas indiscriminadamente o sin ninguna precaución.

Son pocos los estudios que reportan los efectos tóxicos de los extractos o productos a base de *Aloe vera*. Al parecer, se debe a la sensibilidad de las pruebas utilizadas, al tipo de especie y a la ubicación geográfica (altitud, temperatura, tipo de suelo, humedad) que incluye variables que determinan la cantidad y, la clase de componentes que caracterizan a la planta (Vega et al, 2005). Debido a esto se vio la necesidad de evaluar el efecto cito y genotóxico del extracto de *Aloe vera* a partir de sus cristales, en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, debido a que no hay información acerca de estudios realizados con este

modelo biológico, para determinar el efecto generado a nivel de la célula y de su material genético, con el fin de determinar su potencial medicinal en el tratamiento de distintas enfermedades como el cáncer, o moderar su uso para evitar potenciales riesgos de salud. Con base a lo anterior, en esta investigación se resolvieron las siguientes preguntas:

¿El extracto completo *Aloe vera*, tiene efecto citotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in Vitro*?

¿El extracto completo de *Aloe vera*, tiene efecto genotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in Vitro*?

Por lo tanto, en esta investigación se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

Si el extracto de *Aloe vera* tienen efecto citotóxico para los linfocitos humanos, cultivados *in Vitro*, entonces se espera que el índice mitótico se deprima (**H1**) o de lo contrario este será igual o incluso mayor que el registrado en los linfocitos tratados con el solvente puro (**H0**)

Si el extracto completo de *Aloe vera*, tienen efecto genotóxico para los linfocitos humanos *in Vitro*, entonces se espera que se incremente significativamente la frecuencia de alteraciones cromosómicas en los linfocitos tratados, respecto al grupo control negativo (**H1**), de lo contrario su frecuencia permanecerá igual o incluso menor al del grupo control negativo (**H0**)

3. JUSTIFICACIÓN

Los extractos de *Aloe vera*, en su mayoría, ya han sido estudiados por la comunidad científica, demostrando el gran potencial que posee esta planta. No obstante, son escasos los registros encontrados que confirmen el grado de citotoxicidad y genotoxicidad que estos extractos podrían tener en linfocitos humanos cultivados *in vitro*. De aquí parte el interés por investigar esta planta, que además tiene potencial anticancerígeno e influencia benéfica sobre el sistema inmunológico (Womble et al, 1992).

El extracto de *Aloe vera*, induce la proliferación de células T y macrófagos a una concentración de entre 1 y 200mg/ ml, que permiten al organismo defenderse de infecciones virales (Kahlon et al, 1991). Por esta razón, es necesario identificar las posibles aplicaciones biológicas de esta planta, en especial la relacionada con su potencial citotóxico y genotóxico, que permita racionalizar su uso y buscar su posible aplicación como agente anticancerígeno.

Hoy la ciencia médica enfoca sus estudios hacia el mejoramiento de la calidad de vida, buscando de alguna manera resolver o aportar soluciones a los problemas detectados en el campo de la salud, como la obtención de fármacos más específicos para el tratamiento o cura de la enfermedad que minimicen los riesgos de contraer posteriores consecuencias afectando indirectamente al ser humano, operando en otros sitios o modulando otros mecanismos diferentes al órgano diana en el ser humano. La búsqueda de plantas con propiedades medicinales se ha incrementado en los últimos años, debido a la capacidad de las mismas para contrarrestar enfermedades, dado a la acción de sus componentes en conjunto o por algunos de sus componentes que son identificados como moléculas bioactivas importantes para el desarrollo de fármacos.

Se han estudiado varias plantas de consumo tradicional que no han mostrado efectos benéficos, por el contrario, han resultado ser peligrosas, si no se limita su consumo. Muestra de ello es el caso de *Piper auritum* H.B.K. la cual es utilizada tradicionalmente como “emoliente” para aliviar el dolor de cabeza y como antídoto en las mordeduras de serpientes. Se le atribuyen propiedades “diaforéticas”, estimulantes y ha sido empleada en el tratamiento de anginas, erisipelas, fiebres, gota y reumatismo. Pero los resultados arrojados en las pruebas citotóxicas y genotóxicas permiten concluir que el extracto fluido de *P. auritum* H.B.K. es una mezcla de baja toxicidad, con signos de alerta sobre el núcleo de las células hepáticas, que mostró una clara respuesta genotóxica en el ensayo de segregación mitótica con la cepa D-30 de *A. nidulans*, lo que no fue corroborado por el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. (Blanco et al, 2006). Este es solo uno de los casos a cerca de plantas que se consumen sin ninguna precaución y que, gracias a estos

estudios se pueden determinar las propiedades nocivas. De aquí la necesidad de estudiar diferentes modelos biológicos, y diferentes pruebas para descartar por completo cualquier efecto negativo contra la salud humana, o por el contrario, corroborar sus efectos benéficos disminuyendo al máximo la presencia de componentes tóxicos.

Aloe vera es una planta ampliamente utilizada gracias a todos los beneficios atribuidos por la medicina tradicional, pero como ya se mencionó también posee moléculas tóxicas de bajo peso molecular que sin duda pueden afectar al ser humano si su consumo es frecuente. Es de suma importancia estudiar los efectos citotóxicos y genotóxicos que una sustancia puede generar a largo o acorto plazo, pues su consumo excesivo o desordenado puede generar efectos toxicológicos a nivel metabólico y, más específicamente, alteraciones de tipo celular o cromosómico, los cuales se convierten en daños permanentes que pueden desencadenar enfermedades como el cáncer.

Aloe vera es una planta con una composición bioquímica altamente variada siendo ampliamente utilizada desde cientos de años atrás por diferentes culturas y, actualmente por las industrias para la elaboración de productos, con fines terapéuticos, productos de belleza, de higiene y alimenticios, entre otros (Vega et al, 2005). De esta manera, la presente investigación se centra en el estudio de *Aloe vera*, comúnmente llamada sábila, para analizar sus efectos sobre linfocitos humanos cultivados *in vitro*, debido a que es una planta de uso común y los reportes acerca de sus efectos tóxicos son escasos.

Según Womble y Helderman (1992), *Aloe vera* estimula las defensas del cuerpo humano produciendo un incremento de algunas células del sistema inmunológico, especialmente macrófagos y células T, las cuales devoran y destruyen bacterias y virus presentes en la sangre y los tejidos. Además, se ha encontrado que esta planta produce sustancias que combaten las células cancerosas. Debido a esta propiedad, recientemente se ha estudiado la posibilidad de emplear la sábila en el tratamiento de la leucemia y algunos tipos de cáncer.

Según registros encontrados, los métodos de extracción determinan la calidad del producto obtenido de la planta, es decir, que estos métodos arrastran diferentes componentes que bien pueden atribuirle al extracto propiedades curativas como tóxicas, como es el caso conocido del extracto hidroalcohólico de *P. auritum* H.B.K. el cual presentó actividad genotóxica, no encontrada en el extracto acuoso, probablemente a causa de su menor polaridad. Varios de los trabajos realizados con *Aloe vera* han empleado el extracto acuoso para determinar su potencial citotóxico y genotóxico para el cual han utilizados varios 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. En ninguno de estos estudios se detectó efecto citotóxico y genotóxico (Ramos et al, 2001). Pero en otros ensayos con un invertebrado de aguas saladas (*Artemia salina* L) como modelo biológico para determinar toxicidad de diferentes extractos (acuoso e hidroalcohólico) de plantas, entre ellas *Aloe vera*, se determinó una toxicidad aguda significativa por parte del extracto de sábila en

comparación con los otros extractos de plantas evaluadas. En esa misma investigación, utilizando ratones albinos suizos para determinar citotoxicidad oral aguda, reveló que *Plectranthus amboinicus* fue menos tóxico en ambos ensayos, *in vivo* e *in vitro*, y el extracto de *Aloe vera* continuó mostrando una toxicidad alta en comparación con las otras 20 plantas analizadas (Lagarto et al, 2001).

Los reportes acerca de los estudios con los extractos de *Aloe vera* obtenidos a partir de sus cristales son escasos, solo datos acerca de los componentes individuales de la planta hallados en el gel. Debido a que esta planta ha sido usada por la medicina popular durante siglos, comúnmente consumida en forma de jugos utilizando sus cristales y algunas veces junto con la corteza, se consideró la posibilidad de evaluar el jugo de los cristales de *Aloe vera*, tratando al máximo de conservar todos sus compuestos o moléculas y eliminando solo el material sólido como las fibras o vestigios celulares que componen el parénquima, para el tratamiento de linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

De esta manera se puede observar que la sábila es capaz de modular y regular muchas funciones del organismo, teniendo en cuenta que muchas de estas moléculas actúan más efectivamente si se hallan individualmente. En este trabajo se quiso estudiar el extracto de *Aloe vera*, utilizando sus cristales, tal y como los consumen las personas para el tratamiento de diferentes enfermedades, como la diabetes, para la curación de las heridas y para la regulación del sistema digestivo, entre otras, analizando sus efectos sobre cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, dado a que son escasos los estudios que impliquen técnicas *in vitro* para determinar sus efectos citotóxicos y genotóxicos.

De aquí la importancia de realizar múltiples estudios a este tipo de plantas las cuales son de mayor consumo humano, dado a que en muchos casos las plantas que se consumen con estos fines resultan ser perjudiciales para la salud. Sin embargo el afán por encontrar la cura a muchas enfermedades ha permitido estudiar a profundidad los componentes presentes en estas plantas para encontrar su efectividad, y su modo de acción pero principalmente para advertir del riesgo que se presenta al consumir estas plantas sin ninguna precaución.

Gracias al potencial que presenta *Aloe vera* se pretendió realizar un estudio a nivel citotóxico y genotóxico, para verificar el efecto del extracto completo de la sábila, a nivel de la célula y de su material genético, con el fin de identificar su potencial medicinal en el tratamiento de desordenes proliferativos (cáncer) o racionalizar su uso para evitar potenciales riesgos de salud.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del extracto completo de *Aloe vera* (sábila), en cultivos *in Vitro* de linfocitos humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto citotóxico del extracto completo de *Aloe vera* mediante la prueba del índice mitótico
- Identificar el efecto genotóxico del extracto, para linfocitos humanos cultivados *in vitro*, mediante la prueba de alteraciones cromosómicas.

5. ANTECEDENTES

Existen muchos reportes que demuestran la eficacia de los componentes que posee *Aloe vera*, frente a muchas enfermedades del sistema inmunológico, entre ellas el ocasionado por el virus VIH. Estudios llevados a cabo por Kahlon et al, (1991), han indicado que el acemannan, que es la mayor fracción carbohidratada obtenida de la planta, aumenta la expresión antigénica en la superficie celular; esto es una consecuencia de la liberación de interferón gamma que permite la mayor expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, las cuales portarían el antígeno del virus en la superficie celular y asegurarían su reconocimiento por parte de las células T citotóxicas para que sea eliminado. Según Womble et al, (1992), el acemannan no es tóxico para las células y, a altas concentraciones, estimula la proliferación de células T citotóxicas durante el ataque infeccioso del VIH y otros virus, datos que proveen como mínimo un mecanismo inmunológico por el cual el acemannan puede ser clínicamente saludable. Otro compuesto bioactivo puro del *Aloe vera*, llamado aloeride, identificado por Pugh N et al, (2001), induce la expresión de NF-Kappa B que dirige la expresión de células monocíticas humanas THP-1, induciendo la expresión de los mRNAs codificantes para IL-1 beta y TNF-alfa.

Habeeb et al, (2007) examinó la actividad anti-inflamatoria de gel de *Aloe vera* (cristales de *Aloe vera*) empleando un ensayo *in vitro* a corto plazo, utilizando la bacteria *Shigella flexneri* para la producción de citoquinas pro-inflamatorias llamadas TNF-a y IL-1b de linfocitos de sangre periférica. En esta investigación se observó la supresión de ambas citoquinas con el gel de *Aloe vera* comprobando estos efectos sobre una línea celular monocítica humana (THP-1 células).

Sun-A et al, (2005) lograron aislar tres polisacáridos de *Aloe vera* con diferentes pesos moleculares G2E1DS3 (MW > 400 KDa), G2E1DS2 (5 KDa < MW < 400 KDa), y G2E1DS1 (MW < 5 KDa), para determinar la relación entre la actividad inmunomodulatoria y el peso molecular, examinando este efecto sobre líneas celulares de macrófagos de ratón, donde se observó que los polisacáridos con un peso molecular entre 400 y 5 KDa exhibieron una mayor activación de macrófagos dado por el incremento de la producción de citoquinas, liberación de óxido nítrico, expresión de moléculas de superficie y actividad fagocítica. Con respecto a esto, Leung et al, (2006), estableció que estos polisacáridos son sustancias con respuesta biológica modificada (BRMs), pues aumentan la respuesta inmune, haciendo parte de los compuestos exógenos como derivados de bacterias, hongos, lípidos, proteínas y polisacáridos los cuales se enlazan a patrones de reconocimiento de los receptores disparando la respuesta inmune. Por lo tanto se ha reportado que estos exógenos tienen actividad antiviral, antibacterial, antifúngica, antitumoral, entre otras. De la misma forma el acemannan que es la mayor fracción

carbohidratada presente en la planta de *Aloe vera* posee también la capacidad para acelerar la curación de las heridas, estimula el sistema inmune, tiene efecto anticancerígeno y antiviral. En un estudio realizado por Zhang et al, (1996) para determinar los efectos de este polisacárido sobre la línea celular de macrófago de ratón, encontró que el acemannan estimula la producción de citoquinas, liberación de óxido nítrico, expresión de moléculas en la superficie de los macrófagos y la generación de cambios morfológicos celulares. La expresión de las citoquinas IL-6 y TNF- α dependió de la dosis de acemannan, concluyendo que este componente bioactivo es efectivo para el desarrollo de medicamentos y tratamientos terapéuticos de enfermedades como el cáncer y enfermedades de origen inmunológico.

Lee et al, (2000), investigaron el efecto del diethylhexylphthalate (DEHP) de *Aloe Vera*, en la apoptosis de líneas celulares K 562, HL60 y U937 de humanos leucémicos, para examinar su actividad farmacológica. A una concentración de 10 microgramos/ml, DEHP tuvo un efecto apoptótico significativo, que se pudo confirmar mediante electroforesis y análisis de flujo citométrico en las tres líneas celulares; estos resultados indicaron que DEHP aislado del *Aloe vera*, tiene un potente efecto antileucémico, representando un nuevo tipo de actividad farmacológica con respecto a las células leucémicas humanas.

Dihydroisocoumarin es una molécula aislada recientemente por Zhang et al, (2008) de los cristales de *Aloe vera* con propiedad antioxidante y por lo tanto protector contra el daño oxidativo inducido por radicales libres sobre las membranas celulares, el ADN y sobre las proteínas, las cuales juegan un papel importante en el envejecimiento y enfermedades degenerativas. Estas Investigaciones han revelado que las proteínas son los blancos de las moléculas de aloe mas específicamente, Aloe dihydroisocoumarin el cual se enlaza con gran afinidad a la albúmina de la sangre (HSA) importante para el entendimiento del mecanismo de acción de la droga a un nivel molecular.

Vazquez et al, (1996), estudiaron los efectos de los extractos acuoso, clorofórmico y etanólico de *Aloe vera*, en edema inducido en patas de ratas, y la migración de neutrófilos dentro de la cavidad peritoneal. Determinaron que el extracto acuoso inhibe la actividad ciclooxigenasa, disminuyendo el edema inducido en la pata posterior de las ratas y la migración del número de neutrófilos dentro de la cavidad peritoneal. Ocurre lo mismo con el extracto clorofórmico, mientras que el extracto etanólico solamente disminuye el número de neutrófilos. Estos resultados demostraron que los extractos de *Aloe vera* tienen actividad anti-inflamatoria. Gracias a los componentes importantes que posee el *Aloe vera* (azúcares), se han llevado al mercado cientos de productos que tiene diferentes efectos en el organismo, mejorando la calidad de vida de las personas que los consumen.

Investigaciones llevadas a cabo por Ávila et al, (1997), aseguran que LMWF, una fracción de bajo peso molecular extraído del gel de *Aloe vera*, presentó una toxicidad igual a aloemodin y aloin (una antraquinona y su precursor presentes en la corteza de *Aloe vera*) y al SDS (sodium dodecyl sulfate) una sustancia tóxica bien conocida (Effendy and Maibach,

1995). Primero, la exposición de monocapas de fibroblastos de gallina a LMWF indujo disrupción de uniones intracelulares y separación de células encontradas en el fondo del frasco, y formación de brechas (*gaps*) en células libres de la monocapa de fibroblastos. En segunda instancia, LMWF inhibió la producción de especies reactivas de oxígeno estimuladas por zymozan (Kroes et al, 1992) sobre leucocitos polimorfonucleares seguido por la quimilumiscencia dependiente del luminol. Como ya se mencionó, la actividad tóxica de LMWF se comparó con SDS, aloe-emodin y aloin usando el ensayo de quimilumiscencia y se encontró una potencia similar entre estas sustancias tóxicas. Estos resultados confirman que *Aloe vera* contiene compuestos tóxicos de bajo peso molecular, por lo cual surge la necesidad de que se limiten estas toxinas en los productos de *Aloe vera* gel, preparados comercialmente.

Jing et al, (2004), demostró que la coadministración de emodin en bajas dosis (0.5–10 μM) con As_2O_3 (agente terapéutico para leucemia promielocítica aguda y una variedad de tumores humanos), intensifica la citotoxicidad sobre células tumorales sin detectarse efectos proliferativos y apoptóticos sobre células no tumorales. Emodin presenta una estructura particular que probablemente sea la que incremente la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular. Esta citotoxicidad consiste en una inhibición de la proliferación celular y una inducción de apoptosis. La exposición de las células HeLa a emodin estimula una elevación inmediata del nivel de ROS celular. Esta elevación es mayor y más rápida que el causado por As_2O_3 , pero prontamente retorna a los niveles normales.

Aloe emodin es un compuesto aislado de la planta de *Aloe vera* con un número de propiedades biológicas, encargados de llevar a cabo actividades antivirales, antimicrobiales, hepatoprotectivas, actividades anticancerígenas sobre tumores neuroectodermales, carcinoma de células escamosas de pulmón, entre otras. Sheng-hsuan et al (2007) comprobó la inducción de apoptosis por medio de la liberación de la caseína quinasa II en células del carcinoma gástrico, la liberación del factor inductor de apoptosis y citocromo C en líneas celulares AGS y NCI-N87 produciendo apoptosis; la enzima caspase 3 fue inducida después de 24 horas en la línea celular AGS de carcinoma gástrico humano.

Segun Lachenmeie et al, (2006), los productos a base de *Aloe vera* son aptos para el consumo humano, si ellos están libre de aloin un constituyente nativo del *Aloe vera* que actúa como un laxante y se presume que este compuesto genera daños a nivel del ADN y opera como agente carcinogénico. Es posible eliminar al máximo la presencia de aloin durante la elaboración de los productos eliminando las capas exteriores de la planta y las cantidades restantes pueden ser desechadas antes de la extracción del jugo.

Según Steenkamp et al, (2007), se reportaron casos de intoxicación por el consumo de productos a base de *Aloe vera*, observándose hipersensibilidad, reacciones alérgicas; incluso en estudios realizados con ratones inyectados con el extracto de esta planta durante

90 días, se detectó neuropatía y pigmentación en el túbulo renal y, casos de hepatitis crónica por el consumo de productos a base de *Aloe vera*. Al parecer hay una posible interacción entre los medicamentos para la diabetes y *Aloe vera* pues se reportó un caso de hemorragia masiva intraoperativa. Los productos fabricados a partir de la hoja entera de *Aloe vera* presentan un alto contenido de antraquinonas en corteza, las cuales tienen efecto laxante que pueden generar, en mujeres embarazadas, severas contracciones intrauterinas e incrementar el riesgo de un aborto. Estos y otros pocos casos han sido reportados acerca de los efectos generados por el consumo de productos o extractos de esta planta.

La diversidad biológica de la planta se ve reflejada en la variabilidad de sus efectos, de allí la importancia de conocer a fondo el tipo de ambiente apropiado para el cultivo de esta planta, pues se ha determinado que esto influye en la clase y contenido de los componentes que le confieren a la planta diversas características físico- químicas. Kanat et al, (2006), describe que *Aloe vera* puede ser cultivada en climas y ambientes extremos de las regiones subtropicales, pues el peso seco de la planta no varia, específicamente el gel o los cristales los cuales son ampliamente utilizados por las industrias. Se desconoce en este estudio las variaciones biológicas que puede presentar esta planta en estos climas, pues se ha demostrado que algunos productos a base de esta planta presentan características tóxicas que son potencialmente dañinos para la salud. Según Rodríguez et al, (2008), existen también otros factores que pueden afectar el contenido de los constituyentes activos de los productos a base de plantas como son los microorganismos, toxinas microbiales y factores genéticos.

Se han evaluado los efectos generados por los diferentes extractos de *Aloe vera* obtenidos a partir de diferentes metodologías, en su mayoría derivados de solventes alcohólicos y los extractos acuosos, debido a que arrastran componentes que permiten determinar las características fito-químicas del extracto. Por otra parte, los ensayos y modelos biológicos utilizados para estos estudios presentan características que hacen que sean más sensibles que otros, resultando los mismos extractos poseer características tóxicas solo en algunas pruebas. De aquí la necesidad de evaluar el extracto completo de *Aloe vera* obtenido a partir del gel o los cristales de esta planta, pues es la forma mas utilizado por las personas para su consumo, utilizando los linfocitos humanos cultivados *in vitro* debido a que no se han encontrados registros que evalúen sus efectos sobre este modelo biológico.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 ALOE VERA

6.1.1 Origen del *Aloe vera*. Es una planta originaria de África oriental y meridional, extendiéndose por Europa y Asia, debido a sus propiedades curativas, cosméticas y llevando consigo diferentes tipos de creencias religiosas. En el siglo I de la era cristiana, Dioscórides (c. 40-90 d.C.), médico griego nacido en Anazarbus, Cilicia (en la actual Turquía), estudió las propiedades médicas de las plantas. Escribió “De Materia Medica”, el primer tratado serio y libre de supersticiones sobre botánica y farmacología, describiendo intensamente las virtudes medicinales y cosméticas del *Aloe vera*. Existen documentos históricos de los romanos, griegos, hindúes, árabes y otros pueblos de climas cálidos, que también comentan sus ventajas curativas y cosméticas (Encarta, 2005).

Los Franciscanos españoles trasladaron esta planta a América, seguramente a la isla Barbados, de donde viene su actual nombre científico *Aloe barbadiensis* (*Aloe vera*).

6.1.2 Descripción de la planta. El *Aloe vera* es una pequeña planta herbácea perenne, de aspecto suculento con sistema radicular superficial, que habita en climas cálidos, semicálido, semiseco, seco y templado.

El rizoma es largo y el tallo corto, en torno al cual se agrupa el rosetón de hojas, las cuales son lanceoladas, de 30 a 60 cm de longitud; son turgentes verdes y posee márgenes con dientes espinosos separados.

Las flores son abundantes y en forma tubular, suelen tener color rojizo, anaranjado o amarillento. Los estambres son seis, con largos filamentos que arrancan del fondo de la flor, debajo del pistilo. El fruto es una cápsula de paredes inconsistentes (Atherton, 1997)

6.1.3 Clasificación del *Aloe vera*

Reino: Plantae.
División: Magnoliophyta.
Clase: Liliopsida.
Orden: Asparagales
Familia: Asphodelaceae

Género: Aloe

Especie: *Aloe vera* o *Aloe barbadensis*.

Se ha reportado la existencia de aproximadamente 200 especies de *Aloe vera*, pero 5 principales especies naturales son utilizadas en las industrias farmacéutica, cosmética, de higiene, alimenticias y de bebidas (Geocities, 2006) ellas son:

Aloe vera o *Aloe barbadensis*

Aloe saponaria

Aloe Arborens *millar*

Aloe ferox

Aloe perryi.

Esta planta posee diferentes nombres comunes: sábila, zábila, sávila; pero en este proyecto se utilizará *Aloe vera*.

6.1.4 Características del *Aloe vera*. La parte más utilizada de la planta de *Aloe vera* son sus hojas, como materia prima de diversas industrias y, en particular, sus productos internos. El más abundante de ellos es un mucílago gelatinoso transparente e incoloro que ocupa el mayor volumen interno de la hoja y, en menor medida, un líquido viscoso o látex amarillento que se encuentra en la parte interna, próxima a la epidermis de la hoja.

A partir de este mucílago gelatinoso se fabrican diversos productos industriales, debido a la cantidad de componentes que este contiene, proporcionando diversos beneficios a quienes lo consumen.

El gel de *Aloe vera* está compuesto principalmente por agua en aproximadamente un 98% de su peso. El 2% de peso restante es una mezcla compleja de sustancias químicas, algunas de las cuales ya han sido aisladas e identificadas, conociéndose además sus efectos farmacológicos y cosmetológicos (Healthnotes, 2004). Ver tabla 1.

6.1.5 Principios activos del *Aloe vera*

Cuadro 1. Principios activos del *Aloe vera*

COMPONENTES	TIPOS DE COMPONENTES	CARACTERÍSTICAS Y EFECTOS
	Proporciona 20 de los 22 aminoácidos requeridos por	Proporciona los bloques básicos de proteínas en la

Aminoácidos	los humanos y 7 de los 8 esenciales	producción del tejido fino, del músculo, etc...
-------------	-------------------------------------	---

Antraquinonas	Proporciona 12 antraquinonas: emodin del áloe, ácido de aloetico, Aaoin, anthracine, antranol, barbaloin, ácido de chrisofanico, emodin, aceite etéreo, éster del ácido de cinnamonic, isobarbaloin, resistanol.	Proporcionan actividad analgésica, anti-bacteriana, anti-hongos y antiviral. En alta concentración, las antraquinonas pueden ser tóxicas
Enzimas	Proporciona 8 enzimas: aliiasa, fosfatasa alcalino, amilasa, carboxypeptidase, catalasa, celulosa, lipasa, peroxidasa	Ayuda a la interrupción de los azúcares y de las grasas de los alimentos ayudando así a la digestión y mejorando la absorción de nutrientes
Hormonas	Auxinas Y gibirelinas	Curación de heridas y anti-inflamatoria
Ligninas	Sustancia basada en celulosa	Diseñada para proporcionar energía penetrante en productos para la piel.
Minerales	Proporciona 9 minerales: Calcio, Cromo, Cobre, Hierro, Magnesio, Manganeso, Potasio, Sodio, Zinc	Esencial para la buena salud y se sabe que trabaja en ciertas combinaciones unas con otras, con las vitaminas y otros elementos de rastro
Ácido Salicílico	Compuesto parecido a la aspirina	Analgésica
Saponinas	Glucósidos	Sustancia jabonosa que limpia y es antiséptica
Esteroles	Proporciona 4 esteroides principales de la planta: Colesterol, campesterol, lupeol, Beta sitosterol agentes anti-inflamatorios	El Lupeol también posee características antisépticas y analgésicas
Azúcares	Monosacáridos: glucosa y fructosa. Polisacáridos: gluco-gluco-mannans/polimanose	Acción anti-inflamatoria, Antiviral, actividad de modulación del sistema inmunológico del Acemannan
Vitaminas	A, C, E, B, Choline, B12, Ácido fólico.	Antioxidante, (A, C, E): neutraliza radicales libres. B y choline implicado en el metabolismo del aminoácido, B12 requerido para la producción de las células rojas de la sangre, ácido fólico en el desarrollo de las células de la sangre.

6.1.6 Aplicaciones del *Aloe vera*. Las propiedades medicinales del *Aloe vera* han despertado el interés de los investigadores, por estudiar mas profundamente las interacciones moleculares de los componentes del *Aloe vera* y el sistema biológico, con el fin de determinar con mayor exactitud que tipo de estímulo desencadenan y que vías están implicadas.

Datos importantes aseguran la actividad antiviral *in vivo* del *Aloe*, al parecer mediante la activación y la estimulación de la célula efectora pluripotencial de la médula ósea y de los macrófagos, por parte del acemannan, nombre de la mayor fracción carbohidratada obtenida de la planta. El acemannan permite la producción de citoquinas, co-interleucina 6, interferón gamma y el factor de necrosis tumoral. La liberación de óxido nítrico que está relacionado con receptores para la manosa, que es el monosacárido dominante del acemannan, favorece la actividad candidida por parte de los fagocitos. Otro mecanismo implicado por parte del acemannan es la producción de anticuerpos específicos y la inducción de la hipersensibilidad retardada, lo cual puede ser responsable del efecto inmunomodulador del *Aloe vera* (Kahlon et al; 1991).

De alguna manera, *Aloe vera* puede modular el sistema inmune para facilitar determinados mecanismos que favorecen la eliminación viral *in vivo*, por lo que estos resultados no constituyen una novedad, sino que marcan los inicios de la profundización de los estudios de los efectos del *Aloe* sobre el sistema inmunológico (Puerto et al; 2001).

Entre las propiedades curativas atribuidas a esta planta, está la reducción de la infección por VIH y la respuesta inmunológica contra el cáncer (Alternative Medicine.1999). Es astringente, analgésico, anticoagulante y cicatrizante. Actúa eficazmente contra los dolores dentales y de las encías, neuralgias, aftas, laringitis, disfonía, amigdalitis, anginas, placas y cualquier afección bucal o faríngea, reduce el azúcar de la sangre por la diabetes, trata los problemas intestinales y muchos otros beneficios que esta planta suministra (Atherton, 1997).

6.2 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD

La exposición a diferentes agentes presentes en el ambiente puede generar de manera directa o indirecta, según el tiempo y el tipo de exposición, alteraciones en la regulación normal del ciclo de división celular, que pueden ser determinadas por biomarcadores, tal como el índice mitótico.

6.2.1 Índice mitótico. El índice mitótico es un biomarcador que se utiliza para evaluar una sustancia con efecto bloqueador premitótico, cuya consecuencia es una disminución significativa del índice de células en división celular, respecto de un grupo control tratado

con el solvente puro. Las etapas premitóticas más sensibles a la acción de una sustancia es la de síntesis de ADN, cuyo bloqueo impide que la célula avance en el ciclo celular. Datos obtenidos con respecto a la proliferación de linfocitos indican que este es un buen biomarcador de exposición a sustancias tóxicas, que sirven para detectar procesos de inmunomodulación (Ramírez et al; 2001).

El cultivo *in vitro* de linfocitos humanos es una técnica relevante utilizada por mucho tiempo atrás para evaluar los efectos generados por cualquier tipo de sustancia o agente potencialmente tóxico para el ser humano, los linfocitos humanos son bien llamados células centinelas por que en ellas se registra con facilidad los efectos generados por estas sustancias a las que se ve expuesto el ser humano. Un si número de estudios han sido realizados para monitorear a la población expuesta ocupacionalmente o por exposición ambiental a agentes potencialmente tóxicos que estén deteriorando su salud.

6.3 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

La exposición del ADN a gentes físicos, químicos o biológicos, originan daños en su estructura, alterando su actividad normal, o lo afectan indirectamente mediante la alteración de las enzimas involucradas en su replicación, causando también mutaciones, que pueden ser o no heredables.

6.3.1 Alteraciones cromosómicas. Las alteraciones cromosómicas se presentan por cambios en la estructura y número cromosómico, donde están involucrados diferentes mecanismos encargados de mantener la integridad del genoma; estos cambios se dan por la exposición a diferentes agentes mutagénicos que reaccionan directamente con el ADN formando aductos que generan cambios en la lectura normal del genoma o interactúa con proteínas encargadas de su regulación y funcionamiento normal, de esta manera las alteraciones cromosómicas son consideradas por los investigadores como biomarcadores de efecto temprano de carcinógenos tóxicos, de aquí su relevancia para el análisis de sustancias con potencial para alterar la integridad celular, y más específicamente en el genoma representando un riesgo para el desarrollo de diferentes problemas de salud, como cáncer, esterilidad, abortos espontáneos, malformaciones y otras enfermedades genéticas (Madrigal et al, 2001; R. Mateuca, et al 2006).

Se han identificado alteraciones cromosómicas de tipo numérico que se originan por la no disyunción de los cromosomas durante la división celular (ganancia o pérdida de cromosomas). Las aberraciones de tipo estructural se dan por daños en la estructura cromosómica (quebres, inserciones etc.).

Los agentes S-independientes (radiaciones ionizantes y algunos compuestos químicos radiomiméticos) inducen aberraciones de tipo cromosómico cuando actúan durante las

fases G₀ y G₁, aberraciones de tipo cromatídico durante la fase G₂ y una mezcla de ambos tipos durante la fase S del ciclo celular. Los agentes S-dependientes (radiación ultravioleta, agentes alquilantes, etc.) inducen aberraciones de tipo cromatídico en cualquier fase del ciclo celular y las alteraciones sólo se visualizan una vez la célula atraviesa la fase S del ciclo celular. Estas lesiones son acumuladas en las células (linfocitos periféricos) durante el tiempo, y sólo son detectadas cuando las células son estimuladas *in vitro* por un mitógeno, observándose diferentes tipos de alteraciones estructurales y numéricas (Rappaport, 1993). Estas alteraciones son visibles en el microscopio, lo cual convierte a este biomarcador en un predictor de riesgo muy relevante de fácil obtención y análisis. La relación exposición - efecto no siempre se refleja como daño estructural, puesto que el químico o la sustancia, pueden estar actuando a través de un mecanismo diferente, tal como aquellos que originan mutaciones puntuales o génicas (Bonassi et al; 2005).

El biomarcador de alteraciones cromosómicas fue utilizado en este trabajo para determinar si el extracto fabricado a partir de los cristales de *Aloe vera* genera efecto genotóxico en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, dado a que no existen reportes acerca del tratamiento con este extracto sobre este modelo biológico para determinar si posee estos efectos.

7. METODOLOGÍA

7.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Se escogieron 2 pencas de sábila sanas, se lavaron con agua destilada, se limpiaron con alcohol y se introdujeron en la cámara de flujo laminar con todo los materiales necesarios para la obtención y macerado de los cristales. Las hojas se irradiaron con luz UV por 20 minutos, con un bisturí se retiró la corteza y se extrajeron los cristales, se maceraron y con una jeringa se deshicieron las partículas que quedaron del macerado, lo cual se recogió y se alicuotó en frascos de vidrio de 5 ml y se almacenaron congelados a -20 °C. Todo este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

7.2 OBTENCIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TRABAJO

A partir del extracto puro (solución madre al 100%) se prepararon siete diluciones con un factor de dilución de ½. La dilución se hizo tomando 5 ml de la solución inicial y agregamos 5ml de agua estéril como solvente, reduciendo la concentración cada vez a la mitad.

7.3 SIEMBRA Y COSECHA DE LINFOCITOS HUMANOS

7.3.1 Siembra de linfocitos humanos. La sangre se extrajo de una misma persona, por personal capacitado y teniendo en cuenta todos los cuidados y condiciones de asepsia. La persona donante de la sangre no presentaba antecedentes de enfermedades como hepatitis, ni consumía drogas psicoactivas, ni cigarrillo; debido a que esto podía influir en los resultados. En 18 tubos de cultivo estériles, de 15 ml, se adicionaron 4.5 ml de medio RPMI suplementado con penicilina y streptomocina (1%), suero bovino fetal (10%) y L glutamina (1%). Se adicionaron 0.5 ml de sangre y finalmente la fitohemaglutinina (2%). Los cultivos se incubaron a 37° C, durante 24 horas, tiempo en el cual se aplicó el tratamiento.

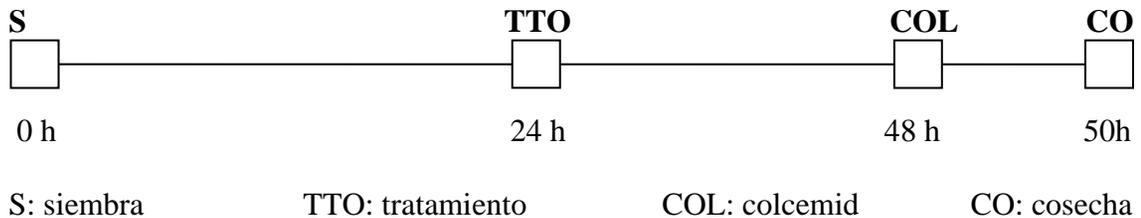
7.3.2 Cosecha de linfocitos humanos. Los cultivos se incuban 26 horas más, a partir del tratamiento, hasta la cosecha, dos horas antes de la cual se agrega 0.1 ml de colcemide a la concentración final de 0.1 µg/ml. Para la cosecha los tubos se retiran de la incubadora, y el contenido se transfiere a tubos de polipropileno. Se centrifugan a 800-1000 rpm, por 7 minutos y se descarta el sobrenadante. Se adiciona 6 ml de la solución hipotónica de cloruro de potasio (0.075 M), y se incuba a 37 °C por 20 minutos. Se hace la prefijación con carnoy (Ácido acético y metanol 1:3) y se centrifuga por 7 minutos. Se descarta el sobrenadante y se adiciona 5 ml de fijador (frío) y se llevan al refrigerador por 20 minutos. El procedimiento de fijación se repite 2 veces más, pero sin llevar al refrigerador.

Finalmente se gotean 3 o 4 gotas del precipitado sobre las placas limpias y empapadas de ácido acético al 60%. Se secan las placas en la plancha caliente (40-45° centígrados) y se tiñen con Giemsa al 5% por 10 minutos. Este experimento se repitió al menos dos veces, haciendo los ajustes pertinentes con base en la citotóxicidad obtenida.

7.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

7.4.1 Citotoxicidad. Para identificar las alteraciones generadas en el ciclo normal de división celular, por los extractos de *Aloe vera* en linfocitos humanos, se empleó como biomarcador el índice mitótico (Fig. 1).

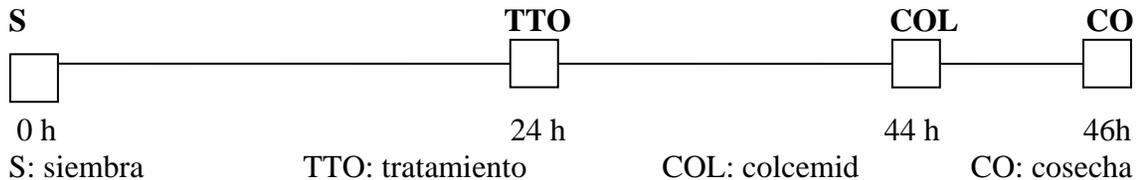
Figura 1. Protocolo para determinar citotoxicidad.



A las 24 horas después de la siembra, se adicionan las soluciones de trabajo del extracto, a razón de 0.1 ml por cultivo. Se incluye un control negativo o concentración 0, tratado con 0.1 ml de agua estéril. Mediante este estudio se identifican las concentraciones de cada extracto (alta, media, y baja), necesarias para realizar el análisis de genotoxicidad.

7.4.2 Genotoxicidad. Para identificar el efecto dañino sobre el material genético, en este estudio se utilizó como biomarcador de genotoxicidad, las alteraciones cromosómicas (Fig. 2).

Figura 2. Protocolo para determinar genotoxicidad



El tratamiento se aplicó a las 24 horas de realizada la siembra, adicionando a cada cultivo 0.1 ml de la solución de trabajo respectiva. Se incluyó el control negativo tratado con 0.1 ml de agua estéril, y el control positivo tratado con 0.1 ml de Mitomicina C (5mg/ml).

7.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7.5.1 Citotoxicidad. Se empleó un diseño de bloques completos aleatorizados. Este diseño permitió identificar la variabilidad originada al repetir el experimento, al menos tres veces en épocas diferentes, cada repetición fue un bloque. Cada bloque o experimento, incluyó 18 cultivos, entre los cuales se aleatorizaron los 9 tratamientos (8 concentraciones del extracto y el control negativo), a razón de dos cultivos por tratamiento.

El dato de índice mitótico se expresa en forma de número de metafases/ 1000 células, por cada cultivo. En cada experimento o repetición (bloque) se obtienen dos datos por tratamiento, como el experimento se repitió por tres veces (tres bloques), se obtuvieron en total 6 datos por tratamiento.

No se logró seleccionar las concentraciones para someterlas las pruebas de genotoxicidad, debido a que no se registró efecto citotóxico, por lo tanto se escogieron de acuerdo a la concentración final en el medio, desde la mas alta, 2%, seguida de la concentración al 1% y la concentración al 0.125%, 5 veces menor con relación a la concentración mas alta.

Se hizo el análisis comparativo entre las diferentes concentraciones del extracto de *Aloe vera* incluidos los controles (positivo y negativo), con respecto al índice mitótico (IM) y número de alteraciones cromosómicas (AC), mediante la prueba de Kruskal Wallis debido a que el tamaño de la muestra es pequeña ($n=6$); se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para hacer el análisis estadístico de los tratamientos ordenados por parejas en cada uno de los ensayos de citotoxicidad y de genotoxicidad.

Se hizo la comparación estadística de los resultados obtenidos en los tres experimentos del ensayo de genotoxicidad aplicando la prueba de Kruskal Wallis.

7.5.2 Genotoxicidad. Mediante un diseño de bloques completos aleatorizados, (cada experimento se repitió tres veces en épocas distintas), se sometieron a prueba 5 tratamientos: tres concentraciones de cada extracto (alta, media y baja), un control negativo o concentración cero y un control positivo (Mitomicina C: 5mg/ml).

En cada experimento se incluyeron 10 cultivos, es decir dos cultivos por tratamiento; como el experimento se realizó al menos tres veces, se obtuvieron 6 datos por tratamiento.

Para registrar las alteraciones se observaron solo células con 46 cromosomas. Se analizaron al menos 100 metafases en primer ciclo de división. El resultado de las alteraciones

cromosómicas se expresó en forma de número de alteraciones cromosómicas/100 metafases.

El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal la de U de Wallis, de Mann-withney y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet empleando el paquete estadístico SPSS- versión 13, con un nivel de significancia máximo de 0.05.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD

Tabla 1. Índice mitótico (%) obtenido al tratar los linfocitos humanos cultivados *in vitro* con ocho (8) concentraciones del extracto de *Aloe vera* un control negativo (concentración 0) y control positivo (MMC; 5mg/ml).

Concentraciones de <i>Aloe vera</i> (%) y MMC	Índice mitótico (%) $\bar{X} \pm EE$ (n)*
0	6.23 \pm 1.02 (6)
0.015625	6.00 \pm 2.55 (2)
0.03125	5.05 \pm 1.45 (2)
0.0625	5.05 \pm 1.20 (2)
0.125	5.90 \pm 0.52 (2)
0.25	6.47 \pm 1.57 (6)
0.5	5.93 \pm 0.80 (2)
1	6.73 \pm 0.30 (6)
2	6.12 \pm 0.95 (6)
MMC (5mg/ml)	1.46 \pm 0.44 (6)
P**	0,039

* Porcentaje promedio \pm error estándar. Resultados de n experimentos. 2000 células analizadas por cultivo.

** Significancia estadística mediante la prueba de Kruskal Wallis.

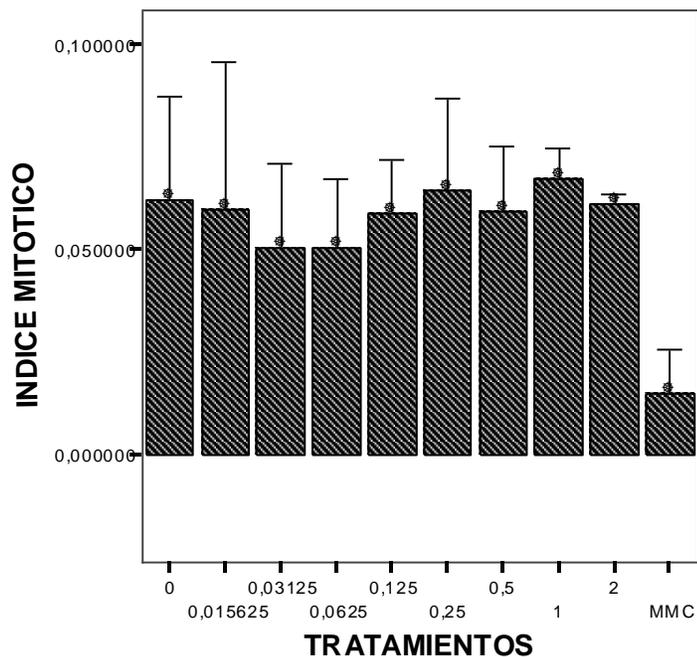
^a promedio que difiere significativamente de las demás concentraciones, incluido el control negativo (prueba U de Mann Withney).

En la tabla 1 se presenta el índice mitótico (%) correspondiente a las diferentes concentraciones de *Aloe vera* y al control positivo (MMC). Se identificó diferencia significativa (P= 0.039) al comparar las diferentes concentraciones.

En cuanto a la comparación de las diferentes concentraciones por parejas, se encontró que la diferencia significativa se debe básicamente a que hay una reducción significativa del índice mitótico en los cultivos tratados con MMC (0.5mg/ml) respecto del índice mitótico de las concentraciones del extracto de *Aloe vera*. En la mitomicina C, el índice mitótico fue de 0.0146 % mientras que a las concentraciones de la *Aloe vera*, les correspondió un índice mitótico entre 0.0673 y 0.0505% (Figura 3).

Entre las concentraciones del extracto de *Aloe vera* no se identificó diferencia significativa estadísticamente ($P>0,05$) respecto del índice mitótico. Es así como al control negativo le corresponde un índice mitótico de 0.0623% y a la concentración más alta (2mg/ml) un índice mitótico de 0.0612%. En consecuencia, se puede concluir que el extracto de *Aloe vera* no tiene efecto citotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, en las condiciones de esta investigación, es decir no se observa un efecto bloqueador premitótico, ni mitótico.

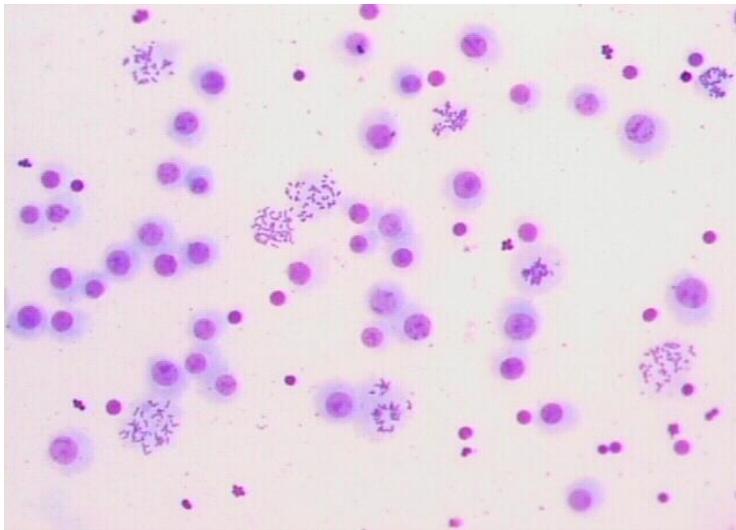
Figura 3. Análisis comparativo del índice mitótico correspondiente a las diferentes concentraciones del extracto de *Aloe vera*. La MMC es la única que difiere significativamente de los demás tratamientos.



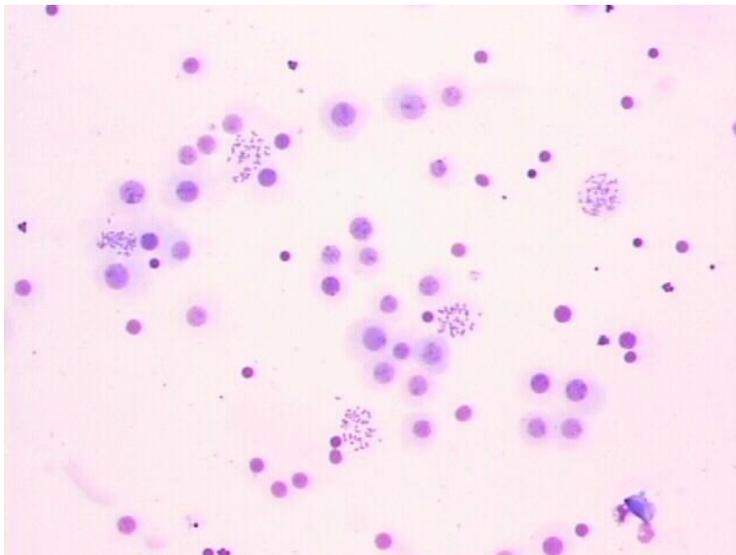
De esta manera se determinó que el extracto de *Aloe vera* no presenta actividad citotóxica para los linfocitos cultivados *in vitro*, debido a que no se observó un cambio significativo del índice mitótico de ninguna de las concentraciones.

No obstante, con el fin de realizar la prueba de genotoxicidad, se seleccionaron las siguientes concentraciones del extracto de *Aloe vera*: baja, cercana al control negativo (0.125%), alta, la de mayor concentración (2%) y la media (1%), que se encuentra entre las dos concentraciones anteriores.

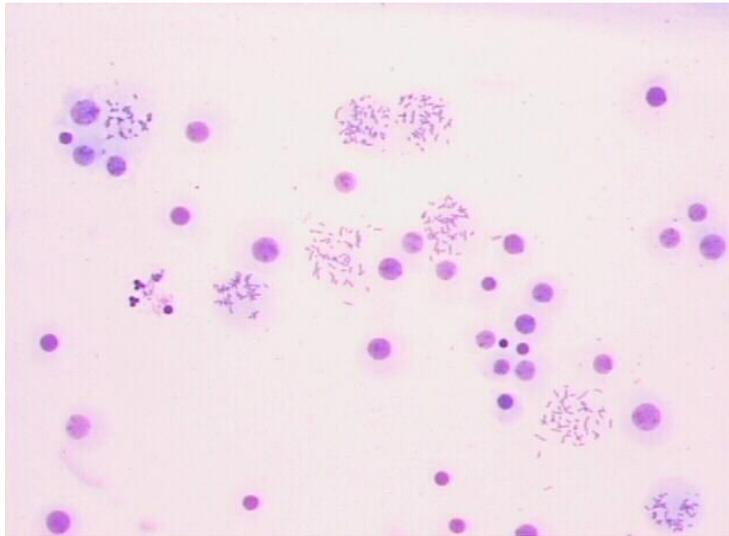
Figura 4. Metafases registradas en los cultivos *in vitro* de linfocitos humanos, tratados con diferentes concentraciones del extracto de *Aloe vera*.



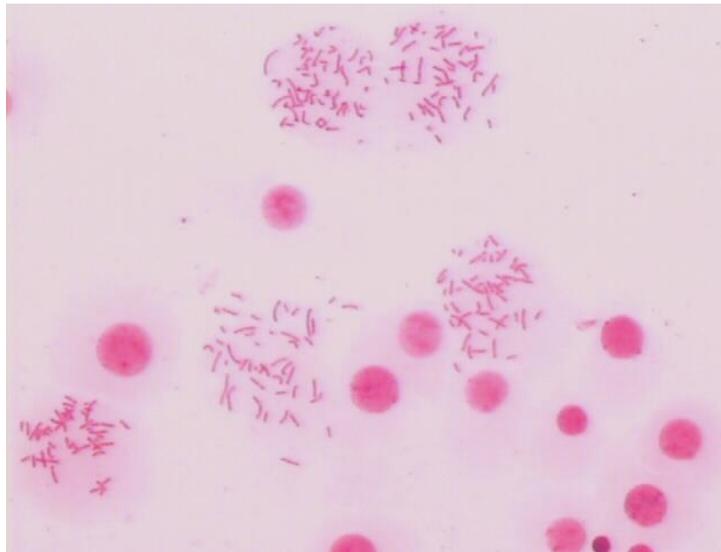
Concentración 2%



Concentración 1%



Concentración 0.125 %



Agua estéril 40x

Existe numerosa información acerca de los efectos del extracto de *Aloe vera*, que destacan su capacidad inmunomodulatoria, anti-inflamatoria, antiviral, antibacteriana, entre otros efectos importantes generados por varios tipos de componentes presentes en la planta, como es el caso de acemannan con capacidad de estimular el sistema inmune durante el ataque infeccioso de virus y bacterias, aloeride con funciones semejantes al acemannan, tres polisacáridos aislados recientemente: G2E1DS3, G2E1DS2, G2E1DS1, con actividad inmunomodulatoria, dihydroisocoumarin con acción antioxidante, y otros componentes que actualmente se están aislando y estudiando con el fin de desarrollar medicamentos o productos benéficos para el mejoramiento de la salud y para el tratamiento de enfermedades (Womble et al, 1992; Pugh N et al, 200; Habeeb et al, 2007; Sun-A et al, 2005; Zhang et al, 1996). Sin embargo, son escasos los estudios relacionados con los efectos citotóxicos del extracto de *Aloe vera* los cuales fueron retomados por este trabajo para discutir los resultados.

Según Seongwon y Myung-Hee, (2003), los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados con los extractos de *Aloe vera*, son difíciles de interpretar, dado que esta planta presenta una gran diversidad de componentes activos, los cuales le confieren virtudes medicinales y terapéuticas. A nivel molecular se ha observado que estas biomoléculas tienen diversas actividades funcionales, tanto en conjunto como individualmente, activando ciertos mecanismos e inhibiendo otros.

Los resultados arrojados por este trabajo indican que el extracto fabricado a partir de los cristales de *Aloe vera*, no presenta efecto citotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, pues no hubo una disminución significativa del índice mitótico con respecto al incremento de las concentraciones, sin embargo, en estudios realizados por Paes-Leme, et al (2005) determinaron que probablemente *Aloe vera* presente efecto citotóxico si sus componentes activos lograran atravesar con facilidad la pared celular de las bacterias *Escherichia coli*. No obstante, ellos realizaron un experimento utilizando una cepa de estas bacterias modificadas, que poseen una pared celular más permeable que lo normal, observando la entrada de pocas moléculas al interior de las células, especialmente de las cepas mutantes *uvrA*, lo cual generó una citotoxicidad estadísticamente despreciable. Teniendo en cuenta que los linfocitos humanos son células eucarióticas que carecen de pared celular, para lo cual, se consideraría la posibilidad de que los componentes presentes en el extracto de *Aloe vera* atravesaran con facilidad la membrana de estas células, resultado no observado en este estudio considerando la posibilidad anteriormente mencionada.

Ramos et al, (2001), empleó tres tipos de ensayos para estudiar los efectos toxicológicos del extracto acuoso liofilizado de *Aloe vera*, entre ellos el test de micronucleos, en el cual no se observó efectos citotóxicos sobre la proliferación celular, en la médula ósea de ratón. En otro estudio realizado por Vizoso et al, (2000), se evaluó un extracto de derivados antraquinónicos de *Aloe vera* para determinar su potencial tóxico, empleando varias pruebas, en especial el ensayo de segregación mitótica en el hongo *Aspergillus nidulans* D-30, no se apreció diferencias estadísticas significativas para ningún tratamiento, dado a que no se observó una reducción en el diámetro de las colonias respecto al control negativo, deduciendo que este extracto no posee efecto citotóxico. Según discuten sus autores, este efecto se debe a que esta prueba es poco sensible al tratamiento con estos compuestos. Es plausible aludir que las antraquinonas son compuestos activos en la planta de *Aloe vera*, los cuales en su mayoría, como es el caso de aloe emodin y aloin, poseen efectos tóxicos a altas concentraciones operando como agente carcinogénico, generando daños a nivel del ADN (Lachenmeier et al, 2006), pues se ha observado que estos compuestos también provocan reacciones laxantes, alérgicas, irritan la piel, pues reaccionan con la luz ultravioleta generando especies reactivas de oxígeno que contribuyen al envejecimiento, al foto-daño y al deterioro en la piel de las personas (Qingsu, et al 2007).

Sin embargo, se puede observar que en los estudios sobre los efectos tóxicos de *Aloe vera*, se descartan sus efectos citotóxicos, quizá debido al hecho de que los compuestos presentes en esta planta carecen de capacidad para atravesar con facilidad la pared celular

de ciertas células, en especial las procariotas, las cuales son ampliamente usadas para el desarrollo de estas investigaciones.

Debido a la complejidad de sus componentes, los cuales varían de acuerdo al origen geográfico de la planta y ambiente de desarrollo, no se ha logrado identificar con claridad sus mecanismos de acción, dado a que sus biomoléculas también trabajan en conjunto, no detectándose efectos significativamente característicos. De esta manera resulta necesario analizar sus componentes individualmente, pues se ha encontrado que estas moléculas, actúan efectivamente modulando varias funciones, es así como las glicoproteínas y mas específicamente la lectina, posee actividad mitogénica encargada de estimular la proliferación celular (Koike et al, 1995), también hay presencia de compuestos fenólicos responsables de la reducción de los efectos mitógenos de las glicoproteínas (lectina) (Yagi, et al, 1997); moléculas como el acemannan, que actúan como anticancerígenos y anti-inflamatorios, que ayudan a la curación rápida de las heridas (Zhang et al, 1996); las antraquinonas (aloin , aloe- emodin) (Chapman, 1995; O'Brien, 1997) y algunos compuestos presentes en el gel (LMWF) (Avila et al, 1997) los cuales poseen actividad mutagénica a altas concentraciones, contraponiéndose a los efectos generados por los compuestos con actividad antioxidante y anticancerígena, observando que todos estos efectos opuestos originarían una variabilidad en los resultados de un cierto número de estudios, a nivel farmacológico, terapéutico y aquellos estudios enfocados en el análisis de sus efectos toxicológicos.

Se observa que los modelos biológicos empleados para la ejecución de los estudios, difieren en su capacidad para reaccionar ante la exposición de los diferentes agentes investigados, detectándose que no todos estos modelos son adecuados para la evaluación de dichos estudios, debido a que, al parecer, las diferencias bioquímicas que existe entre ellos se ven reflejadas en los resultados.

8.2 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

Para el análisis estadístico de los datos se tomó como variable dependiente las alteraciones cromosómicas, y como variable independiente las diferentes concentraciones del extracto, mediante la prueba de Kruskal Wallis, no se observó diferencia estadística significativa entre los tres experimentos realizados ($P > 0.355$), es decir, entre bloques.

Tabla 2. Frecuencia de AC/100 células, registrados en los tres experimentos con tres concentraciones del extracto, un control negativo (concentración cero) y un control positivo (MMC: 5mg/ml).

Concentración (%)	Frecuencia de AC/100 células $\bar{X} \pm DS (n)^*$
0	0.33 \pm 0.516 (6)
0.125	0.83 \pm 0.983 (6)
1	0.83 \pm 1.169 (6)
2	0.67 \pm 0.816 (6)
MMC	5.67 \pm 3.327 (6) ^a
P**	0.011

* Número promedio \pm desviación estándar, obtenido en n experimentos. 100 células analizadas en por cultivos en cada experimento.

** Significancia estadística mediante la prueba de Kruskal Wallis

^a promedio que difiere significativamente de las concentraciones de *Aloe vera* y del control negativo (prueba de Mann Withney)

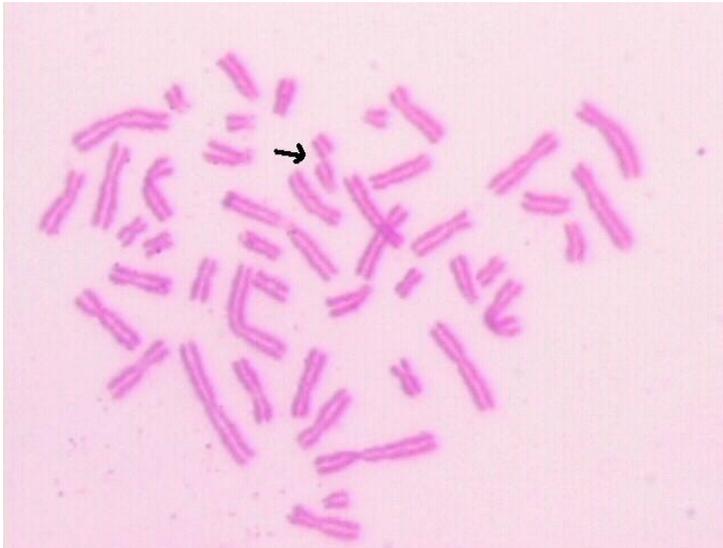
En la tabla 2 se muestra el número promedio de alteraciones cromosómicas, correspondientes a las tres concentraciones del extracto y a los controles positivo (MMC) y negativo (agua estéril). Al realizar la comparación por parejas, se logró identificar que realmente el número de alteraciones cromosómicas que difiere del resto de los tratamientos es la MMC (5.67 \pm 3.327/100 células) la cual es significativamente mayor (P 0.011) que el registrado en las diferentes concentraciones del extracto de *Aloe vera*, incluido el control negativo, a las cuales les correspondió un número de AC/100 que oscila entre 0.67 \pm 0.816 para la concentración más alta y, 0.33 \pm 0.516 para la concentración cero.

Con base en lo anterior se puede concluir que el extracto de *Aloe vera* no tiene efecto genotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, por que a altas concentraciones (2%) el extracto no genera daños significativos a nivel cromosómico.

Figura 5. Alteraciones cromosómicas registradas en las tres concentraciones del extracto y en el control negativo.



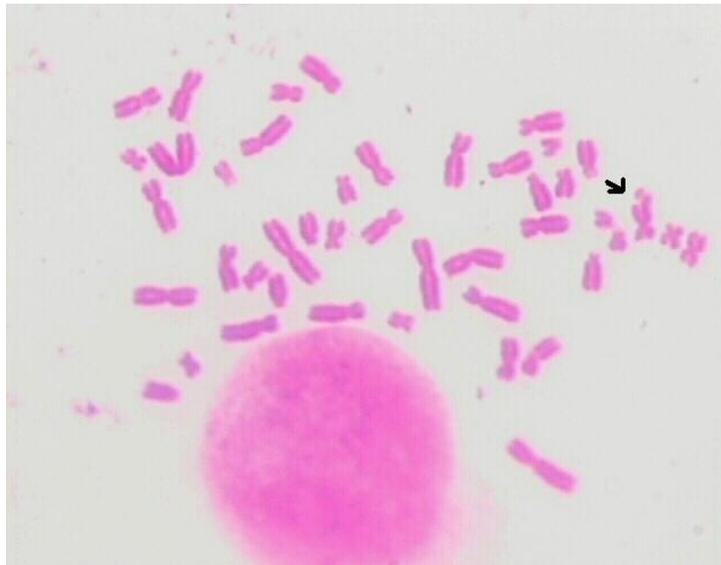
Control negativo



Concentración 2%



Concentración 1%



Concentración 0.125%

En un estudio realizado por Paes-Leme, et al (2005), se investigó los efectos biológicos del extracto de pulpa de *Aloe vera*, empleando mutantes de *Escherichia coli* deficientes en la reparación y plásmidos de DNA, para determinar su potencial genotóxico. En la prueba de eficiencia de transformación utilizando las mismas cepas de bacterias, a las cuales se les adicionó 10 μ g/ml de plasmido (DNA) incubado con las diferentes concentraciones de *Aloe vera*, se determinó que si hubo efecto genotóxico, pues hubo una baja eficiencia de transformación a medida que aumentaba la concentración del extracto de *Aloe vera* (3, 30, 300 μ g /ml) y, por medio del gel de electroforesis, se confirmaron las propiedades genotóxicas del extracto *Aloe vera* observándose rompimientos de cadena simple. Los ensayos de transformación también mostraron que, al parecer, los mecanismos celulares más efectivos en contra de las lesiones inducidas por *Aloe vera* son la reparación por excisión de bases y reparación por excisión de nucleótidos.

En algunas cepas bacterianas (AB1157 y AB2463), hubo un aumento inesperado de la eficiencia de transformación, posiblemente debido a que, a bajas concentraciones algunos componentes del extracto incrementan la permeabilidad celular, esto también fue reportado por Dantas et al, (1999).

Es de resaltar que los estudios realizados con los extractos de *Aloe vera*, los cuales analizan sus efectos, elogian sus propiedades benéficas, pues los reportes acerca de sus efectos tóxicos son escasos, de hecho se observa mas una interacción de estas moléculas con mecanismos externos a la célula como moduladores de la respuesta inmune, capacidad antiinflamatoria y en fin se ha hallado que son capaces de regular o intensificar una serie de mecanismos importantes en el organismo.

Otro punto a tener en cuenta es el tipo de metodología utilizada para la obtención del extracto, debido a que durante el proceso se pueden eliminar componentes importantes que le confieren a la planta distintas propiedades, lo cual puede influir en los resultados obtenidos. También la ubicación geográfica de la planta puede determinar el tipo y la cantidad de componentes presentes en la planta, pues se ha estudiado que diferentes factores ambientales, entre ellos el clima, la humedad, el pH, el tipo de suelo y la luz, influyen en el desarrollo de la planta, el tipo de especie utilizada para el tratamiento de las enfermedades posee variaciones en su composición química, pues se ha considerado que *Aloe vera* o *Aloe barbadensis* Millar, es biológicamente mas activa que otras especies de la familia Asphodelaceae (Yagi et al, 1998; Balunas et al, 2006).

En un estudio realizado por Paez et al, (2000), se analizó la incidencia de la luz sobre el crecimiento de la planta, distribución y contenido de los principales constituyentes de *Aloe vera*, encontrando que, bajo las condiciones totales de luz solar, la planta exhibió un mayor peso seco en las hojas y el desarrollo de raíces auxiliares en comparación con las plantas expuestas a radiación solar parcial y oscuridad profunda; no hubo una discrepancia estadística de las concentraciones de algunos solutos orgánicos, incluyendo glucosa, galactosa, ácido quínico y ácido málico en el gel de las plantas expuestas a la irradiación solar total y parcial. Se descartó la posibilidad de que la concentración de aloin se incrementara con respecto a la incidencia de la luz solar. Esto da a entender que, al parecer, la luz solar no influye en la concentración de sustancias orgánicas de la planta de *Aloe vera*, solo en el desarrollo de un mayor peso seco de la planta cuando se expone a la radiación solar total.

Por otra parte, Hu Y et al, (2003), determinaron que la fase de crecimiento de *Aloe vera* juega un papel importante en su composición y actividad oxidante, dado a que se encontró que plantas con tres años de desarrollo, contienen niveles mas altos de polisacáridos y flavonoides que plantas con dos y cuatro años de edad, dato importante para la selección adecuada de esta planta para la elaboración los productos con fines terapéuticos y con propósitos investigativos, debido a que esto también se consideraría como una variable

indispensable, por que podría influir en los resultados de este y otros estudios que buscan determinar los efectos de *Aloe vera*.

Ramos et al, (2001), evaluó el efecto mutagénico del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Aloe vera* para lo cual se emplearon tres ensayos a corto plazo: inducción de mutaciones puntuales (supresores) en el *locus* meth G1 de *Aspergillus nidulans*, segregación mitótica en un diploide heterocigótico de *Aspergillus nidulans* y el *test* de micronúcleos en médula ósea de ratón; *Aloe vera* no resultó genotóxico en ninguno de los casos, por que no se detectó aumento significativo en la frecuencia de mutantes y tampoco aumentos significativos en la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados.

Los modelos biológicos utilizados para la realización de diferentes experimentos en el área de toxicología, para analizar sustancias con potencial mutagénico o para determinar alguna función o mecanismo de acción generado por estas sustancias, varían según su sensibilidad ante la exposición a estos agentes tóxicos. Un caso particular se observó en un estudio realizado por Lagarto et al, (2001), quienes utilizaron un invertebrado de aguas salada *Artemia salina* L, como modelo biológico para evaluar los efectos toxicológicos de 20 plantas medicinales, encontrando que el extracto de *Aloe vera* resultó ser mas tóxico en comparación con los demás extractos evaluados a medida que se aumentaba la concentración (10-1000 µg/ml), ocasionando una alta mortalidad. Estos resultados fueron corroborados por un “test *in vivo*” con ratones albinos suizos, a los cuales les fue suministrado oralmente el extracto de *Aloe vera* generando una alta mortalidad a medida que se incrementaba la concentración.

Viveros et al, (2006), evaluó los efectos generados por el extracto acuoso de *Morinda citrifolia* L. planta comúnmente llamada noni consumida por las personas con fines terapéuticos y curativos, determinando que esta planta posee efecto citotóxico y genotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, hallazgo importante dado a la falta de registros bibliográficos que advirtieran sobre los efectos genotóxicos de esta planta. Con base en esto se puede observar que los linfocitos humanos son una excelente herramienta empleada por años debido a su sensibilidad para evaluar los efectos generados por cualquier tipo de sustancia o agente potencialmente tóxico para el ser humano. De acuerdo a esto se podría inferir que los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, posiblemente, no son los causantes de que el extracto de *Aloe vera* no haya presentado actividad genotóxica, pues se sabe que los componentes de *Aloe vera* varían según la ubicación geográfica y la incidencia de diferentes factores ambientales, lo cual se cree ha dificultado la identificación de las características o propiedades determinantes de la planta. Además, se puede asumir el hecho, de que los componentes presentes en la planta de *Aloe vera* presentan una baja capacidad para ingresar al interior de la célula, lo cual dificulta su análisis.

Aloe vera presenta diversidad de componentes que, si bien pueden generar beneficios, también pueden ser potencialmente tóxicos o perjudiciales a largo plazo. La corteza de esta planta posee una gran cantidad de compuestos antraquinónicos, capaces de afectar la capacidad proliferativa de las células; según estudios, estos compuestos inhiben la

proliferación de células cancerígenas gracias a su potente toxicidad (Acevedo et al, 2004), de igual forma se han encontrado componentes tóxicos de bajo peso molecular (LMWF) en la pulpa de las hojas, con funciones similares a las antraquinonas, induciendo rupturas de uniones intracelulares, separación de células, y formación de brechas (gaps) en células libres de la monocapa de fibroblastos (Ávila et al, 1997); estas moléculas se obtuvieron individualmente para analizar sus funciones, dado a que esta planta presenta gran cantidad de componentes activos, mas específicamente en el gel (200 compuestos aproximadamente) entre los cuales sobresalen las glicoproteínas, carbohidratos y esteroides, incluyendo ácidos carbónicos alifáticos y aromáticos (Esuaa y Wilhelm, 2006). Estas moléculas poseen una notable actividad biológica, las cuales, en conjunto, ejercen diversas funciones, por cuanto algunas de ellas poseen la capacidad de atenuar ciertos mecanismos, mientras otras los activan como ya se describió anteriormente, impidiendo el análisis claro de los resultados.

La interacción bioquímica generada en el momento del contacto de sustancias con el organismo depende de diversos factores, como la carga genética, más específicamente polimorfismos que confieren al ser humano la capacidad para metabolizar las sustancias que ingresan al organismo (moléculas exógenas) confiriéndoles características tóxicas o bien, neutralizándolas y volviéndolas inofensivas. A nivel molecular las isoenzimas CYP encargadas de llevar a cabo procesos de metabolización de un gran número de drogas y químicos estructuralmente diversos (Rodriguez et al, 2008), tienen variaciones genéticas que pueden alterar el funcionamiento o procesamiento adecuado de los compuestos que ingresan al organismo. De aquí la importancia de, no solo profundizar en los estudios dirigidos al tratamiento de enfermedades con extractos de plantas para determinar sus efectos curativos o sus efectos nocivos, si no determinar la predisposición genética de cada individuo influye directamente en la reacción final después de metabolizada la sustancia dentro del organismo.

La divergencia entre los resultados de las investigaciones previas, han impedido establecer con exactitud las características determinantes, de los extractos y productos a base de *Aloe vera*. De hecho en el presente estudio, se concluye que el extracto total de *Aloe vera* no tiene efecto citotóxico ni genotóxico y los resultados obtenidos por otras investigaciones, que si identificaron efectos tóxicos, se pueden explicar por la variabilidad que presenta la planta en la cantidad y tipo de moléculas que dependen del medio geográfico, de las condiciones ambientales durante su desarrollo y la diferencias que existe entre las especies de sábila. Por lo tanto, aunque la planta de *Aloe vera* evaluada en el presente estudio no tiene efecto tóxico para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, se debe racionalizar su uso con el fin de prevenir posible problemas de salud, por acción de moléculas en la planta, que en ciertas condiciones pueden ser dañinas.

9. CONCLUSIONES

El extracto de *Aloe vera* no presentó efecto citotóxico para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, porque ninguna concentración del extracto, se diferenció estadísticamente de los cultivos celulares no tratados.

No se determinó efecto genotóxico, inductor de alteraciones cromosómicas, para los linfocitos humanos cultivados *in vitro*, tratados con el extracto de *Aloe vera*.

Los resultados arrojados por el presente estudio indican que el extracto de *Aloe vera* no es tóxico, y que su consumo moderado quizá no genere efectos adversos en las personas, sin embargo teniendo en cuenta estudios previos, *Aloe vera* presenta variaciones en su composición bioquímica y concentración de los constituyentes, identificándose en algunos casos, intoxicación por el consumo de productos a base de esta planta. Al parecer, los resultados también dependen de los modelos biológicos utilizados para su estudio, y de la capacidad de estos componentes para acceder al medio intracelular, pues basado en algunos aportes bibliográficos *Aloe vera* posee actividad citotóxica y genotóxica.

La composición fito-química de la planta varía de acuerdo al lugar de origen y desarrollo, donde la influencia de la luz, factores ambientales, genéticos y una serie de elementos que intervienen en la cantidad y tipo de sus constituyentes, le otorgan a estas plantas diferentes características. También los métodos utilizados para la elaboración de los extractos y productos a base de *Aloe vera* son importantes porque el tipo y concentración de los componentes que se extraigan le confieren a la planta propiedades medicinales o en otros casos, tóxicas.

La diversidad bio-química que separa una sustancia de la conformación molecular y funcional que caracteriza los modelos biológicos empleados para el estudio de estas sustancias, influye en los resultados pues en estudios previos se ha observado una variabilidad en ellos, impidiendo la identificación de la verdadera naturaleza de la sustancia estudiada. Si se conociera a profundidad las características químicas y biológicas tanto de las sustancias como los prototipos utilizados para la ejecución de los estudios, se evitaría el desgaste de un sin número de ensayos con un mismo propósito y una diversidad de resultados que no son del todo claros.

10. SUGERENCIAS

Sería de gran importancia llevar a cabo más estudios con extractos de otras plantas de uso medicinal, empleando como modelo biológico los linfocitos humanos cultivados *in vitro* para determinar con más exactitud la sensibilidad de esta prueba ante la exposición a estas sustancias, con el fin de comprobar que esta técnica es una buena herramienta para el análisis de extractos de plantas.

Los estudios realizados, con referencia a los efectos citotóxicos y genotóxicos del extracto de *Aloe vera*, son insuficientes, debido a que es una planta ampliamente utilizada, pues son mas los estudios que se preocupan por determinar sus virtudes y, el análisis individual de sus componentes. Sería recomendable utilizar otros modelos biológicos y técnicas moleculares de relevancia, para observar el comportamiento del extracto de *Aloe vera* de una manera más minuciosa. De la misma forma, los estudios que emplean pruebas *in vivo* son escasos, lo cual resultaría significativo implementarlo en el estudio de los extractos de *Aloe vera*, debido, a que se asemeja mas al ser humano a nivel metabólico y funcional.

Se sugiere que se amplíen los estudios, que analizan los efectos generados por el medio ambiente sobre el contenido de los componentes que conforman la planta, como la temperatura, la influencia de la luz, el pH, la humedad, el tipo de suelo, entre otros factores. Esto, sería importante, sobre todo para aquellas industrias, que cultivan *Aloe vera* como materia prima, para la elaboración de los productos.

10. BIBLIOGRAFIA

ACEVEDO, D; PATEL, S. and PATEL, R. Aloe-emodin modulates PKC isozymes, inhibits proliferation, and induces apoptosis in U-373MG glioma cells. En: Int Immunopharmacol. Vol. 4 (Dec 2004); p. 1775-84.

Alternative Medicine. Ways Aloe Vera can help you". Vol. 28 (1999).

ATHERTON, Peter. The Essential Aloe Vera. The Actions And The Evidence. 2nd Edition (1997).

ÁVILA, H; RIVERO, J; HERRERA, F. and FRAILE, G. Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel. En: Toxicol. Vol.35, N°9 (Sep 1997); P. 1423-30.

BALUNAS, M; JONES,W; HIN, Y; MI, Q; FARNSWORTH, N; SOEJARTO, D; CORDELL, G; SWANSON, S; PEZZUTO, J; CHAI, H. and KINGHORN, A. Relationships between inhibitory activity against a cancer cell line panel, profiles of plants collected, and compound classes isolated in an anticancer drug discovery project. En: Chem Biodivers. Vol.3, N°8 (Aug 2006); P. 897-915.

BEPPU, H; NAGAMURA, Y. and FUJITA, K. Hypoglycemic and anti-diabetic effects of *Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger. En: Phytotherapy Research. Vol.7 (1993); P. S37–S42.

BLANCO, N; RAMOS, A. y VIZOSO, A. Evaluación tóxica y genotóxica del extracto fluido de *Piper auritum* H.B.K. En: Rev Cubana Plant Med. Vol. 11 (2006); P. 3-4.

BONASSI, S; UGOLINI, D; KIRSCH, M; STROMBERG, U. and TUCKER, J. Human Population Studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives. En: Environment and Molecular Mutagenesis. Vol. 45 (Feb 2005); P. 258-270.

CASTELLANOS, E; RODRÍGUEZ, M; VÁZQUEZ, T. y SIN MAYOR, A. Efecto antiviral del extracto acuoso de *Aloe Barbadensis* contra el virus de la hepatitis B. En: Revista cubana Plantas Medicinales. Vol.1 (2001); P. 7-11.

CHAPMAN, M. Excessively high cell proliferation in sigmoid colon after an oral purge with anthraquinone glycosides. En: Journal of the National Cancer Institute. Vol.87 (1995); P. 1086-1087.

DANTAS, F; MORAES, M; DE MATTOS, J; BEZERRA, R; CARVALHO, E; BERNARDO, M. and CALDEIRA, A. Stannous chloride mediates single strand breaks in plasmid DNA through reactive oxygen species formation. En: Toxicology Letters. Vol.110 (1999); P.129–136.

DAVIS, R; DIDONATO, J; JOHNSON, R. and STEWART, C. *Aloe vera*, hydrocortisone, and sterol influence on wound tensile strength and antiinflammation. En: Journal of the American Podiatric Medical Association. Vol.84 (1994); P. 614–621.

DIRECTOMED. Usos del Aloe vera de la “A a la Z”. www.directomed.com

DJERABA, A and QUERE, P. In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from Aloe vera. En: Int J Immunopharmacol. Vol. 22, N° 5 (May 2000); P. 365-72.

EFFENDY, I. and MAIBACH, H. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. En: Contact Dermatitis. Vol. 33 (1995); P. 217-22.

ESUAA, M. and WILHELM, R. Novel bioactive maloyl glucans from Aloe vera gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. En: Carbohydrate Research. Vol. 34 (2006); P. 355–364.

FENECH, M. and MORLEY, A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. En: Mutant Research. Vol. 147. N° 1-2 (1985); P. 29-36.

GEOCITIES. Propiedades Constituyentes del Aloe, Clasificación Taxonómica del Aloe. Online 2006. www.geocities.com

GONZÁLEZ, R; ROQUE, A; MORIER, L. y RODRÍGUEZ, L. Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en células PLC/PRF/5. En: Rev Cubana Med Trop. Vol.58, N°2 (2006).

GRINDLAY, D, REYNOLDS, T. The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. En: J Ethnopharmacol. Vol. 16, N°2-3 (Jun 1986); p.117-51.

HU, Y; XU, J. and HU, Q. Evaluation of antioxidant potential of Aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) extracts. En: J Agric Food Chem. Vol.51, N°26 (Dec 2003); P.7788-91

HABEEB, F; STABLES, G; BRADBUR, F; NONG, S; CAMERON, P; PLEVIN, R. and FERRO, V. The inner gel component of Aloe vera suppresses bacterial-induced pro-inflammatory cytokines from human immune cells. En: Methods. Vol.42 (2007); p. 388–393.

HOYOS, L. CARVAJAL, S. y CAJAS, N. Manual de Citogenética: linfocitos humano. Grupo de investigación en Toxicología Genética y Citogenética (2002).

JING, Y; JIE, Y; RONG, H; FEI, G; HAIRONG, S; XUEMING, T. and RICHARD Y. Emodin Enhances Arsenic Trioxide-Induced Apoptosis via Generation of Reactive Oxygen Species and Inhibition of Survival Signaling. En: Cancer Research. Vol.64 (Jan 2004); P. 108-116.

KAHLON, J; KEMP, M. and CARPENTER, R. Inhibition of AIDS virus replication by acemannan in Vitro. En: Mol Biother. Vol.3, N°3 (Sep 1991); P.127-35.

KAHLON, J; KEMP, M and YAWEI, N. In Vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan in combination with azidothymidine and acyclovir. En: Mol Biother. Vol.3, N°4 (Dec 1991); P.214-23.

KANAT, O; OZET, A. and ATAERGIN, S. Aloe vera-induced acute toxic hepatitis in a healthy young man. En: European Journal of Internal Medicine. Vol.17 (2006); P. 589.

KOIKE, T; BEPPU H; KUZUYA H; MARUTA K; SHIMPO K; SUZUKI M; TITANI K and FUJITA K. A 35 KDa mannosyl-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from “kidachi Aloe” (*Aloe arborecens* Miller var. *natalensis* Berger). En: J Biochem. Vol. 118, N°6 (Dec 1995); p.1205.

KROES, B; VAN DEN BERG, A; QUARLES VAN UFFORD, H; VAN DIJK, H. and LABADIE, R. Anti-inflammatory activity of gallic acid. En: Planta Medica. Vol. 58 (1992); P. 489-504.

LACHENMEIE, K; KUEPPER, U; MUSSHOFF, F; MADEA, B; REUSCH, H. and LACHENMEIER, D. Quality control of Aloe vera beverages. En: Journal Environmental. (Feb 2006).

LEE, K; HONG, H. and LEE, C. Induction of apoptosis in human leukaemic cell lines K562, HL60 and U937 by diethylhexylphthalate isolated from Aloe vera Linne. En: Pharm Pharmacol. Vol.52, N°8 (Aug 2000); P. 1037-41.

LEE, K. and KIM, J. Anti-leukaemic and anti-mutagenic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate isolated from Aloe vera Linne. En: Pharm Pharmacol. Vol.52, N°5 (May 2000); P. 593-8.

MADRIGAL, B; MADRIGAL, E; CASSANI, M; LEYVA, Y. and PIÑA, A. Efecto genotóxico de la Crocidolita en cultivo de linfocitos humanos. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Genética. México, D F (2001).

MATEUCA, R; LOMBAERT, N; AKA, P; DECORDER, I. and KIRSCH, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. En: BIOCHIMIE. (2006); p.1515-1524.

MERRIAM, E; CAMPBELL, B; FLOOD, L; WELSH, C; MCDANIEL, H. and BUSBEE, D. Enhancement of immune function in rodents using a complex plant carbohydrate which stimulates macrophage secretion of immunoreactive cytokines. En: Advances in Anti-Aging Medicine. Vol.1 (1996); P. 181–203.

LEUNG, M; LIUB, C; KOON, J. and FUNGA, K. Polysaccharide biological response modifiers. En: Immunology Letters. Vol.105 (2006); P. 101–114.

O'BRIEN, P. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. En: Chemico-Biological interactions. Vol.80 (1991). P. 141.

PAES-LEME, A; MOTTA, E; MATTOS, J; DANTAS, F; BEZERRA, R. and CALDEIRA-DE-ARAÚJO A. Assessment of *Aloe vera* (L.) genotoxic potential on *Escherichia coli* and plasmid DNA. En: Journal of Ethnopharmacology. Vol.102 (2005); P.197–201.

PAEZ, A; GEBRE, G; GONZÁLEZ M. and TSCHAPLINSKI, T. Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. En: Environmental and Experimental Botany. Vol.44 (2000); P. 133–139.

LAGARTO, P; YHEBRA, S; GUERRA, S. and IGLESIAS, B. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Drug Research and Development Center (CIDEM), Biologic Research Department.Cuba. En: Phytomedicine.Vol. 8, N°5 (2001); P. 395–400.

PECERE, T; GAZZOLA, M; MUCIGNAT, C; PAROLIN, C; VECCHIA, F; CAVAGGIONI, A; BASSO, G; DIASPRO, A; SALVATO, B; CARLI, M. and PALU G. Aloe-emodin is a new type of anticanc agent with selective activity against neuroectodermal tumors. En: Cancer Res. Vol.60, N°11 (Jun 2000); P.2800-4.

_____; SARINELLA, F; SALATA, C; GATTO, B., BET, A. VECCHIA, F; DIASPRO, A; CARLI, M; PALUMBO, M. and PALU, G. Involvement of p53 in specific anti-neuroectodermal tumor activity of aloe-emodin. En: Int J Cancer. Vol.106 (2003); P.836-40.

PETKOV, V. “La Revolución Verde” de la medicina popular. En: El Correo de la UNESCO 1979; Año XXXII: 39-41.

PUGH, N; ROSS, S. and ELSOHLY, M. Characterization of Aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from *Aloe vera* with potent immunostimulatory activity. En: J Agric Food Chem. Vol.49, N°2 (Feb 2001); P.1030-4

QINGSU, X; YIN, J; FU, P. and BOUDREAU, M. Photo-irradiation of *Aloe vera* by UVA—Formation of free radicals, singlet oxygen, superoxide, and induction of lipid peroxidation. En: Toxicology Letters. Vol.168 (2007); P. 165–175.

RAMAMOORTHY, L; KEMP, M. and TIZARD, I. Acemannan, a beta-(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. En: Mol Pharmacol. Vol.50, N°4 (Oct 1996); P. 878-84.

RAMOS, A; EDREIRA, A; VILLAESCUSA, A; VIZOSO, A y MARTÍNEZ, M. Evaluación genotóxica de un extracto acuoso de *Aloe vera* L. Industria medico farmacéutica. Centro de investigación y desarrollo de medicamentos. Departamento de investigaciones microbiológicas (2001).

RAMÍREZ, T; BRIBIESCAS, L; OSTROSKY-WEGMAN, P y HERRERA L. Efecto citotóxico y genotóxico del Albendanzol y sus metabolitos en linfocitos humanos de sangre periférica. Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM. Unidad de investigación (2001).

RAPPAPORT, S. Biological considerations in assessing exposures to genotoxic and carcinogenic agents. *Int. Arch. Occup. En: Environ. Health* Vol.65 (1993); P. S29-S35

RODRIGUEZ, L; REYES, J; BURCHIEL, W; HERRERA, D. and TORRES, E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *En: Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol.227 (2008); P. 125–135

SALAZAR, I. Actividad del extracto acuoso y la fracción acético acuosa *Phyllanthus orbicularis* HBK, *Caléndula officinalis* L, *Psidium guajava* L. *Eucalyptus ssp*, sobre la viabilidad celular y la producción de A_gsHB en células PLC/PRF/5. La Habana 2001. Trabajo de grado (Microbiología). Universidad de La Habana. Facultad de Biología.

SEONGWON, C. and MYUNG, C. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*, Vol 1, N°1 (March 2003); P.53-62.

SERRA, B. y LLUIS, J. Gran enciclopedia de las plantas medicinales. Madrid: Ediciones Tikal. 1ª edición (1998).

SHENG, C; KAI, L; CHUN, C; CHIA, F. and CHIH, L. Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *En: Food and Chemical Toxicology*. Vol.45 (2007); P. 2296–2303.

SHIDA, T; YAGI, A; NISHIMURA, H. and NISHIOKA, I. Effect of aloe extract on peripheral phagocytosis in adult bronchial asthma. *En: Planta Médica* Vol.51 (1985); P. 273-275.

SINGH, R; DHANALAKSHMI, S. and RAO, A. Chemomodulatory action of *Aloe vera* on the profiles of enzymes associated with carcinogen metabolism and antioxidant status regulation in mice. *En: Phytomedicine*. Vol.7, N°3 (Jun 2000); P. 209-19.

STEENKAMP, V. and STEWART, M. Medicinal Applications and Toxicological Activities of *Aloe* Products. *OpenUP* (October 2007).

SUN-A, I; SUN-TACK, O; SUKGIL, S; MI-RAN, K; DONG-SEON, K; SUNG-SICK, W; TAE, J; YOUNG, P. and CHONG-KIL, L. Identification of optimal molecular size of modified Aloe polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. En: International Immunopharmacology. Vol.5 (2005); p. 271–279.

TOBAR, D. Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico *in Vitro* del extracto de alcaloides de Lirio pequeño (*Eucharis amazonica* planchon & linden) en cultivo de linfocitos humanos. Popayán. 2004. Trabajo de grado (Bióloga). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación. Unidad de Toxicología Genética y Citogenética.

VAZQUEZ, B; ÁVILA, G; SEGURA, D; ESCALANTE, B. Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. En: Ethnopharmacol. Vol.55, N°1 (Dec 1996); P.69-75.

VEGA, A; AMPUERO, N; DÍAZ, L. y LEMUS, R. El *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. En: Rev. Chil. Nutr. Vol.32, N°3 (Dic. 2005).

VIVEROS, J; MUÑOZ, J. Efecto cito-genotóxico *in vitro* del extracto acuoso de *morinda citrifolia* L. (noni) en linfocitos humanos. Popayán, 2006. Trabajo de grado (biólogo). Universidad del cauca. Facultad de educación. Unidad de Toxicología Genética y Citogenética.

VIZOSO, A; GARCÍA, A; RAMOS, A; PILOTO, J. y RIVERO, R. Derivados antraquinónicos del *Aloe vera* L. tamizaje Genotóxico. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. CIDEM (2000).

VUORELAA, P; LEINONENB, M; SAIKKUC, P; TAMMELAA, P; RAUHAD, J; WENNBERGE, T. and VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. En: Curr Med Chem. Vol.11, N°11 (Jun 2004); P.1375-89.

WILFLE, D; SCHMUTTE, C; WESTENDORF, J. and MARQUARDT, H. Hydroxyanthraquinones as tumor promoters: enhancement of malignant transformation of C3H mouse fibroblasts and growth stimulation of primary rat hepatocytes. En: Cancer Research. Vol.50 (1990); P. 6540-6544.

WOMBLE, D. and HELDERMAN, J. The impact of acemannan on the generation and function of cytotoxic T-lymphocytes. En: Mol Pharmacol. Vol.14, N°1-2 (1992); P.63-77.

XIU-FENG, Z; LING, X; YANG, L; JUN-FENG, X. and YA-LIN, T. Binding of the bioactive component Aloe dihydroisocoumarin with human serum albumin. En: Journal of Molecular Structure (2008).

YAGI, A ; EGUSA, T ; ARASE, M ; et al. Isolation and characterization of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells in vitro from Aloevera gel. En: Planta Med. Vol.63 (1997); P. 18-21.

_____ ; _____ ; TSUNODA, M; AKASAKI, K; and TSUJI, H. Immunochemical distinction of aloe vera, *A. arborescens*, and *A. chinensis* gels. En: Planta Medica. Vol.64, N°3 (1998); P. 277–278.

ZHANG, L. and TIZARD, I. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. En: Immunopharmacology. Vol.35, N°2 (Nov 1996); P.119-128.