



Evaluación preclínica del potencial terapéutico antitumoral del gel de *Aloe Vera*

Preclinical evaluation of the antitumor therapeutic potential of *Aloe Vera* gel

RUIZ PINELL, GRACE¹
TORREZ CHOQUE, CLAUDIA¹

CALLAPA RAFAEL, JORGIA¹
ÁVILA ILLANES, JUAN ANTONIO¹

FECHA DE RECEPCIÓN: 7 DE AGOSTO DE 2018

FECHA DE ACEPTACIÓN: 12 DE OCTUBRE DE 2018

Resumen

Se evaluó el gel de *Aloe vera* para determinar la capacidad antitumoral y potencializadora en modelo in vivo, desarrollado en ratones swiss albinos portadores de tumores inducidos experimentalmente con benzopireno. Luego de tratar a los animales con el gel de *Aloe vera* administrado de forma orogástrica a una dosis diaria de 88 mg/kg durante 75 días, se encontró una reducción significativa de un 60%, en la incidencia de tumores en pulmón, el grupo tratado con la combinación *Aloe vera* + cisplatino la incidencia de tumores se redujo a un 40%. La tasa de inhibición con el gel de *Aloe vera* fue de un 40% incrementándose a un 60% con la combinación *Aloe vera* + cisplatino, mientras que la multiplicidad tumoral para el grupo tratado con *Aloe vera* fue de 0.2 mostrando una disminución muy marcada con la combinación *Aloe vera* + cisplatino que fue de 0.7, paralelamente se realizó el potencial genotóxico sobre ensayos de micronúcleos y aberraciones cromo-

Abstract

The *Aloe vera* gel was evaluated to determine the antitumor and potentializing capacity in the in vivo model, developed in swiss albino mice carriers of tumors experimentally induced with benzopyrene. After treating the animals with the *Aloe vera* gel administered in an orogastric form at a daily dose of 88 mg / kg for 75 days, a significant reduction of 60% was found, in the incidence of lung tumors, the treated group with the combination of *Aloe vera* + cisplatin, the incidence of tumors was reduced to 40%. The inhibition rate with *Aloe vera* gel was 40% increasing to 60% with the combination of *Aloe vera* + cisplatin, while the tumor multiplicity for the group treated with *Aloe vera* was 0.2, showing a very marked decrease with the combination *Aloe vera* + cisplatin, the tumoral multiplicity obtained was 0.7, At the same time, the genotoxic potential was performed on micronucleus assays and chro-

¹ Unidad de Ensayos Biológicos - Bioterio, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés
* Correspondencia: gracefm@hotmail.com

sómicas en médula ósea donde no se evidencian signos de citotoxicidad en los grupos tratados con gel de Aloe vera y la combinación Aloe vera + cisplatino en relación al grupo de animales tratados con ciclofosfamida fármaco utilizado como control de toxicidad. Los resultados sobre aberraciones cromosómicas mostraron que los animales tratados solo con el gel de Aloe vera no presentaron anomalías cromosómicas, en relación al grupo tratado con cisplatino y al grupo control (benzopireno) donde se pudo observar: rotura de cromátidas, fragmentos acéntricos, anillos centrales, anillos dicéntricos, y la combinación de Aloe vera + cisplatino mostró una disminución importante en las aberraciones cromosómicas. Respecto al comportamiento hematológico, en todos los grupos de ensayo en relación a valores de referencia se encuentran disminuidos, especialmente en los grupos tratados con cisplatino y la combinación Aloe vera + cisplatino. Además, se realizó la citotoxicidad *in vitro* del gel de Aloe vera sobre eritrocitos, linfocitos y células normales MDCK y BHK-21 mostrando ser potencialmente no tóxico. Se puede concluir que en condiciones experimentales el gel de Aloe vera expuso un efecto antitumoral y potencializador del cisplatino en tumores de pulmón.

PALABRAS CLAVE

Aloe vera, antitumoral, potencializadora.

chromosomal aberrations in bone marrow where no evidence of cytotoxicity was observed in the groups treated with Aloe vera gel and the combination Aloe vera + cisplatin in relation to the group of animals treated with cyclophosphamide drug used as a toxicity control. The results on chromosomal aberrations showed that the animals treated only with the Aloe vera gel did not present chromosomal anomalies, in relation to the group treated with cisplatin and the control group (benzopyrene) where it could be observed: chromatid rupture, acentric fragments, central rings, dicentric rings, and the combination of Aloe vera + cisplatin showed a significant decrease in chromosomal aberrations. Regarding the hematological behavior, in all the test groups in relation to reference values are decreased, especially in the groups treated with cisplatin and the combination Aloe vera + cisplatin. In addition, the *in vitro* cytotoxicity of Aloe vera gel on erythrocytes, lymphocytes and normal cells MDCK and BHK-21 was shown to be potentially nontoxic. It can be concluded that under experimental conditions the Aloe vera gel exhibited an antitumor and potentiating effect of cisplatin in lung tumors.

KEY WORDS

Aloe vera, antitumor, potentializing

INTRODUCCIÓN

La unidad experimental fue el *Aloe vera* conocido como sábila, según referencias se puede utilizar para tratar tumores cancerígenos gracias a sus grandes propiedades, posee un efecto aún mayor en los sarcomas blandos ya que el acemanano, polisacárido presente en el gel del *Aloe vera*, sustancia activa principal, que le otorga a la planta el poder de reforzar el sistema inmune activando los macrófagos (fagocitos), los anticuerpos y las células asesinas. El acemanano es un componente destacado de este grupo de sustancias por sus aplicaciones en la medicina. Este compuesto está estructurado por una cadena principal de β -(1 \rightarrow 4) manosa con de β -(1 \rightarrow 4) glucosa insertada en el interior de la cadena principal y α -(1 \rightarrow 6) galactosa ramificada de la cadena principal. La sección molecular β -(1 \rightarrow 4) glucósido del acemanano es identificada como la responsable de los efectos terapéuticos del gel de sábila, dado que los humanos carecen de la capacidad de romper enzimáticamente estas cadenas. El acemanano contenido en la sábila es estructuralmente única, y es una sustancia característica de las especies de aloes, y algunas otras plantas. (Del Ángel 2010)

La sábila puede ayudar a prolongar el tiempo de supervivencia y estimular el sistema inmune de los pacientes con cáncer. Un estudio de 1994 publicado en el diario médico japonés *Yakhak Hoeji*, indica que ratones con tumores cancerosos fueron tratados con sábila oral durante 14 días. Aunque el tratamiento con sábila no suprimió el crecimiento del tumor, la vida media de los ratones fue prolongada un 22% (con dosis 50 mg/kg día) y un 32% (con dosis 100 mg/kg día). Un experimento simultáneo en células humanas con cáncer (fuera del cuerpo) encontró que las altas dosis de la sábila suprimieron perceptiblemente el crecimiento de estas células cancerígenas (Ruiz Caubin 2012).

Estos antecedentes permitieron plantear la evaluación del potencial terapéutico antitumoral del *Aloe vera* planta cultivada a 2932 m.s.n.m. considerada Aloe de altura en combinación con *cisplatino*.

El producto vegetal se recolectó de la localidad de Cahuayuma del Departamento de La Paz que presenta componentes orgánicos e inorgánicos y bioactivos en mayor proporción a otros Aloes cultivados a diferentes alturas. Se planteó un modelo *in vivo* a mediano plazo de 75 días induciendo tumores en pulmón con benzopireno en una primera fase, siguiendo protocolos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos OCDE y armonizando con estudios del potencial genotóxico sobre ensayos de micronúcleos y aberraciones cromosómicas. Los ensayos *in vitro* permitió monitorizar el comportamiento hematológico sobre eritrocitos y linfocitos. Se utilizaron células MDCK y BHK-21 para determinar la citotoxicidad.

El estudio experimental se realizó en la Unidad de Ensayos Biológicos – Bioterio de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, en concordancia al Certificado de Aval Ético código de registro CEI-UMSA0616 otorgado por el Comité de Ética de la Investigación de la UMSA CEI - UMSA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 20 ratones de la línea swiss albinos (*Mus musculus*) recién nacidos (<24h de edad) de ambos sexos, procedentes de la Unidad de Ensayos Biológicos-Bioterio (UEB-B) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA, cuyo peso corporal oscilaron entre 8 a 9 g.

Los animales fueron mantenidos a una temperatura de $21 \pm 3^\circ\text{C}$, la humedad entre $40 \pm 60\%$ y los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 horas. Alojados en jaulas de polipropileno con alimento balanceado estándar para esta especie (pellet) y agua *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos internacionales establecidos para investigación con animales de laboratorio indicados por la Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA).

Reactivos

Para la inducción de tumores se utilizó benzopireno (BP) obtenido de Sigma Aldrich (043K3524), a una dosis de 0.5 mg/kg/ratón.

Material vegetal

El material vegetal utilizado para el experimento fue gel obtenido de las hojas de *Aloe vera*, previo tratamiento fisicoquímico.

Diseño experimental

Administración y dosificación

A 20 ratones hembras recién nacidos (<24h de edad), se les administro por vía subcutánea en la región escapular por única vez con 0.02 mL de BP utilizando como vehículo una suspensión de gelatina acuosa al 1% para la inducción de tumores (Figura 1 - 2)

Figura 1. Ratones Suizos albinos recién nacidos (-24h de edad) Fuente UEB-B



Figura 2. Administración vía subcutánea en la región escapular con benzopireno. Fuente UEB-B



A los grupos experimentales tratados gel de *Aloe vera* se administraron a concentraciones que se ajustaron semanalmente en función al aumento del peso corporal.

Los 20 ratones fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro grupos:

Grupo I (*Aloe vera*): Los animales de este grupo recibieron 100 μ L de gel de *Aloe vera* durante 21 días (después del destete) por vía orogástrica.

Grupo II (*cisplatino*): Los animales de este grupo recibieron tratamiento con 2 mg/Kg de *cisplatino* por única vez por vía intraperitoneal, a los 21 días de inducido tumores con BP.

Grupo III (*cisplatino- Aloe vera*): Los animales de este grupo recibieron tratamiento a los 21 días de inducido tumores con BP con 2 mg/kg de *cisplatino* por única vez, y 100 μ L de *Aloe vera* simultáneamente durante 75 días.

Grupo IV (control): Los animales de este grupo no recibieron ningún tratamiento, solo fueron inducidos con BP.

Observaciones clínicas

Se realizaron observaciones clínicas diarias durante todo el ensayo tomando en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, detección de tumores por inspección visual, posibles afecciones respiratorias afecciones a nivel del sistema nervioso, estado de piel, pelo coloración de mucosas y ojos, además se realizó un control de peso desde el inicio del experimento hasta la culminación.

Eutanasia

Todos los animales fueron sacrificados por método químico con atmósfera de éter a las 10 semanas de vida (75 días) y sometidos a pruebas complementarias.

Exámenes realizados

Se realizaron pruebas que detectaron cambios morfofisiológicos correlacionados con la inhibición y progresión cancerígena como ser: Incidencia de tumores, estudios citogenéticos como la prueba de micronúcleos en medula ósea, análisis de aberraciones cromosómicas, y control hematológico. Además, se realizó la evaluación citotóxica *in vitro* en células de sangre periférica humana (eritrocitos y linfocitos) y en células normales MDCK (línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby) y BHK 21 (células normales del riñón de hámster dorado).

Incidencia de tumores

A todos los ratones sacrificados se les extirpo los pulmones y previo a la fijación con solución de Tellyesniczky (100 mL de etanol al 70%, 3 mL de formol y 5 mL de ácido acético glacial) se procedió al pesaje de los pulmones y al conteo de tumores en la superficie de la misma por inspección visual a través de una lente de aumento (lupa), con el fin de obtener un índice de incidencia, multiplicidad del tumor y el porcentaje de ratones portadores de tumor.

Estudios citogenéticos

Estos estudios permitieron registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias de causar un posible daño a nivel genético brindando información sobre la proliferación celular en médula ósea, además identificar la capacidad de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea

La prueba de micronúcleos, es un método ampliamente utilizado para la detección del daño genotóxico, producido por diferentes sustancias químicas y agentes físicos. Esta indica el daño de agentes mutagénicos sobre los cromosomas, mediante la identificación de fragmentos acéntricos y/o cromosomas rezagados. Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos, que espontáneamente o por causa de agentes genotóxicos, quedan fuera del núcleo durante la división celular. Este ensayo está incluido actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras, como la OECD y la agencia estadounidense para la Protección del Medio Ambiente (EPA) (OECD 2009; EPA, 1998).

Para este ensayo se extrajo el fémur de cada animal y la cavidad medular se lavó suavemente por flujo, introduciendo una aguja 29GX ½ con jeringa cargada con 1 mL de suero bovino fetal (SBF). La médula obtenida, diluida con el SBF, se centrifugó a 2500 rpm por 10 min, tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular disuelto en gotas del SBF en un portaobjetos (mínimo 2/animal). Después de montadas las láminas se mantuvieron a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron con metanol durante 10 min, para luego ser teñidos con la tinción panóptica rápida. Se utilizó además como control la ciclofosfamida fármaco antineoplásico.

El análisis se realizó a través de un microscopio LABOMED (100X con lente de inmersión). Se contabilizó la presencia de eritrocitos portadores de micronúcleos en 1000 cel/animal. Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad por la relación de la población total de eritrocitos vs. eritrocitos portadores de micronúcleos.

Análisis de aberraciones cromosómicas

El análisis de aberraciones cromosómicas se realizó en células de médula ósea 3 horas antes del sacrificio una vez finalizado el experimento. La división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (2mg/kg) por vía intraperitoneal. Una vez sacrificado el animal se extrajo el fémur de cada animal y la cavidad medular se lavó con 2 mL de suero bovino fetal (SBF). La suspensión celular se centrifugó, eliminando el sobrenadante. El botón fue tratado con una solución hipotónica (KCl 0.05 M) y centrifugado por segunda vez. El botón celular se fijó en una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 15 min, se realizaron 3 fijaciones con centrifugaciones sucesivas, y se extendieron en láminas húmedas con enfriamiento previo. Finalmente, las lá-

minas se secaron a medio ambiente y se tiñeron con Giemsa al 10% durante 30 min las aberraciones cromosómicas de observaron a través del microscopio con objetivo de inmersión anotándose roturas de cromosómicas, fragmentos, anillos e intercambios dicéntricos.

Control hematológico

El uso de productos de origen natural y productos como quimiopreventivos o como tratamiento a diversas enfermedades como el cáncer e inclusive productos de uso convencional no actúan exclusivamente sobre las células tumorales, afectan también a las células sanas, especialmente a las que tiene una gran capacidad de replicación o renovación. Las células *hematopoyéticas* (células progenitoras de las células sanguíneas) localizadas en la médula ósea, son las más expuestas a esta destrucción, efecto que se conoce como mielosupresión. La mayoría de quimioterápicos empleados producen la disminución de las células sanguíneas, al actuar sobre la maduración y proliferación de sus células precursoras. Para conocer los efectos que los quimioterápicos ejercen sobre las células sanguíneas se realizó un control hematológico a través de un hemograma completo de todos los grupos de ensayo vs. ratones sanos.

Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

La combinación del gel de *Aloe vera* + *cisplatino* y *cisplatino* se evaluó sobre eritrocitos y linfocitos de sangre periférica humana a través del método de coloración supravital con azul tripan por observación microscópica directa, para ello, las células se cultivaron a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio RPMI con 10% de suero bovino fetal (SBF) en placas de 96 pozos para cultivo celular. Se realizaron cinco diluciones triples seriadas de cada uno de los productos a partir de (2000, 1000, 500, 250 y 125 $\mu\text{g/gel}/100 \mu\text{L}$ de medio). Cada concentración de los compuestos, así como los controles se evaluó por triplicado. Los resultados se expresaron como la Concentración Citotóxica media (CC_{50}), que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50% de muerte celular.

Para las valoraciones en células de crecimiento adherente (MDCK y BHK 21), las células fueron cultivadas en frascos de 25 cm^2 de área, mantenidas en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), en una atmósfera húmeda del 100%, con 5% de CO_2 a 37 °C. Para la evaluación de la actividad citotóxica, se emplearon los cultivos en un 90% de confluencia. Las células se *tripsinizaron* y se contaron en cámara de Neubauer usando azul tripan al 0.4% y luego se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano, donde se sembraron 1×10^5 células por pozo, en 100 μL de medio. Tras un periodo de incubación de 24 h, estas células se trataron con el gel de *Aloe vera*, la combinación *Aloe vera* + *cisplatino* a diferentes concentraciones (2000, 1000, 500, 250 y 125 $\mu\text{g/gel}/100 \mu\text{L}$ de medio) disueltos previamente en medio RPMI. Como control se utilizaron células no tratadas por el producto y células tratadas con *cisplatino*. Como medida indirecta del efecto citotóxico, se cuantificó la viabilidad celular empleando el método de reducción del XTT que emplea sales de tetrazolio, técnica basada en la transformación mediante una deshidrogenada mitocondrial (succi-

nato-deshidrogenasa) del compuesto tetrazolio (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5[(phenylamino)carbonyl]-2H) en una sal de formazán, esta conversión sólo puede ser hecha por células metabólicamente activas obteniendo un producto naranja soluble en agua, el cual es medido directamente por absorción a 492 nm. La cantidad de formazán producido es proporcional al número de células presentes, las pruebas se realizaron por triplicado en tres repeticiones. Los valores de absorbancia obtenidos se usaron para calcular el porcentaje de supervivencia celular en función a la concentración de los extractos. Empleando un programa estadístico se calculó la concentración en la que el extracto causa la muerte al 50% de las células tratadas (CC_{50}).

RESULTADOS

El peso corporal de los ratones tratados con benzopireno (control) y *cisplatino* mostró una reducción significativa al final del experimento en relación con los ratones tratados con el gel de *Aloe vera* y la combinación *Aloe vera* + *cisplatino*. El peso de los pulmones no mostró diferencias entre los grupos, excepto en el grupo tratado con *cisplatino* donde se observa una ligera disminución (Tabla I).

Incidencia de tumores

La administración de benzopireno por única vez, permitió inducir tumores de pulmón con una incidencia del 100% (Figura 3). Después del tratamiento con gel de *Aloe vera* la incidencia de tumores en pulmón se redujo significativamente a un 60% (Tabla I). En el caso del grupo tratado con la combinación *Aloe vera* + *cisplatino*, droga convencional utilizado para el tratamiento de cáncer de pulmón la incidencia de tumores se redujo a un 40% al igual que con el tratamiento solo con *cisplatino*, con la diferencia que este último grupo presento ratones con metástasis en pulmón, estómago y piel. (Figura 4)

Figura 3. Incidencia de tumores: A Grupo I (gel de Aloe vera); B Grupo II (cisplatino); C Grupo III (cisplatino - Aloe vera); D Grupo IV (control). Fuente UEB-B



Tabla 1. Efecto preventivo y antitumoral del gel de *Aloe vera* en ratones *swiss albinos* inducidos con benzopireno

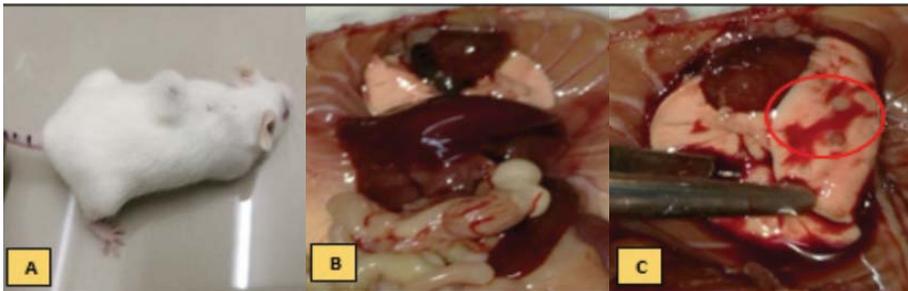
Grupo de ensayo	Número de ratones	Peso promedio de ratones (g)	Peso promedio de pulmones (g)	Incidencia de tumores (%)	Inhibición (%)	Multiplidad tumoral
Grupo I (<i>Aloe vera</i>)	20	27,04±0,84	0,3±0,08	60(8)*	40	0,2 (20)**
Grupo II (<i>cisplatino</i>)	20	23,86±0,91	0,25±0,05	40(8)*	60	0,5 (40)**
Grupo III (<i>cisplatino</i> - <i>Aloe vera</i>)	20	28,7±0,37	0,32±0,05	40(8)*	60	0,7 (70)**
Grupo IV (control)	20	22,13±0,58	0,32±0,05	100(20)*	0	1,04 (130)**

*Número de ratones portadores de tumores

** Total número de tumores

La tasa de inhibición con el gel de *Aloe vera* fue de un 40% incrementándose a un 60% en el grupo tratado con *cisplatino* y con la combinación *Aloe vera* + *cisplatino* con respecto al grupo control. La multiplicidad tumoral del grupo control fue de 1.04 mientras que del grupo tratado con *Aloe vera* fue de 0.2 mostrando una disminución muy marcada y con la combinación *Aloe vera* + *cisplatino* fue de 0.7. (Tabla 1)

Figura 4. Ratón con metástasis: Grupo II (*cisplatino*); A Tumor en piel; B tumor en estómago. Fuente UEB-B



Estudios citogenéticos

Ensayo de micronúcleos en médula ósea

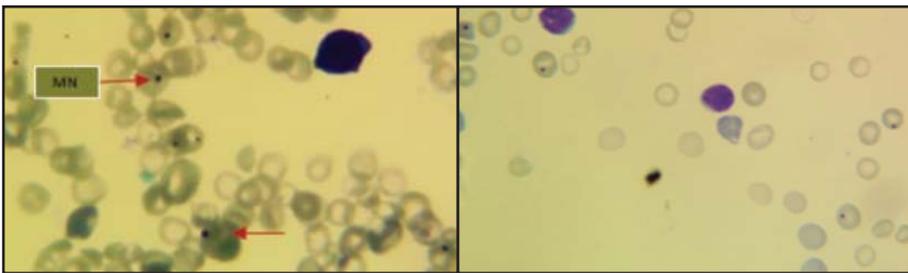
En el presente estudio no se encontró signos clínicos de toxicidad en el Grupo III (*Aloe vera* + *cisplatino*) en relación a la frecuencia inducida con ciclofosfamida fármaco utilizado como control positivo de toxicidad destacándose como un clastógeno químico de gran potencia. Los Grupos I, II mostraron un ligero aumento en los valores con referencia al control negativo es decir a la frecuencia basal de ratones sanos portadores de micronúcleos espontáneos en esta especie y un mucho más acentuado se observó en el Grupo IV. (Tabla 2)

Tabla 2. Índice de citotoxicidad con micronúcleos en medula ósea de ratones swiss albinos

Grupo I (Aloe vera)	Grupo II (cisplatino)	Grupo III (cisplatino - Aloe vera)	Grupo IV (control)	Frecuencia inducida (ciclofosfamida)	Frecuencia basal
6,8±1,78	6,6±2,01	5,4±4,03	7±1,73	33,4±6,2	5,4±0,54

Este ensayo demostró que el gel de *Aloe vera* según la dosis y la vía empleada no es tóxico a nivel sistémico ni a nivel de células de la medula ósea.

Figura 5. Micronúcleos (MN) en eritrocitos de médula ósea inducida con ciclofosfamida. Fuente UEB-B



Análisis de aberraciones cromosómicas

El grupo tratado con benzopireno (Grupo control) mostro anomalías cromosómicas a las 10 semanas en células de medula ósea. En el Grupo II, se observó aumentos significativos de estos cambios (rotura de cromátides, anillos centrales, anillos dicéntricos, intercambio y fragmentos) (Figura 6). El Grupo I tratado solo con el gel de *Aloe vera* no presentó anomalías cromosómicas (Figura 7). También cabe hacer notar que la combinación de *Aloe vera* + *cisplatino* mostró una disminución importante en las aberraciones cromosómicas (Tabla 3).

Figura 6. Aberración cromosómica: Grupo IV - control (rotura de cromátides, anillos centrales, anillos dicéntricos, intercambio y fragmentos) Fuente UEB-B



Figura 7. Aberración cromosómica: Grupo I tratado sólo con el gel de Aloe vera.
Fuente UEB-B

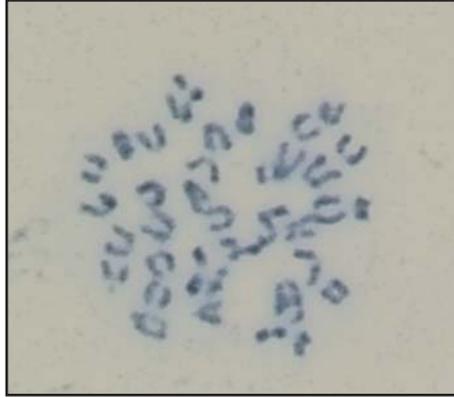


Tabla 3. Efecto preventivo del gel de *Aloe vera* en aberraciones cromosómicas en ratones swiss albinos inducidos con benzopireno

Grupo de ensayo	Rotura de cromátides (%)	Anillos centrales (%)	Anillos dicéntricos (%)	Intercambio (%)	Fragmentos (%)
Grupo I (Aloe vera)	0,12±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,86±0,28
Grupo II (cisplatino)	11,3±0,02	1,24±0,18	2,01±0,42	1,23±0,32	102±0,89
Grupo III (cisplatino - Aloe vera)	1,72±0,08	0,8±0,26	1,12±0,42	0,65±0,16	8,23±1,60
Grupo IV (control)	10,3±0,82	1,22±0,08	1,98±0,56	1,18±0,28	96,42±1,06

Control hematológico

Se analizaron los resultados del comportamiento hematológico en todos los grupos de ensayo en relación a valores de referencia establecidos con anterioridad. Observamos que en el recuento de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina los valores se encuentran marcadamente disminuidos en los cuatro grupos de estudios en relación a los valores de referencia, especialmente en los grupos tratados con *cisplatino* y con la combinación *Aloe vera* + *cisplatino*. También cabe hacer notar el aumento considerable en la velocidad de eritrosedimentación en todos los grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Comportamiento del cuadro hematológico de ratones tratados con gel de *Aloe vera* y cisplatino en ratones swiss albinos inducidos con benzopireno

Grupos de Ensayo	Eritrocitos Mill./mm ³	Reticulocitos %	Hematocrito %	Hemoglobina g/dL	VCM fL	HCM pg	CHCM g/dL	Plaquetas Mill./mm ³	VES mm./1h
Grupo I (Aloe vera)	4,18±0,31	2,7±0,7	43,6±0,89	13,6±1,51	105,17±9,56	32,6±3,55	31,16±3,13	348,2±90,22	6,2±3,27
Grupo II (cisplatino)	4,31±0,42	3,2±1,75	40±3,74	13,45±2,08	93,15±10,05	31,17±3,51	33,48±2,23	248,5±23,89	6±2
Grupo III (cisplatino-Aloe vera)	4,31±0,40	2,280,64	38±2,54	12,12±0,77	89,2±13,77	28,37±3,50	31,92±1,34	327,4±66,54	9,6±0,89
Grupo IV (control)	5,13±0,40	8,36±2,01	43,6±0,89	13,84±0,56	85,43±8,31	50,34±32,39	31,77±0,87	293±53,19	5,6±1,94

VCM= Volumen Corpuscular Medio

HCM=Hemoglobina corpuscular medio

CHCM=Concentración Hemoglobina Corpuscular Medio

VES= Velocidad de eritrosedimentación

UEB-B= Unidad de Ensayos Biológicos

En relación al comportamiento de la serie blanca los grupos I, III y IV mostraron una disminución de los valores de leucocitos y linfocitos. También se pudo observar un aumento en los valores de neutrófilos y eosinófilos según valores de referencia (Tabla 5).

Tabla 5. Comportamiento de la serie blanca de ratones tratados con gel de *Aloe vera* y *cisplatino* en ratones swiss albinos inducidos con benzopireno

Grupos de Ensayo	Leucocitos mm ³	Linfocitos %	Neutrófilos %	Eosinófilos %	Basófilos %	Monocitos %
Grupo I (<i>Aloe vera</i>)	2,61±0,45	70,2±5,06	22,8±5,97	5,6±3,84	00±00	0,2±0,44
Grupo II (<i>cisplatino</i>)	3,45±1,32	81,75±5,5	15±5,58	3,25±1,19	00±00	0,25±0,028
Grupo III (<i>cisplatino-Aloe vera</i>)	2,9±0,69	65,4±6,61	23,6±6,10	10,8±2,77	00±00	0,2±0,44
Grupo IV (control)	2,91±1,31	62±8,71	9,8±5,26	8±6,08	00±00	0,4±0,54
Referencia (UEB-B)	3,5±1,36	87±4,1	11,6±4,345	1±0,51	00±00	0,6±0,70

Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

La evaluación de la citotoxicidad en eritrocitos mostró una CC_{50} de 4985.7 $\mu\text{g/mL}$ para el gel de *Aloe vera*, para el *cisplatino* una CC_{50} de 1968.9 $\mu\text{g/mL}$ y para la combinación *Aloe vera* + *cisplatino* de 3161.8 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas de exposición (Tabla 6). Esto revela que el gel de *Aloe vera* y la combinación *Aloe vera* + *cisplatino* no causan mortalidad de los eritrocitos siendo potencialmente no tóxico, el *cisplatino* muestra una marcada diferencia en relación a los otros dos.

La pureza y viabilidad de los linfocitos se analizó mediante observación directa en microscopio de contraste de fase. En los ensayos se obtuvo un 90% de linfocitos purificados por adhesión de monocitos al plástico. La viabilidad celular con Azul Tripán a las tres horas de incubación para su purificación arrojó el 100%. La evaluación de la citotoxicidad en linfocitos mostró que la Concentración Citotóxica Media (CC_{50}) del gel de *Aloe vera* fue de 4550.72 $\mu\text{g/mL}$, para el *cisplatino* fue de 1331.09 $\mu\text{g/mL}$ y para la combinación *Aloe vera* + *cisplatino* fue de 1955.73 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas de exposición. Esto revela que el gel de *Aloe vera* y la combinación *Aloe vera* + *cisplatino* no causan mortalidad de los linfocitos.

La evaluación de la citotoxicidad mostró que la Concentración Citotóxica (CC_{50}) del *Aloe vera* fue de 1095,6 $\mu\text{g/mL}$ para las células MDCK y de 994,1 $\mu\text{g/}$

mL para las células BHK-21. Para la combinación *Aloe vera* + *cisplatino* en las células MDCK fue de 664.9 $\mu\text{g/mL}$ y para las células BHK-21 fue de 465.9 $\mu\text{g/mL}$. El *cisplatino* mostró un CC_{50} para las células MDCK de 552,1 $\mu\text{g/mL}$ y para las células BHK-21 de 455,5 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 horas de exposición. Esto revela que el gel de *Aloe vera* para ambas células no mostró toxicidad (Tabla 6). Según los criterios definidos por el Programa de Estudio de Enfermedades Tropicales PECET los productos *Aloe vera*, *cisplatino* y la Combinación *Aloe vera* + *cisplatino* estaría considerada como potencialmente no tóxico.

Tabla 6. Evaluación citotóxica *in vitro* de del gel de *Aloe vera*, *Aloe vera* + *cisplatino* y *cisplatino* en eritrocitos, linfocitos y líneas celulares BHK-21 y MDCK.

	Eritrocitos $\text{CC}_{50}\mu\text{g/mL}$	Linfocitos $\text{CC}_{50}\mu\text{g/mL}$	Línea celular MDCK $\text{CC}_{50}\mu\text{g/mL}$	Línea celular BHK-21 $\text{CC}_{50}\mu\text{g/mL}$
Aloe vera	4987,7	4550,72	1095.6	994,1
Aloe vera + cisplatino	3161,8	1955,73	664.9	465.9
Cisplatino	1968,9	1331,09	552.1	455.5

Interpretación de resultados (CC_{50}): (Criterios definidos por el Programa de Estudio de Enfermedades

Tropicales PECET)

<10 $\mu\text{g/mL}$: Muy tóxico

>10<100 $\mu\text{g/mL}$: Tóxico

>100 y < 1000 $\mu\text{g/mL}$: Medianamente tóxico

> 1000 $\mu\text{g/mL}$: Potencialmente no tóxico

CONCLUSIONES

La aplicación del benzopireno a ratones swiss albinos hembras recién nacidos (< 24h de edad) a dosis 0,5 mg/kg de peso, vía subcutánea en la región escapular, indujo tumores en pulmón a los 21 días en el 100% de animales inoculados. Los tumores se presentaron únicos o dobles con localización principalmente en pulmón, llegando a alcanzar volúmenes de 3 mm. Sin embargo, algunos ratones tratados con *cisplatino* presentaron metástasis en pulmón, estómago y piel. Este trabajo demostró que la utilización del gel de *Aloe vera* como tratamiento por sí solo y combinado con un agente neoplásico inhibe el crecimiento de tumores en 75 días, por lo tanto, representa una alternativa importante capaz de revertir el proceso de carcinogénesis suprimiendo la promoción de tumores. Este compuesto ha sido estudiado extensivamente verificando que no presenta toxicidad a nivel sistémico ni toxicidad génica. La investigación demuestra que la dosis utilizada fue tolerada por los animales y su eficacia fue del 100%, además no mostraron casos de toxicidad y deterioro de los animales por la administración del producto. Los estándares internacionales de evaluación de compuestos de origen natural con potencial uso en medicina, recomiendan la realización de estudios preclínicos usando líneas celulares establecidas o células humanas cultivadas *in*

vitro. Para el caso de las células humanas, se prefieren aquellas más susceptibles al efecto tóxico de la sustancia, como lo son los eritrocitos y otras células de la sangre, que son muy susceptibles al efecto de una gran variedad de estímulos, como las radiaciones, bacterias y compuestos, en este trabajo se pudo observar el potencial no tóxico del gel de *Aloe vera*, su efecto antitumoral y potencializador del *cisplatino* a través del estudio *in vivo* e *in vitro* realizado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento de los recursos concursables IDH de la Universidad Mayor de San Andrés, gestión 2016-2017. De la misma manera agradecer a los pobladores de la región de Cahuayuma a través de su representante el Sr. German Larico por haber proporcionado el material vegetal y al Ing. Agrónomo Juan Alfonso Quipe Alí quien colaboró con la recolección del *Aloe vera* para el presente estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Del Angel, E. (2010). Acción biomédica y potencial económica de la sábila (*Aloe barbadensis* M.) pp. 13-18
- El-Shemy, H.A., Aboul-Soud, M.A.M., Nassr-Allah, A.A., Aboul-Enein, Kabash, K.M., A. and Yagi, A. (2010). Antitumor Properties and Modulation of Antioxidant Enzymes' Activity by *Aloe vera* Leaf Active Principles Isolated via Supercritical Carbon Dioxide Extraction Current Medicinal Chemistry.17, 129-138
- Furstenberger, G., Schurich, B., Kaina, B., Petrussevska, R.T., Fwenig, N.E. and Mark, F. (1989) Tumor induction in initiated mouse skin by phorbol esters and methyl methanesulfonate: correlation between chromosomal damage and conversion (Stage I of tumor promotion) *in vivo*. Carcinogenesis, 10, 749-752.
- González, A. D., Sabana, V. C. (2015) Efecto inmunomodulador de *Brassica oleracea* l.var. *Botrytis "coliflor"* sobre células inmunes en *mus musculus* var. Swiss isogénicos con cáncer experimental "Ciencia y Tecnología", 4, 139-153
- Haesen, S., Timmermans, M. and Kirsch-Volders, M. (1993) Induction of micronuclei and karyotype aberrations during *in vivo* mouse skin carcinogenesis. Carcinogenesis, 14, 2319-2327.
- Hayashi, M., Tice, R.R., Macgregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Kirsch-Volders, M., Oleson, F.B., Jr, Pacchierotti, F., Romaya, F., Shimada, H. et al. (1994) *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. Mutat. Res., 312, 293-304.
- Kaina, B. (1989) Chromosomal aberrations as a contributing factor for tumor promotion in the mouse skin. Teratog. Carcinog. Mutagen, 9, 331-348.
- Morales, P., Vallarino, T., Cruz, V.L. (2017). The OECD's micronucleus test guideline for single exposure to an agent the genotox-kinetic alternative. Mutagenesis, 1; 32 (4): 411-415
- Ohyama, W., Gonda, M. and Miyajima, H. (2002) Collaborative validation study of the *in vivo* micronucleus test using mouse colonic epithelial cells. Mutat. Res., 518, 39-45.
- Ruiz, A.F., Ruiz, J.A., Brito, E.M., Navarro, R. (2012). Aplicaciones Terapéuticas del *Aloe vera*. Revista Canarias Médica y quirúrgica. 9 (27), 3-4
- Steinel, N.H., Bonin, A.M., He, S. and Baker, R.S. (1993) Cytogenetic damage and tumor incidence in mouse skin after single, topical applications of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene. Mutat. Res., 285, 19-26.
- Winters, W.D., Benavides, R., Clouse, W.J. (1981). Efectos de extractos de *Aloe Vera* en las células normales y tumorales humanas *in vitro*. Econ. Bot. 35: 89-95.
- Yun, T.K., Kim, H.S. and Lee, Y.S. (1995) Trial of new medium term model using benzo (a) pyrene induced lung tumor in newborn mice. Anticancer Res., 15, 839-845.