



Comparación de la citotoxicidad del amaranto en dos líneas celulares de mamífero utilizando bioensayos colorimétricos rápidos

Santa María A, López A, Díaz MM, Ortiz AI

Serv. de Biotecnología. CNA (Inst. de Salud Carlos III). 28220 Majadahonda, Madrid (España). Tel. 91 509 79 00, Ext. 3094.

e-mail:asantamaria@isciii.es

Recibido 16 de Diciembre de 2000 / Aceptado 7 de Mayo de 2001

Resumen: El amaranto es un colorante de color rojo ampliamente utilizado en alimentación y cosmética. En la bibliografía consultada no se han encontrado referencias sobre la citotoxicidad de este colorante por lo que se ha creído oportuno abordar su estudio. Este estudio se ha llevado a cabo en dos líneas celulares de naturaleza fibroblástica: línea celular 3T3 (fibroblastos de origen embrionario de ratón) y línea celular FP (fibroblastos de origen embrionario humano). La citotoxicidad fue evaluada mediante dos bioensayos: *a*) ensayo de rojo neutro (RN); *b*) ensayo de proteína total (PT).

Se han calculado las IC_{50} del amaranto en ambas líneas celulares, observándose mayor sensibilidad al colorante con las células 3T3 que con los fibroblastos humanos.

Palabras clave: amaranto, citotoxicidad, fibroblastos de mamífero.

Abstract: Comparison of amaranth cytotoxicity in two mammalian cell lines using rapid colorimetric bioassays. A red dye, called amaranth, is widely used in the food and cosmetic industry. There are few references about cytotoxicity of this dye; for this reason, we have considered of interest to realize this work. This study was performed in two cell lines: human fibroblasts (FP) and mouse fibroblasts (3T3). The cytotoxic effects of amaranth were evaluated by two endpoint systems: *a*) neutral red (NR) uptake assay and *b*) total protein content (PT).

The IC_{50} values were calculated. The results showed that 3T3 cells were more sensible than human fibroblasts.

Key words: amaranth, cytotoxicity, and mammalian fibroblasts.

Introducción

El amaranto es un colorante de color rojo, también llamado kiwicha fue en la antigüedad el grano sagrado de los aztecas, parece un cereal pero pertenece a otra familia botánica. El amaranto también es una buena fuente de minerales, sobre todo hierro, magnesio y calcio. Este colorante es ampliamente utilizado tanto en la industria cosmética como en la alimentaria. Los colorantes nítricos, entre los que se encuentra el amaranto, al llegar al tracto gastrointestinal sufren la acción de la flora bacteriana, que posee una actividad nitroreducta-

sa responsable de la transformación fundamental: el enlace N = N se rompe, apareciendo aminas cíclicas que pueden presentar distintas cinéticas de absorción. Esta etapa es por lo tanto primordial y ha justificado las diversas investigaciones sobre el riesgo toxicológico inducido, algunos autores [1] estudiaron de los efectos de la administración en una sola dosis en la alimentación en ratas observando alteraciones en la membrana del intestino delgado.

En la bibliografía consultada se han encontrado diferentes estudios sobre aspectos inmunológicos de colorantes alimentarios [2] y otros de carcinogenicidad y teratogenicidad [3,4]. Por otro lado, algunos autores [5] hicieron una revisión sobre la genotoxicidad de algunos colorantes azoicos utilizados en alimentación y cosmética. Sin embargo, son muy escasos los datos encontrados acerca de la citotoxicidad de este colorante, por lo que en el presente trabajo se ha considerado oportuno ampliar estos estudios.

Material y Métodos

Materiales

Producto

El amaranto (N° Registro CAS 915-67-3) fue suministrado por SIGMA. La muestra fue disuelta en agua para obtener las concentraciones objeto de estudio (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 2,5 mg/ml), las cuales posteriormente se esterilizaron por ultra filtración con membranas Millipore de 0,22 mm de poro. Las soluciones se prepararon inmediatamente antes de ser utilizadas.

Líneas celulares

El estudio ha sido llevado a cabo en dos líneas celulares de origen fibroblástico: línea celular 3T3, fibroblastos de origen embrionario de ratón y FP, fibroblastos de origen embrionario humano. En cada experimento, las células fueron obtenidas a partir de viales en congelación. Los cultivos fueron mantenidos en medio MEM suplementado con suero fetal

bovino al 10% y 1% de solución de antibióticos (penicilina 10000 U/estreptomicina 10000 mg/ml) en atmósfera de CO₂ (5%) a 37 °C.

Las células son recolectadas y diluidas a una concentración de 2×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos, manteniéndolas en incubación durante 24h antes del periodo de tratamiento. El experimento con las concentraciones escogidas se repitió con tres ensayos independientes.

Métodos

Ensayo del rojo neutro (RN)

La técnica seguida es la de Borenfreund y Puerner [6]. Este método está basado en la medida de la inhibición del crecimiento celular provocada por la sustancia objeto de estudio, empleando rojo neutro, colorante vital que es absorbido por las células vivas. Después de un periodo de tratamiento de 24 h con la sustancia problema en el medio de cultivo con suero bovino fetal (10%), se retiró el medio y se añadió una solución de rojo neutro (50 mg/ml), y después de 3 h de incubación *in situ*, las placas se lavaron con solución salina buffer fosfato (PBS), y se añadió una solución de etanol: ácido acético. La absorbancia en cada pocillo se midió a 540 nm en un lector de placas MRX II (DYNEX).

Ensayo de proteína total (PT)

El método utilizado es el propuesto por Knox y cols. [7], empleando el colorante azul de Coomassie para teñir la proteína celular. Una vez finalizado el periodo de tratamiento con las distintas concentraciones de la sustancia problema en medio suplementado con 10% de suero bovino fetal, las células se tiñeron durante 30 min. con la solución del colorante después de eliminar esta solución, se añadió 200µl/pocillo de una solución de acetato potásico 1M en alcohol al 70%. La absorbancia en cada pocillo se midió a 620 nm en un lector de placas MRX II (DYNEX).

Resultados

Las Tablas 1 y 2 representan la media \pm la desviación estándar de los resultados de la citotoxicidad de las diferentes concentraciones del amaranto en los tres ensayos independientes realizados con las dos líneas celulares. Se ensayaron cinco concentraciones de amaranto, en un rango amplio teniendo en cuenta los límites permitidos tanto en la industria cosmética como alimentaria, utilizando dos ensayos diferentes de citotoxicidad (RN y PT).

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos con los fibroblastos humanos (FP). La inhibición del crecimiento celular fue similar en los dos ensayos, no observándose efecto citotóxico en ninguna de las concentraciones ensayadas, aunque la mayor inhibición de crecimiento observada fue a la concentración más alta ensayada (2,5 mg/ml).

Los resultados obtenidos con los fibroblastos de ratón (3T3) se muestran en la Tabla 2. La inhibición del crecimiento celular fue muy similar en los dos sistemas

Tabla 1. Crecimiento celular en % (media \pm desviación estándar) con fibroblastos humanos (FP). RN (rojo neutro), PT (proteína total)

Concentración (mg/ml)	RN	PT
0,5	90,7 \pm 3,12 ns	87,6 \pm 1,72*
1,0	83,6 \pm 1,3*	81,0 \pm 0,75**
1,5	76,6 \pm 6,04 ns	88,6 \pm 3,75 ns
2,0	71,6 \pm 3,31*	74,0 \pm 6,07*
2,5	61,6 \pm 7,12*	82,6 \pm 1,05**

ns, no significativo. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ (t Student)

Tabla 2. Crecimiento celular en % (media \pm desviación estándar) con fibroblastos de ratón (3T3). RN (rojo neutro), PT (proteína total).

Concentración (mg/ml)	RN	PT
0,5	58,6 \pm 5,46*	50,0 \pm 2,2**
1,0	59,0 \pm 4,56*	69,3 \pm 6,19*
1,5	55,6 \pm 3,7*	59,6 \pm 5,5*
2,0	47,0 \pm 2,3**	26,3 \pm 3,47**
2,5	11,0 \pm 0,13**	13,3 \pm 0,62**

* $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ (t Student)

empleados, siendo muy relevante en las concentraciones más altas ensayadas. Los valores de las IC₅₀ del amaranto en esta línea celular fueron muy similares en los dos ensayos utilizados (RN y PT), siendo de 1,81 y 1,61 mg/ml, respectivamente.

Los datos obtenidos en nuestros ensayos ponen de manifiesto una mayor sensibilidad de las células 3T3 (fibroblastos de ratón), respecto a la mostrada por los fibroblastos humanos (FP), cuando se evaluó la citotoxicidad del amaranto en las condiciones anteriormente descritas.

Para el análisis estadístico de los resultados se ha utilizado el test de la *t* de Student.

Discusión

Los ensayos de citotoxicidad empleados en este estudio (RN y PT) son ampliamente utilizados para evaluar la toxicidad *in vitro* de productos químicos [8]. Los resultados obtenidos han mostrado que la citotoxicidad fue similar independientemente del método de ensayo empleado, apoyando así el concepto de citotoxicidad basal [9].

Sin embargo, la sensibilidad de las dos líneas celulares empleadas para estudiar la citotoxicidad del amaranto fue diferente, siendo los fibroblastos de ratón (3T3) más sensibles que los fibroblastos humanos (FP). Esta sensibilidad queda reflejada al observar los valores de IC₅₀. Cuando los ensayos se realizaron con células 3T3

(fibroblastos de ratón) los valores de IC₅₀ fueron de 1,81 y 1,61 mg/ml (RN y PT respectivamente) y con los fibroblastos humanos (FP), estos valores fueron superiores a 2,5 mg/ml.

Los datos encontrados en la bibliografía muestran resultados de toxicidad y genotoxicidad contradictorios. Algunos autores [10] mostraron la ausencia de genotoxicidad del amaranto en células germinales de *Drosophila melanogaster*. Sin embargo, otros [11] observaron evidencia de genotoxicidad, ya que la ingestión de colorantes azoicos parece ser una fuente potencial de agentes genotóxicos por reducción de estos compuestos. Por otro lado [12], algunos utilizaron el ensayo FETAX para demostrar el bajo o nulo potencial teratogénico del amaranto. En 1984 otros autores [13] estudiaron la mutagenicidad en *Salmonella typhimurium* de muestras de orina de animales tratados con amaranto; mientras que otros [14] anteriormente habían mostrado la ausencia de actividad mutagénica de este colorante usando las cepas TA98 y TA100. Algunos autores [15] observaron concentraciones citotóxicas de algunos colorantes azoicos utilizando células de origen fetal de hepatocitos de rata.

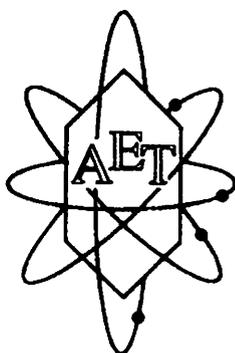
Nuestros resultados están en la misma línea de los datos obtenidos en la bibliografía revisada, apoyando la conveniencia de utilizar una batería amplia de ensayos tanto para evaluar la citotoxicidad como la genotoxicidad de un producto químico.

Agradecimientos

Los autores dan las gracias a E. Tebar y A. Polaina por su ayuda técnica.

Bibliografía

1. Kimura T, Hasegawa K, Imamura H, Yoshida A (1983) Mechanisms of adverse effect of amaranth feeding in the rat. *J Nutr Vitaminol* 29: 153-9.
2. Koutsogeorgopoulou L, Maravalias C, Methenitou G, Koutselinis A (1998) Immunological aspects of the common food colorants, amaranth and tartrazine. *Vet Hum Toxicol* 40: 1-4.
3. Tamaka T (1992) Effects of amaranth on F-1 generation mice. *Toxicol Lett* 60: 315-324.
4. Tamaka T (1993) Reproductive and neurobehavioral effects of amaranth administered to mice in drinking water. *Toxicol Ind Health* 9: 1027-1035.
5. Combes R, Haveland-Smith D (1982) A review of genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo riphenylmethane and xanthene dyes. *Mutat Res* 98: 101-248
6. Borenfreund E, Puerner J.A (1984) A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD / NR-90). *J Tissue Cult Meth* 9: 7-9.
7. Knox P, Uphill PF, Fry JR, Benford DJ, Balls M (1986) The Frame Multicentre Project on *in vitro* Cytotoxicity. *Food Chem Toxicol* 24: 457-463.
8. Ekwall B, Bondesson L, Hellberg S, Högberg J, Romert L, Stenberg K., Walum E (1991) Validation of *in vitro* toxicity tests: Past and present strategies. *ATLA* 19: 226-233.
9. Ekwall B (1995) The basal cytotoxicity concept. In: A. Goldberg and L. Zutphen, Eds. *Alternative Methods in Toxicology*. Vol. II: pp 721-725.
10. Tripathy NK, Nabi MJ, Sahu GP, Kumar AA (1995) Genotoxicity testing of two red dyes in the somatic and germ line cells of *Drosophila*. *Food and Chemical Toxicology* 33: 923-927.
11. Sweeney EA, Chipman JK, Forsythe SJ (1994) Evidence for direct-acting oxidative genotoxicity by reduction products of azo dyes. *Environmental Health Perspectives* 102:119-122.
12. Bantle J.A, Fort DJ, Rayburn JR, De Young DJ., Bush SJ. (1990) Further validation of FETAX: Evaluation of the developmental toxicity of five known mammalian teratogens and non-teratogens. *Drug Chem Toxicol* 13: 267-282.
13. Edwards CN, Combes RD (1989) Mutagenicity studies of urine and faecal samples from rats treated orally with the food colouring. *Food Chem Toxicol*. 22: 593-597.
14. Izbirik A, Sumer S, Diril N (1990) Mutagenicity testing of some azo dyes used as food additives. *Microbiology Bulletin* 24: 48-56.
15. Sako F, Kobayashi N, Watabe H, Taniguchi N (1980) Cytotoxicity of food dyes on cultured foetal rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 54: 285-92.



Asociación Española de Toxicología

aetox@uhm.es

Revista de Toxicología

revista.toxicologia@ccma.csic.es

<http://tox.umh.es/aet/revista/>