

## ASSESSMENT OF THE GENOTOXICITY OF A COMMERCIAL INSTANT SOUP USING *VICIA FABA* MICRONUCLEUS TEST AND CD-1 MICE MICRONUCLEUS TEST

### EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UNA SOPA INSTANTÁNEA COMERCIAL UTILIZANDO LA PRUEBA DE MICRONUCLEOS EN *VICIA FABA* Y RATÓN CD-1

<sup>1,1,5</sup>Saúl Flores-Maya, <sup>2,4</sup>Raul Ríos Torres, <sup>3,3</sup>Sandra Gómez-Arroyo, <sup>4,1</sup>Arturo Rosas Cipriano, <sup>5,1</sup>Norberto Alarcón Herrera, <sup>6,2</sup>Héctor Barrera Escorcía y <sup>7,2</sup>María del Pilar Villeda Callejas.

<sup>1</sup>Laboratorio de Recursos Naturales, UBIPRO. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México, 54090.

<sup>2</sup>Laboratorio de Microscopia, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. De los Barrios, No.1 Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México, 54090.

<sup>3</sup>Laboratorio de Genotoxicología Ambiental, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, D.F., México.

<sup>4</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4. Universidad Nacional Autónoma de México, Km 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México CP.54714

<sup>5</sup>Universidad del Valle de México campus Lago de Guadalupe Prolongación. Paloma No.7 Col. Lago de Guadalupe, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.C.P.54760.

#### ABSTRACT

Due to the high market demand that instant soup has among the Mexican population, the question arose whether it may cause any mutagenic effects after its consumption. The aim of this study was to analyze the cyto-genotoxic effects caused after the exposure of this food product compounds to meristematic root cells of *Vicia faba* and to peripheral blood cells of CD-1 mice. To determine this effect, it was performed both analysis of micronuclei as well as toxicity degree by using these two biological models. The interpretation of our statistical significance tests (ANOVA and Dunnett's multiple comparison  $p < 0.05$ ), allowed us to conclude that neither the soup chemical compounds nor the packaging induce clastogenic damage but they cause a slight delay on cell division in *V. faba*; nevertheless the compounds can cause clastogenic damage and cytotoxicity to peripheral blood cells of CD-1 mice.

**Key words:** monosodium glutamate, dioxins, polychromatic cells, root apical meristems.

Correspondence to author

1,1 [saulsel@unam.mx](mailto:saulsel@unam.mx) 2,4 [maruchan\\_73r@hotmail.com](mailto:maruchan_73r@hotmail.com) 3,3 [slga@atmosfera.unam.mx](mailto:slga@atmosfera.unam.mx)

4,1 [arturorosas.cip@gmail.com](mailto:arturorosas.cip@gmail.com) 5,1 [nor\\_hammettesp@hotmail.com](mailto:nor_hammettesp@hotmail.com)

6,2 [hectorbarrerae@hotmail.com](mailto:hectorbarrerae@hotmail.com) 7,2 [mapili\\_villeda@yahoo.com.mx](mailto:mapili_villeda@yahoo.com.mx).

Manuscrito recibido el 18 de julio de 2014, aceptado el 20 de agosto de 2014.

## RESUMEN

Debido a la gran demanda comercial que tiene la sopa instantánea en la alimentación de la población mexicana, se planteó el riesgo mutagénico de su consumo. El objetivo de este estudio fue analizar los efectos cito-genotóxicos después de la exposición de los componentes de este producto alimenticio en células meristemáticas radiculares de *Vicia faba* y en células de sangre periférica de ratón CD-1. Para determinar este efecto se realizó el análisis de micronúcleos y la evaluación del grado de toxicidad empleando estos dos modelos biológicos. La interpretación de las pruebas estadísticas (ANOVA y la prueba múltiple de Dunnett  $p < 0.05$ ), permitieron concluir que los componentes químicos mezclados de la sopa y su envase no inducen daño clastogénico, pero sí un ligero retraso en la división celular de *V. faba*, en cambio, pueden provocar daño clastogénico y son tóxicas en células de sangre periférica del ratón CD-1.

**Palabras clave:** glutamato monosódico, dioxinas, células policromáticas, meristemas radiculares.

## INTRODUCCIÓN

Entre las pruebas genotóxicas con plantas y animales el ensayo de micronúcleos es un biomarcador de la inestabilidad del genoma y daño cromosómico, que se ha utilizado como criterio indirecto de valoración en células, que presuntamente reflejan alteraciones cromosómicas más específicas pertenecientes a la carcinogénesis (Te-Hsiu Ma et al., 1995; Askin y Sultan, 2007; Iarmarcovai et al., 2008).

En el presente siglo, el ensayo de micronúcleos ha sido considerado como evidencia de daño cromosómico y como marcador de estados tempranos de enfermedades crónicas como el cáncer, su presencia también indica que una frecuencia elevada de éstos predice riesgo de cáncer en seres humanos (Bonassi et al., 2005; Bonassi et al., 2007). En la revisión de la literatura se encontraron trabajos utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* donde analizan los efectos genotóxicos de componentes químicos agregados a alimentos sintéticos o naturales, estos estudios en la actualidad utilizan metodologías muy complejas y con presupuestos muy altos y sin duda con una calidad excelente en la interpretación de datos sobre la genotoxicidad de los compuestos (Zengin et al., 2011; Drumond et al., 2012). Sin embargo, a pesar de que la técnica de micronúcleos ha sido utilizada desde el siglo pasado aún sigue siendo vigente para determinar la genotoxicidad de los compuestos químicos de los alimentos por las siguientes razones: es una técnica de bajo presupuesto, la obtención de resultados es rápida y verificable, utiliza modelos biológicos muy cercanos a la genética o fisiología humana y además se puede aplicar en cualquier momento o situación de exposición a cualquier agente químico o físico. En 2003 se mencionó que México consumía uno de cada diez vasos de sopas instantáneas que se producían en el mundo. Un año después, los mexicanos consumían cuatro millones de sopas instantáneas al día, lo que representaba 15% de la producción mundial de este tipo de alimento (Aguilar, 2010).

Todas las sopas instantáneas son prácticamente iguales desde el punto nutricional: ofrecen un aporte calórico considerable, entre 290 y 334 kilocalorías; sus contenidos de proteínas oscilan entre 6 y 7 g, los de grasas de 12 a 14 g y los de carbohidratos entre 38 y 39 g (Corleone, 2013). El principal problema de este tipo de sopas se centra en la cantidad de 1.2 g de sodio que contienen y como aditivo para potenciar el sabor de la comida salada es el glutamato monosódico –también llamado E621, se trata de la sal del ácido glutámico, un aminoácido presente en todas las proteínas (Aguilar, 2010). En ratas se han realizado numerosos estudios sobre los efectos fisiológicos provocados por el glutamato monosódico (GMS). En estas investigaciones se reportan varias anomalías como la causa de la ampliación del hígado, aumento de la albúmina de suero, disminución de globulina en el suero, alteración de la actividad de varias funciones endocrinas, de provocar la sensibilidad del eje hipotálamo-

hipófisis-rata-suprarrenal, provocar una disminución en el número de los folículos de Graaf, disminución del espesor del endometrio e inducir alteraciones en la tasa metabólica de la glucosa (EL-Meghawry et al., 2013).

Existen reportes sobre los efectos tóxicos y genotóxicos de esta sal y algunos componentes químicos que contienen los productos de sopas instantáneas y los materiales que se ocupan para su transporte y protección comercial, es decir el envasado. El glutamato monosódico mostró un efecto inhibitorio sobre la división celular en las raíces de *Allium cepa*, causó una disminución de los valores de índice mitótico; en tratamientos con 20, 40, y 60 ppm aplicados por 6, 12, y 24 horas respectivamente, cambiaron la frecuencia de las fases de la mitosis en comparación con los grupos control. Este compuesto aumentó anomalías cromosómicas, entre las que se encuentran los micronúcleos, c-mitosis, puentes anafásicos, binúcleos y cromosomas rezagados (Türkoğlu, 2013).

El glutamato monosódico a una dosis de 4 mg/g inyectada intraperitonealmente en ratas Wistar durante 10 días, significativamente (PB/0,01) indujo la formación de eritrocitos policromáticos micronucleados (MCNCP) en médula ósea. El presente trabajo es el primer estudio que informa que el glutamato monosódico induce micronúcleos en células de médula ósea de rata (Farombi y Onyema, 2006). Por otro lado, investigadores de la Universidad de Cartagena, Colombia identificaron compuestos orgánicos volátiles liberados por envases de alimentos hechos de poliestireno expandido (EPS), estos fueron sometidos a diversas temperaturas y se determinaron sustancias químicas liberadas que fueron capturadas por microextracción en fase sólida en la columna de cromatografía de gases y espectrometría de masas. Los resultados revelaron la presencia de al menos 30 compuestos diferentes en los productos examinados; los registrados con mayor frecuencia fueron benzaldehído, estireno, etilbenceno y tetradecano. La liberación de estas moléculas era dependiente de la temperatura. Estos investigadores aconsejan regular el uso de los productos de EPS que puedan quedar sometidos a un calentamiento con el fin de proteger la salud humana (Pajaro-Castro et al., 2014). Investigadores de la Universidad de Gotemburgo, establecieron que los polímeros que son clasificados como más peligrosos están hechos de monómeros y son considerados como mutagénicos y/o carcinogénicos (categorías 1A o 1B). Estos pertenecen a las familias de polímeros de poliuretanos, poliacrilonitrilos, cloruro de polivinilo, resinas epoxi, y estirenos, estos últimos fueron detectado en el envase de las sopas instantáneas (Lithner et al., 2011; Pajaro-Castro et al., 2014).

Es notable que los productos envasados en EPS tienen una gran posibilidad de que este contenedor genere dioxinas, al ser sometido al calor en el horno de microondas. Las dioxinas son cancerígenas, mutagénicas, persistentes, bioacumulables, tóxicas y volátiles, éstas son transmitidas a través de la cadena alimenticia; en la cual el ser humanos se encuentra al final, a pesar de esto en la actualidad la exposición a las dioxinas en alimentos ha disminuido notablemente sus concentraciones sin embargo, no deja de ser un riesgo de contaminación accidental de los alimentos (Llobet et al., 2003).

Dentro de las disposiciones generales de las normas mexicanas se considera que los productos de uso médico y para consumo humano, deben someterse a pruebas de citogenotoxicidad o mutagenicidad para prevenir riesgos a la salud (DOF, 2013a, 2013b). Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el riesgo mutagénico en las células meristemáticas radiculares de *V. faba* y en las células de sangre periférica de ratón CD-1, provocado por los componentes químicos de una sopa instantánea de una marca comercial reconocida y/o los de sus envases.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

La cicloheximida (4-[(2R)-2-[(1S, 3S, 5S)-3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl]-2-hydroxyethyl]piperidine-2,6-dione) 94% de pureza, fue obtenido de Sigma-Aldrich, USA. Sustancia tóxica de referencia utilizada como testigo positivo (Calabresi y Parks, 1985; Arencibia y Rosario, 2003; Hettinger et al., 2007; García, 2008).

### Plantas y sopa instantánea

Las semillas certificadas de *V. faba* (variedad minor) fueron donadas por el laboratorio de Recursos Naturales de la UBIPRO de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM.

Se adquirieron los envases con sopa instantánea de una marca reconocida en un supermercado del Estado de México, México. Información nutricional contenida en una sopa instantánea: Contenido energético 292 kcal (1238 kJ), proteínas 7.0 g, grasas (lípidos) 12 g, carbohidratos (hidratos de carbono) 39 g, sodio 1.2 g, proteína 9%, vitamina A 14%, vitamina B1 5 %, ácido fólico 10%, hierro 15%.

Ingredientes: Harina de trigo enriquecida (harina de trigo, niacina, hierro enriquecido, mononitrato de tiamina, riboflavina, ácido fólico), aceite vegetal (contiene uno o más de lo siguiente: canola, semilla de algodón, tallo de apio), conservado con TBHQ, sal, vegetales deshidratados (zanahoria, maíz, trigo, chicharos, cebolla, ajo, tallo de apio), maltodextrina, glutamato monosódico, azúcar, maíz, trigo y proteína de soya hidrolizados, el sabor de la sopa en polvo, especias (semilla de apio), extracto de levadura, carbonato de potasio (mono, hexameta y/o triplo) fosfato de sodio, salsa de soya (agua, trigo, frijón de soya, sal) carbonato de sodio, curcuma, dióxido de silicio (agente antiendurecedor), inosinato disódico, guanilato disódico, caldo de pollo, lactosa, lectina de soya.

### Germinación

Las semillas de *V. faba* (variedad minor) fueron desinfectadas por cinco min en una solución de hipoclorito de sodio 5%, después se enjuagaron cuatro veces con agua destilada. Inmediatamente fueron embebidas durante 12 h en agua destilada. Posteriormente se pusieron a germinar entre dos capas de algodón humedecido a 22°C por cinco días. Cuando las raíces alcanzaron un tamaño de dos a tres cm de longitud fueron usadas para este estudio.

### Tratamientos

Se seleccionaron y colocaron al azar cinco plántulas por tratamiento, formando cuatro grupos de la siguiente forma: 1) Plántulas sumergidas en 10 ml de sopa instantánea envasada en EPS cocida en microondas, 2) Plántulas sumergidas en 10 ml de sopa cocida a fuego en sartén, 3) testigo negativo: las plántulas de *V. faba* fueron suspendidas en 10 ml de agua destilada y 4) grupo testigo positivo: fueron colocados sobre una solución de cinco µg/ml de cicloheximida. Cada lote tuvo un tiempo de exposición al caldo de la sopa de 24 y 72 h. Los grupos experimentales estuvieron en condiciones de incubación a 22 °C ± 1 °C y en obscuridad para evitar el incremento de la oxidación o la alteración físico-química de las sopas.

### Ensayo de micronúcleos

Para la prueba de micronúcleos, se adoptó el protocolo de Te-Hisiu Ma et al. (1995). Después de 24 y 72 h post-tratamiento, las raíces fueron cortadas a 1 cm de la zona meristemática y fueron fijadas en solución Farmer (etanol-ácido acético 3:1) y almacenadas a 4°C por 12 h. Posteriormente fueron hidrolizadas en HCL 1N a 60 °C por cinco minutos. Posteriormente se cortaron raíces de aproximadamente dos mm de la zona meristemática y fueron maceradas sobre un portaobjetos. Después, las células fueron teñidas con aceto-orceína al 1%. Finalmente utilizando un cubreobjetos se realizó el aplastamiento en monocapa

("squash") para dispersar las células con la finalidad de observar al microscopio. La frecuencia de micronúcleos (MCN) fue expresada en términos del número de células con MCN/1000 células contabilizadas por raíz en un microscopio óptico Nikon a un aumento de 1000 x y fueron fotografiadas para su análisis en un programa proporcionado por la Universidad de Texas (UTHSCSA ImageTool para Windows Versión 3.00). Simultáneamente se contabilizó la cantidad de células en división mitótica. A partir de la siguiente fórmula se calculó el índice mitótico  $\%IM = \text{No de células en I+P+M+A+T}/1000 \times 100$ , parámetro usado para evaluar citotoxicidad.

### **Organismos**

El trato y el mantenimiento de los organismos siguieron los protocolos establecidos por la Norma Oficial Mexicana 3R (NOM-062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se usaron ratones machos de la cepa CD-1 de ocho semanas de edad con un peso aproximado entre 25-30 gramos. Los ratones fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Desde la aclimatación hasta el final del experimento los animales se mantuvieron en condiciones de laboratorio a  $21 \pm 2$  °C con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 h., con acceso a alimento especial para ratones y agua *ad libitum*.

### **Tratamientos**

Se formaron cuatro lotes (marcando a los animales previamente) cada uno con cinco ejemplares (machos seleccionados aleatoriamente) y distribuidos de la siguiente manera: 1) un testigo negativo al cual sólo se le administró agua y el alimento especial para roedores, 2) un testigo positivo en el cual se aplicó únicamente en una ocasión 0.3 ml de la cicloheximida por vía intraperitoneal a una concentración de 60 mg/k, 3) un lote experimental al cual se le administró vía oral (aproximadamente 1 g) la sopa cocida en el envase de unigel por cinco minutos en microondas y 4) a este lote experimental se le aplicó del mismo modo la ingesta de la sopa a diferencia de la cocida a fuego por cinco minutos sin el envase. Diariamente se le abasteció sopa fresca a cada grupo experimental.

### **Ensayo de micronúcleos**

Posterior a la administración de la sopa instantánea, se procedió a extraer sangre realizando una punción en la zona caudal de los ratones a las 24, 48 y 72 h de haber sido administrada. La gota de sangre se colocó sobre una laminilla y se procedió a realizar un frotis (tres laminillas por ratón). Inmediatamente se fijaron las muestras con metanol. Las laminillas fueron sometidas a un tren de tinción de hematoxilina/eosina por 10 minutos.

Las células policromáticas y normocromáticas de la sangre periférica de los ratones fueron contabilizadas auxiliándose de un microscopio óptico Nikon y posteriormente se fotografiaron utilizando una cámara digital Moticam acoplada a una computadora. Se observaron un total de 2000 células entre policromáticas (CP) y normocromáticas (CN) y la frecuencia de micronúcleos (MCN) en células policromáticas (MCNCP) en cada ratón.

### **Calculo del porcentaje de genotoxicidad y toxicidad**

Los índices de genotoxicidad (%) y toxicidad (%) fueron calculados mediante el método propuesto por Hayashi et al., (2000). Para ambos índices se consideró un total de 2000 eritrocitos. Las fórmulas para calcular ambos índices son las siguientes:

% Toxicidad:  $[\text{No de CP}/2000] \times 100$

% Genotoxicidad:  $\% \text{MCN} = \text{No. de MCN en CP} / 2000 \text{ células totales} \times 100$ .

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos para *V. faba* y células de ratón CD-1 fueron evaluados estadísticamente por separado. Se empleó para cada modelo biológico un análisis de varianza de un factor (ANOVA) en un nivel de confianza de  $\alpha = 0.05$  y los valores medios obtenidos por

los diferentes tratamientos fueron estadísticamente comparados usando la prueba de comparación múltiple de Dunnett ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### Prueba de cito-genotoxicidad en *V. faba*

Con los datos promedio de los experimentos (10000 células de cada uno de los tratamientos) se determinó que existe algún efecto cito-tóxico significativo de la sopa instantánea cocida en el envase de EPS al microondas y cocida a fuego en un sartén ( $F_{(obs)} = 9.32 > F_{\alpha, 0.05, 4, 25} = 2.76$ ). La aplicación de la prueba de comparación múltiple de Dunnett ( $p < 0.05$ ) con respecto al testigo negativo, permitió observar que al incrementar el tiempo de exposición de esta sopa (72 h) disminuyó el porcentaje del índice mitótico, en cambio, estos tiempos de exposición no fueron suficientes para inducir una frecuencia alta de micronúcleos (MCN) en raíces de *V. faba* (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la sopa instantánea sobre el índice mitótico y la frecuencia de micronúcleos en células radiculares de *V. faba*.

Tratamientos	Promedios	Promedios
	% IM $\pm$ DE	% micronucleos $\pm$ DE
	zona M <sup>1</sup>	zona F1
agua (testigo negativo)/24 h	17.98 $\pm$ 4.71	0.0 $\pm$ 0.0
agua (testigo negativo)/72 h	17.6 $\pm$ 6.6	0.2 $\pm$ 0.09
cicloheximida (5 $\mu$ g/ml) (testigo positivo)/24 h	2.53 $\pm$ 1.8**	2.21 $\pm$ 0.87**
cicloheximida (5 $\mu$ g/ml) (testigo positivo)/72 h	2.49 $\pm$ 0.9**	1.58 $\pm$ 0.25**
sopa instantánea cocción en microondas /24 h	8.24 $\pm$ 4.06*	0.2 $\pm$ 0.09
Sopa instantánea cocción en microondas /72 h	8.44 $\pm$ 4.7*	0.0 $\pm$ 0.0
Sopa instantánea cocción a fuego/24 h	13.08 $\pm$ 4.54	0.0 $\pm$ 0.0
Sopa instantánea cocción a fuego/72 h	9.16 $\pm$ 4.5*	0.6 $\pm$ 0.16

M<sup>1</sup> = meristemo; \* Diferencia significativa  $p < 0.05$  en prueba de Dunnett con testigo negativo promedio de 10 000 células por tratamiento.

En los tratamientos de 24 y 72 h de exposición de las raíces a la cicloheximida (testigo positivo), la sopa cocida en microondas con envase de EPS y cocida a fuego en sartén se observó ennegrecimiento y endurecimiento de las raíces, lo que posiblemente afectó la disminución de la mitosis significativamente ( $p < 0.05$ ).

Para determinar si hubo un efecto de clastogenicidad (MCN) de la sopa instantánea, se realizó la cuantificación en la zona F1 (filial 1) de las raíces de *V. faba*. Se observó que los componentes de la sopa no tuvieron efecto genotóxico (clastogénico) sobre las células radiculares F1 de *V. faba* ( $F_{(obs)} = 1.80 < F_{\alpha, 0.05, 4, 25} = 2.76$ ) (Tabla 1). Para dar un seguimiento de la funcionalidad del experimento se empleó como testigo positivo a la cicloheximida (Fig. 1). Este es considerado un agente químico clastogénico y tóxico (retardo de división), lo cual fue confirmado en este estudio, observando en los dos tiempos de exposición una diferencia significativa ( $p < 0.05$  prueba de comparación múltiple de Dunnett) (Tabla 1).

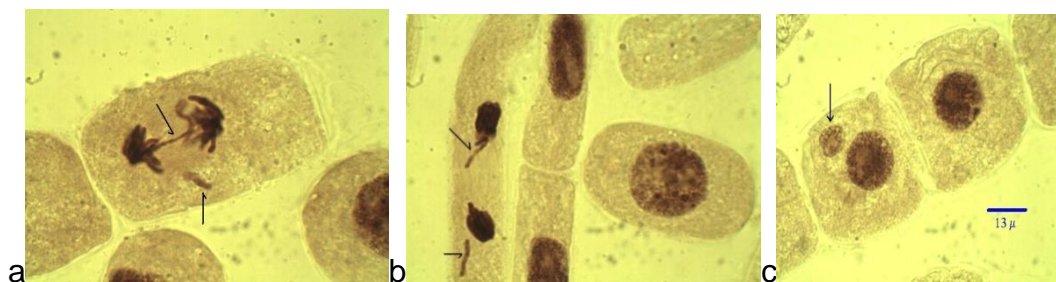


Fig. 1. Imágenes tomadas a 100x donde se muestran daños clastogénicos provocados por la exposición a la cicloheximida (testigo positivo). Estos efectos no se registraron en las células de *V. faba* con los tratamientos de la sopa instantánea. Las flechas muestran puentes anafásicos y cromosomas retrasados (a y b) y micronúcleos (c).

### Prueba de cito-genotoxicidad en ratón CD-1

Con el objetivo de resolver la pregunta ¿Por qué la ingesta de la sopa instantánea provoca efectos citogenotóxicos en células de sangre periférica de ratón?, se realizó un análisis estadístico de ANOVA de un solo factor ( $p < 0.05$ ) de los datos promedio de cada uno de los experimentos (10000 células de cada uno de los tratamientos), dando como resultado que por lo menos una media presentaba una diferencia significativa. Los resultados de esta prueba fueron:  $F_{(obs)}=10.12 > F_{\alpha, 0.05, 6, 21}= 2.57$  y  $F_{(obs)}= 11.42 > F_{\alpha, 0.05, 6, 21}= 2.57$  para el porcentaje de toxicidad y el % de genotoxicidad (MCN), respectivamente. Estos resultados muestran que existió alguna diferencia significativa entre las medias de los tratamientos tanto para registrar los valores de toxicidad y de genotoxicidad. Por tanto, se procedió a la aplicación de la prueba de comparación múltiple de Dunnett utilizando un nivel de confianza de  $p < 0.05$  (Tabla 2). Así se determinó un incremento significativo en el porcentaje de la toxicidad y de la frecuencia de micronúcleos en las células policromáticas de los tratamientos de consumo durante 48 y 72 h de sopa instantánea cocida en microondas y cocida a fuego en células de sangre periférica del ratón CD-1. Para dar un seguimiento de la funcionalidad del experimento se empleó como testigo positivo a la cicloheximida (60 mg/k). Este es considerado un agente químico clastogénico lo cual fue confirmado en el presente estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto cito-genotóxico en sangre periférica de ratón de una sopa instantánea cocida en microondas y a fuego.

Tratamientos	Promedios %toxicidad± DE	Promedios % micronucleos ± DE
agua (testigo negativo)	7.03 ± 1.02	0.025 ± 0.03
cicloheximida (60 mg/k) (testigo positivo)	5.82 ± 0.4**	0.98 ± 0.23**
sopa instantánea cocción en microondas /24 h	17.46 ± 9.5	0.06 ± 0.04
sopa instantánea cocción en microondas /48 h	34.36±7.7**	0.54±0.3**
sopa instantánea cocción en microondas /72 h	40.1 ± 7.98**	0.65 ± 0.12**
sopa instantánea cocción a fuego/24 h	34.9 ± 5.7**	0.012 ± 0.02
Sopa instantánea cocción a fuego/48 h	13.25±5.94	0.33±0.21**
sopa instantánea cocción a fuego/72 h	22.9 ± 12.1**	0.53 ± 0.16**

\*\*Diferencia significativa  $p < 0.05$  en prueba ANOVA de un factor y múltiple de Dunnett con testigo negativo. Promedio de 10000 células por tratamiento. También se utiliza como grupo de comparación al tratamiento de los ratones con agua destilada (testigo negativo), en donde no hay ningún efecto de cito-genotoxicidad.

## DISCUSIÓN

### Prueba de cito-genotoxicidad en *V. faba*

La actividad mitótica expresada como el porcentaje (%) del índice mitótico (IM) fue el primer parámetro para evaluar la citotoxicidad de la sopa instantánea. La citotoxicidad puede

ser determinada por la tasa de disminución del IM en la zona meristemática de la raíz de *V. faba*. En este estudio es evidente que la sopa cocida en microondas y cocida a fuego (72 h) reduce significativamente el IM. La disminución en el número de células en división en las raíces de *V. faba* muestra el efecto con carácter de ligeramente cito-tóxico de las sustancias que se encuentran mezcladas en el sistema acuoso de la sopa. Algunos autores señalan que alimentos envasados en unigel (poliestireno) tiene el riesgo potencial de contener componentes químicos como benceno, estirenos y 1,3-butadieno, además el unigel al ser calentado en hornos de microondas genera dioxinas (Llobet et al., 2003; Celis, 2008-2009; UAM 2010; EFSA, 2012).

Para resaltar la discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio fue considerado lo señalado por los autores antes mencionados, es decir, se piensa que los compuestos contenidos en el caldo de la sopa, como el alto contenido de NaCl (cloruro de sodio =sal de cocina) y el glutamato monosódico, y los compuestos liberados por el calentamiento de la sopa en los envases de poliestireno expandido en el microondas como son el benceno (fenoles) y los estirenos (Aguilar, 2010; Lithner et al., 2011; Pajaro-Castro et al., 2014), o los compuestos químicos producto del metabolismo de las células vegetales de *V. faba* expuestas al caldo de la sopa. Por lo tanto, son considerados estos compuestos químicos como bioactivos que pueden originar especies más reactivas capaces de interactuar con las biomoléculas celulares, unirse covalentemente a macromoléculas o iniciar en la célula reacciones radicalarias en cadena, todo ello con el resultado de ennegrecer y endurecer las células corticales de las raíces de *V. faba* por lo que éste fenómeno de lignificación de las raíces reduce el % de división celular, trayendo como consecuencia el retraso en el crecimiento de las plántulas, esta observación concuerda por lo observado por Türkoğlu (2013), este investigador señala que el glutamato monosódico muestra un efecto inhibitorio sobre la división celular en raíces de *Allium cepa* que trae como consecuencia una disminución en los valores del índice mitótico. Como se observó, la división celular de las raíces de *V. faba* se redujo significativamente en los tratamientos utilizando el microondas en los tiempos de exposición de 24 y 72 h. Esto se debe posiblemente a que las dioxinas y las sustancias fenólicas producto del metabolismo del benceno se fueron acumulando a una exposición de mayor tiempo provocando significativamente la disminución del % del IM (ATSDRUSPHS, 2007; Ávalos y Pérez-Urria, 2009; Santolaya et al., 2003).

Estos metabolitos podrían estar involucrados con mecanismos del crecimiento de la raíz. Como lo han señalado algunos estudios por ejemplo, uno de los mecanismos que posiblemente puedan explicar la acción de estos metabolitos en la inhibición del ciclo celular en la fase G1 es por activación de genes implicados con la regulación del ciclo celular y/o apoptosis, en presencia de daño genético, donde serían encargados de desencadenar una serie de señales que dependiendo de la magnitud del daño resultará en el retraso del ciclo para dar lugar a la reparación del mismo o bien en la eliminación vía apoptosis de las células muy dañadas (Menéndez et al., 2000; Prieto et al., 2008). Retomando lo señalado por MacLeod (1968) y Kunikowska et al. (2013), quizá otro mecanismo de disminución celular en este trabajo es la interacción de las sustancias fenólicas y las dioxinas con las cinetinas y las auxinas (ácido indol acético), dos hormonas necesarias para el crecimiento vegetal. Los mismos autores señalan que en especial las cinetinas son propuestas como probable mecanismo de ésta disminución de la división celular en *V. faba*. Las cinetinas son convertidas con fosforibosil transferasa a monofosfatos. Estos compuestos se unen a receptores que inducen la salida de iones de calcio desde el retículo endoplasmático y directamente o indirectamente detienen a las células en la fase G1 y en la fase G2 dirigiéndose al proceso de la muerte programada con la condensación del ADN, la segmentación de los núcleos y la degradación de ADN por nucleasas (MacLeod, 1968; Kunikowska et al., 2013).

En el presente estudio la mayor incidencia de micronúcleos y aberraciones cromosómicas (fragmentos cromosómicos y puentes anafásicos) fueron observados en el testigo



positivo (cicloheximida) indicando el funcionamiento correcto de la técnica (Calabresi y Parks, 1985; Arencibia y Rosario, 2003; Hettinger et al., 2007; García, 2008).

En este sistema vegetal la química de la sopa instantánea no provocó daño genotóxico significativo (clastogénico) a las células meristemáticas de *V. faba*. Esto se puede explicar en primer lugar al nivel alto de toxicidad que tienen los compuestos benceno y dioxinas que fueron disminuyendo el porcentaje de células en división, segundo las concentraciones de estos componentes y su tiempo de exposición no fueron suficientes para provocar un daño genético y tercero las células vegetales presentan un metabolismo genético que les permite reparar el daño clastogénico que podría ser provocado por los componentes químicos y sus metabolitos del envase y de la sopa.

### **Prueba de cito-genotoxicidad en ratón CD1**

La proporción de las células policromáticas en relación a las células normocromáticas fue expresada como el % de toxicidad, este fue el primer parámetro para evaluar la cito-toxicidad de la sopa instantánea. La cito-toxicidad puede ser determinada por la tasa de disminución o aumento de la frecuencia de células policromáticas en sangre periférica de ratones. En este estudio es evidente que la sopa cocida utilizando el microondas y cocida a fuego (48 y 72 h) aumentan significativamente la producción de células policromáticas, esto demostró quizá, que la sopa tiene carácter de estimulador en la formación de eritrocitos en sangre. De tal forma que permitió inferir, si los eritrocitos derivan de las células madre (médula ósea) conocidas como hemocitoblasto, entonces la sopa instantánea tiene algunos componentes químicos que se relacionan a la eritropoyetina que es una hormona de crecimiento producida en los tejidos renales, y que estimula a la eritropoyesis (es decir, la formación de eritrocitos), la cual es responsable de mantener una masa eritrocitaria en un estado constante (Guyton, 2006). El aumento de la concentración de eritrocitos (eritrocitosis) es menos común. Naturalmente, esto es una suposición que abrirá en un futuro un protocolo de investigación para confirmar o desechar esta idea.

Como se señaló anteriormente algunos investigadores indican que los alimentos envasados en unigel tienen el riesgo potencial de contener componentes químicos como benceno, estirenos y 1,3-butadieno, además el unigel al ser calentado en hornos de microondas generan dioxinas (Celis, 2008-2009; UAM, 2013). De acuerdo con esta idea, en este estudio los compuestos bencénicos, dioxinas y alcoholes podrían ser los causantes del aumento en el % de células policromáticas y en el incremento de la frecuencia de micronúcleos en células policromáticas, esto último, probablemente provocó los efectos clastogénicos y aneugénicos en estas células. Te-Hsiu Ma et al. (1995), Askin y Sultan (2007) e Iarmarcovai et al., (2008) han señalado que estos efectos posiblemente podrían estar relacionados a la formación de alteraciones celulares por ejemplo, el cáncer.

Solamente en los tratamientos de cocimiento de la sopa en microondas y a fuego en el tiempo de exposición a 24 h las células no mostraron daño. Esto se debió principalmente a que las sustancias que contribuyeron a la citogenotoxicidad de la sopa instantánea en otros tratamientos, de algún modo fueron metabolizados, pero no fueron bio-activos en un tiempo de 24 h o los sistemas de reparación genético fueron eficientes en tiempos cortos de consumo de estas sopas, no siendo así a las 48 y 72 h. Quizá esto último, se debió al aumento de los compuestos de la sopa o sus metabolitos secundarios en el torrente sanguíneo de los ratones provocando los daños de toxicidad y genotoxicidad. En los tratamientos de 72 h tanto en sopas calentadas en microondas como a fuego, en las muestras de sangre de los ratones de este tratamiento se observaron eritrocitos crenados, esto se debió principalmente a la acumulación de las sales (glutamato monosódico más 1.2 g. de sodio) en los recipientes (Aguilar, 2010) y por tanto, los animales ingirieron mayor porción de sales. Este trabajo aporta en el conocimiento de

la genotoxicidad del glutamato monosódico reportado por primera vez por Farombi y Onyema (2006).

Se puede concluir que a) La citotoxicidad ligera de la sopa instantánea sobre la división celular de *V. faba* se debe posiblemente a los componentes químicos del envase (poliestireno) y a los constituyentes químicos de la sopa mezclados en el caldo, B) la reducción en la división mitótica trae como consecuencia un retraso en el crecimiento somático de las plántulas, c) la exposición de la sopa instantánea a células de *V. faba* por 72 h no es genotóxica, d) la citogenotoxicidad de la sopa instantánea sobre las células de sangre periférica del ratón CD-1 se debe a los componentes químicos del envase (poliestireno) y a los mezclados en la sopa y e) en éste sistema animal la sopa instantánea provocó daño genotóxico (clastogénico) en las células sanguíneas de ratón CD-1.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la participación del QFB Axel Pineda Molina, adscrito al Departamento de Ciencias Biológicas FESC, UNAM en la revisión gramatical y en la traducción al inglés del resumen de éste estudio.

## REFERENCIAS

1. Aguilar J.A., 2010. Sopas de vasito. Revista del Consumidor, reporte especial, 43-52. [http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est\\_06/maruchan\\_abr06.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_06/maruchan_abr06.pdf) (accesado en noviembre 5, 2013).
2. Arencibia D.F. y L.A. Rosario, 2003. Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos in vitro. Revista de Toxicología en Línea, 20: 24-41. [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/20003.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/20003.pdf) (accesado en diciembre 10, 2013).
3. Askin C.T. y A.Ö. Sultan, 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. Biologia Bratislava, 62: 292-296.
4. ATSDRUSPHS (Agency for toxic substances and disease registry United States public health service), 2007. <http://www.eco-usa.net/toxics/quimicos-s/benceno.shtml> (accesado en diciembre 17, 2013).
5. Ávalos A.G. y C.E. Pérez-Urria, 2009. Metabolismo secundario de plantas. Red (Biología) Serie Fisiología Vegetal, 2: 119-145.
6. Bonassi S., D. Ugolini, M. Kirsch-Volders, U. Stromberg, R. Vermeulen y J.D. Tucker, 2005. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives. Environmental and molecular mutagenesis, 45: 258-270.
7. Bonassi S., A. Znaor, M. Ceppi, W.P. Lando, W.P. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zieger, S. Ban, R. Barale, M.P. Bigatti, C. Bolognesi, A. Cebulska-Wasilewska, E. Fabianova, A. Fucic, L. Hagmar, G. Joksić, A. Martell, L. Migliore, E. Mirkova, A. Scarfi, A. Zijno, H. Norppa y M. Fenech, 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis, 28: 625-631.
8. Calabresi P. y R. Parks, 1985. Agentes citostáticos y drogas usadas para la inmunosupresión. En: Goodman y Gilman (Eds.). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Panamericana, México.

9. Celis H.J., 2008-2009. Contaminación de alimentos por dioxinas. *Ciencia Ahora*, 22: 36-43. <http://www.bierzoairelimpio.org/imagenes/descargas/Contaminacionalimentosdioxinas.pdf> (accesado en junio 2, 2014).
10. Corleone J., 2013. Maruchan instant lunch nutrition information. <http://www.livestrong.com/article/332882-maruchan-instant-lunch-nutrition-information/> (accesado en octubre 21, 2013).
11. DOF (Diario Oficial de la Federación), 2013a. Norma Oficial Mexicana NOM-043-SSA2-2012, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5285372&fecha=22/01/2013](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5285372&fecha=22/01/2013) (accesado en agosto 12, 2014).
12. DOF (Diario Oficial de la Federación), 2013b. Proyecto de Norma Oficial Mexicana. PROY-NOM-257-SSA1-2013. Autorización de medicamentos, registro, renovación y modificaciones. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5298031&fecha=06/05/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5298031&fecha=06/05/2013) (accesado en agosto 12, 2014).
13. Drumond F., V. Venancio, M. Pires y L. Greggi, 2012. Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 3447-3451.
14. EL-Meghawry, A. EL-Kenawy, H.E.H. Osman y M.H. Daghestanid, 2013. The effect of vitamin C administration on monosodium glutamate induced liver injury. An experimental study. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 65: 513-521.
15. EFSA (european food safety authority), 2012. Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed. *EFSA Journal*, 10(7): 2832 [82 pp.] <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2832.htm> (accesado en junio 10, 2014).
16. Farombi E.O. y O.O. Onyema, 2006. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Human and Experimental Toxicology*, 25: 251-259.
17. García P.B.E., 2008. Informe final proyecto SIP-20080400. Efecto de diversos inhibidores endocíticos sobre la entrada de micobacterias a fibroblastos de pulmón murinos (mlg). Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Departamento de Inmunología. ([sappi.ipn.mx/cgpi/archivos\\_anexo/20080400\\_6838.pdf](http://sappi.ipn.mx/cgpi/archivos_anexo/20080400_6838.pdf)) (accesado en noviembre 24, 2013).
18. Guyton A.C., 2006. Tratado de fisiología médica. 11ªed., Elsevier, España.
19. Hayashi M., J.T. MacGregor, D.G. Gatehouse, I. Adler, D.H. Blakey, S.D. Dertinger, G. Krishna, T. Morita, A. Russo y S. Sutou, 2000. *In Vivo* erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 234-252.
20. Hettinger T.P., K.F. Bradley y E.F. Marion, 2007. Cycloheximide: No ordinary bitter stimulus. *Behavioural Brain Research*, 180: 4-17.
21. Iarmarcovai G., S. Bonassi, A. Botta, R.A. Baan y T. Orsière, 2008. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutation Research*, 658: 215-233.

22. Kunikowska A., A. Byczkowska y A. Kaźmierczak, 2013. Kinetin induces cell death in root cortex cells of *Vicia faba* ssp. minor seedlings. *Protoplasma*, 250: 851-861.
23. Lithner D., Å. Larsson y G. Dave, 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of the Total Environment*, 409: 3309-3324.
24. Llobet J.M., J.L. Domingo, A. Bocio, C. Casas, A. Teixidó y L. Müller, 2003. Human exposure to dioxins through the diet in Catalonia, Spain: carcinogenic and non-carcinogenic risk. *Chemosphere*, 50: 1193-1200.
25. MacLeod R.D., 1968. Changes in the mitotic cycle in lateral root meristems of *Vicia faba* following kinetin treatment. *Chromosoma*, 24: 177-187.
26. Menéndez D., A. Bendesky y P. Ostrosky-Wegman, 2000. Importancia de la funcionalidad de P53 en el efecto estimulador de la proliferación del metronidazol y de sus metabolitos hidroxilado y acetilado. *Memorias de la Reunión de Genética y Biomedicina Molecular. Revista Salud Pública y Nutrición* 2. <http://respyn.uanl.mx/especiales/genetica/index.html> (accesado en diciembre 20, 2013).
27. NOM-062-ZOO-1999 (Norma Oficial Mexicana 1999), 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [http://www.inb.unam.mx/bioetica/documentos/nom\\_062\\_zoo\\_99.pdf](http://www.inb.unam.mx/bioetica/documentos/nom_062_zoo_99.pdf) (accesado en noviembre 12, 2012).
28. Pajaro-Castro N., K.C. Gallardo y J.O. Verbel, 2014. Identification of volatile organic compounds (VOCs) in plastic products using gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). *Revista Ambiente Agua*, 4: 610-620.
29. Prieto Z., R. Fernández, J. León-Incio, C. Quijano-Jara y R. Vallejo-Rodríguez, 2008. Genotoxicidad del dicromato de potasio en meristemos radiculares y meiocitos de *Vicia faba*. *Arnaldoa*, 15: 217-226.
30. Santolaya M.C., S.X. Guardino y M.G.R. Farrás, 2003. Evaluación de la exposición a benceno: control ambiental y biológico. <http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/Entrega.asp?identrega=298> (accesado en diciembre 12, 2013).
31. Te-Hsiu Ma, Z. Xu, C. Xu, H. McConnell, E.R. Valtierra, G.A. Arreola y H. Zhang, 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research*, 334: 185-195.
32. Türkoğlu Ş., 2013. Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Toxicology and Industrial Health*, 0748233713475509.
33. UAM, 2010. [www.concienciambiental.com.mx](http://www.concienciambiental.com.mx) (accesado en noviembre 22, 2013).
34. Zengin N., D. Yüzbaşıoğlu, F. Ünal, S. Yılmaz y H. Aksoy, 2011. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 763-769.