



## Artículo Original

# Efecto citotóxico y genotóxico del aspartame<sup>R</sup> a diferentes tiempos y concentraciones en el ciclo celular de *Allium cepa*

## Cytotoxic and genotoxic effects of aspartame<sup>R</sup> at different times and concentrations in the cell cycle of *Allium cepa*

Fátima Zavala De La Cruz, Juan César Muro Morey, José A. Saldaña Jiménez, Gina Zavaleta Espejo y Fiorela Luján Gonzáles

Laboratorio de Biología de la Reproducción. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

### RESUMEN

El aspartame<sup>R</sup> es un edulcorante artificial que presenta sospechosos efectos secundarios tóxicos. Por tal motivo, el objetivo de la presente investigación es determinar el efecto citotóxico y genotóxico del aspartame a diferentes tiempos y concentraciones en el ciclo celular de *Allium cepa*. Se expusieron bulbos enraizados de *A. cepa* a soluciones de aspartame a 0,1, 0,3 y 0,4 mg/mL y un control y un testigo durante 24 horas. Se observó una disminución del Índice mitótico y de fases en relación inversa al aumento de la concentración de aspartame; asimismo, se observó un aumento del índice de buds nucleares directamente al aumento de aspartame. Se concluye que el aspartame presenta efecto citotóxico disminuyendo el IM y genotóxico aumentando la frecuencia de buds nucleares.

**Palabras clave:** Aspartame, *allium cepa*, efecto citotóxico-genotóxico

### ABSTRACT

The aspartame<sup>R</sup> is an artificial sweetener having suspected toxic side effects. Therefore, the objective of this research is to determine the cytotoxic and genotoxic effects of aspartame concentrations and at different times in the cell cycle of *Allium cepa*. Enraizados bulbs of *A. cepa* to aspartame solutions at 0.1, 0.3 and 0.4 mg / mL and a control and a control were exposed for 24 hours. Mitotic index decreased phase and inversely with the increasing concentration of aspartame was observed; also increasing the rate of nuclear buds directly to increased aspartame was observed. It is concluded that aspartame has cytotoxic effect by decreasing the IM and genotoxic increasing the frequency of nuclear buds.

**Keywords:** Aspartame, *Allium cepa*, genotoxic-cytotoxic effect

## INTRODUCCIÓN

El aspartame es un edulcorante artificial es 180-200 veces mayor que la de la sacarosa y es consumida por millones de personas en aproximadamente 6000 productos como las bebidas gaseosas, goma de mascar, jugos de frutas, gelatinas y jaleas. Se ha asociado con muchos problemas de salud cuando se ingiere después de haber estado expuesto durante más de 30 minutos a temperaturas mayores de 40°C<sup>1,2</sup>. Es una neurotoxina compuesta por 3 componentes: ácido aspártico 40%, fenilalanina 50% y metanol 10%; de ellos, el metanol es extremadamente tóxico, es fácilmente absorbido después de la ingestión, inhalación o exposición dermal y metabolizado por el hígado en formaldehído<sup>3</sup>.

La estabilidad del aspartame depende del pH y de la temperatura del medio, es estable a pH 3-5, su mejor estabilidad está a pH de 4.3, es menos estable a pH > 5 y también se hace menos estable con el calor<sup>4</sup>. Dicho endulzante se encuentra naturalmente en carnes, legumbres, productos lácteos y frutas. Fue descubierto en 1965 por James Schlatter<sup>5</sup>. Su uso se inicio hace más de 25 años y está aprobado en más de 90 países. Es un constituyente de más de 6,000 productos, y cuenta con la aprobación de la FDA (por sus siglas en inglés de Food and Drug Administration) en los EE.UU<sup>6</sup>.

Se ha reportado que los aminoácidos del aspartame actúan de manera individual o combinada en el sistema nervioso central (SNC) provocando efectos adversos que incluyen alteraciones neuronales, desórdenes conductuales y enfermedades neurodegenerativas. Si bien, no se ha determinado los mecanismos de acción en estos eventos, se ha descrito que la función de ambos aminoácidos en el SNC es de tipo excitador y que el incremento plasmático de ambos aminoácidos provenientes de la ingesta de alimentos y bebidas elaboradas con este edulcorante, ocasiona sobre excitación neuronal debido a la entrada de iones Ca<sup>2+</sup> en la célula, favoreciendo una cascada de reacciones con generación de radicales libres (RL)<sup>7</sup>. El consumo habitual del aspartame no sólo puede provocar enfermedades, sino también adicción clínica<sup>8</sup>.

Todo producto que contengan ASP debe ser debidamente etiquetados, en atención a los que presentan la enfermedad hereditaria fenilketonuria, que son sensibles a fenilalanina (uno de los metabolitos componentes)<sup>9</sup>. La fenilketonuria clásica (PKU) se produce por defecto del gen que codifica la enzima fenilalanina hidroxilasa (FAH) ubicado en el cromosoma 12q22-24.1. Se caracteriza por presentar niveles de fenilalanina (FA) en la sangre arriba de 20 mg/dl. Si esta enfermedad no es diagnosticada y tratada precozmente, ocasiona deterioro progresivo en el sistema nervioso central, produciendo retardo mental moderado o profundo<sup>10</sup>.

En el Instituto Ramazzini de Italia se estudiaron siete grupos de ratas que fueron alimentadas administrándoles concentraciones de 0 a 100,000 ppm de aspartame en la dieta, desde la 8va semana de vida hasta que se produjo la muerte natural. Las ratas fallecidas fueron sometidas a una biopsia completa para revisar el estado de sus órganos. Como resultado observaron por primera vez de forma experimental que, el aspartame aumenta la incidencia de tumores malignos, incrementa la aparición de linfomas y leucemias, aumenta la incidencia de carcinomas de pelvis renal y uréteres, y por último, aumenta la incidencia de Schwannomas de nervios periféricos; por lo tanto, según la fundación Ramazzini APM es un compuesto multicarcinogénico, donde los efectos son evidentes en dosis diaria de 20 mg/Kg de masa corporal, mucho menor que el actual consumo diario aceptable de 40 mg/Kg y 50 mg/Kg de masa corporal para Europa y Estados Unidos respectivamente<sup>11</sup>.

En 1938 el uso de *Allium cepa* se introdujo como un sistema de prueba biológico para evaluar los efectos citogenéticos de la colchicina. Desde entonces ha sido un material biológico de amplio uso, debido al crecimiento rápido de sus raíces y la respuesta de su material genético a la presencia de citotóxicos; siendo de esta manera frecuentemente utilizada sus meristemos, para estudios de dinámica celular<sup>12</sup>.

Teniendo en cuenta los mencionados antecedentes, es necesario establecer su potencial citotóxico y genotóxico, es por eso que el objetivo de la presente investigación está orientado a determinar el efecto del aspartame a diferentes concentraciones sobre el ciclo celular de *A. cepa*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material Biológico

Se utilizó bulbos de *Allium cepa*, de la variedad roja arequipeña, de buen estado fitosanitario, de forma ovalada, tamaño mediano y un peso aproximado de 90 gramos cada uno, los que se adquirirán en el mercado “mayorista” de la ciudad de Trujillo – Perú.

### Material Químico

Se utilizó Aspartame en polvo como edulcorante comercial, a concentraciones de 0.00, 0.1, 0.30 y 0.40 mg/mL.

### Obtención de raicillas de *Allium cepa*

Se extrajeron las catáfilas y raicillas secas a los bulbos de cebolla, en la parte ecuatorial de los mismos se introdujo 3 ó 4 palitos mondadientes distribuidos equidistantemente para suspender el bulbo en un vaso con agua potable, permitiendo que establezca contacto con el disco germinativo, y así estimular el crecimiento de nuevas raíces.

El tiempo que se dispuso para el enraizamiento de los bulbos de *Allium cepa* fue de 72 horas, con un recambio diario de agua potable a cada vaso, obteniéndose así las raicillas de 2 – 3 cm aproximadamente, necesarias para la investigación.

### Exposición de las raicillas de *A. cepa* a las soluciones de Aspartame:

Se prepararon soluciones de Aspartame en vasos de precipitación, donde se dispusieron de la siguiente manera:

- Para el primer tratamiento se utilizó 200 ml de agua potable como testigo a las cero horas.
- Para el segundo tratamiento se utilizó 200 ml de agua potable como testigo a las 24 horas.
- Para el tercer tratamiento se utilizó 20 mg de Aspartame sobre 200 ml de agua potable, para obtener una concentración de 0.1 mg/ml.
- Para el cuarto tratamiento se utilizó 60 mg de aspartame sobre 200 ml de agua potable, donde se obtuvo una concentración de 0.30 mg/ml.
- Para el quinto tratamiento se utilizó 80 mg de aspartame, sobre 200 ml de agua potable, donde se obtuvo una concentración de 0.40 mg/ml.

La exposición de los bulbos enraizados de *A. cepa* a los tratamientos fueron durante 24 horas según un diseño anidado en el que se consideraron 3 bulbos por tratamiento y 3 raicillas por bulbo.

### Obtención de los preparados citológicos

Finalizada la exposición de las raicillas de *A. cepa* a las soluciones de aspartame, se procedió a cortar y disponer en viales de vidrio conteniendo fijador carnoy, seguidamente se procedió a la coloración de las raicillas con Orceina acética y HCL 1N en proporción 9:1 respectivamente a 60° C, durante 15 minutos.

Luego, se colocó las raicillas en laminas portaobjetos, se aisló los ápices radiculares, se cubrió con laminillas cubreobjetos y se procedió a realizar la técnica de Squash o aplastamiento la cual se fundamenta en ejercer una presión uniforme con la yema del pulgar sobre la laminilla cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.

### Recuento celular

Los preparados citológicos se observaron a 400 aumentos en un microscopio compuesto Olympus CX21, donde se llevó a cabo el recuento de aproximadamente 3000 células por lámina, registrando el número de células en interfase, mitosis y posibles células con alteraciones.

### Análisis estadístico

Se hizo mediante análisis de varianza ANAVA para comparar los tratamientos del diseño experimental y la Prueba de Duncan, para comparar parejas de tratamientos tomando en cuenta el orden que ocupan en función del rendimiento promedio.

## RESULTADOS

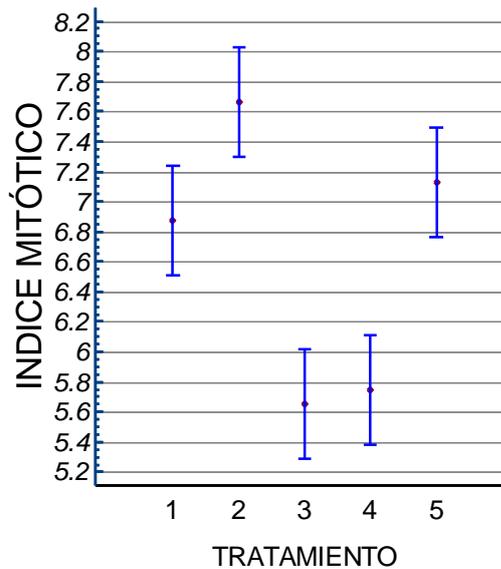
Se observaron valores disminuidos del Índice mitótico de *A. cepa* en los tratamientos a 0,2 y 0.3 mg/mL con respecto a los grupos control (Fig. 1), Asimismo, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para los valores de profase (Fig. 2), metafase (Fig. 3), anafase (Fig. 4) y telofase (Fig. 5).

Se observó un incremento progresivo del índice de buds nucleares en relación al control a medida del aumento de la concentración de Aspartame<sup>R</sup>.

## DISCUSIÓN

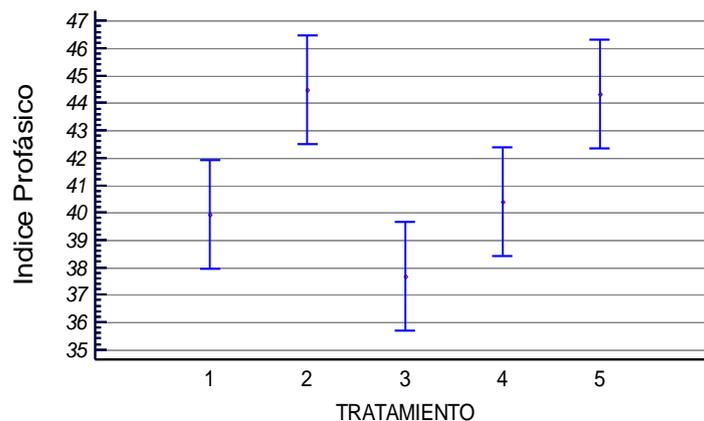
El empleo de edulcorantes acalóricos como sustitutos de todo o parte del contenido en azúcares de comidas y bebidas, ha tenido su máxima expansión en los últimos 35 años y en la actualidad, el Aspartamo (E951) y sal de Aspartamo-Acesulfamo (E962) son edulcorantes autorizados por la Unión Europea (UE)<sup>13</sup>.

La disminución del índice Mitótico (IM) de los tratamientos a 0,3 y 0,4 mg/mL de aspartame<sup>R</sup> podría deberse a alteraciones en la maquinaria molecular que controla el paso de la célula de interfase a mitosis por efecto del edulcorante en análisis; consecuentemente conllevando a alteraciones de los índices de fases en células meristemáticas de *A. cepa*.



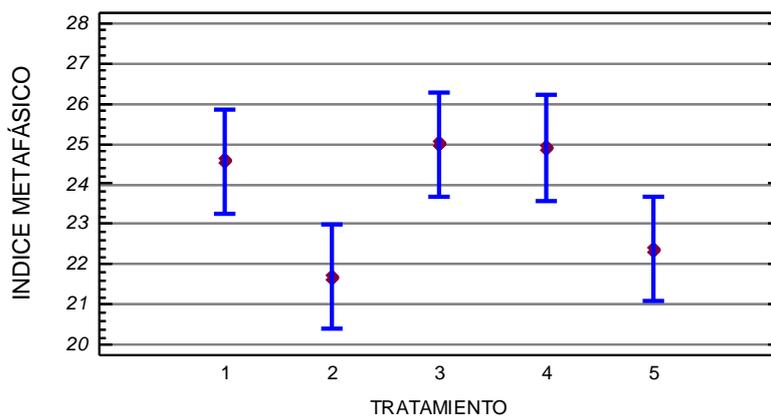
T <sub>1</sub> = 0.0 mg/mL – 0 horas	T <sub>4</sub> =0.3 mg/mL– 24 horas
T <sub>2</sub> = 0.0 mg/mL – 24 horas	T <sub>5</sub> =0.4 mg/mL– 24 horas
T <sub>3</sub> = 0.1 mg/mL– 24 horas	

Fig. 1.- Índice mitótico en células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de aspartame<sup>R</sup> durante 24 horas



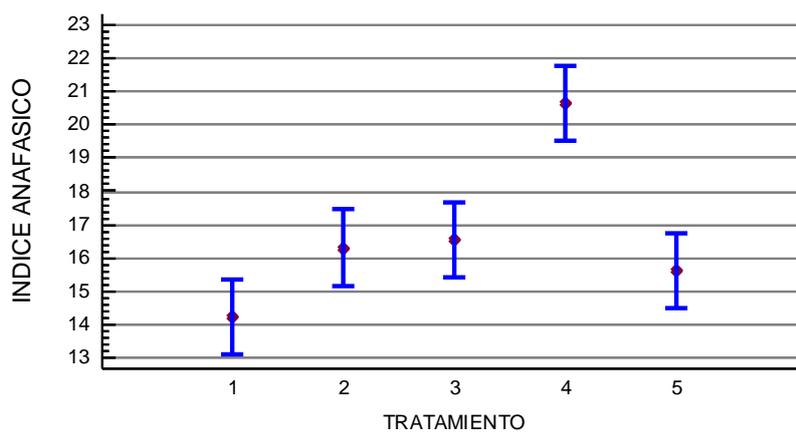
T <sub>1</sub> = 0.0 mg/mL – 0 horas	T <sub>4</sub> =0.3 mg/mL– 24 horas
T <sub>2</sub> = 0.0 mg/mL – 24 horas	T <sub>5</sub> =0.4 mg/mL– 24 horas
T <sub>3</sub> = 0.1 mg/mL– 24 horas	

Fig. 2.- Índice Profásico en células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de aspartame<sup>R</sup> durante 24 horas.



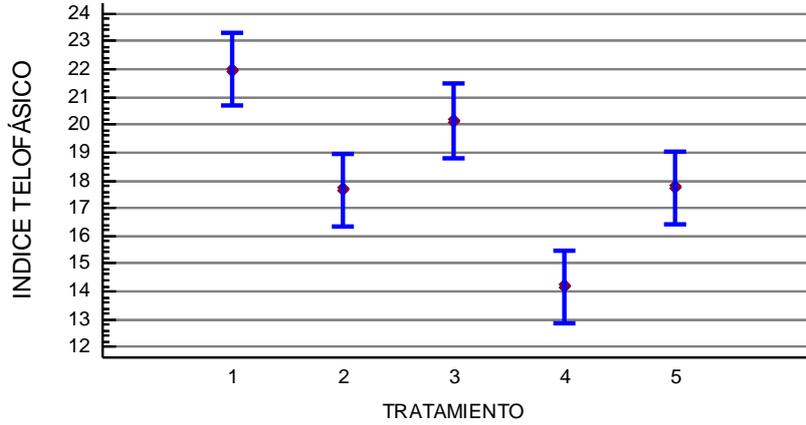
T <sub>1</sub> = 0.0 mg/mL – 0 horas	T <sub>4</sub> =0.3 mg/mL– 24 horas
T <sub>2</sub> = 0.0 mg/mL – 24 horas	T <sub>5</sub> =0.4 mg/mL– 24 horas
T <sub>3</sub> = 0.1 mg/mL– 24 horas	

Fig. 3.- Índice Metafásico en células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de aspartame<sup>R</sup> durante 24 horas.



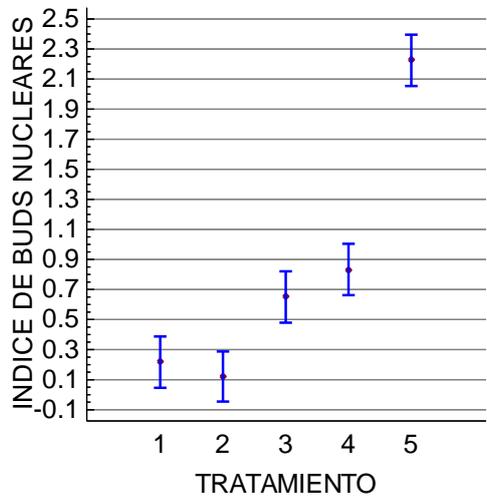
T <sub>1</sub> = 0.0 mg/mL – 0 horas	T <sub>4</sub> =0.3 mg/mL– 24 horas
T <sub>2</sub> = 0.0 mg/mL – 24 horas	T <sub>5</sub> =0.4 mg/mL– 24 horas
T <sub>3</sub> = 0.1 mg/mL– 24 horas	

Fig. 4.- Índice Anafásico en células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de aspartame<sup>R</sup> durante 24 horas.



T <sub>1</sub> = 0.0 mg/mL – 0 horas	T <sub>4</sub> =0.3 mg/mL– 24 horas
T <sub>2</sub> = 0.0 mg/mL – 24 horas	T <sub>5</sub> =0.4 mg/mL– 24 horas
T <sub>3</sub> = 0.1 mg/mL– 24 horas	

Fig. 5.- Índice Telofásico en células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de aspartame<sup>R</sup> durante 24 horas.



T <sub>1</sub> = 0.0 mg/mL – 0 horas	T <sub>4</sub> =0.3 mg/mL– 24 horas
T <sub>2</sub> = 0.0 mg/mL – 24 horas	T <sub>5</sub> =0.4 mg/mL– 24 horas
T <sub>3</sub> = 0.1 mg/mL– 24 horas	

Fig. 6.- Índice de Buds nucleares en células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de aspartame<sup>R</sup> durante 24 horas.

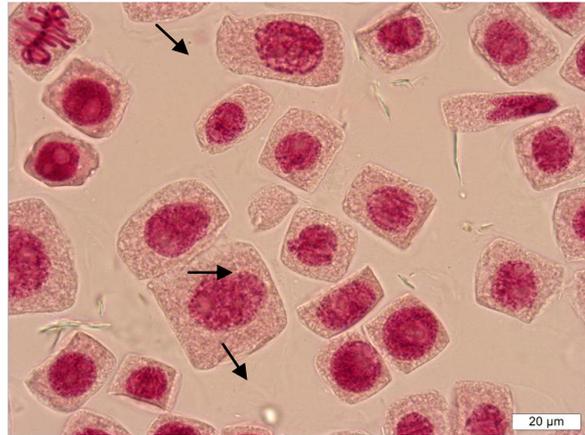


Fig. 7.- Buds nucleares en células meristemáticas de ápices radiculares de *Allium cepa* expuestos a diferentes concentraciones de aspartame<sup>R</sup> durante 24 horas.

Las alteraciones observadas en la dinámica del ciclo celular en células meristemáticas de *A. cepa* encuentran sustento con la nefrotoxicidad fetal en ratas asociada con la disminución del peso fetal, incremento del diámetro, perímetro y área nuclear de células de los glomérulos, túbulos contorneados distal y proximal y ductos colectores al ser tratados con 14mg de aspartame por kg de peso durante nueve, diez y once días<sup>14</sup>.

El incremento progresivo de Buds Nucleares en función al aumento de la concentración de Aspartame<sup>R</sup> evidencia la posible genotoxicidad de este edulcorante cuyo probable origen es el resultado de la eliminación de material genético excedente derivado de procesos de poliploidización por efecto de una hiperamplificación del DNA en la fase o por efecto de una respuesta fisiológica celular seguido de micronúcleos o minicélulas<sup>15,16</sup>.

Otros mecanismos, consideran que la formación de nuclear buds es resultado de roturas de puentes anafásicos, o de cromosomas con migración retrasada que no son incluidos totalmente en el núcleo principal, y que estarían sustentadas por la presencia de centrómero o telómero positivo en losbuds<sup>16</sup>.

Los buds nucleares como alteraciones nucleares y las alteraciones de la dinámica celular encontrados en este estudio podrían deberse también a metabolitos residuales como producto de descomposición del aspartame<sup>R</sup> dado que libera fenilalanina, ácido aspártico y metanol, que se metaboliza en una molécula de formaldehído, sustancia altamente reactiva clasificada como carcinógeno. Sin embargo, las cantidades ingeridas de estas sustancias peligrosas, suelen estar muy por debajo de los niveles de riesgo. Por lo tanto, no es raro que cantidades muy pequeñas de edulcorantes puedan modificar la microbiota, ya que estas actúan como la primera línea de defensa intestinal y están por lo tanto en contacto directo con el edulcorante y sus compuestos metabólicos. Durante la realización de una dieta hipocalórica para el control del peso con el uso de edulcorantes como el aspartamo se puede alterar el funcionamiento óptimo de la microbiota intestinal<sup>13,17</sup>.

## CONCLUSIONES

- El Aspartame<sup>R</sup> disminuye el índice Mitótico y de fases de células meristemáticas de *Allium cepa* expuesta durante 24 horas.
- El Aspartame<sup>R</sup> aumenta el índice de Buds nucleares progresivamente al aumento de su concentración en células meristemáticas de *A. cepa* expuesta durante 24 horas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Galdámez M. Cuantificación de aspartame en las bebidas carbonatadas de dieta de tres marcas que se expenden en supermercados de la ciudad de Guatemala .Tesis de Pregrado; Universidad de San Carlos de Guatemala. 2011
2. Cruzado S, Figueroa L, Guzmán A, Hernández D, et al. Efectos a nivel conductual y citogenético de los edulcorantes artificiales que con tienen aspartame en ratones de la especie *mus musculus*. Universidad nacional autónoma de México. 2005
3. Morales J. Cuantificación de Aspartame y Acesulfame-k por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Tesis de Pregrado; Universidad de Honduras. 2007.
4. Hernández A, Palomo E, Santos A. Dulzura Percibida de Aspartame y Sacarosa en Yogur. *Naturaleza y Desarrollo* 2004; 2(1): 11-15
5. Gayol, F. Un análisis del consumo de aspartamo desde la perspectiva de programas de investigación. *Problemas del Conocimiento en Ingeniería y Geología*, Vol. I Editorial Universitas, Córdoba, 2003.
6. Calzada R, Ruíz M, Altamirano N, Padrón M. Características de los edulcorantes no calóricos y su uso en niños. *Acta Pediátrica México* 2013; 34:141-153.
7. Labra N, Vences A, Hernández N, Gómez J, et al. Efecto de aspartame, fenilalanina y ácido aspártico sobre los niveles de glutatión y peroxidación de lípidos en cerebro de rata. *Arch Neurocién* 2008; 13(2): 79-83.
8. Roberts HJ. Aspartamo. *Revista de Medicinas Complementarias. Medicina Holística*. N° 65. 1995.
9. Zhu Y, Guo Y, Ye M, James F. Separation and Simultaneous Determination of Four Artificial Sweeteners in Food and Beverages by Ion Chromatography. *J Chromatograph* 2005; 1085:143-146.
10. Cornejo V, Manríquez V, Colombo, M, Mabe P, et al. Fenilquetonuria de diagnóstico neonatal y lactancia materna. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1280-1287.
11. Soffritti M, Belpoggi F, Degli D, Lambertini L, et al. First Experimental Demonstration of the Multipotential Carcinogenic Effects of Aspartame Administrated in the Feed to Sprague-Dawley rats. *Environ Health Perspectives* 2006; 114(3): 379-385.
12. Kram W. Efectos citotóxicos de extractos crudos de “Tirica”. Test de *Allium cepa* .FEQYN-UNAM-Modulo de Farmacia y Bioquímica. Catedras De Microbiología Gral (C.Bioq.) y Farmacotecnia I y II (C.Fcia.). 2005
13. García-Almeida JM, Casado GM, García Alemán J. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr Hosp* 2013; 28(Supl. 4):17-31.
14. Martins MRI, Azoubel R. Effects of aspartame on fetal kidney: A morphometry and stereological study. *Int J Morphol* 2007; 25(4): 689-694.
15. Fernandes TC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to triXuralin herbicide. *Pesticide Biochem & Physiol* 2007; 88: 252-259.
16. León-Incio J, Prieto Z, Quijano-Jara C, Fernández R, et al. Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (tilapia). *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 2008; 25(1): 51-58
17. Zaninovic V. Emergencias en salud pública. *Colombia Médica* 2002; 33(3): 129-130.