

TESIS DOCTORAL

PAPEL DE ADITIVOS ALIMENTARIOS EN LA MODULACIÓN DE PROCESOS DEGENERATIVOS: ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*



Isabel Rocío Merinas Amo
2020

TITULO: *Papel de aditivos alimentarios en la modulación de procesos degenerativos: estudios in vivo e in vitro*

AUTOR: *Isabel Rocío Merinas Amo*

© Edita: UCOPress. 2021
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TESIS DOCTORAL

Papel de aditivos alimentarios en la modulación de procesos degenerativos:
estudios in vivo e in vitro.

Role of food additives in the modulation of degenerative processes:
in vivo and in vitro studies.

Trabajo realizado en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba para optar al grado de Doctora en Biociencias y Ciencias Agroalimentarias por el Máster de Medicina, Sanidad y Mejora Animal:

Isabel Rocío Merinas Amo

Dirigido por:

Dra. Ángeles Alonso Moraga

Dra. María Tania Merinas Amo



TÍTULO DE LA TESIS:

Papel de aditivos alimentarios en la modulación de procesos degenerativos: estudios *in vivo* e *in vitro*.

Role of food additives in the modulation of degenerative processes: *in vivo* and *in vitro* studies.

DOCTORANDA: Isabel Rocío Merinas Amo.

INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS

La Tesis Doctoral de Dña. Isabel Rocío Merinas Amo se ha llevado a cabo en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba. Su desarrollo se ha ajustado a los plazos inicialmente previstos y ha permitido a la doctoranda adquirir una sólida formación en diversas disciplinas de la Genética aplicándolas de un modo transversal. Durante la realización de la Tesis, Dña. Isabel Rocío Merinas Amo ha confirmado una excelente aptitud y vocación por la investigación científica y ha demostrado poseer una excelente capacidad de trabajo, organización e integración, así como de redacción de trabajos científicos. La doctoranda ha conseguido aportar un nuevo cuerpo de datos sobre las actividades biológicas de los aditivos alimentarios más consumidos actualmente. Podemos destacar el carácter seguro, el escaso potencial nutracéutico y el nulo potencial quimiopreventivo que los aditivos ensayados muestran, para las concentraciones IDA extrapolables establecidas respectivamente, en nuestros ensayos *in vivo* e *in vitro*. El papel de los colorantes aditivos en la modulación de procesos degenerativos ha sido publicado en el artículo:

- "Biological Effects of Food Coloring in *In Vivo* and *In Vitro* Model Systems". Rocío Merinas-Amo; María Martínez-Jurado; Silvia Jurado-Güeto; Ángeles Alonso-Moraga; Tania Merinas-Amo*. Foods. Volumen 8 (5), 176, 2019, Páginas 1-19. <https://doi.org/10.3390/foods8050176>.

Por todo ello, autorizamos la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 25 de Agosto de 2020

Firma de Las Directoras:

Fdo.: Ángeles Alonso Moraga

Fdo.: María Tania Merinas Amo

Dra. Ángeles Alonso Moraga y Dra. María Tania Merinas Amo

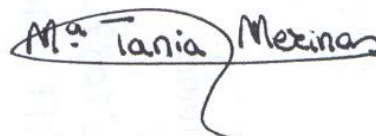
INFORMAN:

Que el trabajo titulado "Papel de aditivos alimentarios en la modulación de procesos degenerativos: estudios *in vivo* e *in vitro*" realizado por Dña. Isabel Rocío Merinas Amo bajo la dirección de la Dra. Ángeles Alonso Moraga y la Dra. María Tania Merinas Amo, puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba.

Firmado en Córdoba, a 25 de Agosto de 2020



Fdo. Ángeles Alonso Moraga



Fdo. María Tania Merinas Amo

Quiero comenzar dando mis más sincero agradecimiento a la persona que me ha abierto las puertas de su laboratorio incluso desde antes de empezar esta aventura; ha confiado en mí y me ha enseñado todo lo que sé. Además de profesionalmente, ha hecho que crezca personalmente, gracias por todos tus consejos y por estar presente en todos los momentos principales de mi vida. Angelines, ya sabes que eres más que una directora, ¡muchísimas gracias por todo!

En segundo lugar, quiero agradecer a otra de mis directoras, mi hermana Tania. Sin ella nada de esto habría sido posible; gracias por tu paciencia, esfuerzo, dedicación y entrega en todo lo que haces. Caminar contigo es todo un privilegio. Nunca podré compensar todo el esfuerzo que haces por mí.

A mis padres, Manolo e Isabel, por apoyarme y presionarme para seguir avanzando y creciendo personal y profesionalmente. Gracias por los valores que me habéis inculcado: la educación y el trabajo persistente son dos puntos fuertes de mi personalidad, y es gracias a vosotros.

Por último, quiero agradecer a todo el equipo humano que ha contribuido a que este proyecto haya podido lograrse. Quiero hacer especial mención a los compañeros y amigos de laboratorio con los que he compartido todos estos maravillosos años. Me guardo miles de anécdotas y buenos momentos, los cuales estoy convencida que seguirán ampliándose durante muchos años más.

Muchas gracias a todos.

Rocío Merinas

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	29
RESULTADOS	49
DISCUSIÓN	77
CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	95
ANEXO	111

- Biological Effects of Food Coloring in *In Vivo* and *In Vitro* Model Systems

ÍNDICE DE IMÁGENES

- Imagen 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*
- Imagen 2. Células HL-60
- Imagen 3. Fenotipos de *D. melanogaster*
- Imagen 4. Sectores del ala de *D. melanogaster*
- Imagen 5. Cámara de Neubauer
- Imagen 6. Ciclos de qMSP

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Aditivos alimentarios y sus usos
- Tabla 2. Información de los aditivos estudiados
- Tabla 3. Información de las concentraciones usadas para cada aditivo estudiado
- Tabla 4. Información de las secuencias repetitivas usadas
- Tabla 5. Genotoxicidad de los aditivos alimentarios en *Drosophila melanogaster*
- Tabla 6. Antigenotoxicidad de los aditivos alimentarios en *Drosophila melanogaster*
- Tabla 7. Medias y significancias de las diferentes curvas de longevidad y calidad de vida de *D. melanogaster* tratadas con aditivos alimentarios
- Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos en la presente tesis desde un punto de vista holístico
- Tabla 9. Resultados obtenidos en la presente tesis desde un punto de vista cuantitativo

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura de la Riboflavina
- Figura 2. Estructura de la Tartrazina
- Figura 3. Estructura del Ácido Carmínico
- Figura 4. Estructura de la Eritrosina
- Figura 5. Estructura de la Indigotina
- Figura 6. Estructura del Azul Brillante FCF
- Figura 7. Estructura del BHA
- Figura 8. Estructura del BHT
- Figura 9. Estructura del Ácido Cítrico
- Figura 10. Estructura del Glutamato
- Figura 11. Estructura de Nitritos
- Figura 12. Estructura de Nitratos
- Figura 13. Esquema resumen del ensayo SMART en *Drosophila*
- Figura 14. Representación de las mutaciones inducidas en el ensayo SMART
- Figura 15. Niveles de toxicidad causados por los aditivos alimentarios en *D. melanogaster*
- Figura 16. Niveles de antitoxicidad obtenidos por los aditivos alimentarios en *D. melanogaster*
- Figura 17. Curva de supervivencia de *D. melanogaster* alimentadas con distintas concentraciones de aditivos alimentarios durante toda su vida
- Figura 18. Efectos de los aditivos alimentarios sobre la viabilidad celular
- Figura 19. Fragmentación internucleosómica del ADN de células HL-60
- Figura 20. Ensayo del cometa alcalino en células HL-60
- Figura 21. Estado de metilación de células HL-60 tratadas con aditivos alimentarios

ABREVIATURAS

ADI	Acceptable Daily Intake (Ingesta Diaria Admisible)
Alu	Secuencia repetitiva de ADN <i>SINE</i> (Short Interspersed Nuclear Elements)
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CpG	Cytosine-Phosphate-Guanine dinucleotide (dinucleótido Citosina-Fosfato-Guanina)
Ct	Cycle threshold (ciclo umbral)
DIM	<i>Drosophila Instant Medium</i> (Medio Instantáneo de <i>Drosophila</i>)
DL ₅₀	Dosis Letal 50
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food and Drugs Administration (Administración de Medicamentos y Alimentos)
<i>flr</i> ³	Marcador genético <i>flare</i>
HL-60	Células de Leucemia Humana-60
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50 (Concentración Inhibitoria 50)
IDA	Ingesta Diaria Admisible
iTaq	Polimerasa de ADN
JECFA	Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios
LD ₅₀	Lethal Dose 50 (Dosis Letal 50)
LINE-1	Secuencia repetitiva de ADN larga (Long Interspersed Nuclear Elements)
<i>mwh</i>	Marcador genético <i>multiple wing hairs</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PI	Porcentaje de Inhibición
qMSP	quantitative Methylation-Specific PCR (PCR cuantitativa de metilación específica)
Sat- α	Secuencia repetitiva de ADN <i>Satellite-alpha</i>
SCCP	Comité Científico de Productos Cosméticos
SCF	Comité Científico de Alimentos de la UE
SMART	Somatic Mutation And Recombination Test (Test de recombinación y mutación somática)
TM	Tail Moment (Cola del cometa)

PALABRAS CLAVE

Aditivos alimentarios; Antigenotoxicidad; Antitoxicidad; Células tumorales HL-60; Citotoxicidad; Daño celular; *Drosophila melanogaster*; Estado de metilación; Ensayo del Cometa; Genotoxicidad; Longevidad; Toxicidad.

KEYWORDS

Food additive; Antigenotoxicity; Antitoxicity; HL-60 tumour cells; Cytotoxicity; DNA damage; *Drosophila melanogaster*; Methylation status; Comet Assay; Genotoxicity; Longevity; Toxicity.

RESUMEN

La dieta es uno de los agentes medioambientales más importantes que ejercen efectos sobre la salud y por tanto está relacionada con el riesgo de adquirir enfermedades. En el presente trabajo hemos evaluado los efectos biológicos que distintos aditivos alimentarios ejercen en modelos animales y celulares, añadiendo un nuevo cuerpo de datos a la ciencia en el campo de la nutraceutica.

Para llevar a cabo nuestro objetivo, se han usado ensayos a diferentes niveles (molecular, celular, individual y poblacional) para analizar la seguridad y el posible efecto protector frente a una toxina oxidativa en el organismo modelo *Drosophila melanogaster*, así como el potencial quimiopreventivo y la capacidad de inducir daño en el ADN en células tumorales de leucemia humana HL-60. Todos estos estudios consisten en un conjunto de ensayos de detección de actividad biológica donde se pueden verificar varios puntos relacionados con los procesos degenerativos. La metodología usada se resume a continuación:

i) Los ensayos *in vivo* usando el modelo *Drosophila* han permitido estudiar:

- Toxicidad y Antitoxicidad: se evalúa la seguridad y la capacidad protectora a nivel individual midiendo el porcentaje de individuos supervivientes con respecto a su control negativo o positivo cuando *Drosophila* es tratada con diferentes concentraciones de aditivos alimentarios de forma simple y/o combinados con una toxina oxidativa (H₂O₂).
- Genotoxicidad y Antigenotoxicidad: evaluación de la seguridad genómica y el potencial protector a nivel cromosómico mediante el análisis de mutaciones y recombinaciones somáticas en células en expansión clonal de alas de *Drosophila* tratadas en su estado larvario con diferentes concentraciones de los aditivos alimentarios en estudio de forma simple o combinada con H₂O₂.
- Longevidad: evaluación de los efectos sobre la extensión y calidad de vida en poblaciones de *Drosophila* alimentadas durante toda su vida con los aditivos alimentarios a diferentes concentraciones.

ii) Los ensayos *in vitro* usando el modelo celular promielocítico humano HL-60 nos han permitido evaluar:

- Citotoxicidad: capacidad de los aditivos alimentarios para inhibir el crecimiento tumoral a diferentes concentraciones.
- Daño en el ADN: potencial clastogénico de los aditivos alimentarios para inducir fragmentación proapoptótica del ADN y/o daño en el ADN en células tumorales individuales induciéndoles cometas.
- Estado de metilación: capacidad de los aditivos alimentarios de modular el epigenoma de células tumorales mediante el estudio de los patrones del estado de metilación de amplias secuencias genómicas (secuencias repetitivas Alu, LINE y Satélite).

Basándonos en los resultados obtenidos tanto en los ensayos *in vivo* del organismo modelo *Drosophila* como en los ensayos *in vitro* en la línea celular HL-60, sobre la seguridad, potencial nutracéutico y potencial quimiopreventivo de nuestros aditivos, las conclusiones más destacables para la concentración correspondiente a la Ingesta Diaria Admisible (IDA) de los aditivos estudiados en la presente tesis quedan reflejadas a continuación:

- 1.- Los aditivos alimentarios tienen un carácter seguro. Ninguno de los aditivos ensayados alcanza la DL₅₀, ni tampoco induce mutaciones genéticas cuando *Drosophila melanogaster* es alimentada a distintas concentraciones.
- 2.- Cuatro de los aditivos mostraron capacidad protectora frente a un agente tóxico (Nitrato de Sodio, Tartrazina, Indigotina y Glutamato); cuatro mostraron resultados perjudiciales (Eritrosina, Azul Brillante FCF, Nitrito de Potasio y Nitrito de Sodio); el resto no mostraron efectos significativos, tanto a nivel de individuo como genómico.
- 3.- La mayoría de los aditivos mostraron un potencial nutracéutico bien significativamente positivo (Tartrazina, Azul Brillante FCF, Glutamato, Ácido Cítrico y Nitrato de Sodio) o bien neutro sobre la expansión de vida de *Drosophila*, siendo solo tres de ellos (Ácido Carmínico, Eritrosina y BHA) los que acortaron significativamente la longevidad .
- 4.- Tan solo resultó tener potencial quimiopreventivo uno de los compuestos estudiados (Nitrato de Potasio); el resto de aditivos indujo crecimiento celular y no fue capaz de ejercer daño genómico en las células de leucemia humana HL-60 tratadas.

De forma general, podemos destacar el escaso potencial nutracéutico y el casi nulo potencial quimiopreventivo que los aditivos ensayados muestran, para las concentraciones IDA extrapolables establecidas, en nuestros ensayos *in vivo* e *in vitro*. Por todo lo anterior comentado, además de hacer un uso y consumo responsable de alimentos que contengan dichos compuestos, y continuar con las evaluaciones periódicas por los diferentes comités alimentarios, también se necesitan más estudios que nos permitan dilucidar las actividades biológicas y el potencial nutracéutico de los aditivos alimentarios estudiados con mayor claridad. Por ejemplo, se deben usar células no tumorales para compararlas con nuestros estudios *in vitro*. Ensayos clínicos en humanos también se podrían realizar como último paso.

SUMMARY

Diet is one of the most important environmental agents that exert a significant effect on health and consequently related to disease risk. In this work, the biological effects that food additives show on animal and cellular model systems have been evaluated, adding a new data corpus to science in the nutraceutical area.

In order to carry out our goal, multilevel assays (molecular, cellular, individual and population) were used to analyse the safety and the possible protective effects against an oxidative toxin in the *Drosophila melanogaster* model organism, as well as the chemopreventive potential and the induction of DNA damage ability in the human leukaemia tumour HL-60 cells. Here, we present a set of biological activity screening assays where several points related to degenerative processes can be checked. Briefly, the used methodology is below mentioned:

i) *In vivo* assays using the *Drosophila* model allowed to study:

- Toxicity and Antitoxicity: the safety and protective ability at individual level measuring the survival percentage of individuals with respect to their concurrent negative or positive controls is evaluated when *Drosophila* is treated either with different concentrations of a single food additive or it is combined with an oxidative toxin (H₂O₂).
- Genotoxicity and Antigenotoxicity: the genomic safety and protective potential at chromosomal level measuring the somatic mutation and recombination wing spot test of *Drosophila* treated at larval stage with different concentrations of a single or a combined food additive with H₂O₂ is evaluated.
- Longevity: evaluation of effects on the life extension and quality of life of *Drosophila* populations feed over time with different concentrations of food additives.

ii) *In vitro* assays using the HL-60 promyelocytic human cell model allowed us to evaluate:

- Cytotoxicity: ability of food additives to inhibit the tumour cells growth treated with different concentrations.
- DNA damage: clastogenic potential of food additives to induce proapoptotic DNA fragmentation and/or DNA damage in single tumour cell by inducing comets.
- Methylation status: capacity to modulate epigenome by studying the methylation status pattern of genome wide sequences (Alu, LINE and Satellite repetitive elements) by treating tumour cells with food additives.

According to the obtained results, both in the *in vivo* assays with the model organism *Drosophila* and the *in vitro* assays with the HL-60 cell line, about the safety, nutraceutical potential and chemopreventive potential of our additives, the most highlighted conclusions from the present thesis are bellow mentioned:

- 1.- Food additives are safe. None of the additives tested reaches the lethal dose 50 (LD₅₀), nor does it induce genetic mutations when *Drosophila melanogaster* is fed at different concentrations.
- 2.- Four of the additives showed protective capacity against a toxic agent (Sodium Nitrate, Tartrazine, Indigotine and Glutamate); four showed harmful results (Erythrosine, Brilliant Blue FCF, Potassium Nitrite and Sodium Nitrite); the rest did not show significant effects, both at the individual and genomic level.
- 3.- Most of the additives showed a significantly positive nutraceutical potential (Tartrazine, Brilliant Blue FCF, Glutamate, Citric Acid and Sodium Nitrate) or neutral on the life expansion of *Drosophila*, being only three of them (Carminic Acid, Erythrosine and BHA) which significantly shortened longevity.
- 4.- Only one of the compounds studied (Potassium Nitrate) turned out to have chemopreventive potential; the rest of the additives induced cell growth and were not able to exert genomic damage in the treated HL-60 human leukaemia cells.

In general, it can be highlighted the low nutraceutical potential and the almost zero chemopreventive potential that the additives tested show, for the established extrapolated Acceptable Daily Intake (ADI) concentrations, in our *in vivo* and *in vitro* tests. For all the foregoing, in addition to making a responsible use and consumption of foods that contain these compounds, and continuing with periodic evaluations by the different food committees, more studies are also needed that allow us to elucidate the biological activities and nutraceutical potential of the food additives studied more clearly. For instance, non-tumour cell must be used to be compared with our *in vivo* studies. When appropriate, clinic assays should also be performed.

INTRODUCCIÓN

Una correcta alimentación resulta esencial para el bienestar humano y, concretamente, la forma en que consumimos alimentos ha experimentado grandes cambios a lo largo del tiempo. Desde los recolectores locales en el Paleolítico hasta las domesticaciones de animales y vegetales, hubo un gran salto, solo superado por el comercio de especias y otros bienes en el siglo XV. Hoy en día, en los países modernos, los alimentos se producen en instalaciones específicas y luego se transportan a mercados que pueden estar dentro del mismo país o en lugares distantes (Atkins & Bowler, 2016). La entrega de alimentos en buenas condiciones desde el sitio de producción al consumidor requiere un gran coste energético, ya sea por refrigeración, embalaje o uso de aditivos, para evitar el deterioro y reducir la alteración de los alimentos. En un mercado global competitivo, siempre se prefiere el método menos costoso de conservación de alimentos, y en la mayoría de los casos, los aditivos alimentarios se eligen entre los demás. Además, los aditivos alimentarios son esenciales para que la industria alimentaria pueda hacer que los alimentos satisfagan las demandas legales y de mercado cada vez más desafiantes (Saltmarsh & Saltmarsh, 2013).

Los aditivos alimentarios se definen como “cualquier sustancia que habitualmente no es consumida como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o puede preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características”. Esta definición no incluye “contaminantes” o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales (Manual de Procedimiento del *Codex Alimentarius*, 1989). Los aditivos se utilizan cada vez más en la industria alimentaria como resultado de las tecnologías de producción. Estos productos químicos no sólo aumentan la calidad y el atractivo sensorial del producto, sino que también aseguran el curso apropiado de los procesos tecnológicos y de almacenamiento (Friedrich & Kuchlewska, 2013).

Existe una gran variedad de sustancias que se añaden a un alimento con fines tecnológicos. Entre los aditivos alimentarios más usados destacan: colorantes, conservantes, antioxidantes, reguladores del pH, gelificantes, espesantes y estabilizadores, potenciadores del sabor, edulcorantes y aromatizantes (Carocho, Morales, & Ferreira, 2015; Ibáñez, Torre, & Irigoyen, 2003). En la actualidad, el *Codex Alimentarius* Europeo clasifica los distintos compuestos químicos usados para la conservación de alimentos. Este código clasifica los aditivos alimentarios en 7 grupos según la función que cumplan, teniendo asimismo un código internacional que va precedido de la letra E que indica su control por la Unión Europea. Esta lista comprende aditivos desde el E-100 al E-1521 (Tabla 1).

Tabla 1. Aditivos alimentarios y sus usos.

Uso	Código	Función
Colorantes	E-100 – E-199	Dan o restituyen color a un alimento
Conservantes	E-200 – E-299	Prolongan la vida en almacén de alimentos protegiéndolos del deterioro ocasionado por microorganismos
Antioxidantes	E-300 – E-399	Prolongan la vida en almacén de alimentos protegiéndolos del deterioro ocasionado por la oxidación
Estabilizantes Emulsionantes Emulgentes Espesantes Gelificantes	E-400 – E-499	Forman o mantienen una emulsión uniforme de dos o más fases en un alimento / Aumentan la viscosidad de un alimento / Reducen la tendencia de los componentes de un alimento a adherirse unos a otros
Acidulantes Correctores de la acidez Antiaglomerantes	E-500 – E-599	Modifican acidez, o refuerzan sabor del alimento / Reducen la tendencia de los componentes de un alimento a adherirse unos a otros
Potenciadores del sabor	E-600 – E-899	Realzan el sabor y/o aroma que tiene un alimento
Edulcorantes	E-900 – E-1521	Dan sabor dulce a alimentos

Fuente: Carochó et al., (2015).

Los aditivos se encuentran presentes en muchos tipos de alimentos que a menudo consumimos sin saber que están presentes, por lo que es muy importante estudiar las consecuencias biológicas del uso de aditivos alimentarios. Además, debido a la estrecha relación entre dieta y salud, y la creciente concienciación de la población sobre la mejora de la calidad de vida, se ha incrementado el número de estudios para determinar qué aditivos alimentarios pueden ser perjudiciales para la salud, induciendo, por ejemplo, hiperactividad infantil, urticaria, asma (Juhlin, Michaëlsson, & Zetterström, 1972) o rinitis (Vedanthan, Menon, Bell, & Bergin, 1977) o cuáles pueden ayudar a prevenir enfermedades (Mateo-Fernández, Merinas-Amo, Moreno-Millán, Alonso-Moraga, & Demyda-Peyrás, 2016). Por ello, es necesario realizar estudios en ensayos extrapolables que evalúen correctamente dicha relación (Willett, 1994). La FDA (Food and Drugs Administration) es la responsable de regular los aditivos alimentarios para asegurar su seguridad alimentaria.

Hoy en día, más de 2500 aditivos son añadidos de forma intencionada a los alimentos con el objetivo de mantener ciertas propiedades o de prolongar su vida útil; aunque otros muchos han sido prohibidos a lo largo de los años, bien a nivel mundial o en países específicos (Branen, Davidson, Salminen, & Thorngate, 2001; Carochó, Barreiro, Morales, & Ferreira, 2014).

Ante la imposibilidad de estudiar, en un trabajo de tesis, toda la panoplia de aditivos alimentarios asequible hoy día, se ha seleccionado un grupo en el que se ha intentado que estuvieran presentes los más utilizados y los que de mayor impacto en la sociedad occidental, así como que estuvieran representados aditivos de una misma categoría creados de forma artificial o natural para comparar el potencial de cada uno. Además, otros aditivos como los edulcorantes ciclamato, aspartamo, acesulfamo K (Mateo-Fernández, 2019); los antioxidantes como el ácido ferúlico y catequinas (Merinas-Amo, Merinas-Amo, et al., 2016); o el colorante como la cúrcuma (El Hamss et al., 1999), ya han sido objeto de diferentes trabajos previos y de tesis en el seno de nuestro grupo de investigación.

A continuación se detalla la información más relevante de los aditivos alimentarios seleccionados.

- La Riboflavina (E-101) (Figura 1) forma parte de moléculas del grupo de la vitamina B. Es una sustancia sólida amarillo-naranja con poca solubilidad en agua. Este colorante alimentario está presente en una amplia gama de alimentos, siendo el hígado, la leche, la carne y el pescado las fuentes más importantes (EFSA, 2013a) aunque se puede obtener por fermentación controlada utilizando una cepa genéticamente modificada de *Bacillus subtilis* o el hongo *Ashbya gossypii* (Elmadfa, 2009). La Riboflavina fue evaluada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en 1996, que estableció una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 0,5 mg/kg*peso corporal/día (EFSA, 2013a). No se han relacionado efectos tóxicos, genotóxicos, citotóxicos o alérgicos adversos a la Riboflavina en diferentes organismos (Fukuwatari, Kuzuya, Satoh, & Shibata, 2009; Masuda, Katoh, Mizutani, & Kishimoto, 2009).

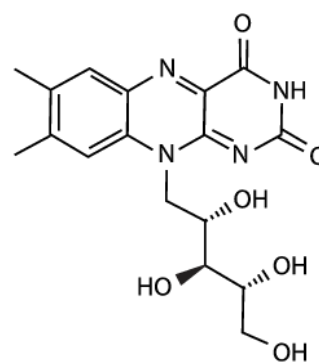


Figura 1. Estructura de la Riboflavina.

- La Tartrazina (E-102) (Figura 2) es un colorante azoico amarillo-limón sintético utilizado principalmente como colorante alimentario. Su presencia está permitida en diversos alimentos y bebidas (Komisvonu, 1994). Tanto el JECFA como el Comité Científico de Alimentos de la UE (SCF) establecieron una IDA de 7,5 mg/kg*peso corporal/día en 1996 (EFSA, 2009). Los efectos de la Tartrazina sobre la salud son controvertidos, siendo los más adversos los relacionados con daños en el ADN (Sasaki et al., 2002), hiperactividad (McCann et al., 2007), cambios en el sistema nervioso central (Novembre, Dini, Bernardini, Resti, & Vierucci, 1992) y reacciones alérgicas (Bhatia, 2000; Elhkim et al., 2007; Inomata, Osuna, Fujita,

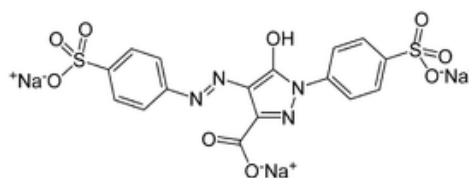


Figura 2. Estructura de la Tartrazina.

Ogawa, & Ikezawa, 2006; Nettis, Colanardi, Ferrannini, & Tursi, 2003; Worm, Vieth, Ehlers, Sterry, & Zuberbier, 2001).

- El Ácido Carmínico (E-120) (Figura 3) es un colorante rojo natural que proviene de *Datylopius coccus*, un insecto que vive en la planta *Opuntia coccinellifer*. Para obtener este colorante, es necesario secar y pulverizar el cuerpo de las hembras preñadas de estos insectos (Wüthrich, Kägi, & Stücker, 1997). Los Comités JECFA y SCF establecieron una IDA de 5 mg/kg*peso corporal/día para el Ácido Carmínico (EFSA, 2015). Este colorante es llamado por la FDA "extracto de cochinilla" o "carmín" y está clasificado como exento de certificación. Según la FDA, se usa en alimentos, medicamentos y cosméticos (Swaroop, Roy, & Vijayakumar, 2011); además se usa en mermeladas, gelatinas, productos horneados, productos lácteos y bebidas no carbonatadas (MacDougall, 2002). A pesar de la ausencia de efectos genotóxicos o citotóxicos descritos para el Ácido Carmínico, se ha relacionado con reacciones anafilácticas, asma, urticaria y angioedema (DiCello, Myc, Baker Jr, & Baldwin, 1999; Ferrer, Marco, Andreu, & Sempere, 2005; Sarıkaya, Selvi, & Erkoç, 2012; Wüthrich et al., 1997). Además, se ha demostrado que induce deterioro de la función renal en ratas albinas machos (Helal, Zaahkouk, & Mekkawy, 2000).

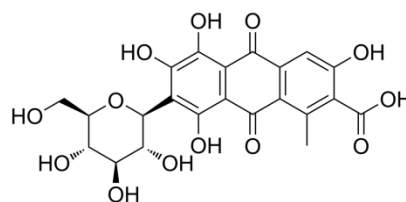


Figura 3. Estructura del Ácido Carmínico.

- La Eritrosina (E-127) (Figura 4) es un colorante alimentario sintético de color rosa cereza con una estructura de xanteno poliyodado (Chequer, de Paula Venâncio, Bianchi, & Antunes, 2012). Es ampliamente utilizado para colorear los dulces de los niños (Tuormaa, 1994), así como para determinar la presencia de placa dental en Odontología (Mpountoukas et al., 2010). La IDA de la Eritrosina fue establecida por el JECFA y SCF en 0,1 mg/kg*peso corporal/día (EFSA, 2011b). En cuanto a la FDA, esta permite el uso de Eritrosina tanto para alimentos como para medicamentos (Swaroop et al., 2011). Sin embargo, algunos estudios han sugerido una relación entre el consumo de la Eritrosina y la cognición y el comportamiento alterados en los niños, lo que podría deberse a la inhibición de los receptores de dopamina (Ganesan, Margolles-Clark, Song, & Buchwald, 2011). Además, diferentes estudios muestran la inducción de aberraciones cromosómicas y un aumento en la incidencia de tumores de tiroides por el consumo de Eritrosina en ratones, hámsteres y ratas (Hagiwara, Watanabe, Barrett, & Tsutsui, 2006; Mekkawy, Massoud, & El-Zawahry, 2000; Sasaki et al., 2002).

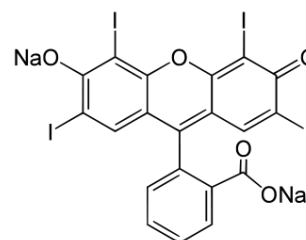


Figura 4. Estructura de la Eritrosina.

- La Indigotina (E-132) (Figura 5) es uno de los primeros colorantes naturales conocidos. Originalmente, se obtuvo de las hojas de las plantas *Indigofera tinctoria*, *Indigofera sui-fruticosa* e *Isatis tinctoria*, donde aparece un glucósido de indoxilo (Steingruber, 2000). En 1975, el JECFA y SCF establecieron una IDA de 5 mg/kg*peso corporal/día para este aditivo azul (EFSA, 2014). Solo un estudio de toxicidad subaguda realizado con ratones albinos suizos machos adultos mostró graves efectos adversos de Indigotina en los testículos (Dixit & Goyal, 2013).

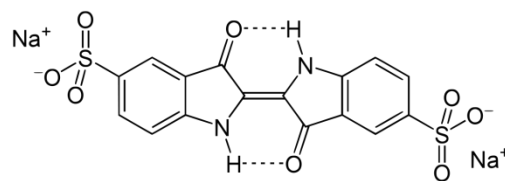


Figura 5. Estructura de la Indigotina.

- El Azul Brillante FCF (E-133) (Figura 6) es un colorante alimentario sintético triarilmetano autorizado como aditivo alimentario. En 2017, el JECFA revisó la IDA a 6 mg/kg*peso corporal/día para este aditivo azul (EFSA, 2010). El Azul Brillante FCF ha sido recientemente evaluado y aprobado como colorante cosmético por el Comité Científico de Productos Cosméticos (SCCP) (EFSA, 2010). Las bases de datos actuales no muestran efectos adversos del Azul Brillante FCF en ningún organismo analizado para ninguna prueba biológica realizada (Aboel-Zahab et al., 1997; Borzelleca, Depukat, & Hallagan, 1990; Lau, McLean, Williams, & Howard, 2006; Lucarelli, Shirk, Julian, & Crouser, 2004; Sasaki et al., 2002).

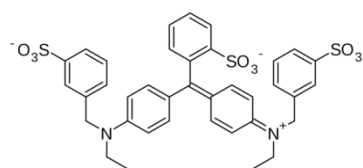


Figura 6. Estructura del Azul Brillante FCF.

- El BHA (butilhidroxianisol) (E-320) (Figura 7) es un antioxidante sintético autorizado como aditivo alimentario en la UE que fue evaluado previamente por los Comités Alimentarios JECFA y SCF. Ambos Comités establecieron una IDA de 0,5 mg/kg*peso corporal/día (EFSA, 2011a; JECFA, 1996). El BHA es una mezcla de los isómeros 2-tert-butil-4-hidroxianisol y 3-tert-butil-4-hidroxianisol. En general, el BHA se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, y sus metabolitos se excretan principalmente en orina y/o heces (Jeong, Kim, Kang, Ku, & Cho, 2005). Se utiliza para prevenir la oxidación de grasas. Los estudios de toxicidad y carcinogenicidad

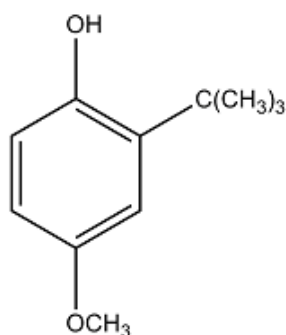


Figura 7. Estructura del BHA.

con BHA, demostraron cambios proliferativos en el estómago; aunque la mayoría de estudios de genotoxicidad indican una falta de potencial mutagénico (Ramadan & Suzuki, 2012). En grandes dosis provoca hiperactividad, asma, urticaria, insomnio, aumento del colesterol y problemas metabólicos en el hígado. En estudios con animales de laboratorio provoca cáncer (EFSA, 2011a; Ramadan & Suzuki, 2012).

- El BHT (butilhidroxitolueno) (E-321) (Figura 8) es uno de los antioxidantes más

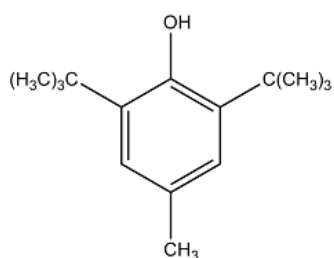


Figura 8. Estructura del BHT.

utilizados en alimentos que contienen grasas y aceites y en envases de alimentos, ya que este aditivo actúa eliminando radicales libres, y previene el enranciamiento y otras oxidaciones de las grasas (Babich, 1982). El SCF estableció una IDA de 0 – 0,05 mg/kg*peso corporal/día basada en su efecto en el tiroides, reproducción y parámetros hematológicos en la rata (Commission of the European Communities, 1975; EFSA, 2012). Los estudios de genotoxicidad en BHT indican una falta de

potencial para que BHT induzca mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas, o para interactuar o dañar el ADN (EFSA, 2012; JECFA, 1996; Vandghanooni et al., 2013).

- El Ácido Cítrico (E-330) (Figura 9) se usa como acidulante, regulador del pH, potenciador del sabor, conservante y antioxidante sinergista en muchos alimentos como refrescos, gelatina dulce, nutrientes horneados, mermelada, dulces, vegetales o frutas enlatadas (Gürsoy, 2002). Debido a la ausencia de efectos perjudiciales, el Ácido Cítrico está autorizado como aditivo alimentario y como monómero para materiales plásticos y artículos en contacto con alimentos (EU Commission, 2011a, 2011b; EFSA, 2013b).

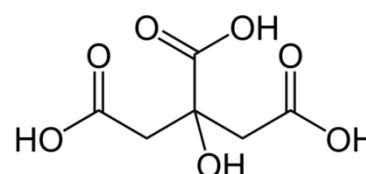


Figura 9. Estructura del Ácido Cítrico.

- El Glutamato Monosódico (E-621) (Figura 10) se utiliza como sustituto de la sal, siendo muy utilizado en la cocina asiática. Cuando se usa como aditivo alimentario tiene estimada su IDA en 30 mg/kg*peso corporal/día (Sasaki et al., 2002). En dosis bajas es potencialmente excitotóxico y neurotóxico ya que es capaz de destruir las neuronas del cerebro con gran rapidez, por lo que está contraindicado en personas que sufran enfermedades neurológicas como el trastorno bipolar, Parkinson, Alzheimer, epilepsia y esquizofrenia (JECFA, 1996). En grandes dosis puede provocar reacciones alérgicas y ataques de asma (EFSA, 2017a).

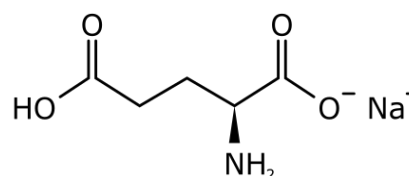


Figura10. Estructura del Glutamato.

- Los nitritos seleccionados son: Nitrito de Potasio (E-249) (Figura 11 izquierda) y Nitrito de Sodio (E-250) (Figura 11 derecha). Los nitritos se usan para dar un color característico y estable en el proceso de curación, dar un sabor típico y una textura que la diferencia de la carne fresca, proteger de algunas bacterias y como antioxidantes

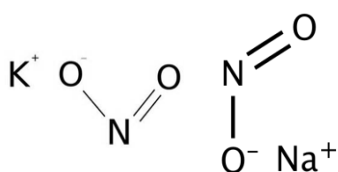


Figura 11. Estructura de Nitritos

(Lugo, 2008). Otros usos son la fabricación de explosivos y el mantenimiento de calderas industriales (Sigler & Bauder, 2012). La IDA de nitritos recomendada por el Comité Mixto de la FAO/OMS es de 0 – 0,06 mg/kg*peso corporal/día (EFSA, 2017b). El empleo de nitrito como aditivo en alimentos infantiles para niños menores de tres meses no está permitido (Speijers, 1996).

- Los nitratos estudiados son: Nitrato de Sodio (E-251) (Figura 12 superior) y Nitrato de Potasio (E-252) (Figura 12 inferior). Los nitratos se utilizan en fertilizantes y como reserva de nitritos (Speijers, 1996).

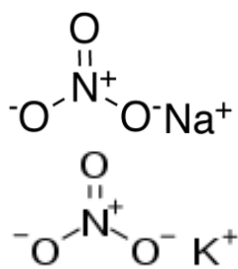


Figura 12. Estructura de Nitratos

Debido al efecto perjudicial que tienen estos compuestos en altas dosis sobre el organismo, su IDA fue establecida por el Comité Mixto de la FAO/OMS con un valor comprendido entre 0 – 3,7 mg/kg*peso corporal/día (EFSA, 2017c). Su toxicidad proviene de su conversión en nitritos y su posible formación endógena en compuestos N-nitroso. Niveles superiores de ambos compuestos podrían suponer un riesgo para la salud importante debido a la formación de nitrosaminas que son cancerígenas (Cornforth, 1996).

Teniendo en cuenta la información disponible sobre los distintos aditivos alimentarios, nuestro objetivo principal era evaluar de modo transversal los efectos biológicos y nutricionales que los aditivos mencionados tienen en los procesos degenerativos relacionados con el tiempo, así como aportar un cuerpo de nuevos datos científicos. Para ello, se realizó un estudio integrador de la actividad biológica a nivel poblacional, individual, celular y molecular basado en ensayos *in vivo* e *in vitro* utilizando dos sistemas modelo: *Drosophila melanogaster*, como eucariota superior holometábolo, y la línea celular tumoral humana HL-60.

Drosophila melanogaster es un excelente organismo modelo para la investigación de enfermedades de tipo degenerativo como el envejecimiento, dado que posee un ciclo de vida relativamente corto, se puede mantener un gran número de individuos en condiciones controladas de laboratorio y los adultos parecen mostrar muchas de las manifestaciones de enfermedades y senescencia celular observadas en los mamíferos (Fleming, Reveillaud, & Niedzwiecki, 1992). Es por todo esto que las moscas se han empleado con frecuencia para realizar estudios de procesos fisiológicos y patológicos que afectan a la esperanza de vida, así como para comprender la relación entre el metabolismo de los nutrientes y los mecanismos del envejecimiento (Li, Chen, Li, Zhang, & Liu, 2010). Este organismo es considerado como un organismo modelo, ya que es un organismo multicelular en el que muchos aspectos de la expresión génica son paralelos a los del ser humano, como ocurre con el cáncer y el envejecimiento (Gonzalez, 2013; Lints & Soliman, 1988; Rudrapatna, Cagan, & Das, 2012). Además se conoce que más del 70% de genes relacionados con diferentes enfermedades degenerativas humanas se encuentran presentes en este organismo modelo (Richardson,

Willoughby, & Humbert, 2001), como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, y enfermedades alérgicas, entre otras; lo cual es un valor añadido para la extrapolación de los resultados evaluados para *Drosophila* en los distintos estudios de toxicidad, antitoxicidad, genotoxicidad, antigenotoxicidad y longevidad, y su posible efecto, *a priori*, en el ser humano.

D. melanogaster es un insecto que lleva a cabo una metamorfosis completa, cuyo mantenimiento en condiciones de estudio se realiza a 25 °C. En condiciones estándares el ciclo de vida completo duraría 9 - 10 días (Imagen 1). Las células de la línea germinal de *Drosophila* se pueden tratar en todas sus etapas, y además la mosca tiene una gran capacidad para metabolizar fármacos o compuestos procarcinogénicos, que puede ser comparable a los que se encuentran en los mamíferos. Por lo que los estudios realizados en este organismo modelo pueden ser extrapolados a mamíferos incluyendo a los humanos (Kilbey, MacDonald, Auerbach, Sobels, & Vogel, 1981).

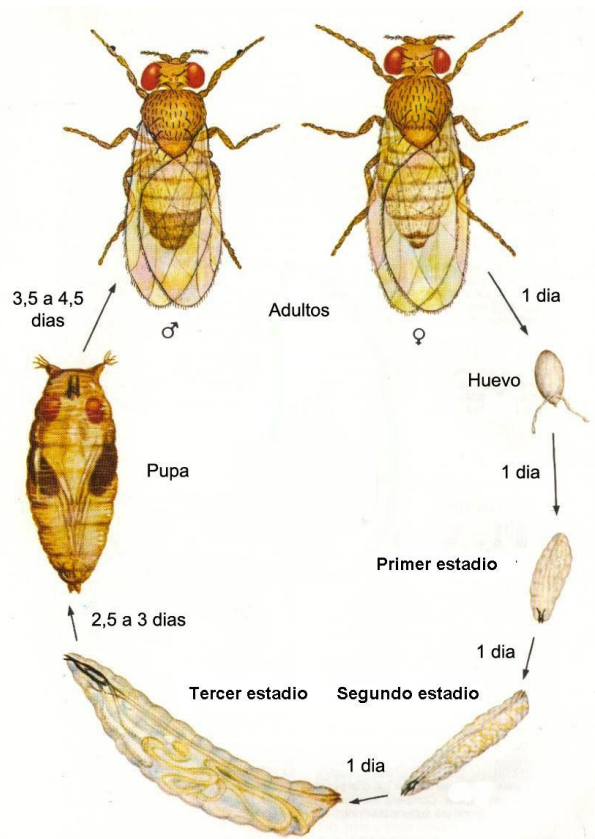


Imagen 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

La línea celular HL-60 (Imagen 2) es una estirpe derivada de una mujer de 36 años con leucemia promielocítica aguda (Gallagher et al., 1979) consistente en células mieloblásticas o promielocíticas. En cultivo, las células son ovoides o redondas, pero ocasionalmente emiten pseudópodos y tienen un tamaño heterogéneo (de 9 a 25 μm de diámetro). Las células HL-60 tienen núcleos grandes y redondos, que en ocasiones son binucleados con márgenes distintos, cromatina fina y de dos a cuatro nucleolos. El

citoplasma es basófilo con múltiples gránulos azurofílicos prominentes (Fleck, Romero-Steiner, & Nahm, 2005).

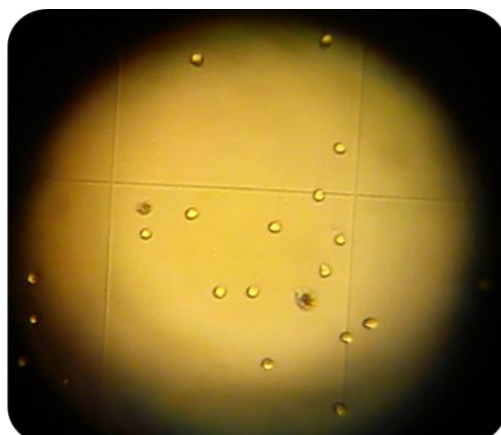


Imagen 2. Células HL-60. Células tumorales observadas a 100 aumentos bajo microscopio fotónico invertido tras el ensayo del Azul Tripán (Departamento de Genética, Laboratorio de Genotoxicología, UCO).

La utilización de modelos *in vitro* de células transformadas humanas como es la HL-60, ha conseguido importantes contribuciones a las disciplinas del cáncer, hematología e inmunología, permitiendo estudiar el efecto de compuestos candidatos sobre la inhibición del crecimiento celular, la regulación biológica del desarrollo hematopoyético o linfoquinas (Harris & Ralph, 1985), el daño del ADN (roturas simples y/o dobles de cadenas de ADN, asociadas con la apoptosis o necrosis celular), así como la modulación del estado de metilación por agentes externos (Merinas-Amo, Merinas-Amo, & Alonso-Moraga, 2017), o la evaluación de anticuerpos anticapsulares inducidos por la vacuna neumocócica por el ensayo estandarizado OPKA (muerte opsonofagocítica) (Fleck et al., 2005).

Conociendo la importancia y el uso que los aditivos alimentarios tiene en nuestra alimentación, es necesario realizar ensayos en organismos modelos que muestren el posible efecto biológico que tendría en humanos. En la presente tesis usaremos un organismo modelo *in vivo* (*Drosophila melanogaster*) y un organismo modelo *in vitro* (células tumorales HL-60).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Debido al alto contenido de aditivos alimentarios en nuestra dieta, a la importancia que esta ha ido adquiriendo sobre la calidad de vida, y a los estrictos controles que las organizaciones alimentarias realizan sobre la Ingesta Diaria Admisible (IDA) para cada alimento, nuestra hipótesis de partida se basa en la seguridad alimentaria que nos proporciona el uso y consumo de los distintos aditivos alimentarios. Se pretende demostrar que el uso de los aditivos propuestos es seguro, aunque no ejerza un valor protector ni quimiopreventivo altamente significativo.

El objetivo final de este trabajo de tesis es valorar las consecuencias del consumo de distintos aditivos naturales y sintéticos (Riboflavina, Tartrazina, Ácido Carmínico, Eritrosina, Indigotina, Azul Brillante FCF, Glutamato Monosódico, Ácido Cítrico, BHA, BHT, Nitrito de Potasio, Nitrato de Potasio, Nitrito de Sodio y Nitrato de Sodio) y, si es posible, poder proponer aquellos que resulten prometedores como sustancias de aplicaciones biomédicas o al menos que no sean nocivos. Para ello se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el papel protector de los aditivos frente a genotoxinas de tipo oxidativo en el mantenimiento de la integridad del ADN usando el modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster*.
2. Estudiar el efecto de los aditivos sobre la supervivencia en *Drosophila melanogaster*.
3. Estudiar *in vitro* el potencial quimiopreventivo de dichos aditivos sobre células de leucemia humana HL-60 mediante ensayos de citotoxicidad, fragmentación y rotura de cadenas simples y dobles de ADN.
4. Estudiar la modificación que estos aditivos inducen en el patrón de metilación genómica de células tumorales HL-60.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Preparación de las muestras

Se ha seleccionado un total de catorce aditivos alimentarios considerados de mayor impacto en los consumidores debido a su alto consumo y abundancia en la dieta (Commission, 2011b; Joint F.A.O. & WHO Expert Committee on Food Additives, 2010), según se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Información de los aditivos estudiados.

Aditivo	Clasificación	Casa Comercial	CAS	IDA (mg/kg)
E-101 Riboflavina	Colorante	Sigma, CAT: R4500	83-88-5	0,5
E-102 Tartrazina	Colorante	Fluka, CAT: 03322	1934-21-0	7,5
E-120 Ácido Carmínico	Colorante	Fluka, CAT: 11298	1260-17-9	5
E-127 Eritrosina	Colorante	Aldrich, CAT: 200964	15905-32-5	0,1
E-132 Indigotina	Colorante	Aldrich, CAT: 229296	482-89-3	5
E-133 Azul Brillante FCF	Colorante	Fluka, CAT: 80717	3844-45-9	6
E-621 Glutamato Monosódico	Estabilizante	Sigma, CAT: G1626	32221-81-1	120
E-330 Ácido Cítrico	Conservante	Sigma-Aldrich, CAT: 251275	77-92-9	0,5
E-320 BHA	Conservante	Fluka, CAT: 78943	25013-16-5	0,3
E-321 BHT	Conservante	Fluka, CAT: PHR1117	128-37-0	0,125
E-249 Nitrito de Potasio	Conservante	Sigma-Aldrich, CAT: 12654	7758-09-0	0,02
E-252 Nitrato de Potasio	Conservante	Aldrich, CAT: 542040	7757-79-1	3,7
E-250 Nitrito de Sodio	Conservante	Fluka, CAT: 67398	7632-00-0	0,02
E-251 Nitrato de Sodio	Conservante	Fluka, CAT: 15736	7631-99-4	3,7

2. Concentraciones ensayadas

Se ha ensayado un rango de seis concentraciones para cada aditivo con el fin de obtener un mejor conocimiento de la actividad biológica en los ensayos de primera línea de detección llevados a cabo. El rango de concentraciones para todas las sustancias fue calculado con el objetivo de hacerlas comparables con la IDA en humanos (EFSA, 2009, 2010, 2011a, 2011b, 2012, 2013a, 2013b, 2014, 2015, 2017a, 2017b, 2017c), teniendo en cuenta el consumo medio diario (1 mg/día) y el peso medio corporal de *D. melanogaster* (1 mg) (William et al., 2007) tal y como se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Información de las concentraciones usadas para cada aditivo estudiado.

Aditivo	Concentraciones *						
	1	2	3	4	5	6	
E-101	Riboflavina	0,0000025	0,000025	0,00025	0,0025	0,025	0,25
E-102	Tartrazina	0,0000375	0,000375	0,00375	0,0375	0,375	3,75
E-120	Ácido Carmínico	0,000025	0,00025	0,0025	0,025	0,25	2,5
E-127	Eritrosina	0,0000005	0,000005	0,00005	0,0005	0,005	0,05
E-132	Indigotina	0,000025	0,00025	0,00250	0,025	0,25	2,5
E-133	Azul Brillante FCF	0,0000005	0,000005	0,00005	0,0005	0,005	0,05
E-621	Glutamato	0,0006	0,006	0,06	0,6	6	60
E-330	Ácido Cítrico	0,0000025	0,000025	0,00025	0,0025	0,025	0,25
E-320	BHA	0,0000015	0,000015	0,00015	0,0015	0,015	0,15
E-321	BHT	0,000000625	0,00000625	0,0000625	0,000625	0,00625	0,0625
E-249	Nitrito de Potasio	0,0000001	0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
E-252	Nitrato de Potasio	0,0000185	0,000185	0,00185	0,0185	0,185	1,85
E-250	Nitrito de Sodio	0,0000001	0,000001	0,00001	0,0001	0,001	0,01
E-251	Nitrato de Sodio	0,0000185	0,000185	0,00185	0,0185	0,185	1,85

* los números 1 al 6 representan los valores, en mg/mL, de las diferentes diluciones ensayadas en los ensayos *in vivo* e *in vitro* para cada aditivo alimentario; la concentración número 3 es la equivalente a la cantidad IDA en humanos.

3. Ensayos *in vivo*

3.1. *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster presenta 4 pares de cromosomas: un cromosoma X telocéntrico (también llamado cromosoma 1), un cromosoma Y submetacéntrico, dos cromosomas metacéntricos grandes (cromosomas 2 y 3) y un cromosoma muy pequeño telocéntrico (cromosoma 4). El fondo genético utilizado en el presente trabajo de tesis consistió en dos estirpes de *D. melanogaster*, presentando cada una de ellas una o varias mutaciones en el cromosoma 3, que afectan al fenotipo del ala (Imagen 3) y/o de los pelos y que se utilizan como marcadores. La dotación génica en el cromosoma 3 de dichas estirpes contiene las siguientes mutaciones:

- *mwh/mwh*: La mutación *mwh* (*multiple wing hairs*) es recesiva y su manifestación fenotípica supone que cada célula del ala emite tres o más pelos o tricomas, en lugar del único pelo visible al microscopio óptico en las moscas de fenotipo salvaje (Yan et al., 2008).
- *flr³/TM3, Bd^s*: La mutación *flr³* (*flare*) es recesiva y letal en homocigosis para los cigotos, pero no para las células somáticas, la expresión del fenotipo *flare* se aprecia como pelos amorfos principalmente (Ren, Charlton, & Adler, 2007). La mutación *Bd^s* (*Beaded-Serrate*) es dominante y letal en homocigosis y afecta a la forma del borde del ala, confiriendo a esta un fenotipo aserrado, en lugar de la forma redondeada del fenotipo salvaje. La mutación *Bd^s* es viable sólo en hemicigosis. Es letal recesivo estrechamente ligado, persiste en muchos de los cromosomas que portan el alelo *Bd^s*, de manera que este alelo se comporta como letal en homocigosis y sirve como marcador de la mutación *flr³* (Lindsley & Zimm, 2012). TM3 es una

inversión múltiple que impide el sobrecruzamiento natural en la zona en la que se encuentra. La inversión TM3 incluye inversiones paracéntricas en ambos brazos del cromosoma, así como una inversión pericéntrica.

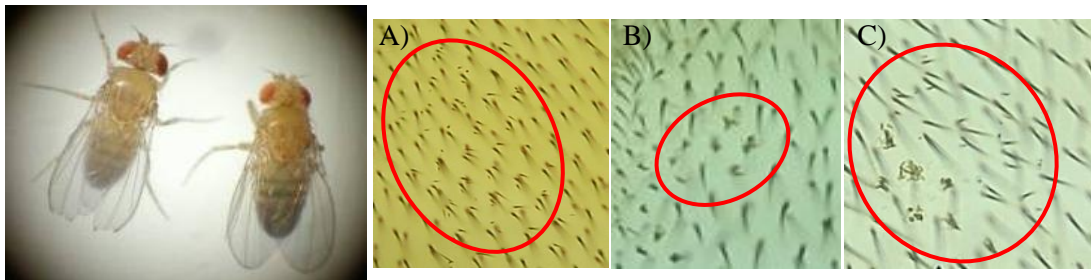


Imagen 3. Fenotipos de *D. melanogaster*. En la imagen de la izquierda se observan los fenotipos de *Drosophila*, siendo la mosca de la izquierda $flr^3/ TM3, Bd^S$ y la mosca de la derecha mwh/mwh . A) mutación mwh ; B) mutación flr^3 ; C) mutación gemela (flr^3/mwh), visualizada a microscopio óptico.

Las estirpes se mantuvieron en condiciones de 25 °C y 80% de humedad en tubos de vidrio con una papilla casera (0,5 g NaCl, 12 g agar-agar, 100 g de levadura, 25 g azúcar, 5 mL ácido propiónico, 3,5 mL de una solución 0,2% de sulfato de estreptomicina y 1 L de agua) realizando cambios seriados tres veces por semana.

3.2. Ensayos de Toxicidad y Antitoxicidad

Los ensayos de toxicidad y antitoxicidad en *Drosophila melanogaster* se iniciaron con el cruzamiento de 200 hembras vírgenes de la línea flr^3 con 100 machos de la línea mwh , así como su cruce recíproco, obteniendo una descendencia transheterocigótica para los genes flr^3/mwh . Tras realizar los cruces de los parentales, se preparó un medio que contenía 25 g de levadura fresca y 4 mL de agua destilada, para que las hembras óptimamente fértiles pusieran los huevos durante 8 h; transcurridas 72 h se obtuvieron las larvas de tres días de edad. Estas fueron extraídas del medio mediante el lavado con agua destilada. Posteriormente, fueron separadas en grupos de 100 larvas para ser transferidas a los tubos con nuestros tratamientos (ver Tabla 3), los cuales contenían 0,85 g de DIM (*Drosophila Instant Medium*) (Fórmula 4-24, *Carolina Biological Supply Company, Burlington NC*) junto con 4 mL de las diluciones preparadas para llevar a cabo el estudio, excepto los controles negativos, los cuales estaban preparados con 0,85 g de DIM y 4 mL de agua destilada para realizar ensayos de toxicidad. Para los tratamientos de antitoxicidad se utilizan las mismas concentraciones que para los ensayos de toxicidad en combinación con una sustancia tóxica (0,12 M H_2O_2) (Anter et al., 2011). Además se usó un control positivo compuesto por 0,85 g de DIM, que incluía 4 mL de agua destilada y H_2O_2 0,12 M.

Posteriormente se procedió al recuento de adultos nacidos en los distintos tratamientos ensayados para conocer la toxicidad y la capacidad de protección frente al agente tóxico oxidativo de las sustancias estudiadas.

Análisis estadístico

Transcurrido un periodo de 10 – 12 días, durante el cual se desarrollan y emergen las moscas, estas se retiraron de los tubos de tratamiento y fueron sumergidas en etanol al 70% en nuevos tubos de ensayo para su almacenaje y posterior recuento. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes para cada ensayo, con los rangos de concentraciones indicados en la Tabla 3 para cada uno de los aditivos, en los que se evaluó el porcentaje de moscas emergidas con respecto a su control según la fórmula: $[(n^\circ \text{ de individuos nacidos en cada tratamiento} / n^\circ \text{ de individuos nacidos en el control concurrente}) \times 100]$. La prueba estadística Chi-cuadrado en *Microsoft Office Excel 2007* se usó para determinar si los compuestos ensayados afectaban significativamente a la supervivencia de las moscas con respecto a su control. En el ensayo de toxicidad se compararon los valores estadísticos de Chi-cuadrado ($p < 0,05$) para las diferentes concentraciones analizadas con respecto al control negativo; mientras que el análisis estadístico de antitoxicidad se llevó a cabo comparando los valores de las diferentes concentraciones con respecto al valor del control positivo mediante la prueba Chi-cuadrado (Merinas-Amo, Tasset-Cuevas, Díaz-Carretero, Alonso-Moraga, & Calahorro, 2017).

3.3. Ensayos de Genotoxicidad y Antigenotoxicidad (SMART)

En los ensayos SMART se analiza la pérdida de heterocigosidad como consecuencia de alteraciones genéticas producidas en células somáticas en división expuestas a la sustancia a ensayar. En el caso del ensayo de alas, la población celular que responde a la exposición es la que forma el disco imaginal del ala en las larvas de *Drosophila melanogaster*. Las divisiones mitóticas en el disco del ala comienzan a partir de las 24 h de la formación del huevo y continuarán hasta la formación de la pupa (Wiirgler & Vogel, 1986). Las alteraciones genéticas inducidas en las células larvarias se detectan, después de la expansión clonal y metamorfosis, como grupos de células mutantes en los pelos o tricomas del ala de la mosca adulta.

El ensayo de mutación y recombinación somáticas en el ala, utiliza dos marcadores que afectan al fenotipo de las células del ala: *mwh* y *flr*³ y ha demostrado su capacidad de detectar mutaciones puntuales, deleciones, ciertos tipos de aberraciones cromosómicas y recombinación mitótica (Graf et al., 1984).

La actividad recombinogénica detectable en el ensayo SMART en alas es cuantificable, analizando las alas de las moscas heterocigotas *mwh/TM3*, *Bd*^s. En estas moscas, la inversión múltiple *TM3* impide los procesos de recombinación en la región afectada y por lo tanto, las manchas detectadas se producen exclusivamente por mutación.

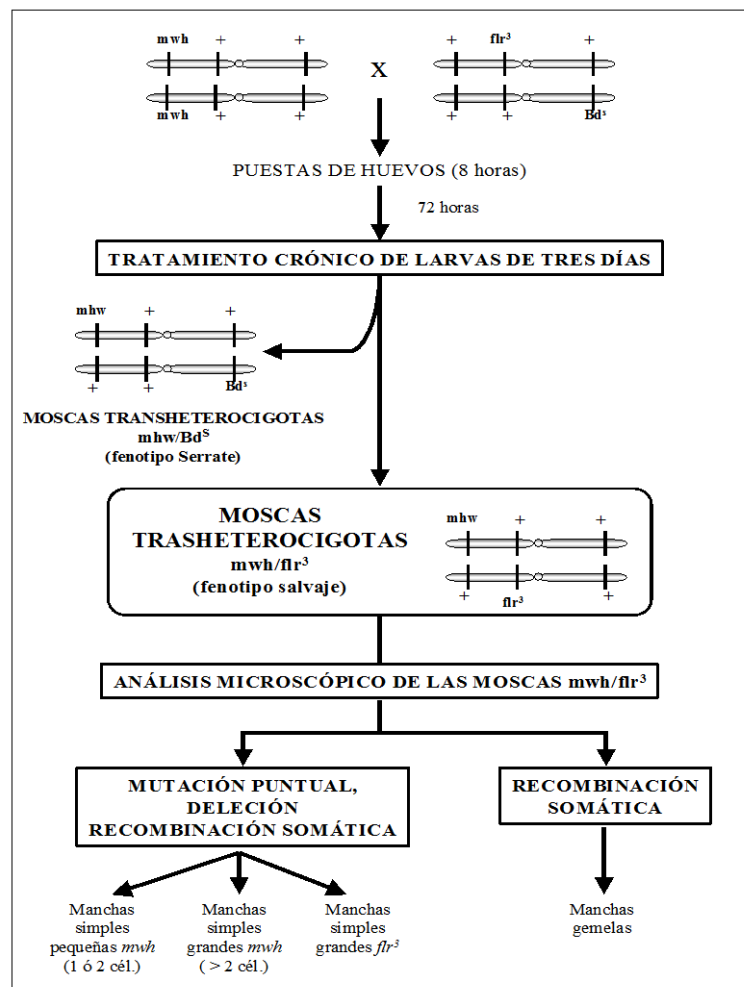
El periodo de tratamiento comprende aproximadamente las 5 ó 6 últimas rondas de división en las células imaginales alares, lo que representa más del 95% de todas las divisiones mitóticas individuales en el desarrollo del ala (Frei & Würgler, 1988). Los ensayos de genotoxicidad fueron llevados a cabo siguiendo el procedimiento de Graf et

al. (1984). Brevemente, las larvas transheterocigotas para los genes *mwh* y *flr³* se obtuvieron cruzando 200 hembras vírgenes *mwh* con 100 machos de *flr³*, al igual que en el cruce recíproco. Cuatro días después de la fertilización, las hembras pusieron huevos en medio de levadura fresca (25 g de levadura y 4 mL de agua destilada estéril) durante 8 h para obtener larvas sincronizadas. Después de 72 h, se recogieron las larvas, se lavaron con agua destilada y se colocaron en grupos de 100 individuos en los tubos de tratamiento donde se alimentaron crónicamente con los diferentes compuestos. Los tubos de tratamiento contenían 0,85 g de medio DIM y 4 mL de soluciones con la concentración IDA indicada para cada uno de los aditivos alimentarios estudiados (concentración 3 indicada en la Tabla 3).

Las pruebas de antigenotoxicidad se realizaron siguiendo el método descrito por Graf, Abraham, Guzmán-Rincón, and Würzler (1998), que consistió en tratamientos combinados de genotoxina (H₂O₂ 0,12 M) y la misma concentración utilizada en los ensayos de genotoxicidad para cada aditivo alimentario.

Tras la emergencia de individuos adultos, estos se almacenaron en etanol al 70% hasta su posterior montaje de alas para el escrutinio de mutaciones. En ambos ensayos se observa el fenotipo de número y forma de los pelos por célula presente en el ala siguiendo la prueba SMART (ver esquema resumen del ensayo SMART, Figura 13).

Figura 13. Esquema resumen del ensayo SMART en *Drosophila*.



Preparación de las alas

Las moscas almacenadas en etanol al 70%, se observaron bajo la lupa para separar las de fenotipo salvaje (que corresponden al genotipo *mwh/flr³*) y clasificarlas según su sexo.

Las moscas analizadas rutinariamente en el ensayo SMART de alas son las transheterocigotas *mwh/flr³*. El resto de las moscas tratadas (*mwh/Bd^S*) se identifica fácilmente por el carácter aserrado (Beaded-Serrate) de las alas y únicamente se analizan cuando es necesario cuantificar la proporción de actividad genotóxica debida a recombinación (Graf, Heo, & Ramirez, 1992; Zordan, Costa, & Levis, 1991). La proporción de manchas cuyo origen no es debido a recombinación se obtiene dividiendo la frecuencia de manchas *mwh* en las larvas *mwh/Bd^S* (originadas únicamente por mutaciones puntuales, ya que la inversión TM3 impide la recombinación) entre la obtenida en larvas *mwh/flr³* (originadas por mutación puntual o recombinación).

Antes de proceder a la preparación de las alas, las moscas almacenadas se lavaron en agua destilada para retirar los restos de etanol. Después, se cubrieron con solución Faure, se separaron las alas y se alinearon sobre un portaobjetos.

Una vez completados los portaobjetos, con un número similar de alas pertenecientes a moscas hembra y a moscas macho, se dejaron secar, al menos 24 h, en una atmósfera libre de polvo. Trascurrido el tiempo, se realiza su sellado, dejando caer unas pequeñas gotas de solución Faure sobre las alas de cada portaobjetos y depositando encima un cubreobjetos sobre el que se colocaron unas pesas de entre 250 y 500 g. Las preparaciones se dejaron así unas 24 h, para conseguir un secado completo y que las muestras queden perfectamente fijadas. Posteriormente se sellaron los bordes con esmalte de uñas y las preparaciones quedaron listas para su examen.

La solución de Faure utilizada en este proceso fue elaborada por nosotros y se compone de:

Compuesto	Cantidad
Goma arábica	30 g
Glicerol	20 mL
Hidrato de cloral	50 g
Agua	50 mL

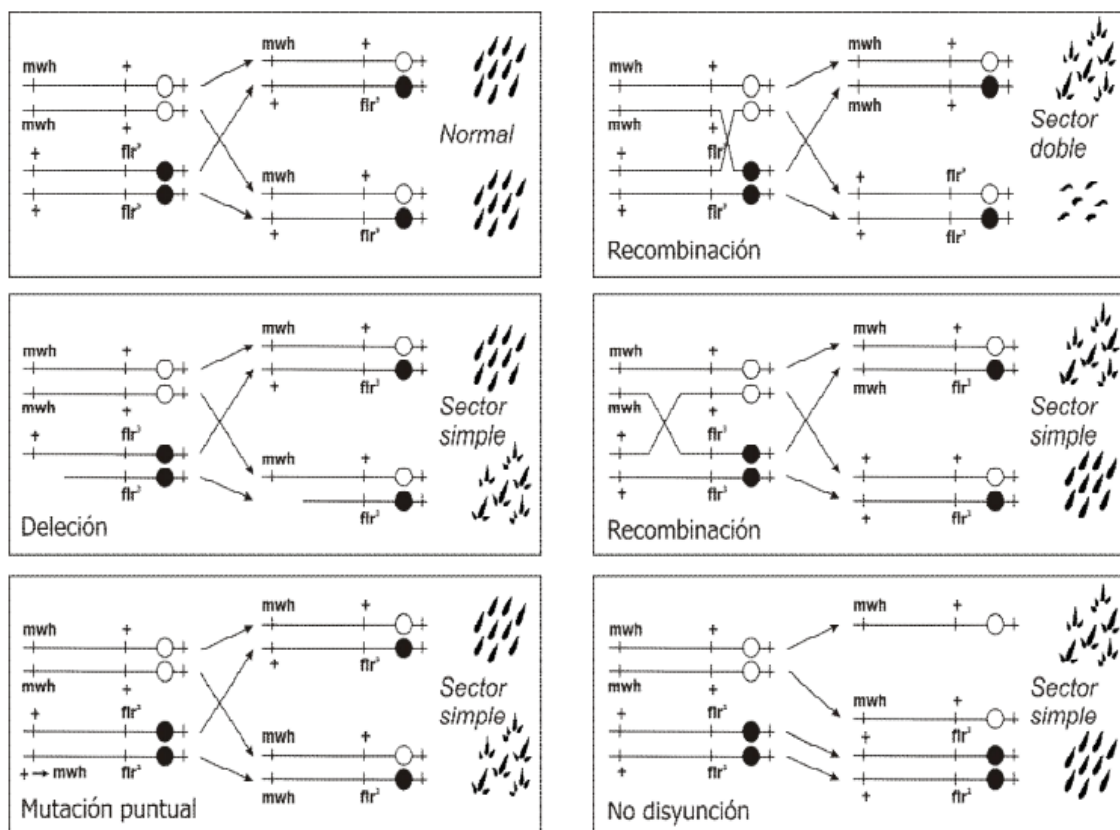
Para un montaje y secado más fácil de las muestras, podemos utilizar la solución de Faure diluida hasta el 50% con agua destilada. También se puede acelerar el secado colocando las preparaciones sobre una estufa a 60 °C, ó sobre una placa térmica a 40 °C, durante 30 min.

Tipos de manchas o clones

Los distintos tipos de manchas que se pueden encontrar en el ensayo SMART están clasificados según el tipo de mutación y tamaño inducido por el aditivo en estudio en las células de *Drosophila*, como se detalla a continuación, y como se representan en la Figura 14:

- Manchas simples mwh, formadas por células con 3 o más pelos cada una. Se considera un clon mwh aquél formado por células con múltiples pelos, en el que al menos una de ellas tiene 3 pelos o más, aunque también contenga células con 2 únicos pelos. Se consideran manchas independientes aquellas que están separadas por 3 o más filas de células salvajes. Las alteraciones genéticas que pueden dar lugar al fenotipo mwh son: mutación puntual, delección, recombinación mitótica entre los loci *mwh* y *flr*, o no disyunción.
- Manchas simples flr^3 formadas por células de fenotipo flare. Generalmente este fenotipo se manifiesta por una mutación puntual o delección en el alelo salvaje para este locus.
- Manchas gemelas, formadas por células adyacentes de fenotipo mwh y flr^3 , respectivamente. Solo se originan por recombinación mitótica entre el locus *flr* y el centrómero.

Figura 14. Representación de las mutaciones inducidas en el ensayo SMART.



Las manchas grandes presentan una forma alargada, longitudinal al eje del ala, indicando la dirección principal de crecimiento (García-Bellido & Merriam, 1971), y son generalmente continuas. A veces, entre las células mutantes aparecen grupos de células salvajes, debido posiblemente a una separación de las células de un clon en desarrollo por presiones interiores del tejido o movimientos de células independientes. Tanto las manchas gemelas como las simples muy grandes, son muy poco frecuentes en las alas de moscas no tratadas y están originadas por mutaciones espontáneas en el embrión de *Drosophila*.

Es útil distinguir entre los clones inducidos en la pupa (los más pequeños) y los inducidos en etapas más tempranas del desarrollo (los más grandes), ya que la última o penúltima ronda de división ocurre dentro de la pupa, cuando ha cesado la ingestión de alimento (Postlethwait, 1978). Así, la distinción de las manchas simples entre las de 3 o más células, y las pequeñas (1 o 2 células), separa las poblaciones celulares diana expuestas durante o después de la ingestión del compuesto (Frei & Würigler, 1988). Esta delimitación no es exacta, debido a posibles variaciones en el desarrollo, diferencias en las propiedades de los compuestos (ingestión, transporte, bioactivación, estabilidad, persistencia, etc.) o incluso, porque ciertos clones pueden tender a permanecer pequeños (Graf et al., 1984).

Análisis estadístico

Para obtener datos sobre genotoxicidad y antígenotoxicidad recurrimos al análisis microscópico de las alas de la prueba SMART. El ala de *Drosophila melanogaster* se compone de dos capas de células, dorsal y ventral, y un total de 24.400 monotricomas por ala (Moraga & Graf, 1989). En las moscas de fenotipo salvaje, cada una de estas células emite un único pelo o tricoma.

El análisis de las alas se realizó bajo un microscopio a 400 aumentos y consistió en localizar clones o células individuales que manifestasen fenotipo mutante *mwh* ó *flr*³, sobre el fondo de células de fenotipo salvaje. Para cada clon encontrado, se registró el tamaño y el sector del ala en el que se encontrara. Los sectores tenidos en cuenta del ala fueron: A, B, C', C, D', D y E (Imagen 4) (Graf et al., 1984).

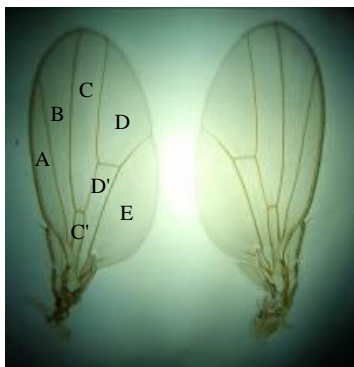


Imagen 4. Sectores del ala de *D. melanogaster*.

La evaluación de los datos se realizó conforme al proceso de decisión múltiple descrito por Frei and Würigler (1988) y Frei and Würigler, (1995). En él, las frecuencias de cada tipo de clon mutante por ala se compararon con su control negativo correspondiente empleando la prueba binomial de Kastenbaum and Bowman (1970), sin corrección de Bonferroni y con un nivel de confianza del 5%. Los resultados inconcluyentes y positivos se analizan posteriormente con la prueba no paramétrica de Mann Whitney U-test y Wilcoxon ($\alpha = \beta = 0,05$), la cual tiene en cuenta el rango de valores en los controles y en los tratamientos (Jacociunas, Dihl, Lehmann, Reguly, & de Andrade, 2010).

Los porcentajes de inhibición de genotoxicidad (PI) para los tratamientos combinados se calculan a partir del total de manchas por ala, con la siguiente fórmula (Abraham, 1994):

$$PI = [(genotoxina - tratamiento combinado) / genotoxina] * 100$$

3.4. Ensayos de longevidad

Los ensayos de longevidad se llevaron a cabo según el procedimiento de Tasset-Cuevas et al. (2013). Este ensayo se utiliza para comprobar la calidad de vida suministrada por el compuesto estudiado al organismo modelo *Drosophila melanogaster*. Tras la obtención de larvas, estas fueron sometidas a su tratamiento específico en los tubos de ensayo con las diluciones pertinentes e incorporando un control negativo con agua destilada (ver concentraciones en Tabla 3). A los 12 días, los individuos que alcanzaron el estado adulto se recolectaron y anestesiaron con éter dietílico (Panreac, 212770.0311 estabilizado con 6 ppm de BHT QP) para su posterior selección. Dicha selección consistió en separar 25 individuos hembra y 25 individuos macho que se colocaron en tubos estériles independientes, especiales para longevidad con doble apertura. La parte inferior consiste en un tapón de rosca que contienen 0,21 g de medio DIM y 1 mL de la dilución a ensayar (ver Tabla 3), mientras que la parte superior queda cubierta con algodón para evitar la huida de los individuos. Los cambios de medio con la dilución y compuesto correspondiente se realizaron dos veces en semana siempre por el extremo del tapón ayudándose de una gasa y film, durante toda la vida de los individuos. En una plantilla se anota el número de adultos en cada tubo de ensayo, que será del orden de 25 adultos por tubo, separados por sexos, por compuesto y por concentración o control. En cada cambio se fue anotando el número de adultos que permanecían vivos y el número de bajas.

Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos de supervivencia de cada concentración ensayada se evaluó con el programa estadístico SPSS 17.0 (SPSS, Inc., Chicago), usando el método de Kaplan-Meier. La significancia de las curvas se determinó mediante el análisis de Mantel-Cox (método de Log-Rank) ($p < 0,05$).

Soh, Hotic, and Arking (2007) defienden que la búsqueda del incremento de la longevidad ha de ir acompañada por un aumento en la calidad de vida. Esto es cuantificable estudiando la calidad de vida, que evalúa la curva de supervivencia cuando el 75% de los individuos están vivos y que también se ha determinado.

4. Ensayos *in vitro*

4.1 Células HL-60

La posible actividad citotóxica se ha evaluado en la línea celular promielocítica de leucemia humana HL-60, la cual fue cedida por el Dr. José M. Villalba Montoro del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Córdoba.

4.2. Procedimientos generales

Condiciones del cultivo celular

Las células se mantuvieron en botellas estériles de cultivo *in vitro* de 40 mL y 25 cm² de superficie con 10 mL de medio líquido RPMI-1640 en un incubador (ShelLab, Cornelius, OR, EEUU) a 37 °C, una atmósfera humidificada, un 5% de CO₂ y en oscuridad (Gallagher et al., 1979).

En fase de crecimiento exponencial se hacen subcultivos cada 48 h, con concentraciones de 250.000 células/mL en 10 mL de medio fresco RPMI previamente calentado a 37 °C. De forma que las células dupliquen su número cada 24 h hasta alcanzar el millón de células/mL a las 48 h.

Medio de Cultivo

El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640 sin L-Glutamina (CAT N° BE12-167F, Cambrex Bio Science Verviers). Este es un medio incompleto, por lo que se debe complementar para que las células puedan proliferar con L-Glutamina (CAT N° G7513, Sigma-Aldrich), Suero Fetal Bovino (CAT N° S01805, Linus) y una mezcla comercial de antibióticos (Penicilina/Estreptomina/Anfotericina, CAT N° A5955, Sigma-Aldrich) (Gallagher et al., 1979).

Para la preparación del medio de cultivo completo se descongeló el suero a 4 °C y se calentó 30 min a 56 °C para descomplementarlo. Paralelamente se descongeló la glutamina y el antibiótico (4 °C).

Una vez preparado, al RPMI-1640 se le añadió por cada 500 mL:

- 5 mL de antibióticos 100x.
- 5 mL de L-Glutamina 200 mM.
- 50 mL de Suero Fetal vacuno, 10% FCS (descomplementado).

Se mezcló todo bien y se guardó a 4 °C hasta su uso.

Congelación

Las células deben congelarse cuando el crecimiento se encuentre en la fase exponencial y la viabilidad celular esté próxima al 100%. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

1. Se contaron las células de cada botella, esperándose una concentración adecuada de células de aproximadamente 1.000.000 células/mL.
2. Se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min.
3. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 90% de medio RPMI completo (900 μ L), previamente calentado a 37 °C.
4. A los criotubos se les añadió DMSO (dimetilsulfóxido) (Merck, CAT N° K47289252550) (100 μ L) y después el medio con las células.
5. Se anotó fecha de congelación y línea celular en el vial y rápidamente se enfrió.
6. Se colocaron en el congelador vacío previamente enfriado a 4 °C; seguidamente al contenedor de -80 °C; y pasadas 72 h, se conservaron en el tanque de nitrógeno líquido.

Descongelación

La descongelación de células debe ser lo más rápida posible para no afectar a la viabilidad celular.

El DMSO utilizado es tóxico para las células, por lo que debe ser eliminado rápidamente, evitando que las células estén en contacto con este agente cuando salgan de la descongelación. El protocolo de descongelación siguió los siguientes pasos:

1. Se sacaron los criotubos del nitrógeno líquido y se transportaron en hielo.
2. Se añadió 9 mL de medio RPMI completo (para lavar las células) a un tubo falcon de 10 mL.
3. Cuando el criotubo se descongeló (con un paso rápido en baño maría), se recogió el volumen y se añadió al tubo con los 9 mL de medio.
4. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.
5. Se prepararon frascos de cultivo con 9 mL de medio RPMI completo.
6. Se descartó el sobrenadante y se añadió 1 mL de medio RPMI.
7. Tras resuspender la mezcla, se sembró en las botellas de cultivo preparadas.

Recuento celular

Para seguir el crecimiento de una población celular y establecer en qué fase se encuentra usamos el recuento celular. Para ello se utiliza la cámara de Neubauer (Imagen 5), diseñada a modo de portaobjetos con una placa más gruesa de cristal, y dos cámaras iguales en su interior. Cada cámara está formada por:

- Cuadro central de 1 mm de lado y 0,1 mL de profundidad, dividido a su vez en 25 cuadrados, cada uno de ellos subdividido en 16 cuadrados, con un total de 400 cuadrados de 0,05 mm de lado.
- Cuatro cuadrados, uno en cada esquina de 1 mm de lado cada uno, subdivididos en 16 cuadrados de 0,25 mm de lado.

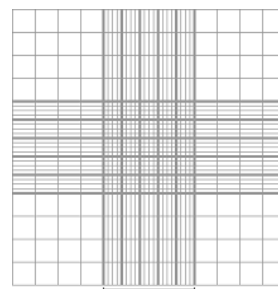


Imagen 5. Cámara de Neubauer

El recuento es necesario para conocer el número de células por mililitro, es decir, determinar la concentración celular que hay en la botella de mantenimiento y determinar el volumen alícuota que se tomará para la siembra.

En primer lugar se toma una alícuota de 10 μL de la botella de cultivo y se introduce en un eppendorf. A continuación, se tiñe con 10 μL de Azul Tripán (Fluka, CAT N° 93595), colorante de exclusión utilizado en conteos de viabilidad celular (las células vivas lo excluyen y las muertas no). Posteriormente se procede al recuento celular en un microscopio óptico invertido (AE3031, Motic) donde las células muertas aparecerán teñidas de azul y las vivas mantendrán su coloración y brillo habitual.

Se coloca un cubreobjetos encima de la cámara y por capilaridad se añade una alícuota de 10 μL de muestra entre cada cámara y el cubreobjetos.

Para el recuento se anota el número de células vivas y muertas presentes en los 4 cuadrados de las esquinas de las dos cámaras, siendo el volumen entre cada cuadrado y el cubre de 0,1 mm^3 , es decir, 10^{-4} mL.

La concentración de células, expresada en número de células/mL, se obtiene con la siguiente fórmula:

$$\text{Células/mL de cultivo} = (\text{n}^\circ \text{ células de la cámara}/4) * 2 * 10^4$$

4.3. Ensayo de citotoxicidad

Para llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad se partió de los cultivos celulares de mantenimiento, a una concentración de 10^6 células viables/mL, cultivadas en botellas estériles de cultivo *in vitro* con 10 mL de medio líquido RPMI a 37 °C y a una atmósfera del 5% de CO_2 .

Una vez que se comprobó que el número de células era el correcto, se llevó a cabo el experimento utilizando una placa multipocillos, con 96 pocillos, en los cuales se depositó un volumen final de 200 μL , constituido por las respectivas soluciones de las sustancias a ensayar, junto con el volumen celular correspondiente en la cantidad de 20.000 células. Así mismo, se estableció un control positivo con medio RPMI estandarizado en nuestro laboratorio (Merinas-Amo, Tasset-Cuevas, Díaz-Carretero, Alonso-Moraga, & Calahorro, 2016).

Las diferentes concentraciones usadas en estos experimentos con células HL-60 corresponden a las que han sido usadas con *Drosophila melanogaster*, con la diferencia de que la dilución no se llevará a cabo con agua, sino con medio RPMI (ver Tabla 3).

Análisis estadístico

Para el estudio de citotoxicidad de nuestras sustancias se ha utilizado la prueba de exclusión del Azul Tripán, anteriormente mencionada. Los resultados obtenidos se han representado gráficamente, utilizando la media de tres experimentos independientes, de las células viables en cada ensayo.

Para obtener las curvas de inhibición del crecimiento tumoral se ha obtenido en primer lugar la curva de crecimiento relativo, es decir, células viables del tratamiento respecto a células viables del control tomando como datos representativos los del crecimiento a las 72 h mediante el programa *Microsoft Office Excel 2007*. También se ha determinado el error típico de los tres experimentos. Si hay curva dosis respuesta se calcula la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) que es aquella que inhibe el crecimiento al 50%.

4.4. Ensayo de fragmentación de ADN

El principal mecanismo de supresión de cáncer es la apoptosis o muerte celular programada. Uno de los mecanismos por el que se produce el efecto citotóxico en las células HL-60 sometidas a tratamiento, y que es una marca indicadora de apoptosis, es la detección de fragmentación internucleosómica de ADN (Wyllie, Kerr, & Currie, 1980). El ensayo de fragmentación se llevó a cabo siguiendo el método desarrollado por Merinas-Amo, Tasset-Cuevas, et al. (2016):

Se incubaron 10⁶ células/mL en placas de cultivo de 12 pocillos y se trataron con nuestros compuestos a las diluciones correspondientes (ver Tabla 3). Utilizamos una botella de cultivo para cada compuesto con su correspondiente control. Se centrifugó la cantidad anterior de células durante 5 min a 3000 rpm, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet con 1,5 mL de las diluciones de nuestros compuestos a ensayar. Los controles fueron resuspendidos con medio RPMI. Las placas de 12 pocillos se incubaron durante 5 h en la cámara de cultivo celular. Posteriormente se centrifugó el cultivo resultante durante 5 min a 3000 rpm, se eliminó el sobrenadante con cuidado y se le añadió 900 µL de tampón de lisis para resuspender el pellet [Tris HCl 10 mM (Sigma, CAT N° 1001582243), EDTA 5 mM (Merck, CAT N° K47012618537) y NaCl 100 mM]; se añadió 100 µL de SDS (1 g/10mL) (Bio-Rad, CAT N° 161-0301) y 25 µL de proteinasa K (20 mg/mL) (Canvax). Se incubó durante 5 h a 55 °C y 350 rpm en termobloque. Seguidamente se mezcló con 432 µL de NaCl 5 M y se alícuotó todo en nuevos eppendorf sin recoger espuma. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. Se recogieron 750 µL del sobrenadante y se le añadieron 750 µL de isopropanol (1:1), mezclando por inversión suavemente, con el objetivo de que nuestro ADN precipitase. Centrifugamos 10 min a 13000 rpm y tiramos el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en etanol 70% con 1 mL para soltar el pellet y se centrifugó de nuevo a 13000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar. Se añadieron 20 µL de agua milliQ y 0,6 µL de ARNasa-working (Qiagen, RNase A) y se dejó incubar a 37 °C y 300 rpm durante toda la noche.

Posteriormente se cuantificaron las muestras en espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000) y se cargó en un gel de agarosa (Conda, CAT N° 8010.22) al 2% la cantidad de 1200 ng de ADN teñidos con Green Gotaq[®] (5x Promega, CAT N° 0000224650), incluyendo un control interno de tamaños. Finalmente se realizó una electroforesis (80 mA durante 35 min) y se fotografió el gel bajo luz ultravioleta.

4.5. Ensayo del cometa

La inducción de daños en el ADN a nivel de cadena simple y/o doble se lleva a cabo usando el ensayo del cometa alcalino ($\text{pH} < 13$). Este experimento se realizó basándonos en los métodos previamente descritos por Husseini, El-Fayoumi, O'Neill, Rapoport, and Pitt (2000); Kumaravel, Vilhar, Faux, and Jha (2009) y Prosperini, Juan-García, Font, and Ruiz (2013), con algunas modificaciones desarrolladas por Mateo-Fernández et al. (2016):

Para llevar a cabo el ensayo del cometa se utilizaron células HL-60 a una densidad de 10^6 células/mL. Estas se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 min y seguidamente se resuspendieron en 1,5 mL de las diluciones IDA de los aditivos en estudio (concentración 3 de la Tabla 3).

Pasadas 5 h de incubación en placas P-12 (Thermo Scientific), se recogieron las muestras en tubos de eppendorf, se centrifugaron y se lavaron con 200 μL de PBS (Bioline 37017). Posteriormente, una concentración de $6,25 \times 10^5$ células/mL se mezcló con una solución de agarosa de bajo punto de fusión (Agarosa Low Melting Point, Sigma, CAT N° 1001803063) al 0,75% y se transfirieron a un portaobjetos. Tras la solidificación del gel, el portaobjetos se sumergió en tampón de lisis alcalina [NaCl 2,5 M, Na-EDTA 100 mM, Tris 10 mM, NaOH 250 mM (Merck, CAT N° B207698-236), DMSO 10% y Triton X-100 1% (PanReac, CAT N° A4975,0500); pH 13] durante 1 h a 4 °C. A continuación se sumergió en un tampón de electroforesis alcalino (NaOH 300 mM y Na-EDTA 1 mM; pH 13) durante 20 min a 4 °C. Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis a 20 V, 400 mA y 15 min, y el portaobjetos se sumergió en un tampón de neutralización (Tris-HCl 0,4 M; pH 7,5). Finalmente, el portaobjetos se dejó secar en oscuridad y a temperatura ambiente durante toda la noche.

El ADN de 50 – 100 células fue visualizado tratando los portaobjetos con 7 μL de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, P4170) durante 5 min, y se analizó la fluorescencia emitida con un microscopio de fluorescencia a 400x (Leica DM2500), con un filtro verde y unido a una cámara (JAI CV-M4CL).

Análisis estadístico

Para el análisis del daño celular se utilizó la versión *OpenComet* del programa *ImageJ* (NIH). Para analizar el tamaño de la cola (TM) causado por las distintas concentraciones de los aditivos en estudio sobre la integridad del ADN de las células HL-60, usamos el programa estadístico SPSS 17.0 aplicando un ANOVA de una vía y el test post hoc de Tukey ($p < 0,05$).

4.6. Ensayo del estado de metilación

La metilación del ADN en la posición 5' de los residuos de citosina dentro de los dinucleótidos CpG mediante la adición de un grupo metilo es la marca epigenética más

conocida (Issa & Kantarjian, 2009). Se ha demostrado que la hipermetilación del ADN en la región promotora de muchos genes es responsable del silenciamiento de más de 600 genes relacionados con el cáncer (Esteller, 2007; Mulero-Navarro & Esteller, 2008; Suzuki & Bird, 2008). Por otro lado, se conoce que la hipometilación global del ADN activa las secuencias endoparásitas y provoca la inestabilidad cromosómica general que conduce a diversas mutaciones y progresión del cáncer (Esteller, 2008).

Conversión con bisulfito

Se utilizó el kit comercial EZ DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research), que integra los procesos de desnaturalización del ADN y de conversión con bisulfito. El mecanismo del kit se basa en una reacción de tres pasos entre la citosina y el bisulfito de sodio, que hace que la citosina se convierta en uracilo. Brevemente: se tomó el volumen correspondiente a 500 ng de ADN de células HL-60 previamente tratadas durante 5 h con las concentraciones IDA para cada uno de los aditivos en estudio (nombradas con el número 3 en la Tabla 3), y se completó con agua milliQ hasta un volumen de 20 µL. Se mezcló con 130 µL de reactivo de conversión de CT y se realizó un ciclo térmico de 98 °C durante 10 min y 64 °C durante 2,5 h. Estas muestras se pueden almacenar a 4 °C hasta un máximo de 20 h. Seguidamente, las muestras pasaron por un tampón de unión, y una etapa de lavado, que se lleva a cabo en una columna IC para pegar el ADN a la solución de unión de la columna. Posteriormente se empleó un tampón de desulfonación durante 17 min para eliminar precipitaciones no deseadas. Finalmente, se realizó un paso de tampón de lavado y un tampón de elución para obtener nuestro ADN convertido con bisulfito (debe almacenarse por debajo de -20 °C hasta su posterior uso).

PCR cuantitativa específica para la metilación (qMSP)

Se utilizó el ADN modificado con bisulfito y se llevó a cabo una PCR cuantitativa a tiempo real basada en fluorescencia específica (qMSP) (Merinas-Amo, Merinas-Amo, et al., 2017). La mezcla de reacción final con un volumen total de 10 µL consistió en: 2 µL de agua desionizada, 5 µM de cada cebador directo e inverso (Isogen Life Science BV), 2 µL de iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, que contiene ADN polimerasa iTaq, dNTP, MgCl₂, SYBR® Green I, reactivos, estabilizadores y una mezcla de colorantes de referencia pasivos, incluidos ROX y fluoresceína) y 25 ng de ADN genómico convertido con bisulfito. Las condiciones de qMSP fueron las siguientes (Imagen 6): una etapa a 95 °C durante 3 min, 45 ciclos a 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 15 segundos, 72 °C durante 15 segundos, otra etapa a 95 °C durante 30 segundos seguido por un paso de 65 °C durante 30 segundos y finalmente un paso de refuerzo de 65 °C a 95 °C durante 95 segundos, aumentando 0,5 °C cada 0,05 segundos. La qMSP se llevó a cabo en placas de 48 pocillos en un termociclador MiniOpticon Real-Time PCR System (MJ Mini Personal Thermal Cycler, Bio-Rad) y se analizó mediante el software Bio-Rad CFX Manager 3.1. El cebador de mantenimiento Alu C4 se utilizó como referencia para corregir la entrada de ADN total y también se usaron controles negativos y cuatro blancos de agua. Cada muestra fue analizada por triplicado.

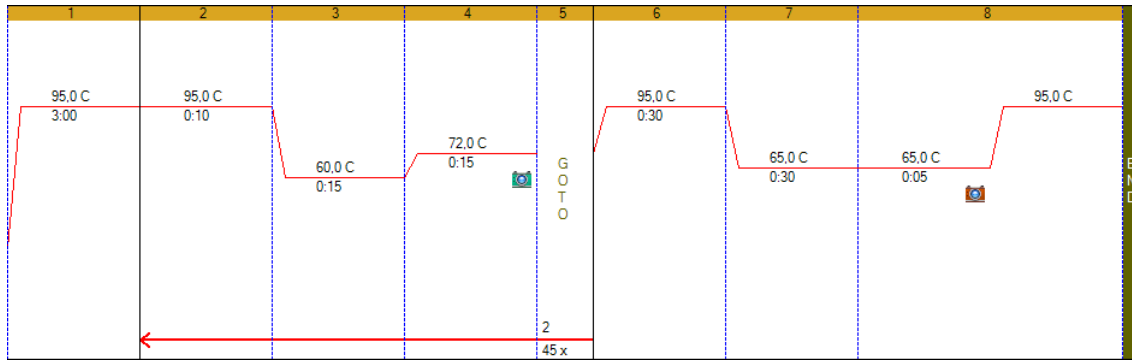


Imagen 6. Ciclos de qMSP.

Primers o Cebadores

Para analizar una amplia región de ADN genómico, se seleccionaron distintos elementos repetitivos. Las secuencias Alu y LINE se intercalan por todo el genoma, mientras que las secuencias satélites sólo se intercalan en regiones del centrómero (Deininger, Moran, Batzer, & Kazazian Jr, 2003; Ehrlich, 2002; Lee, Wevrick, Fisher, Ferguson-Smith, & Lin, 1997; Weiner, 2002). La Tabla 4 detalla las características de las secuencias repetitivas utilizadas para la evaluación del estado de metilación del ADN de células HL-60 tratadas con los aditivos en estudio (Weisenberger et al., 2005). Las secuencias Alu C4, Alu M1, LINE1 M1 y Sat- α fueron obtenidas de Isogen Life Science.

Tabla 4. Información de las secuencias repetitivas usadas.

Reacción ID	Acceso Banco de Genes	Amplicón		Secuencia 5' a 3' primer directo	Secuencia 3' a 5' primer inverso	Contenido en GC-	
		Inicio	Final			Directo	Inverso
Alu C4	Secuencia Consenso	1	98	GGTTAGGTA TAGTGGTTTA TATTTGTAAT TTTAGTA	ATTAAC TAAA CTAATCTTAA ACTCCTAACC TCA	25	27,3
Alu M1	Y07755	5059	5164	ATTATGTTAG TTAGGATGG TTTCGATTTT	CAATCGACC GAACGCGA	27,6	58,8
LINE1 M1	X52235	251	331	GGACGTATT TGGAAAATC GGG	AATCTCGCGA TACGCCGTT	47,6	52,6
Sat-α	M38468	139	260	TGATGGAGT ATTTTTAAAA TATACGTTTT GTAGT	AATTCTAAAA ATATTCCTCT TCAATTACGT AAA	23,5	21,2

Fuente: Weisenberger et al. (2005).

Análisis estadístico

Los resultados de rendimiento relativo se normalizaron con respecto a la secuencia de mantenimiento Alu C4 y se aplicó el método comparativo C_T de Nikolaidis et al. (2012) y Liloglou, Bediaga, Brown, Field, and Davies (2014):

- La C_T del gen diana se normalizó con respecto al gen de referencia (ΔC_T).
- Se compararon ΔC_T de cada muestra de cada experimento o de control ($\Delta C_{T,r}$) con ΔC_T de la muestra del calibrador ($\Delta C_{T,cb}$), $\Delta \Delta C_T$.

El valor relativo de cada muestra fue definido usando la fórmula:

$$2^{-(\Delta C_{T,r} - \Delta C_{T,cb})} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Cada muestra fue analizada por triplicado y se usó la prueba estadística ANOVA y la prueba post hoc de Tukey utilizando el software estadístico SPSS 17.0 para evaluar las diferencias entre los aditivos estudiados y los elementos repetitivos.

RESULTADOS

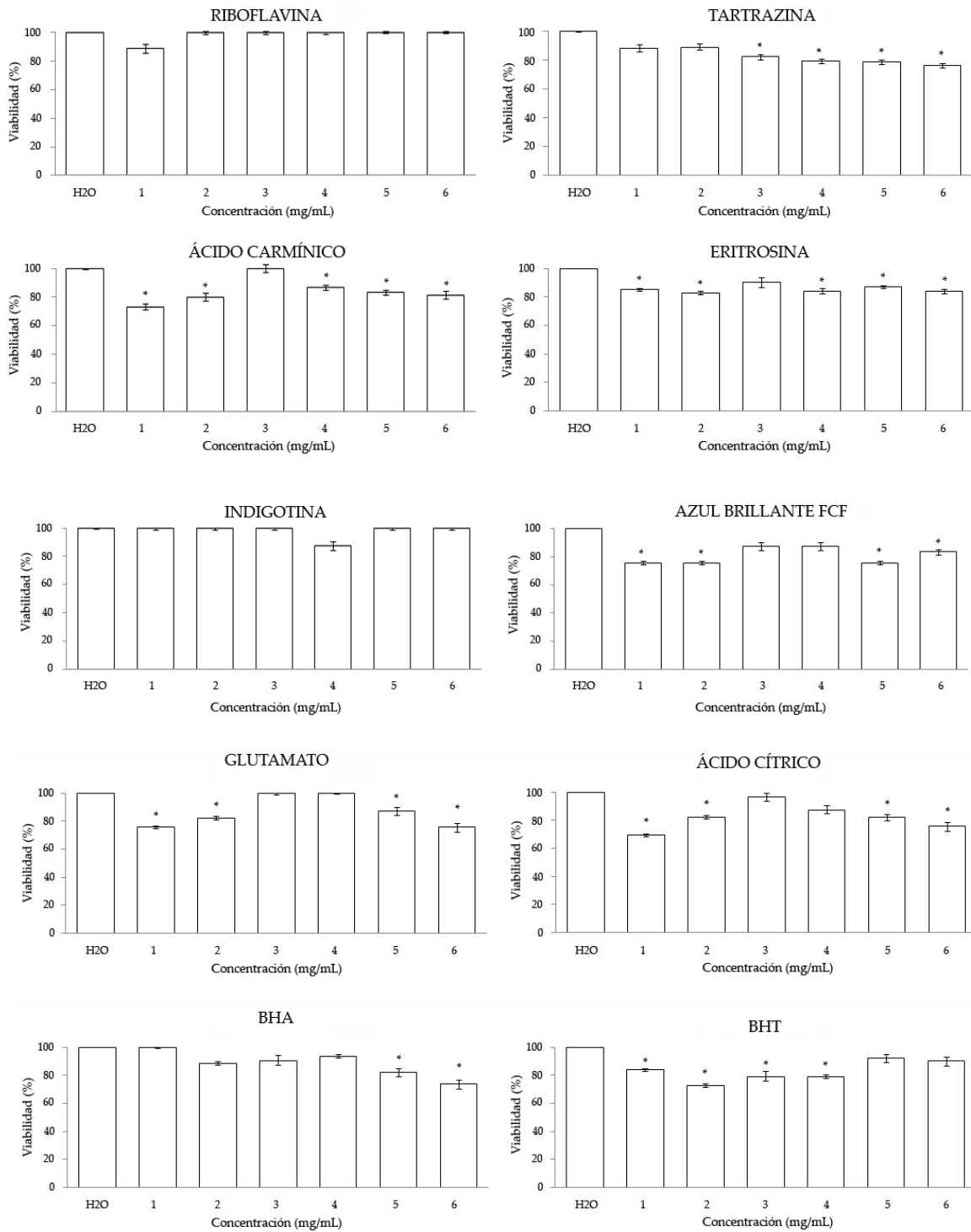
1. Toxicidad

Los resultados de los ensayos de toxicidad para cada uno de los aditivos alimentarios estudiados están representados en la Figura 15.

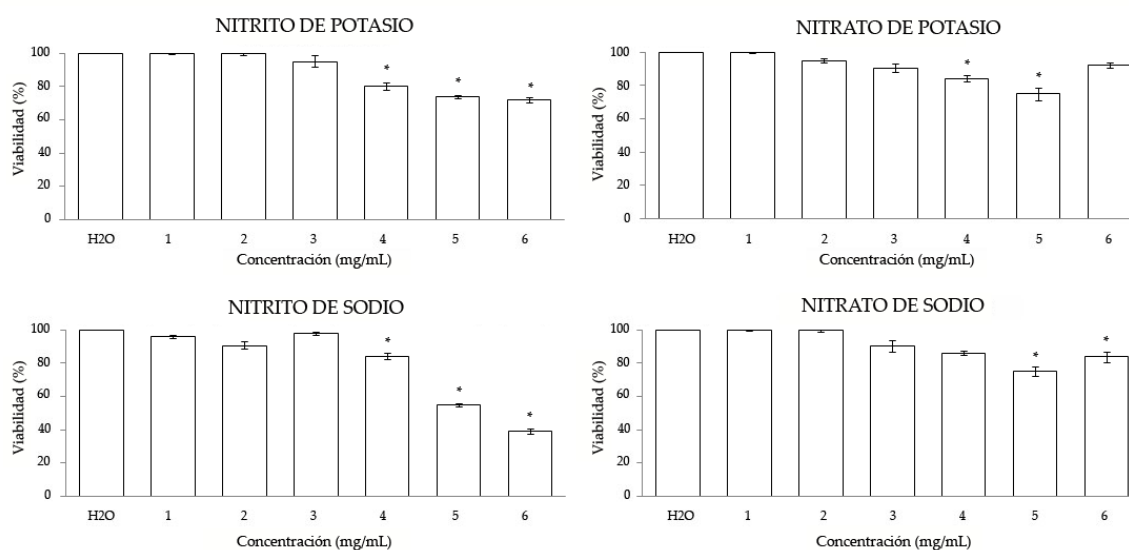
En general, ninguno de los aditivos alimentarios estudiados, a ninguna de las concentraciones analizadas (ver Tabla 3), excepto la concentración más alta ensayada de Nitrito de Sodio, alcanzó la dosis letal 50 (DL₅₀), la cual es considerada como tóxica (Mateo-Fernández et al., 2016). Esto confirma que la concentración IDA (numerada como 3) establecida por la JECFA para cada uno de los aditivos estudiados es una dosis segura, además de la validez del ensayo (EFSA, 2009, 2013a, 2015) (EFSA, 2010, 2011a, 2011b, 2012, 2014, 2017a, 2017b, 2017c; Joint F.A.O. & WHO Expert Committee on Food Additives, 2010).

La Riboflavina e Indigotina no son tóxicos para *D. melanogaster* en ninguna de las concentraciones estudiadas. La Tartrazina mostró un porcentaje de supervivencia dosis-independiente, con una tendencia a la inducción de toxicidad de modo significativo respecto a su control concurrente para las cuatro concentraciones más altas estudiadas. Para los colorantes rojos (Ácido Carmínico y Eritrosina), se halló un descenso de la supervivencia de *Drosophila* inferior al 80% en todas las concentraciones ensayadas, excepto para las concentraciones numeradas como 3, que no mostraron diferencias significativas con respecto a su control. El Azul Brillante FCF, Glutamato y Ácido Cítrico mostraron una disminución significativa de la supervivencia de *Drosophila* en las dos concentraciones más altas y más bajas estudiadas con respecto a su control, siendo las concentraciones 3 y 4 de cada compuesto las únicas que no produjeron efectos tóxicos significativos respecto a sus controles. Los resultados de BHA y Nitrato de Sodio mostraron tendencia tóxica significativa para las dos concentraciones más altas estudiadas con respecto a su control, siendo las cuatro concentraciones más bajas ensayadas no tóxicas para nuestro organismo modelo; además el Nitrito de Potasio también mostró una tendencia a inducir efectos tóxicos significativos para las tres concentraciones más altas estudiadas con respecto a su control, mientras que las concentraciones más bajas no mostraron dicho efecto. El Nitrito de Sodio ha sido el único compuesto que mostró un efecto significativo tóxico en la concentración más alta estudiada para *D. melanogaster*, mientras que las tres concentraciones más bajas ensayadas resultaron no ser tóxicas, con respecto a su control. Por último, BHT exhibió una tendencia a ser significativamente tóxico en las cuatro concentraciones más bajas estudiadas, mientras que las dos concentraciones más altas resultaron ser no tóxicas con respecto a su control.

Figura 15. Niveles de toxicidad causados por los aditivos alimentarios en *D. melanogaster*.



(Figura 15. Continuación)



Los datos se expresan como porcentaje de adultos nacidos de tres experimentos independientes tratados con distintas concentraciones de aditivos, con respecto a un total de 300 larvas de 72 h de edad sin tratar. Los valores representan la media +/- el error estándar de tres experimentos independientes. *: diferencias significativas con respecto a su control. Los números 1 – 6 indican las distintas diluciones ensayadas para cada aditivo (ver Tabla 3).

De forma detallada, los resultados mostraron:

- Riboflavina: no exhibió diferencias significativas para ninguna de las concentraciones ensayadas, con respecto a su control, indicando una ausencia de efecto tóxico en los distintos tratamientos con este aditivo para *D. melanogaster*.
- Tartrazina: produjo resultados tóxicos dosis-dependiente, viéndose afectada la supervivencia de *Drosophila* de manera significativa en las cuatro concentraciones más altas ensayadas, aunque no se llegó a alcanzar la DL_{50} en ninguna de ellas. El rango de viabilidad está comprendido entre 82,2% y el 76,2% con respecto a su control.
- Ácido Carmínico: los resultados muestran una tendencia a presentar efectos tóxicos en la supervivencia de individuos en todas las concentraciones, excepto para la equivalente a la concentración IDA (concentración 3). El rango de viabilidad está comprendido entre 86,6% y el 73,3% con respecto a su control.
- Eritrosina: la supervivencia se vio afectada significativamente de forma negativa en todas las concentraciones estudiadas, aunque sin llegar a la DL_{50} , a excepción de la concentración 3. El rango de viabilidad para este aditivo se encuentra entre el 87% y el 83% con respecto a su control.
- Indigotina: ninguna de las concentraciones ensayadas fue tóxica para la viabilidad de *Drosophila* cuando es alimentada con dicho colorante.
- Azul Brillante FCF: los resultados indicaron una tendencia a disminuir la supervivencia de los individuos alimentados cuando son alimentados a las dos concentraciones extremas ensayadas, aunque en ninguna de ellas se alcanzó la DL_{50} . Las concentraciones 3 y 4 resultaron no ser tóxicas con respecto al control.

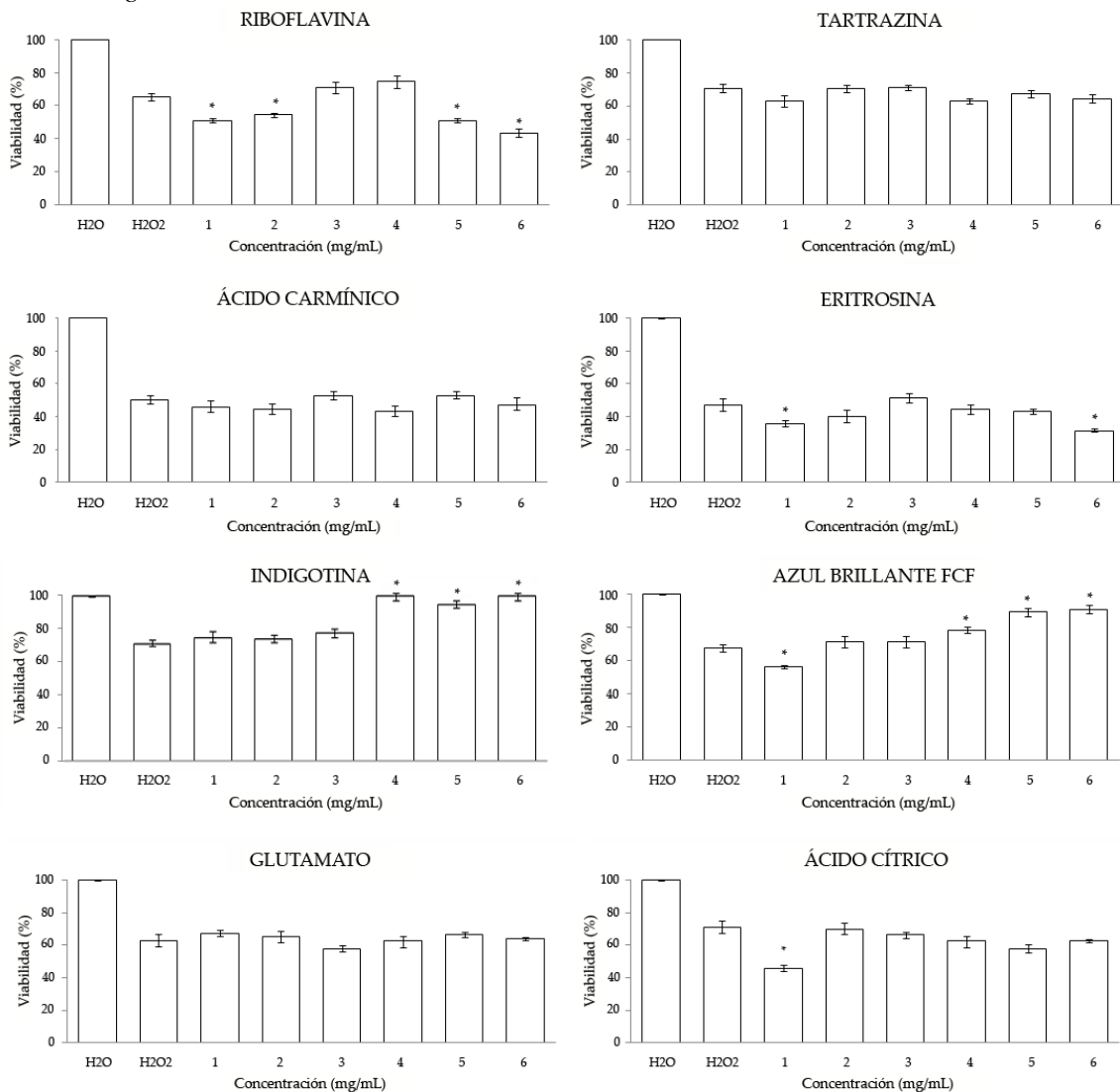
- Glutamato: tan solo las concentraciones centrales (3 y 4) no exhibieron efectos significativos para la toxicidad en *Drosophila*. El resto de concentraciones estudiadas indujo un descenso significativo en la supervivencia de individuos con un rango comprendido entre el 87% y el 75,8% con respecto a su control.
- Ácido Cítrico: aunque ninguna de las concentraciones ensayadas alcanza la DL₅₀, este aditivo presenta un efecto tóxico de manera significativa para la supervivencia de la mosca, excepto para las dos concentraciones centrales (concentración 3 y 4). El rango de supervivencia se encuentra comprendido entre el 82,3% y el 69,4%, con respecto a su control.
- BHA: presentó una disminución significativa de la supervivencia en las dos concentraciones más altas estudiadas. La viabilidad de *Drosophila* en estas concentraciones es del 82,2% y 74,2%, respectivamente, con respecto al control. El resto de concentraciones estudiadas no fue significativamente tóxica.
- BHT: los tratamientos con este aditivo resultaron ser tóxicos para las concentraciones medias-bajas (concentraciones 1 – 4), con un porcentaje de supervivencia del 83,8% y 79% con respecto a su control. Las dos concentraciones más altas ensayadas no mostraron efectos tóxicos para la supervivencia de *Drosophila*.
- Nitrito de Potasio: presenta efecto dosis-dependiente para la toxicidad llegando a tener resultados levemente perjudiciales para *Drosophila* en las tres concentraciones más altas estudiadas. El rango de viabilidad se vio modificado entre el 80% y el 72% con respecto a su control.
- Nitrate de Potasio: presentó una disminución significativa en la supervivencia de individuos tratados a las concentraciones 4 y 5, viendo disminuida su viabilidad hasta el 84% y el 75% respectivamente, con respecto a su control.
- Nitrito de Sodio: mostró un efecto tóxico dosis dependiente, con una disminución significativa de la supervivencia en las tres concentraciones más altas estudiadas, siendo la concentración más alta la que muestra un efecto significativamente tóxico para *Drosophila* con respecto al control. El rango de viabilidad descendió entre un 84% y un 39% con respecto a su control.
- Nitrate de Sodio: los resultados muestran un efecto tóxico dosis-dependiente, siendo las dos concentraciones más altas estudiadas las que presentaron una disminución significativa en la supervivencia de individuos, aunque en ninguna de ellas se llegó a alcanzar la DL₅₀. El porcentaje de viabilidad se vio reducido al 75% y 84% respectivamente, con respecto a su control.

2. Antitoxicidad

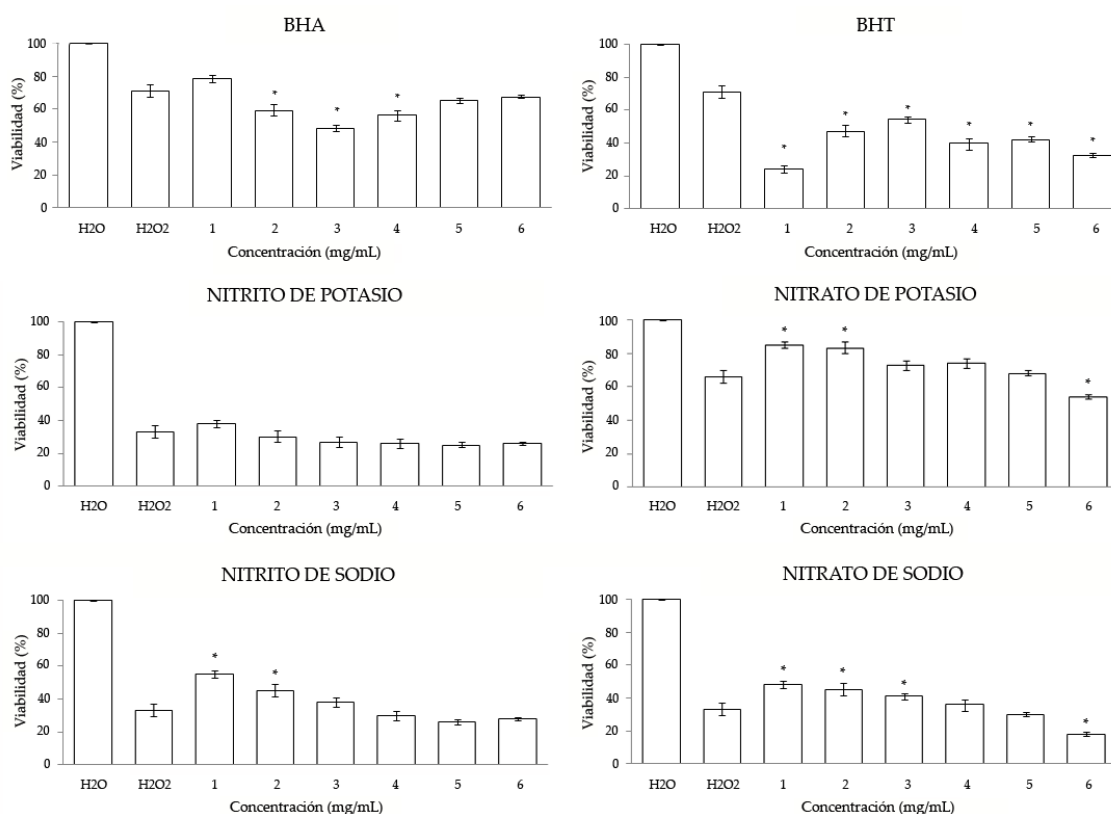
Los resultados de antitoxicidad (Figura 16) mostraron que no todos los aditivos seleccionados en el presente trabajo de tesis tienen la capacidad de proteger a *Drosophila* de un estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno. La falta aparente de concordancia entre los resultados de los ensayos de toxicidad y antitoxicidad en los aditivos alimentarios estudiados puede deberse a que cada

sustancia puede mostrar actividades antioxidantes o prooxidantes de una manera competitiva frente a los efectos del peróxido de hidrógeno cuando ambos se combinan (Scotter & Castle, 2004). En general, sólo se ha encontrado capacidad de contrarrestar el estrés oxidativo en las tres concentraciones más altas de los colorantes azules, en las dos concentraciones más bajas de Nitrato de Potasio y Nitrito de Sodio, y para las tres concentraciones más bajas de Nitrato de Sodio, con respecto a sus controles positivos. Tartrazina, Ácido Carmínico, Glutamato y Nitrito de Potasio no mostraron ningún efecto significativo en los tratamientos combinados para ninguna de las concentraciones ensayadas con respecto a su control positivo. Sin embargo, concentraciones extremas de Riboflavina y Eritrosina, concentración mínima de Azul Brillante FCF y Ácido Cítrico, concentraciones máximas de Nitrato de Potasio y Nitrato de Sodio, concentraciones centrales de BHA, y todas las concentraciones ensayadas de BHT tuvieron efectos tóxicos significativos cuando fueron combinados con el peróxido de hidrógeno como agente oxidativo en *Drosophila*.

Figura 16. Niveles de antitoxicidad obtenidos por los aditivos alimentarios en *D. melanogaster*.



(Figura 16. Continuación)



Los datos se expresan como porcentaje de adultos nacidos, de tres experimentos independientes tratados con distintas concentraciones de aditivos combinados con H₂O₂ 0,12 M, con respecto a un total de 300 larvas de 72 h de edad sin tratar. Los valores representan la media +/- el error estándar de tres experimentos independientes. *: diferencias significativas con respecto a su control positivo. Los números 1 – 6 indican las distintas diluciones ensayadas para cada aditivo (ver Tabla 3).

El posible potencial protector, nulo o perjudicial de los compuestos seleccionados cuando se combinan con un agente tóxico oxidante queda detallado a continuación:

- Riboflavina: mostró efectos perjudiciales significativos para *Drosophila* cuando es alimentada en combinación con peróxido de hidrógeno en sus dos concentraciones superiores e inferiores. La viabilidad de los individuos se vio reducida entre un 14,5% y un 22% con respecto al control positivo.
- Tartrazina: no mostró habilidad para proteger a los individuos frente a un estrés oxidativo de forma significativa en ninguna de las concentraciones estudiadas.
- Ácido Carmínico: no indujo ningún efecto antitóxico en ninguna de las concentraciones estudiadas en *Drosophila* cuando fue combinado con el agente oxidante.
- Eritrosina: los resultados indican un efecto antitóxico significativo negativo en *Drosophila* en las concentraciones más extremas estudiadas (1 y 6), disminuyendo un 11% y 15% la viabilidad de los individuos con respecto al control positivo. El resto de concentraciones no mostraron resultados significativos para la supervivencia de los individuos.

- Indigotina: mostró un efecto significativo antitóxico en las tres concentraciones más altas ensayadas para *Drosophila* con una viabilidad superior al 95%.
- Azul Brillante FCF: la concentración mínima ensayada para este colorante cuando es combinado con un agente tóxico, indica efectos significativos negativos para la protección de la supervivencia de los individuos alimentados, disminuyendo un 11% su viabilidad con respecto a su control positivo. Sin embargo, las tres concentraciones más altas estudiadas son significativamente antitóxicas para *Drosophila*, con un porcentaje de viabilidad entre el 78% y el 91%.
- Glutamato: no ejerce ninguna actividad protectora significativa en el organismo modelo *D. melanogaster* cuando es combinado con peróxido de hidrógeno.
- Ácido Cítrico: ninguna de las concentraciones ensayadas mostró efecto significativo en la protección de *Drosophila*, excepto la concentración mínima ensayada, la cual mostró un efecto negativo en la supervivencia de individuos cuando es combinado con un agente tóxico disminuyendo la viabilidad en un 25%, con respecto a su control positivo.
- BHA: las concentraciones 2, 3 y 4 estudiadas mostraron un efecto antitóxico negativo significativo, con una reducción del porcentaje de viabilidad entre el 12% y el 23% con respecto a su control positivo, para la supervivencia de *Drosophila* cuando son combinadas con peróxido de hidrógeno como agente tóxico.
- BHT: todas las concentraciones estudiadas mostraron un efecto perjudicial significativo, con respecto a su control positivo, para los tratamientos combinados con peróxido de hidrógeno, con una reducción de viabilidad entre el 17% y 47%.
- Nitrito de Potasio: no mostró capacidad significativa para la protección de este aditivo frente a un agente estresante cuando es combinado en el organismo modelo *D. melanogaster*.
- Nitrate de Potasio: las dos concentraciones mínimas ensayadas mostraron efecto protector significativo con un aumento de la supervivencia de individuos del 19% y 17% respectivamente con respecto al control positivo, cuando se realizan tratamientos combinados con un agente genotóxico. Sin embargo, la concentración más alta estudiada mostró de forma significativa un efecto antitóxico negativo en *Drosophila* con una disminución de la supervivencia de los individuos del 12% con respecto al control positivo.
- Nitrito de Sodio: ejerció un efecto antitóxico significativo para las dos concentraciones más bajas estudiadas en *D. melanogaster*, con un aumento de viabilidad del 22% y 12% respectivamente, con respecto al control positivo. El resto de concentraciones ensayadas no mostraron efectos significativos para la supervivencia de las moscas.
- Nitrate de Sodio: los resultados mostraron un efecto antitóxico significativo en las tres concentraciones más bajas estudiadas en *Drosophila*, con un aumento del porcentaje de viabilidad entre un 8% y un 15% con respecto al control positivo, y un efecto significativo negativo para la supervivencia de individuos en tratamientos combinados a alta concentración de este aditivo, con una disminución de la viabilidad del 15% con respecto al control positivo.

3. Genotoxicidad

La Tabla 5 muestra los resultados del ensayo SMART de genotoxicidad para tratamientos con los distintos aditivos alimentarios en estudio, a su concentración IDA respectiva establecida, usando el organismo modelo *Drosophila melanogaster*. La frecuencia total del número de clones mostrado para los controles negativo y positivo fue de 0,158 y 0,400 respectivamente. Estos valores se encuentran comprendidos dentro del rango establecido en similares estudios previos (Romero-Jiménez, Campos-Sánchez, Analla, Muñoz-Serrano, & Alonso-Moraga, 2005; Villatoro-Pulido et al., 2008). Además, se ha demostrado que la concentración usada de H₂O₂ (0,12 M) induce recombinaciones mitóticas y mutaciones somáticas en *Drosophila melanogaster* (Romero-Jiménez et al., 2005).

Tabla 5. Genotoxicidad de los aditivos alimentarios en *Drosophila melanogaster*.

Compuesto	Nº alas	Clones por ala (nº manchas) ⁽¹⁾			Clones gemelos m = 5	Clones totales m = 2	Mann Whitney ⁽²⁾
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (> 2 células) m = 5				
H ₂ O	38	0,105 (4)	0,053 (2)	0	0,158 (6)		
H ₂ O ₂	40	0,200 (8)	0,200 (8)	0	0,400 (16) +		
Riboflavina	40	0,200 (8)	0,050 (2)	0	0,250 (10) i	Δ	
Tartrazina	40	0,350 (14)	0,025 (1)	0	0,375 (15) i	Δ	
Ácido Carmínico	40	0,200 (8)	0,175 (7)	0	0,375 (15) i	Δ	
Eritrosina	36	0,277 (10)	0	0	0,277 (10) i	Δ	
Indigotina	40	0,200 (8)	0,050 (2)	0	0,250 (10) i	Δ	
Azul Brillante FCF	40	0,175 (7)	0	0	0,175 (7) i	Δ	
Glutamato	38	0,158 (6)	0,105 (4)	0	0,263 (10) i	Δ	
Ácido cítrico	40	0,150 (6)	0,075 (3)	0	0,225 (9) i	Δ	
BHA	28	0,107 (3)	0,143 (4)	0	0,250 (7) i	Δ	
BHT	34	0,206 (7)	0,117 (4)	0	0,323 (11) i	Δ	
Nitrito de Potasio	40	0,150 (6)	0,050 (2)	0	0,200 (8) i	Δ	
Nitrato de Potasio	36	0,166 (6)	0	0	0,166 (6) i	Δ	
Nitrito de Sodio	40	0,225 (9)	0,100 (4)	0	0,325 (13) i	Δ	
Nitrato de Sodio	40	0,175 (7)	0,025 (1)	0	0,200 (8) i	Δ	

⁽¹⁾ Diagnóstico estadístico según Frei and Würzler (1988). + (positivo), i (inconclusivo) con respecto al control negativo. m: factor de multiplicación. Test de Kastenbaum and Bowman (1970) sin corrección de Bonferroni, nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$. ⁽²⁾ Los resultados inconclusivos se resolvieron mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney U-test. Delta (Δ) muestra las diferencias no significativas entre el tratamiento y su control.

El rango de frecuencia de mutación para el conjunto de los aditivos estudiados, en su concentración IDA, está comprendido entre los valores 0,166 y 0,375 clones/ala con

respecto al control negativo. Tras analizar los resultados con el test estadístico Mann Whitney U-test, ninguno de los resultados resultó estadísticamente significativo con respecto al control, por lo que no se dan efectos genotóxicos significativos de dichos aditivos en el organismo *Drosophila melanogaster* para las concentraciones ensayadas.

4. Antigenotoxicidad

La Tabla 6 muestra los resultados del ensayo SMART de antigenotoxicidad para tratamientos con los distintos aditivos alimentarios en estudio, a su concentración IDA respectivamente establecida (ver Tabla 3), usando el organismo modelo *Drosophila melanogaster* cuando este es tratado de forma combinada con peróxido de hidrógeno como genotoxina y con los diferentes aditivos.

Tabla 6. Antigenotoxicidad de los aditivos alimentarios en *Drosophila melanogaster*.

Compuesto	Nº alas	Clones por ala (nº manchas) ⁽¹⁾				Clones totales m = 2	Mann Whitney ⁽²⁾	PI ⁽³⁾
		Clones simples pequeños (1-2 células) m = 2	Clones simples grandes (> 2 células) m = 5	Clones gemelos m = 5				
					a b			
H ₂ O	38	0,105 (4)	0,053 (2)	0	0,158 (6)			
H ₂ O ₂	40	0,200 (8)	0,200 (8)	0	0,400 (16)	+		
Riboflavina	12	0,333 (4)	0	0	0,333 (4)	i i	Δ Δ 16,75	
Tartrazina	36	0,166 (6)	0,083 (3)	0	0,250 (9)	i i	Δ Δ 37,50	
Ácido Carmínico	28	0,285 (8)	0,035 (1)	0	0,321 (9)	i i	Δ Δ 19,75	
Eritrosina	20	0,400 (8)	0,100 (2)	0,050 (1)	0,550 (11)	i +	Δ -37,50	
Indigotina	18	0,111 (2)	0	0,055 (1)	0,166 (3)	i i	Δ Δ 58,50	
Azul Brillante FCF	19	0,474 (9)	0,052 (1)	0	0,526 (10)	i +	Δ -31,50	
Glutamato	40	0,125 (5)	0,100 (4)	0	0,225 (9)	i i	Δ Δ 43,75	
Ácido cítrico	32	0,187 (6)	0,157 (5)	0	0,344 (11)	i i	Δ Δ 14,00	
BHA	22	0,227 (5)	0,046 (1)	0	0,273 (6)	i i	Δ Δ 31,75	
BHT	26	0,231 (6)	0,038 (1)	0	0,269 (7)	i i	Δ Δ 32,75	
Nitrito de Potasio	39	0,282 (11)	0,077 (3)	0,026 (1)	0,385 (15)	i +	Δ 3,75	
Nitrato de Potasio	31	0,322 (10)	0,033 (1)	0	0,355 (11)	i i	Δ Δ 11,25	
Nitrito de Sodio	12	0,416 (5)	0	0	0,416 (5)	i +	Δ -4,00	
Nitrato de Sodio	26	0,154 (5)	0,038 (1)	0	0,192 (5)	i i	Δ Δ 52,00	

⁽¹⁾ Diagnóstico estadístico según Frei and Würgler (1988). + (positivo), i (inconclusivo) con respecto al control negativo (a) o positivo (b). m: factor de multiplicación. Test de Kastenbaum and Bowman (1970) sin corrección de Bonferroni, nivel de probabilidad $\alpha = \beta = 0,05$. ⁽²⁾ Los resultados inconclusivos se resolvieron mediante la prueba no paramétrica de Mann Whitney U-test. Delta (Δ) muestra las diferencias no significativas entre el tratamiento y su control negativo (a) o positivo (b).

⁽³⁾ El porcentaje de inhibición (PI) de los tratamientos combinados se calculó para el número total de manchas por ala de acuerdo con Abraham (1994).

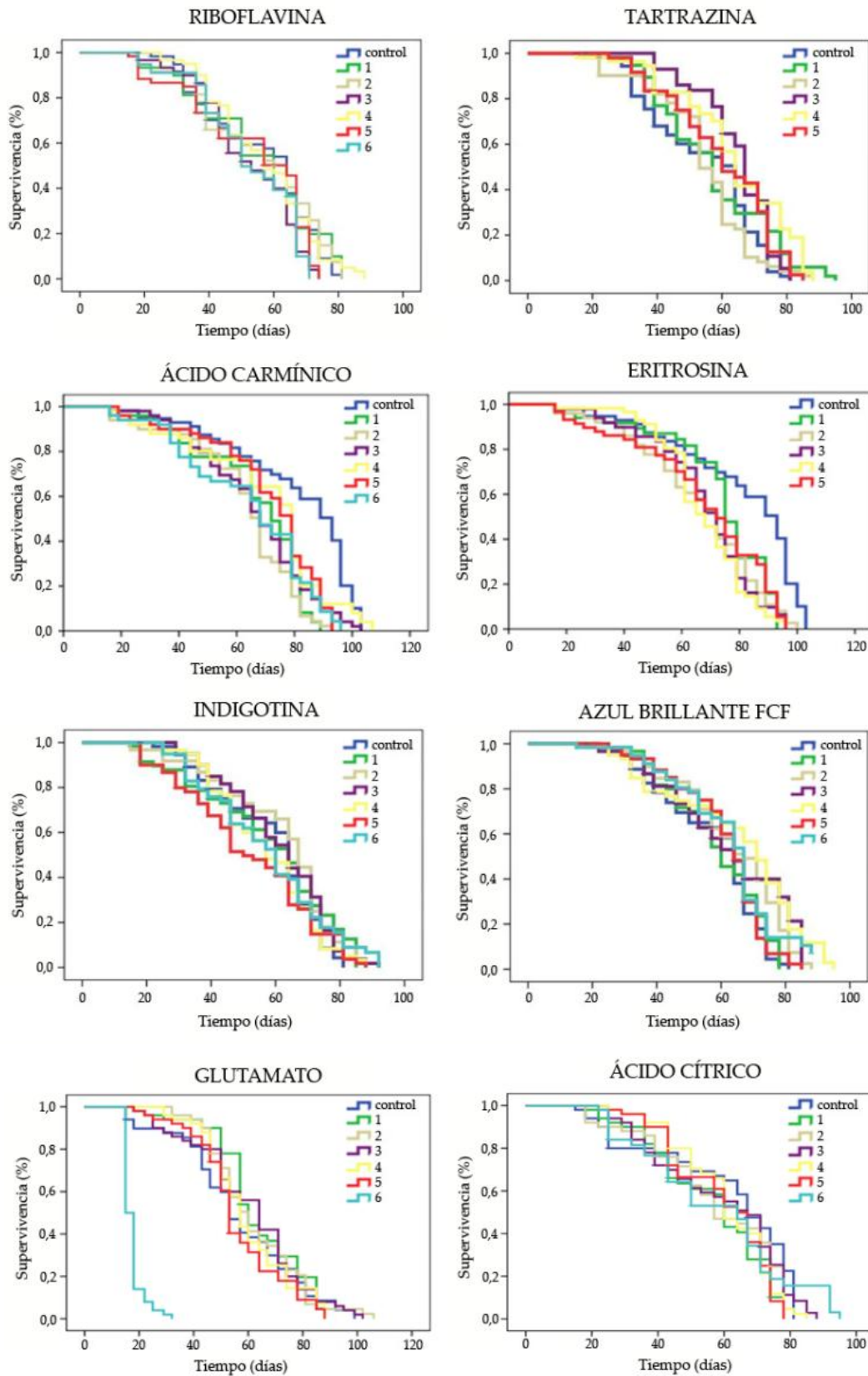
La frecuencia total de clones detectados para los controles negativo y positivo fue de 0,158 y 0,400 respectivamente. Estos valores se encuentran comprendidos dentro del rango establecido en estudios previos, demostrando que la concentración usada de H₂O₂ (0,12 M) es genotóxica siendo capaz de inducir recombinaciones mitóticas y mutaciones somáticas en *Drosophila melanogaster* (Romero-Jiménez et al., 2005).

El rango de frecuencia de mutación para el conjunto de los aditivos estudiados, en su concentración IDA, está comprendido entre los valores 0,166 y 0,550 clones/ala, cuando se llevan a cabo tratamientos combinados. Diez de los aditivos mostraron una inhibición del potencial mutagénico comprendida entre el 11,25% y 58,50%, siendo la Indigotina y el Nitrato de Sodio los que presentaron mayor capacidad de protección genómica, seguidos del Glutamato, Tartrazina, BHT, BHA, Ácido Carmínico, Riboflavina, Ácido Cítrico y Nitrato de Potasio. Sin embargo, la Eritrosina, el Azul Brillante FCF, Nitrito de Potasio y Nitrito de Sodio no fueron capaces de inhibir los efectos genotóxicos del peróxido de hidrógeno. Los valores de inhibición están relacionados con los diagnósticos estadísticos parciales previos llevados a cabo, comparando bien con el control positivo (ningún aditivo a la concentración IDA es estadísticamente inferior al control positivo realizando el Mann Whitney U-test) o comparando bien con su control negativo (en cuyo caso la Eritrosina, el Azul Brillante FCF y los dos Nitritos estudiados son estadísticamente mutagénicos).

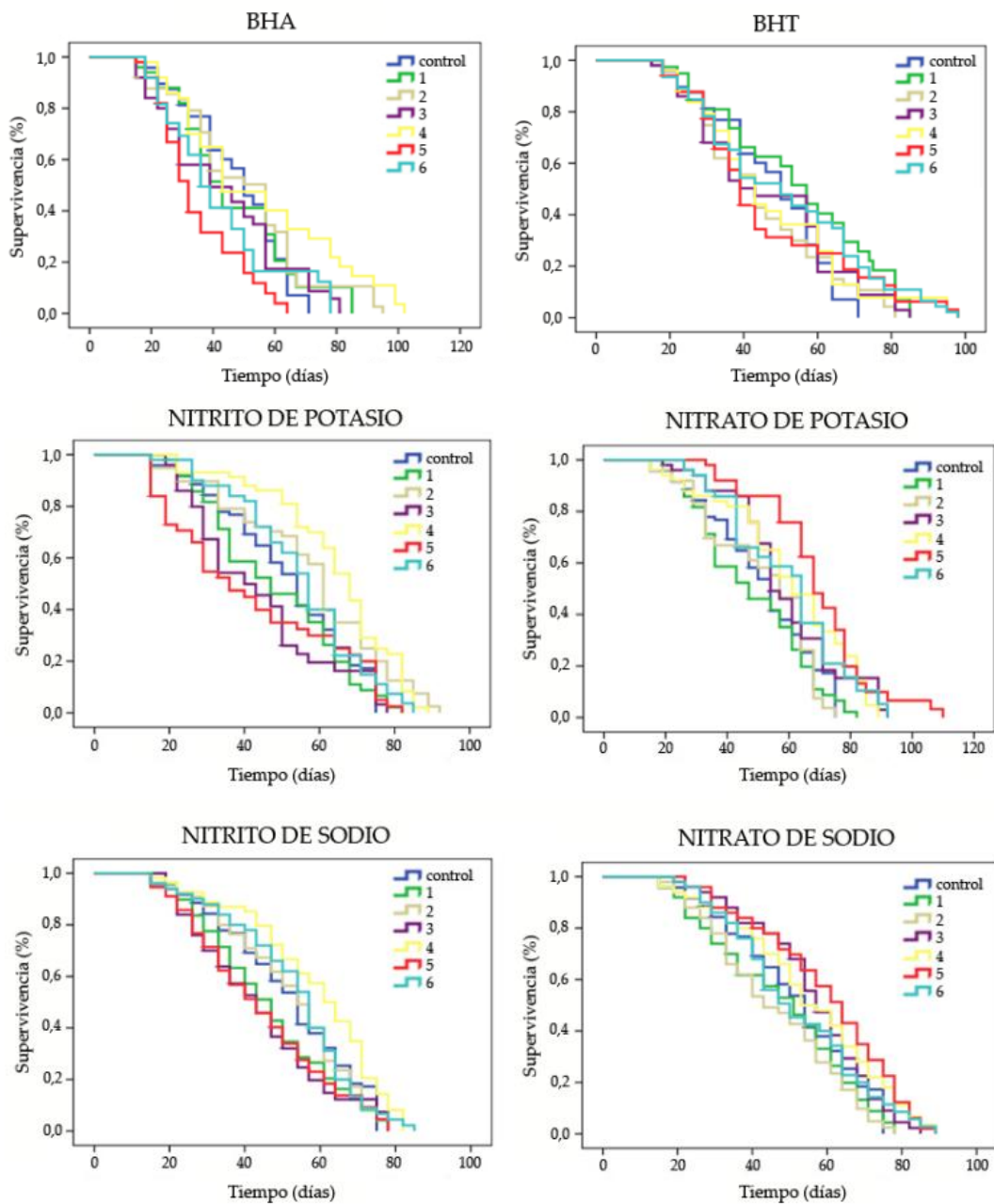
5. Longevidad

Las curvas de longevidad obtenidas por el método de Kaplan-Meier de cada aditivo y concentración ensayada (ver Tabla 3), y los resultados de la calidad de vida (25% de supervivencia de la parte superior de la curva de longevidad), así como su significancia, se muestran en la Figura 17 y la Tabla 7 respectivamente. En general, los distintos aditivos alimentarios estudiados no mostraron una relación dosis-efecto clara, lo que nos puede sugerir que existe un valor umbral significativo en la respuesta de la población, en lugar de una gradación en la respuesta. Los datos proporcionados a la comunidad investigadora por el presente estudio forman parte de los resultados controvertidos observados en la base de datos sobre colorantes alimentarios (EFSA, 2009, 2010, 2011a, 2011b, 2012, 2013a, 2014, 2015, 2017a, 2017b, 2017c; JECFA, 1996).

Figura 17. Curvas de supervivencia de *D. melanogaster* alimentadas con distintas concentraciones de aditivos alimentarios durante toda su vida.



(Figura 17. Continuación)



La supervivencia de los individuos fue evaluada por el método Kaplan–Meier, y la significancia de las curvas se determinó mediante el análisis de Log-Rank (Mantel-Cox). Los números 1 – 6 indican las distintas diluciones ensayadas para cada aditivo (ver Tabla 3).

De forma más detallada, los datos más relevantes de los resultados de ambos ensayos se resumen a continuación:

- Riboflavina: no mostró alteraciones significativas en la longevidad ni en la calidad de vida para ninguna de las concentraciones estudiadas de *D. melanogaster*.
- Tartrazina: ejerció una mejora significativa en la longevidad de *Drosophila* para las concentraciones numeradas como 3, 4 y 5, con una extensión de vida comprendida entre 5 y 10 días con respecto a su control. La calidad de vida también resultó ser mejorada en estas concentraciones y en la concentración mínima ensayada,

- obteniéndose una mejora significativa entre 5 y 12 días de vida con respecto a su control.
- Ácido Carmínico: los resultados para la longevidad de *Drosophila* fueron significativamente negativos para todos los tratamientos realizados, viéndose disminuida la longitud de vida de los individuos entre 14 y 20 días con respecto a su control. La calidad de vida no se vio significativamente alterada para los tratamientos crónicos de este aditivo con respecto a su control.
 - Eritrosina: este colorante indujo una reducción significativa de la longevidad de las moscas en las concentraciones 2 a 5, entre 12 y 13 días con respecto a su control. Además, la calidad de vida resultó ser disminuida significativamente en 16 días, con respecto a su control, para la concentración 5 estudiada.
 - Indigotina: ningún efecto significativo se vio reflejado en la longevidad de *Drosophila* tratada crónicamente con este colorante azul. Sin embargo, la calidad de vida sí se vio reducida significativamente en 6 días, con respecto a su control, para las concentraciones 1 y 5 estudiadas.
 - Azul Brillante FCF: los resultados muestran sólo efecto significativo para la longevidad de *Drosophila* cuando son tratadas a concentraciones intermedias (2, 3 y 4), con un incremento de la extensión de vida de las moscas de entre 5 y 8 días, con respecto a su control.
 - Glutamato: no se hallaron efectos significativos de este aditivo, excepto para la concentración más alta estudiada (6) en los ensayos de longevidad, la cual indujo un descenso significativo de la extensión de vida de *Drosophila* de 39 días con respecto a su control. Por el contrario, la calidad de vida fue significativamente diferente al control para todas las concentraciones: las concentraciones 1 a 5 incrementaron la calidad de vida entre 9 – 16 días, mientras que la concentración 6 redujo su calidad de vida en 12 días, con respecto al control.
 - Ácido Cítrico: los resultados fueron significativos sólo cuando se analizó la calidad de vida de *Drosophila* en los tratamientos crónicos a concentraciones medias-altas (concentraciones 3 – 5), viéndose incrementada significativamente entre 2 y 13 días con respecto a su control. Por otro lado, la concentración 6 disminuyó significativamente la calidad de vida de *Drosophila* en 2 días con respecto a su control.
 - BHA: muestra resultados significativos negativos para ambos parámetros de la vida de *Drosophila*. La longevidad se vio reducida en 12 días, con respecto a su control, para tratamientos crónicos a concentración alta (concentración 5); la calidad de vida se redujo en 6 días con respecto a su control, cuando las moscas con tratadas a la establecida como concentración IDA (concentración 3).
 - BHT: no se obtuvieron resultados significativos para ninguna de las concentraciones ensayadas, exceptuando la concentración mínima, la cual aumentó significativamente la extensión de vida de *Drosophila* en 7 días, comparado con su control. La calidad de vida para los tratamientos con este aditivo no resultó significativa en ninguna de las concentraciones estudiadas.
 - Nitrito de Potasio: los resultados de longevidad indicaron que las concentraciones 2 y 4 estudiadas para este aditivo inducen una mejora significativa entre 6 y 13 días

de la extensión de *Drosophila* cuando es alimentada crónicamente. Por contra, a las concentraciones 4 y 6, la calidad de vida de estos individuos se ve disminuida significativamente entre 4 y 5 días con respecto a su control.

- Nitrate de Potasio: las concentraciones más altas ensayadas (4, 5 y 6) mostraron una mejora significativa de la longevidad y calidad de vida de *Drosophila* respecto a sus controles de entre 8 y 16 días y entre 5 y 15 días, respectivamente.
- Nitrito de Sodio: los resultados sólo mostraron una mejora significativa en 7 días de la expansión de vida de *Drosophila*, con respecto a su control, cuando el tratamiento crónico fue realizado a la concentración numerada como 4.
- Nitrate de Sodio: la longevidad de las moscas tratadas aumentó significativamente en 8 días, con respecto a su control, para tratamientos con la concentración numerada como 5. Además la calidad de vida de *Drosophila* también se vio mejorada significativamente entre 3 y 5 días, con respecto a su control, cuando los tratamientos fueron realizados a las concentraciones numeradas como 3 y 5.

Tabla 7. Medias y significancias de las diferentes curvas de longevidad y calidad de vida de *D. melanogaster* tratadas con aditivos alimentarios.

Aditivo	Concentración	Longevidad ⁽¹⁾ (días)	Calidad de vida ⁽¹⁾ (días)
Riboflavina	Control	55,985	31,399
	1	55,019 ns	27,607 ns
	2	55,864 ns	29,110 ns
	3	52,534 ns	29,966 ns
	4	57,067 ns	32,714 ns
	5	53,341 ns	25,500 ns
	6	52,660 ns	27,222 ns
Tartrazina	Control	54,375	31,399
	1	57,664 ns	36,154 *
	2	54,037 ns	32,681 ns
	3	64,618 *	43,571 *
	4	63,860 *	35,760 *
	5	59,989 *	37,252 *
Ácido Carmínico	Control	62,345	38,509
	1	44,958 *	35,630 ns
	2	43,215 *	29,000 ns
	3	45,515 *	37,067 ns
	4	46,998 *	39,321 ns
	5	48,211 *	40,000 ns
	6	44,236 *	30,533 ns

(Tabla 7. Continuación)

	Control	62,345		38,000
Eritrosina	1	55,487	ns	27,614 ns
	2	49,589	*	34,270 ns
	3	49,847	*	35,050 ns
	4	50,011	*	45,330 ns
	5	50,214	*	22,500 *
	Control	58,433		32,988
Indigotina	1	57,791	ns	27,019 *
	2	61,547	ns	29,182 ns
	3	61,181	ns	33,857 ns
	4	57,067	ns	32,714 ns
	5	52,024	ns	27,189 *
	6	57,570	ns	31,068 ns
	Control	57,526		32,988
Azul Brillante FCF	1	58,686	ns	34,333 ns
	2	63,513	*	31,286 ns
	3	62,664	*	33,000 ns
	4	65,095	*	32,877 ns
	5	61,074	ns	30,800 ns
	6	62,466	ns	31,984 ns
	Control	56,424		27,857
Glutamato	1	63,182	ns	43,769 *
	2	61,950	ns	42,583 *
	3	60,640	ns	41,833 *
	4	59,380	ns	40,917 *
	5	55,971	ns	36,250 *
	6	17,672	*	15,000 *
	Control	60,447		26,857
Ácido Cítrico	1	59,140	ns	31,750 ns
	2	57,486	ns	30,231 ns
	3	59,222	ns	32,154 *
	4	60,598	ns	39,462 *
	5	59,298	ns	38,333 *
	6	57,829	ns	24,750 *
	Control	47,663		25,583
BHA	1	46,871	ns	25,308 ns
	2	50,078	ns	21,267 ns
	3	43,133	ns	18,833 *
	4	55,030	ns	26,083 ns
	5	35,092	*	20,273 ns
	6	42,032	ns	20,400 ns

(Tabla 7. Continuación)

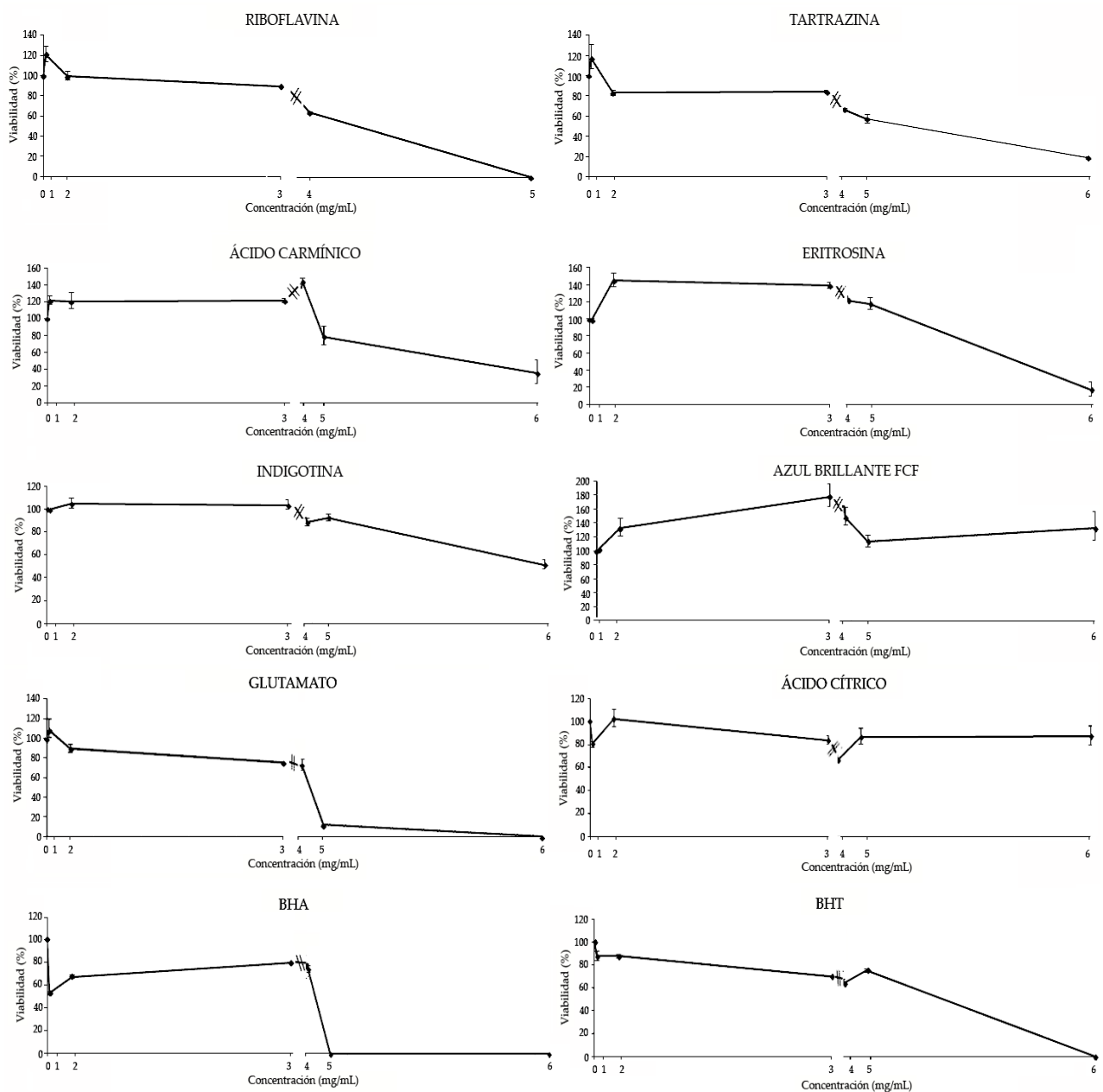
	Control	47,663	25,583
BHT	1	54,469 *	23,750 ns
	2	45,089 ns	22,945 ns
	3	46,730 ns	29,714 ns
	4	47,634 ns	22,833 ns
	5	46,431 ns	24,000 ns
	6	51,261 ns	24,273 ns
	Control	51,355	26,569
Nitrito de Potasio	1	48,212 ns	26,933 ns
	2	57,613 *	28,266 ns
	3	43,736 ns	27,846 ns
	4	64,084 *	21,900 *
	5	42,179 ns	28,421 ns
	6	55,109 ns	21,421 *
	Control	51,355	26,569
Nitrito de Potasio	1	48,212 ns	24,625 ns
	2	51,583 ns	30,077 ns
	3	59,178 ns	23,900 ns
	4	60,310 *	33,583 *
	5	69,333 *	31,875 *
	6	59,712 *	41,271 *
	Control	51,355	25,250
Nitrito de Sodio	1	46,184 ns	25,769 ns
	2	51,879 ns	27,167 ns
	3	43,804 ns	25,789 ns
	4	58,476 *	26,125 ns
	5	43,950 ns	24,000 ns
	6	53,113 ns	25,333 ns
	Control	51,355	25,250
Nitrito de Sodio	1	47,596 ns	24,067 ns
	2	46,205 ns	25,500 ns
	3	56,347 ns	30,000 *
	4	55,468 ns	25,400 ns
	5	59,677 *	30,900 *
	6	52,026 ns	27,900 ns

Las medias fueron calculadas por el método Kaplan–Meier, y las significancias de las curvas fueron determinadas por el método Log-Rank (Mantel-Cox). ⁽¹⁾ ns: no-significativo, *: significativo ($p < 0,05$). Los números 1 – 6 indican las diferentes concentraciones ensayadas para cada aditivo (ver Tabla 3).

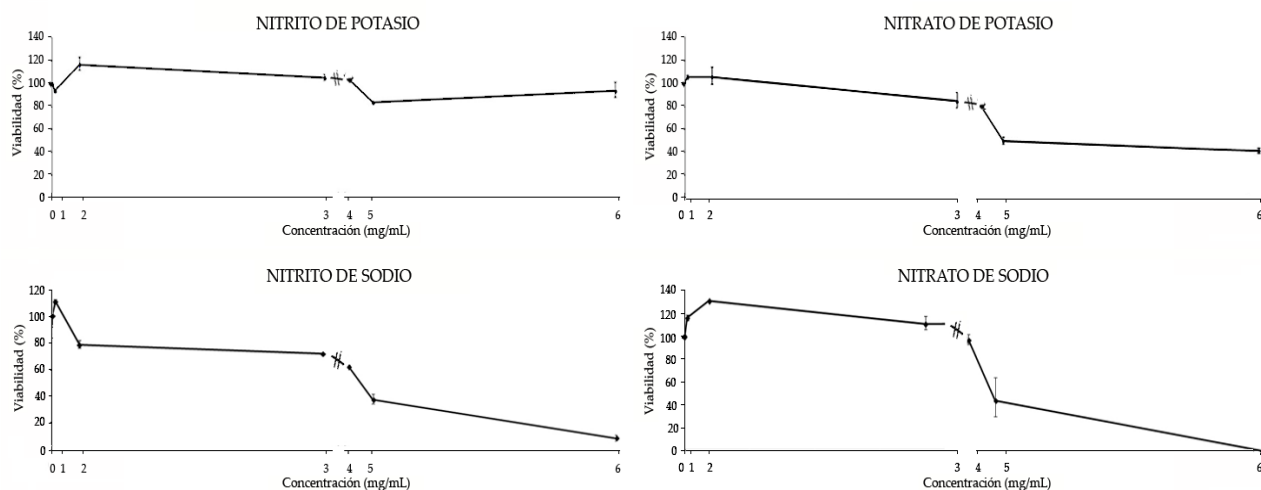
6. Citotoxicidad

Los resultados de citotoxicidad para los tratamientos de los distintos aditivos alimentarios quedan reflejados en la Figura 18. En general, considerando el efecto citotóxico como una disminución de la viabilidad celular mayor del 50%, podemos observar efectos citotóxicos en la mayoría de los aditivos estudiados, con la excepción de la Indigotina, Azul Brillante FCF, Ácido Cítrico y Nitrito de Potasio. Sin embargo, analizando la capacidad de inhibición del crecimiento celular de nuestros aditivos para las correspondientes concentraciones IDA establecidas, se observa no sólo que ninguno de los aditivos fue capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales, sino que algunos de ellos incluso estimularon dicho crecimiento.

Figura 18. Efectos de los aditivos alimentarios sobre la viabilidad celular.



(Figura 18. Continuación)



Viabilidad de las células de leucemia humana (HL-60) tratadas con diferentes concentraciones de aditivos alimentarios durante 72 h. Los valores son el resultado de las medias de tres experimentos independientes +/- el error estándar. Cada punto representa la tasa de crecimiento celular con respecto a su control. Los números 1 – 6 indican las distintas diluciones ensayadas para cada aditivo, las cuales están representadas a distancias proporcionales a su concentración equivalente (ver Tabla 3).

De forma detallada, los resultados más relevantes de citotoxicidad fueron:

- Riboflavina: presentó una inhibición del crecimiento celular dosis-dependiente, alcanzando un descenso de la viabilidad de células HL-60 del 100% en la concentración 5. La concentración mínima ensayada fue la única que presentó potencial para estimular el crecimiento de las células tumorales con respecto al control. La concentración 3 (concentración IDA) tuvo una disminución de viabilidad del 11% con respecto al control. La CI_{50} se encontró entre las concentraciones 4 y 5.
- Tartrazina: los resultados mostraron una tendencia citotóxica dosis-dependiente. La concentración correspondiente a la IDA alcanzó una viabilidad del 84% con respecto a su control. La concentración mínima ensayada fue la única que presentó potencial para estimular el crecimiento de las células tumorales con respecto al control. La CI_{50} se alcanzó entre las concentraciones 5 y 6.
- Ácido Carmínico: los resultados mostraron una disminución de la viabilidad celular de forma dosis-dependiente, con respecto al control, a partir de la concentración 4 estudiada. El rango de viabilidad celular para este aditivo está comprendido entre el 140% – 35%, alcanzándose una supervivencia superior al control en un 20% en la concentración IDA, y una IC_{50} en la concentración más alta estudiada.
- Eritrosina: el rango de viabilidad celular producido en los diferentes tratamientos está comprendido entre el 144% – 17%, con respecto al tratamiento control. El efecto citotóxico de este aditivo en las células HL-60 se produce en la concentración más alta estudiada. La concentración 3 (concentración equivalente a la concentración IDA) mostró un porcentaje de viabilidad del 139% con respecto al control.

- Indigotina: mostró un descenso del crecimiento celular dosis dependiente comprendido entre un porcentaje de viabilidad entre el 104% – 52%, con respecto a control. No se alcanzó la CI_{50} que nos indicaría que nuestro aditivo pudiese presentar potencial quimiopreventivo en ninguna de las concentraciones estudiadas.
- Azul Brillante FCF: no mostró ningún efecto citotóxico para ningunas de las concentraciones estudiadas, con respecto al control. El rango de viabilidad celular alcanza valores comprendidos entre el 177% – 102%, siendo la concentración IDA la que presenta el valor de crecimiento más alto.
- Glutamato: presentó efecto quimiopreventivo dosis dependiente, con un porcentaje de viabilidad comprendido entre el 108% – 0%, con respecto al control. La concentración IDA (concentración 3) tan solo mostró una inhibición del crecimiento celular del 25% con respecto al control; mientras que la CI_{50} se alcanzó entre las concentraciones 4 y 5.
- Ácido Cítrico: indujo solamente un leve descenso de la viabilidad celular del 32% con respecto a su control. La concentración IDA presentó una viabilidad del 83%, frente a las células tumorales no tratadas.
- BHA: indujo una viabilidad comprendida entre el 79% – 0%, con respecto al control. La concentración IDA es la que presentó menor potencial para inhibir el crecimiento de las células tumorales, mientras que las dos concentraciones más altas estudiadas presentaron un potente efecto quimiopreventivo induciendo una muerte celular del 100%, con respecto al control.
- BHT: mostró un efecto citotóxico dosis-dependiente para las concentraciones estudiadas. El porcentaje de viabilidad celular resultó comprendido entre el 88% – 0% con respecto al control. La concentración IDA inhibió el 30% del crecimiento de células de leucemia humana. Tan solo la concentración máxima ensayada es la que presenta un significativo potencial quimiopreventivo para el tratamiento de las células HL-60
- Nitrito de Potasio: los resultados mostraron escaso potencial citotóxico de este aditivo, con un rango de viabilidad celular comprendido entre el 117% – 82%, con respecto al control. La concentración IDA indujo una estimulación del crecimiento de células de leucemia en un porcentaje del 10% con respecto a las células sin tratar. Además, no se alcanzó la CI_{50} que nos indicaría que nuestro aditivo presenta potencial quimiopreventivo para alguna de las concentraciones estudiadas.
- Nitrato de Potasio: los resultados mostraron efecto dosis-dependiente en la inhibición del crecimiento celular de HL-60. El porcentaje de viabilidad celular para las diferentes concentraciones en estudio está comprendido entre el 105% – 40% con respecto al control. La concentración 3 (concentración IDA) mostró una inhibición del crecimiento celular del 18% frente a las células sin tratar; mientras que la CI_{50} se alcanzó en la concentración 5 estudiada.
- Nitrito de Sodio: el porcentaje de viabilidad para las células tratadas a diferentes concentraciones de este aditivo está comprendido entre el 112% – 8% con respecto al control, indicando un potencial quimiopreventivo en las

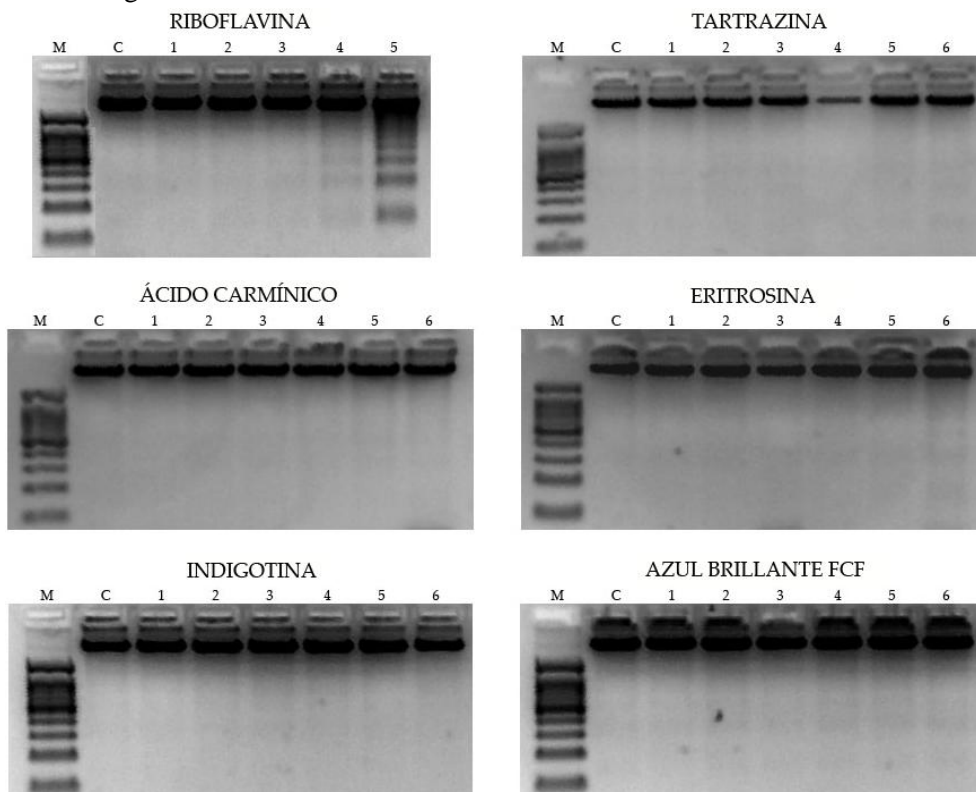
concentraciones más altas estudiadas. El efecto citotóxico que se indujo en la concentración IDA (concentración 3) indicó una supervivencia celular del 71% con respecto al control. La concentración inhibitoria 50 se alcanzó entre las concentraciones 4 y 5 en estudio.

- Nitrato de Sodio: las concentraciones más bajas estudiadas mostraron estimulación del crecimiento celular llegando a alcanzar un porcentaje de viabilidad del 128% con respecto al control. A partir de la concentración 3 (concentración IDA), cuya viabilidad supera al crecimiento control en un 13%, se produce un descenso dosis-dependiente llegando a inducir una muerte celular del 100% en la concentración más alta estudiada. La CI_{50} se alcanzó entre las concentraciones 4 y 5 estudiadas.

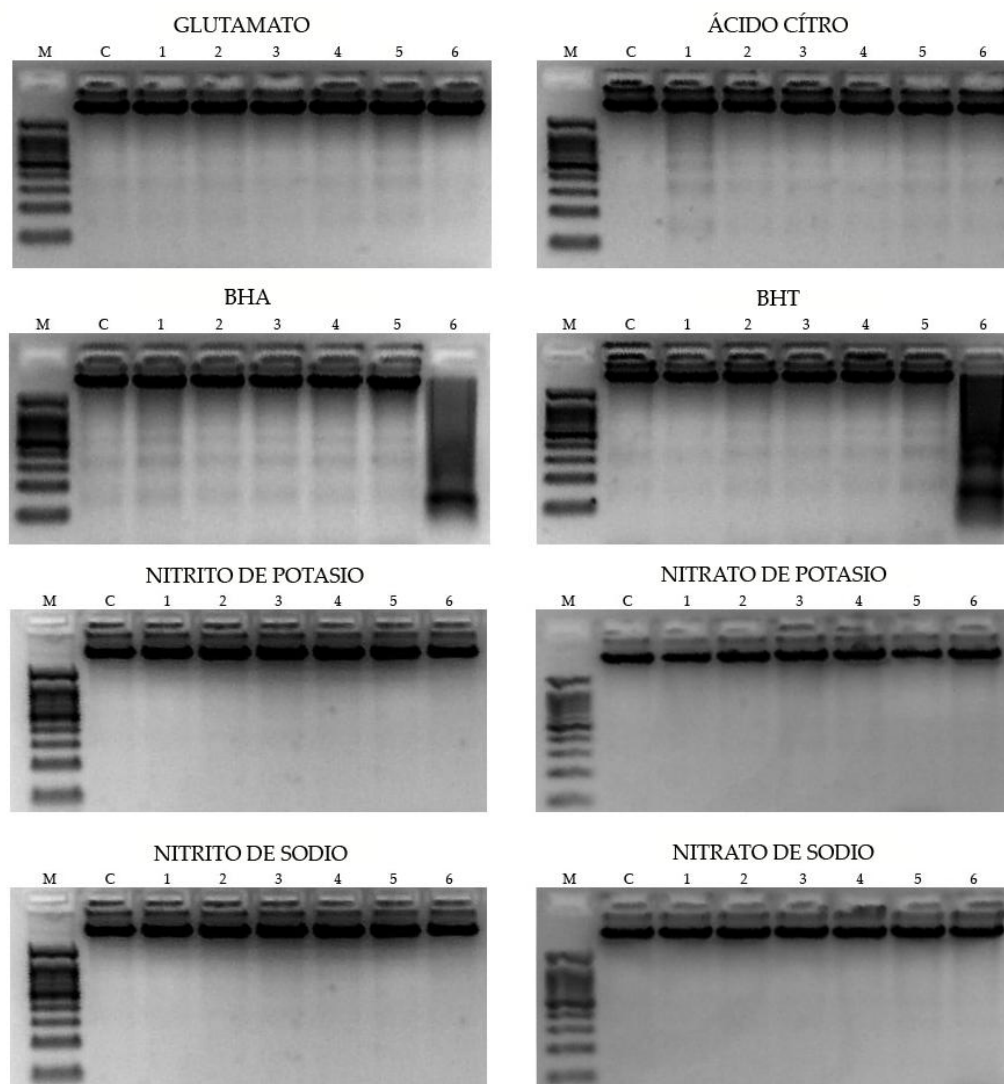
7. Fragmentación internucleosómica de ADN

En la Figura 19 se muestran los resultados de la electroforesis del ADN genómico de las células HL-60 tratadas con distintas concentraciones de aditivos alimentarios (ver Tabla 3). No se observó daño proapoptótico correspondiente a fragmentación de ADN internucleosomal de las células de leucemia humana en ninguna de las concentraciones ensayadas de los diferentes aditivos, a excepción de las dos concentraciones más altas estudiadas de Riboflavina, la concentración más alta de BHA y de BHT que mostraron una clara inducción de daño clastogénico, y en la concentración mínima ensayada de Ácido Cítrico (concentración numerada como 1) donde se observa daño inducido aunque más débil.

Figura 19. Fragmentación internucleosómica del ADN de células HL-60.



(Figura 19. Continuación)



Daño inducido en ADN de células HL-60 promielocíticas tratadas durante 5 h con diferentes concentraciones de aditivos alimentarios. M: marcador de tamaños. C: tratamiento control. Los números 1 – 6 indican las distintas diluciones ensayadas para cada aditivo (ver Tabla 3).

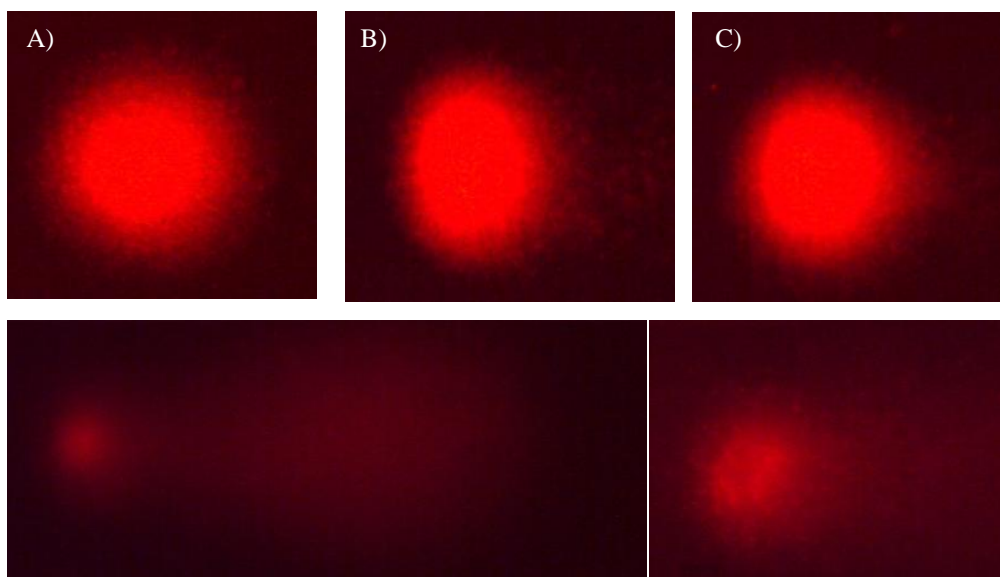
8. Ensayo del cometa

Según Fabiani, Rosignoli, De Bartolomeo, Fuccelli, and Morozzi (2012), el daño causado en el ADN se puede clasificar en las siguientes cinco clases según los valores de TM (cola del cometa) obtenidos: clase 0 ($TM < 1$; sin daño), clase 1 ($TM 1 - 5$; ligeramente dañado), clase 2 ($TM 5 - 10$; daño medio), clase 3 ($TM 10 - 20$; altamente dañado); clase 4 ($TM > 20$; completamente dañado).

En la Figura 20 se muestran imágenes representativas del ensayo del cometa para los aditivos en estudio en su concentración IDA (concentración numerada como 3 en la Tabla 3). Siguiendo el método descrito por Almeida-Lima et al. (2010) y Fabiani et al. (2012) se evaluó de forma cuantitativa el daño genético inducido por nuestros

aditivos en las células HL-60 asignando números del 0 al 4 (siendo el 0 célula sin daño y el 4 célula muy dañada) de forma visual directa a cada una de las células obtenidas. Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación estadística mediante la prueba no paramétrica Mann Whitney U-test. Todos los resultados quedaron comprendidos entre los valores de 0 y 1 y fueron estadísticamente no significativos, lo cual indica que no se indujo ningún tipo de daño genómico significativo a nivel de cadena simple ni doble del ADN de células de leucemia humana tratadas con los distintos aditivos en su concentración IDA.

Figura 20. Ensayo del cometa alcalino en células HL-60.



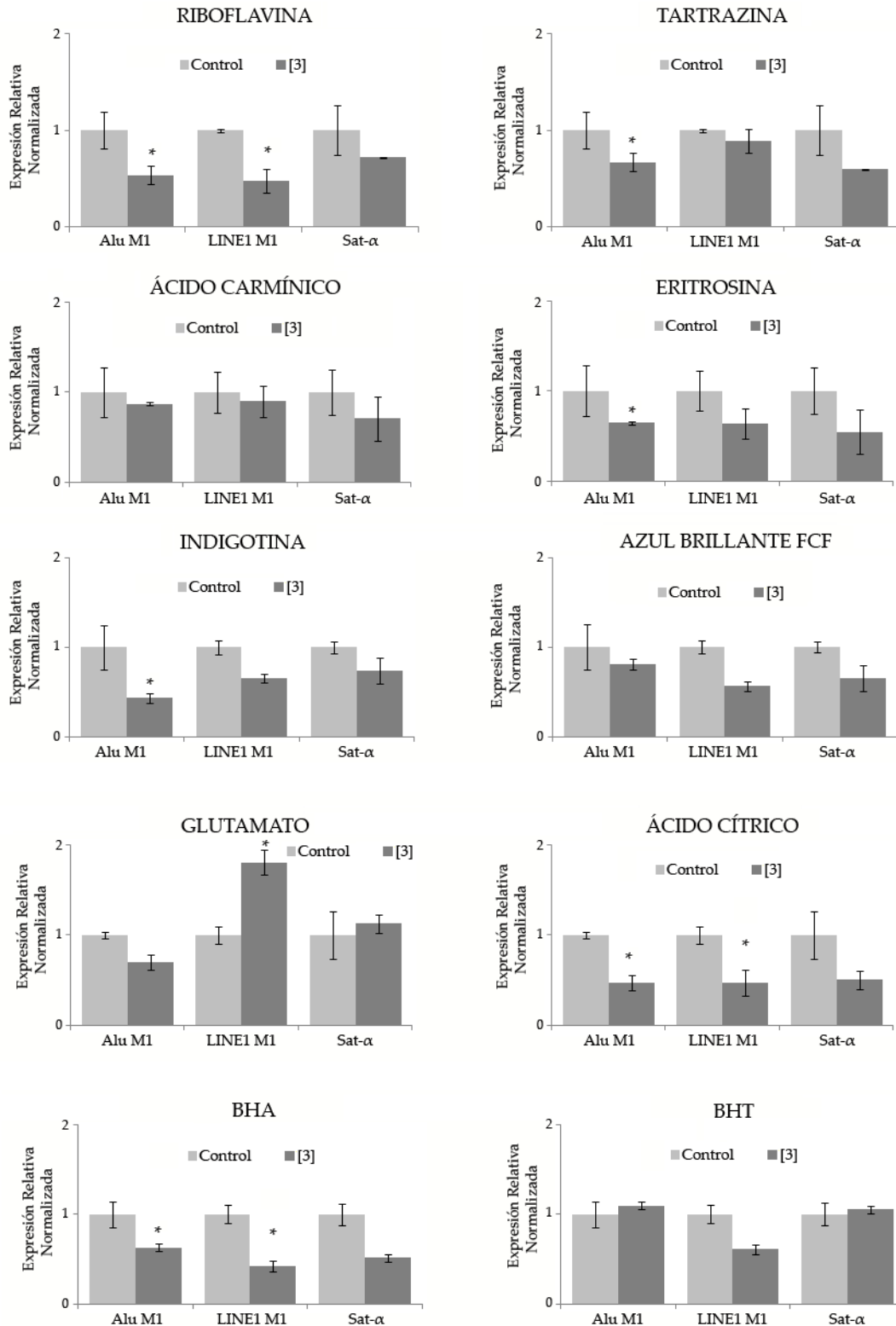
Inducción de roturas de cadena simple y/o doble de ADN en células HL-60 tratadas con la correspondiente concentración IDA para cada uno de los aditivos alimentarios en estudio durante 5 h (ver concentración 3 en Tabla 3). A) Control negativo: ADN de células HL-60 crecidas en medio RPMI sin tratamiento; B) y C) Imágenes de ADN de células tratadas con distintos aditivos; D) y E) Control positivo: ADN de células HL-60 tratadas con compuesto que induce daño genómico (Merinas-Amo, Tasset-Cuevas, et al., 2016).

El ensayo del cometa permite identificar los daños morfológicos causados a nivel del ADN por nuestros compuestos a nivel monocelular en células visualizadas individualmente (Poe & O'Neill, 1997). Según Fairbairn and O'Neill (1995), las medidas de TM en el ensayo del cometa están relacionados con los ensayos obtenidos en citotoxicidad. Nuestros resultados están de acuerdo con las correlaciones mencionadas, pues los valores de TM están asociados al porcentaje de viabilidad celular obtenido mediante el test de exclusión con el azul tripán en células HL-60: ninguno de los aditivos estudiados, a su concentración IDA, induce daño celular, y su porcentaje de viabilidad celular se encuentra entre el 177% – 70%, con respecto al control. Por tanto, los resultados de la fragmentación internucleosómica están de acuerdo con los obtenidos en el cometa, ya que los valores de $TM < 1$ indican que no ha ocurrido daño en el ADN (Fabiani et al., 2012).

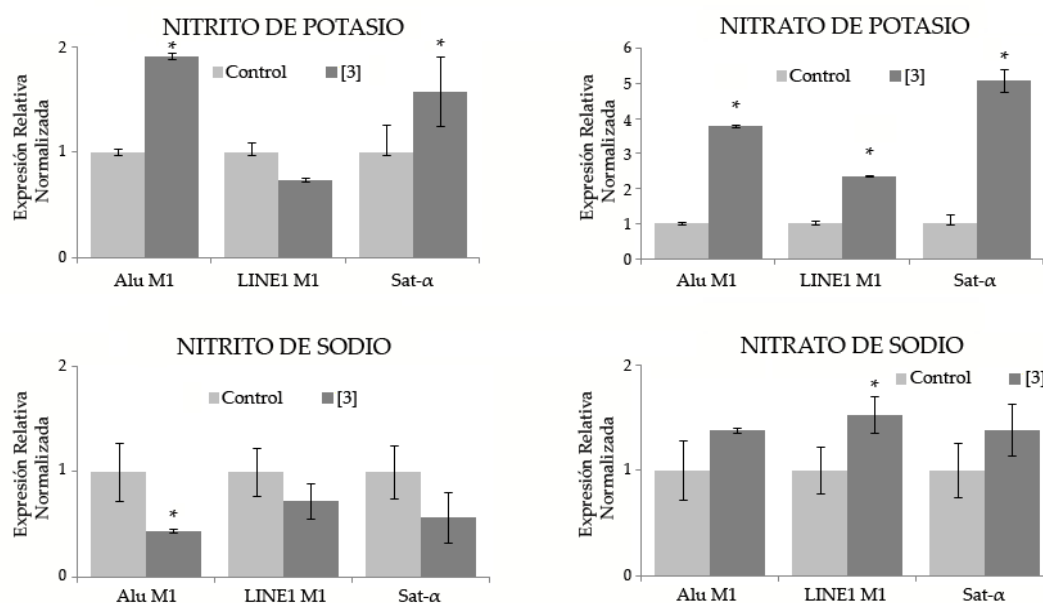
9. Estado de metilación

La expresión relativa normalizada de las tres secuencias repetitivas estudiadas (Alu M1, LINE1 M1 y Sat- α) en las células HL-60 tratadas durante 5 horas con los aditivos seleccionados en el presente trabajo se muestra en la Figura 21.

Figura 21. Estado de metilación de células HL-60 tratadas con aditivos alimentarios.



(Figura 21. Continuación)



Valores de la expresión relativa normalizada de cada elemento repetitivo (Alu M1, LINE1 M1 y Sat- α) de ADN de células HL-60 tratadas con distintos aditivos alimentarios. Los resultados representan los valores medios \pm el error estándar de tres experimentos independientes. Como control se usaron células crecidas en medio RPMI sin tratamiento. El número 3 indica la dilución ensayada para cada aditivo (ver Tabla 3).

Tras el análisis de los resultados con los test ANOVA y post-hoc Tukey, no se detectaron modificaciones estadísticamente significativas en el estado de metilación para las células tratadas con Ácido Carmínico, Azul Brillante FCF y BHT a su concentración IDA, con respecto al control. Para el resto de aditivos se observaron cambios significativos en el patrón de metilación de las células tumorales, los cuales quedan a continuación detallados:

- Riboflavina: se produjo una significativa desmetilación para las secuencias Alu M1 y LINE1 M1 cuando las células son tratadas a la correspondiente concentración IDA, con respecto al control.
- Tartrazina: se observa desmetilación en las secuencias Alu M1, con respecto al tratamiento control.
- Eritrosina: se indujo una desmetilación en las secuencias Alu M1 del ADN de células tumorales tratadas, con respecto a su control.
- Indigotina: se produjo una desmetilación en las secuencias repetitivas Alu M1, con respecto a células HL-60 sin tratamiento.
- Glutamato: el tratamiento de células de leucemia humana con este aditivo produjo un aumento significativo de la metilación de las secuencias LINE1 M1, con respecto a su control.
- Ácido Cítrico: los tratamientos indujeron un estado de desmetilación en las secuencias Alu M1 y LINE1 M1 de las células tratadas con este aditivo, con respecto a las células sin tratamiento.

- BHA: se observó una desmetilación significativa en las secuencias Alu M1 y LINE1 M1 con respecto al control.
- Nitrito de Potasio: los resultados mostraron una hipermetilación significativa para las secuencias repetitivas Alu M1 y Sat- α con respecto al control.
- Nitrato de Potasio: todas las secuencias repetitivas fueron hipermetiladas de forma significativa, con respecto al control, en las células tumorales tratadas.
- Nitrito de Sodio: se produjo una desmetilación significativa en las secuencias Alu M1 con respecto al control.
- Nitrato de Sodio: se produjo un aumento significativo de la metilación en las secuencias LINE1 M1 de células tumorales tratadas, con respecto a las células sin tratamiento.

Teniendo en cuenta que la metilación de secuencias repetitivas se considera como un mecanismo de protección genómica por el silenciamiento de genes claves en el inicio y progresión del cáncer (Link, Balaguer, & Goel, 2010; Roman-Gomez et al., 2008), el Glutamato, Nitrito de Potasio, Nitrato de Potasio y Nitrato de Sodio se pueden considerar como interesantes compuestos quimiopreventivos, ya que pueden inhibir los efectos de las células tumorales total o parcialmente, en las secuencias y concentración estudiadas.

Analizando todos nuestros resultados desde un punto de vista holístico para los distintos ensayos y aditivos (Tabla 8), a la concentración IDA, tan sólo observamos efectos beneficiosos para los ensayos de toxicidad, genotoxicidad, antigenotoxicidad y calidad de vida de *Drosophila* y efecto neutral para los ensayos de longevidad en dicho organismo modelo *in vivo*. Sin embargo para el resto de ensayos, el efecto que producen los aditivos estudiados es perjudicial tanto a nivel de individuo como celular.

Haciendo un balance de los ensayos llevados a cabo en los distintos sistemas modelo, los aditivos con un resultado satisfactorio para su consumo son el Glutamato, Nitrato de Potasio y Nitrato de Sodio. Sin embargo, debemos tener especial cuidado en el uso excesivo de Eritrosina, Ácido Carmínico, BHA y Nitrito de Sodio, seguidos por Riboflavina, BHT, Azul Brillante FCF y Ácido Cítrico por el daño perjudicial mostrado en los distintas pruebas desarrolladas de esta tesis.

Tabla 8. Resumen de los resultados obtenidos en la presente tesis desde un punto de vista holístico.

Aditivo	Ensayos <i>In vivo</i>						Ensayos <i>In vitro</i>			
	Seguridad		Potencial Nutracéutico				Potencial Quimiopreventivo			
	Toxicidad	Geno- toxicidad	Anti- toxicidad	Antigeno- toxicidad	Longevidad	Calidad de vida	Cito- toxicidad	Fragmentación de ADN	Cometa	Estado de Metilación
Riboflavina	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Tartrazina	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Ácido Carmínico	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Eritrosina	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Indigotina	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Azul Brillante FCF	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Glutamato	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Ácido Cítrico	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
BHA	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
BHT	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Nitrito de Potasio	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Nitrato de Potasio	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Nitrito de Sodio	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***
Nitrato de Sodio	*****	*	*****	*	*****	*****	*****	*****	*	***

Cada concentración ensayada está representada por un asterisco. El color de cada asterisco indica el resultado estadístico de cada concentración, de manera que: verde indica resultado positivo, rojo indica resultado negativo y naranja indica que no hay diferencias significativas entre la concentración y su respectivo control.

DISCUSIÓN

A pesar de las visibles mejoras en la legislación y producción de aditivos más seguros, muchos problemas aún siguen sin resolverse, lo que lleva a la creciente controversia y la constante demanda para mejorar los aditivos alimentarios.

A continuación analizaremos de forma detallada los resultados obtenidos en cada aditivo y discutiremos los efectos obtenidos con estudios previos similares.

- Colorantes

Los colorantes alimentarios se utilizan para alterar u otorgar colores a los alimentos, a fin de aumentar su atractivo para los consumidores. Estos aditivos se han utilizado durante mucho tiempo en la industria alimentaria, aunque en ocasiones no sin controversia y desacuerdos con respecto a sus efectos sobre la salud (Branen et al., 2001; Msagati, 2012). Hoy en día se producen químicamente y rara vez se dan reacciones adversas en las cantidades típicas usadas y admitidas para su inclusión en los alimentos. Aunque los colorantes alimentarios han sido objeto de estudios extensos con el enfoque de tecnología de los alimentos, muy pocos han considerado sus efectos peligrosos para la salud. Dos estudios *in vitro* han señalado efectos sinérgicos nocivos de ciertos colorantes en células de neuroblastoma y sobre la neurogénesis de líneas celulares neuronales (Lau et al., 2006; Park et al., 2009).

Aunque los colorantes están muy bien regulados y son seguros, es necesaria una investigación en profundidad que tenga como objetivo evaluar a diversos niveles los efectos de los colorantes, ya sea mejorando la seguridad de los ya aprobados, optimizando la dosis o descubriendo nuevos.

En general, en nuestros resultados para los ensayos de toxicidad llevados a cabo, ninguno de los colorantes alimentarios en ninguna de las concentraciones analizadas alcanzó la dosis letal 50 (DL₅₀) en *D. melanogaster*, que se considera el nivel tóxico para cualquier sustancia. Además, en cuanto a los efectos protectores de los colorantes alimentarios, no hemos encontrado datos previos sobre los efectos antioxidantes de este tipo de aditivos. Igualmente, en nuestros experimentos, y teniendo en cuenta la concentración correspondiente a la IDA equivalente para humanos (concentración numerada como 3), no se obtuvieron resultados significativos para ningún colorante alimentario probado. Este hecho está relacionado con los resultados de Scotter and Castle (2004), quienes sugirieron que, en general, la mayoría de los aditivos de color son inestables en combinación con agentes oxidantes y reductores en los alimentos. Además, dado que el color depende de la existencia de un sistema conjugado insaturado dentro de una molécula de colorante, cualquier sustancia que modifique este sistema (por ejemplo: agentes oxidantes o reductores, azúcares, ácidos y sales) afectará al color (Scotter & Castle, 2004).

1) Riboflavina

Nuestros resultados *in vivo* en *D. melanogaster* están de acuerdo con las investigaciones que muestran la ausencia de efectos tóxicos para la Riboflavina (Fukuwatari et al.,

2009), el escaso poder de inducir mutaciones genómicas (EFSA, 2013a) y la falta de efecto protector cuando el aditivo es combinado con agentes oxidantes y reductores en los alimentos (Scotter & Castle, 2004). Hasta donde sabemos, no se han publicado estudios previos que evalúen los efectos sobre la esperanza de vida y la salud de Riboflavina en el organismo modelo *Drosophila*. Nuestros resultados constatan que este colorante natural no afecta a ninguno de estos parámetros de longevidad de forma significativa.

En nuestros ensayos *in vitro*, se observó un efecto citotóxico dependiente de la dosis para la Riboflavina en células tumorales HL-60 tratadas. Solamente se han podido visualizar los efectos sobre el daño del ADN a nivel internucleosómico en las células HL-60 en las concentraciones más altas de Riboflavina, dato que está estrechamente relacionado con la inducción significativa de roturas de ADN detectada en las concentraciones más altas del ensayo del cometa. Finalmente, se encontró modificación significativa negativa del estado de metilación del ADN en comparación con el control. Hasta donde sabemos, no existen publicaciones previas sobre los efectos de la Riboflavina en el daño del ADN. Por tanto, los datos referentes a citotoxicidad pueden considerarse una nueva vía de investigación encaminada a descubrir más efectos saludables de esta vitamina.

2) Tartrazina

La Tartrazina es probablemente uno de los colorantes más controvertidos, y algunos estudios lo clasifican como un aglutinante de ADN, tóxico para los linfocitos humanos (4 mM), un contribuyente a la cirrosis biliar primaria, promotor de la peroxidación lipídica por la producción de malondialdehído y reductor de la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en ratones (500 mg/kg) (Amin, Hameid II, & Elsttar, 2010; Axon et al., 2012; Gao et al., 2011; Mpountoukas et al., 2010). Además, la Tartrazina se ha relacionado con irritabilidad, inquietud y trastornos del sueño en los niños (Rowe & Rowe, 1994). Aunque en general, muchos estudios también consideran que los colorantes son seguros, dentro de la IDA, uno de ellos ha demostrado que los niños podrían estar consumiendo una mayor cantidad de este colorante de lo que inicialmente se pensaba, mientras que los adultos también están expuestos a otros medios de entrada al cuerpo que se pasan por alto (por ejemplo, cremas de afeitarse y productos para después del afeitado) (Lucová, Hojerová, Pažoureková, & Klimová, 2013; Stevens, Burgess, Stochelski, & Kuczek, 2015).

Los ensayos *in vivo* no mostraron resultados significativos para los estudios de toxicidad, antitoxicidad, genotoxicidad y antigenotoxicidad en *D. melanogaster* para las distintas concentraciones evaluadas. En esa línea, hay estudios que consideran que la Tartrazina es segura para ser consumida en la ingesta diaria aceptable, sin presentar efectos nocivos en modelos murinos, en humanos, conejos y perros (Moutinho, Bertges, & Assis, 2007; Poul, Jarry, Elhkim, & Poul, 2009; Sasaki et al., 2002; Tanaka, 2006; Tanaka, Takahashi, Oishi, & Ogata, 2008), lo cual apoya nuestros resultados de efectos no tóxicos para *Drosophila*. Concretamente, hay estudios en células de la médula ósea

de ratones que no muestran aberraciones cromosómicas en los tratamientos con Tartrazina (Durnev, Oreshchenko, & Kulakova, 1995), lo que confirma la seguridad a nivel genómico de este aditivo. Por último, los estudios de Scotter and Castle (2004), apoyan nuestros resultados de ausencia de antitoxicidad debido a la inestabilidad que presentan este colorante cuando es combinado con agentes oxidantes. Con respecto a su efecto sobre la longevidad y calidad de vida de individuos, no tenemos conocimiento de que se hayan publicado estudios previos al respecto. Nuestros resultados indicaron que las concentraciones más altas de Tartrazina indujeron una prolongación significativa de la vida de *Drosophila* con respecto al control. Además, la calidad de vida mejoró con este aditivo.

Nuestros resultados *in vitro* en células tumorales mostraron que la Tartrazina presenta potencial citotóxico dosis-dependiente capaz de inhibir el crecimiento de células HL-60. Los estudios de carcinogenicidad disponibles han demostrado que la Tartrazina no induce neoplasia benigna ni maligna (Maekawa et al., 1987; Moutinho et al., 2007). Por el contrario, nuestros resultados para Tartrazina sobre la ausencia de daños en el ADN de células de leucemia no están de acuerdo con los resultados obtenidos por Sasaki et al. (2002) y Tsuda et al. (2001), quienes, en el ensayo del cometa, demostraron efectos clastogénicos sobre el ADN de células del estómago de ratones tratados con Tartrazina, a dosis de 10 y 2000 mg/kg*peso corporal/día sin una relación dosis-efecto. Finalmente, no se encontró ninguna modificación significativa del estado de metilación del ADN en comparación con el control, excepto en las secuencias Alu en las que se indujo una desmetilación en el genoma de células tumorales.

3) Ácido Carmínico

Este agente colorante es bastante caro en comparación con otros rojos naturales, como las antocianinas, aunque se considera importante debido a su estabilidad. Se utiliza en mermeladas, gelatinas, productos horneados, productos lácteos y bebidas no carbonatadas (MacDougall, 2002).

Según el ensayo de toxicidad, este colorante no alcanzó la DL_{50} en *D. melanogaster* en ninguna de las concentraciones analizadas, resultado que está de acuerdo con investigaciones previas que muestran la ausencia de efectos tóxicos para el Ácido Carmínico (Helal et al., 2000). Además, la ausencia de potencial antitóxico para este colorante está relacionado con los resultados de Scotter and Castle (2004), quienes sugirieron que los colorantes son, en general, inestables en combinación con agentes oxidantes y reductores en los alimentos. En los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad a nivel genómico de *Drosophila*, el Ácido Carmínico no mostró efectos significativos para la concentración IDA en el ensayo SMART. Nuestros estudios sobre los procesos degenerativos a nivel poblacional no mostraron resultados significativos en la mejora de la expansión y calidad de vida de *Drosophila*. Según nuestro conocimiento, desafortunadamente, no hay estudios previos que rebatan nuestros resultados.

Nuestros resultados *in vitro* sobre el efecto citotóxico del Ácido Carmínico sobre células tumorales mostraron un potencial quimiopreventivo sólo a altas concentraciones ensayadas, mientras que las concentraciones más bajas estimularon el crecimiento de las células HL-60, con respecto al control. Este resultado negativo coincide con un estudio combinado de toxicidad crónica/carcinogenicidad que involucró la exposición del útero de ratas Wistar con Ácido Carmínico, donde Ford et al. (1987) mostraron un patrón general de incidencia de tumores en los animales tratados que no difería estadísticamente de los controles. Hasta donde sabemos, no se han publicado resultados previos sobre los efectos del Ácido Carmínico en el ADN, por lo que la ausencia de daño a nivel de cadenas simples y/o dobles en el genoma y su estable nivel de metilación en los tratamientos con nuestro colorante en células HL-60 no pueden ser confirmados por estudios previos ya que son los primeros reportes al respecto.

4) Eritrosina

Este colorante es un compuesto poliyodado que se ha relacionado con la alteración del comportamiento infantil y la función tiroidea debido al alto contenido de yodo (Ganesan & Buchwald, 2013; Ganesan et al., 2011). Otros estudios señalan que este compuesto podría inducir toxicidad en los testículos (689 mg/kg) y alterar los patrones de comportamiento en modelos murinos. Recientemente, también se ha encontrado que altera las estructuras de ADN, muestra toxicidad en los linfocitos humanos, HepG2 (50 µg/mL), e inhibe de manera promiscua la unión proteína-proteína (Aziz, Shouman, Attia, & Saad, 1997; Mpountoukas et al., 2010; Tanaka, 2001).

Según los resultados obtenidos en nuestro ensayo de toxicidad, la Eritrosina no alcanzó la DL₅₀ en ninguna de las concentraciones estudiadas en *D. melanogaster*, dato que está en desacuerdo con los estudios previos referidos arriba. Además, no se observaron resultados significativos en el ensayo de inducción de mutaciones y recombinaciones somáticas a nivel genómico del individuo, lo cual está de acuerdo con estudios que no muestran aberraciones cromosómica en los tratamientos con Eritrosina en embrión de hámster sirio (Miyachi & Tsutsui, 2005). Sin embargo, aunque no haya estudios que avalen nuestros resultados, la Eritrosina mostró una falta de efecto protector significativo cuando se realizaron tratamientos combinados con un agente genotóxico, mostrándose un efecto sinérgico entre el peróxido de hidrógeno y el colorante. Nuestros estudios sobre los efectos degenerativos a nivel poblacional no mostraron efectos significativos positivos en la expansión de vida ni en la calidad de vida de *Drosophila*, en las concentraciones ensayadas.

Estudios sobre los tratamientos con Eritrosina en ratones (Borzelleca & Hallagan, 1987), ratas (Hiasa et al., 1988) y jerbos (Collins & Long, 1976) no mostraron efectos adversos significativos sobre el potencial carcinogénico y tumoral de este colorante alimentario, dato que en parte apoya el efecto citotóxico dosis-dependiente que la Eritrosina mostró en nuestro estudio con células HL-60. Sin embargo, nuestros resultados sobre la ausencia de daño genómico que este colorante causa sobre células de leucemia no están de acuerdo con estudios de Sasaki et al. (2002) y Tsuda et al. (2001),

quienes demostraron una relación entre la dosis y la inducción del daño del ADN por la Eritrosina en el estómago glandular, el colon y la vejiga urinaria después de la administración oral de 100 mg/kg*peso corporal/día y 2000 mg/kg*peso corporal/día y en el pulmón tras la administración de 2000 mg/kg*peso corporal/día en ratones. Con respecto a los estudios de metilación, no hay datos previos que confirmen nuestros resultados sobre la desmetilación o ausencia de modificación del epigenoma del ADN de nuestro aditivo con respecto al control.

5) Indigotina

Los resultados obtenidos sobre la ausencia de toxicidad y antitoxicidad de este colorante azul en estudios de supervivencia con *D. melanogaster* están apoyados por resultados previos (Borzelleca & Hallagan, 1987; Borzelleca & Hogan, 1985; Oettel, Frohberg, Nothdurft, & Wilhelm, 1965); aunque también se han descrito efectos adversos graves estadísticamente significativos en los testículos en un estudio de toxicidad subaguda (45 días) realizado en ratones albinos suizos machos adultos tratados con dosis orales de Índigo de 0,17 y 39 mg/kg*peso corporal/día (Dixit & Goyal, 2013). En el ensayo SMART de genotoxicidad y antigenotoxicidad en *Drosophila* no se observaron tasas de mutación significativas para tratamientos simples ni combinados de Indigotina a la concentración IDA establecida. Hasta donde sabemos, no se han publicado estudios previos que evalúen los efectos sobre la longevidad y calidad de vida de individuos vivos tratados con este colorante. Nuestros resultados no mostraron efectos significativos en la extensión de vida de *Drosophila* alimentada de forma crónica con Indigotina, aunque sí empeoró significativamente la calidad de vida en algunas de las concentraciones ensayadas.

Los resultados de los ensayos *in vitro* de Indigotina mostraron un débil potencial quimiopreventivo, ya que a pesar de que se indujo un descenso en la viabilidad celular, ninguna de las concentraciones estudiadas llegó a alcanzar la CI_{50} , con respecto al control. Estos resultados están de acuerdo con los de diferentes investigaciones que indicaron que no hay potencial carcinogénico y tumoral de este colorante alimentario: la exposición de ratones a Indigotina no demostró efectos cancerígenos o tóxicos (Borzelleca & Hogan, 1985). Además, los resultados sobre la ausencia de daño que este aditivo causa en el ADN a nivel internucleosómico de células tumorales están respaldados por otros estudios *in vitro* utilizando células de cáncer de mama MCF-7 (Masannat, Hanby, Horgan, & Hardie, 2009) y la línea celular de adenocarcinoma de colon humano (células CaCo2) (Davies et al., 2007), que demostraron una ausencia de daño del ADN de forma significativa con respecto al control.

6) Azul Brillante FCF

Los resultados obtenidos para nuestros ensayos de toxicidad y antitoxicidad en *D. melanogaster* no indicaron efectos perjudiciales, si tomamos como referencia la DL_{50} obtenida, para ninguna de las concentraciones ensayadas y además observamos una tendencia dosis-dependiente en su efecto protector frente a toxinas. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos sobre toxicidad realizados por otros científicos en

diferentes organismos (Aboel-Zahab et al., 1997; Hansen, Fitzhugh, Nelson, & Davis, 1966; Tsujita, 1979). Sin embargo, algunos autores consideran que el consumo de piruletas con colorantes Azules Brillantes por parte de los niños es peligroso debido a su absorción a través de la mucosa lingual (Lucová et al., 2013). Estos colorantes no son fácilmente absorbidos por nuestro cuerpo, de hecho, el 95% de ellos están presentes en las heces, aunque no hay informes de muertes humanas debido a su absorción inadecuada (Gaur, Sorg, & Shukla, 2003). Nuestros resultados en la prueba SMART no mostraron efectos significativos a nivel genómico de la mosca cuando fue tratada con la concentración IDA de forma simple, sin embargo, en el tratamiento combinado con un agente genotóxico, el Azul Brillante FCF mostró presentar un efecto mutagénico a nivel del genoma de *D. melanogaster*. Se han descrito estudios sobre cambios que estos colorantes causan en la respiración mitocondrial (Reyes, Valim, & Vercesi, 1996), así como mutaciones somáticas en la prueba de *Drosophila melanogaster* (25 mg/mL) (Sarikaya et al., 2012; Tanaka, Takahashi, Inomata, Ogata, & Nakae, 2012) que apoyan nuestros resultados. Aunque no existen estudios previos sobre el efecto del Azul Brillante FCF sobre la longevidad de individuos, nuestros datos indican efectos beneficiosos sobre la expansión de vida de *Drosophila* cuando el colorante es administrado de forma crónica a concentraciones próximas a la establecida como IDA.

Analizando los resultados *in vitro* obtenidos en estudios con células de leucemia humana, el Azul Brillante FCF indujo un aumento en el crecimiento de células tumorales. Estos resultados no están de acuerdo con estudios de diferentes investigaciones que indicaron que no hay potencial carcinogénico y tumoral de este colorante alimentario: las inyecciones subcutáneas de 10 dosis de Azul Brillante FCF, 4 mg cada una, seguidas de 50 dosis de 6 mg no mostraron inducción tumoral en ratones después de 78 semanas (EFSA, 2010). Por contra, con respecto al efecto que este colorante azul causa sobre el ADN de células HL-60, nuestros resultados sobre la ausencia de daño concuerdan con otros estudios previos: ratones machos ddY tratados con Azul Brillante FCF no mostraron aumentos estadísticamente significativos en el daño del ADN en el estómago, colon, hígado, riñón, vejiga, pulmón, cerebro y médula ósea glandulares (Sasaki et al., 2002).

- Potenciador del sabor

Los potenciadores del sabor se usan para aumentar, complementar o mejorar el sabor de los alimentos, pero no contribuyen con su propio sabor. Uno de los potenciadores del sabor más utilizados es el Glutamato Monosódico.

1) Glutamato Monosódico

El Glutamato es una sal del ácido glutámico, un aminoácido natural. Se utiliza en alimentos para mejorar su sabor natural y para producir el sabor umami (sabor salado agradable), ya sea solo o en sinergia con inosinato disódico o guanilato disódico. En el año 2000, una revisión de evaluaciones de seguridad anteriores por la FAO, la OMS y el Comité Científico de alimentos para el Glutamato Monosódico concluyó que, a pesar de que una parte de la población es sensible, este aditivo podría consumirse sin ninguna

preocupación (Walker & Lupien, 2000). Recientemente, se le han atribuido efectos perjudiciales en modelos murinos y humanos, pues hay estudios que confirman la inducción de la peroxidación lipídica, el deterioro de la plasticidad sináptica de las neuronas de ratones, efectos nocivos de los ovocitos murinos y el aumento del desarrollo de sobrepeso de adultos chinos que consumen dicho aditivo (Eweka, Igbigbi, & Ucheya, 2011; Sanabria et al., 2002; Singh & Ahluwalia, 2012). Sin embargo, otros científicos no han encontrado correlación entre el Glutamato Monosódico y la obesidad de la población china, y afirman que la suplementación de los alimentos de los cerdos con dicho aditivo es segura y mejora el rendimiento del crecimiento (Rezaei et al., 2013; Shi et al., 2010).

Nuestros resultados *in vivo* se relacionan con los efectos favorables obtenidos previamente por otros investigadores, pues no se observan efectos perjudiciales significativos en los distintos ensayos de toxicidad, antitoxicidad, genotoxicidad, antigenotoxicidad, longevidad y calidad de vida, exceptuando el efecto negativo que el Glutamato causa en la concentración más alta estudiada para la extensión y calidad de vida de *Drosophila*.

Los resultados *in vitro* muestran un efecto citotóxico dosis-dependiente para tratamientos de Glutamato con células tumorales HL-60 y un efecto protector genómico de dicho aditivo en secuencias repetitivas LINE1 M1. Desafortunadamente, no hay estudios previos similares con los que comparar nuestros resultados *in vitro*.

- Antioxidantes

Los antioxidantes son otro subgrupo de conservantes, esenciales para extender la vida útil de muchos productos alimenticios. Los antioxidantes evitan la oxidación de las moléculas al donar un átomo de hidrógeno o un electrón, reduciéndose, en forma radical, pero a diferencia de otros radicales, los antioxidantes cuando están en forma radical son estables y no permiten que se produzcan más reacciones, preservando así el *status quo* del sistema (Carocho & Ferreira, 2013).

Los antioxidantes alimentarios se usan para prolongar la vida útil e impedir la descomposición sin agregar sabor u olores a los alimentos ni modificar la apariencia (Nanditha & Prabhasankar, 2008). La peroxidación lipídica y la rancidificación son los tipos más comunes de oxidación que se producen en los alimentos mientras se almacenan. Junto con el Ácido Cítrico, los antioxidantes más utilizados son el Butilhidroxianisol (BHA) y el Butilhidroxitolueno (BHT).

1) Ácido Cítrico

Uno de los antioxidantes más utilizados en la alimentación es el Ácido Cítrico, cuyos resultados *in vivo* obtenidos en nuestros ensayos para *D. melanogaster* tan solo muestra efectos significativamente positivos para la ausencia de toxicidad y mejora de la calidad de vida; en el resto de ensayos no se muestra efecto protector ni antimutagénico. En los estudios *in vitro*, se observa un leve efecto citotóxico frente a células tumorales HL-60

con respecto a su control, siendo únicamente la concentración mínima ensayada la que induce daño celular apoptótico. Contradictoriamente, en el ensayo de metilación genómica, nuestras células tumorales tratadas con la concentración IDA de Ácido Cítrico sufrieron una desmetilación significativa en secuencias repetitivas repartidas aleatoriamente por el genoma con respecto al control.

Estos resultados de efectos poco deseados por este aditivo pueden verse apoyados por otros resultados similares obtenidos en investigaciones que ya han indicado el daño significativo que el uso a largo plazo de altas cantidades de este aditivo produce en tejidos corporales. Según concluyeron Chen, Lv, Liu, and Deng (2014) y Zhang, Liu, Deng, and Lv (2011) en estudios sobre el efecto dañino que el Ácido Cítrico producía en el tejido hepático de ratones, concentraciones comprendidas entre 120 – 240 mg/kg de este aditivo causan daño oxidativo en el hígado debido a la disminución de las actividades enzimáticas antioxidantes, debido a la elevación de nivel de malonildialdehído (MDA) y la inducción de fragmentación de ADN por la activación de la caspasa-3. Li, Zhou, Yu, & Chen (2000) observaron el efecto potenciador del Ácido Cítrico en la proliferación de células cancerígenas de pulmón humanas PG a distintas concentraciones (0,05, 0,01, 0,5 y 1 mmol/L). Otros estudios sugirieron que el Ácido Cítrico ejerce efectos citotóxicos sobre células gliales al inducir apoptosis (Lan et al., 1999; Navarro-Escobar, González-Rodríguez, & Ferrer-Luque, 2010). Además la falta de antigenotoxicidad frente al H₂O₂ de nuestros resultados está relacionada con un ensayo previo que muestra la falta de actividad antitóxica: Flora, Mehta, Satsangi, Kannan, and Gupta (2003) obtuvieron resultados que no mostraron ninguna reducción significativa con respecto al control, en el contenido de H₂O₂ en el hígado de ratones tratados con Ácido Cítrico. Esto posiblemente es debido a la falta de especificidad de las enzimas de degradación del H₂O₂ o a la incapacidad de Ácido Cítrico para actuar sobre la actividad de la catalasa formando complejos con iones metálicos.

2) BHA

El BHA se ha utilizado desde la década de 1970 como un antioxidante eficaz en los alimentos con numerosos estudios que describen su toxicidad en los modelos de laboratorio. Whysner and Williams (1996) describieron que la toxicidad de BHA es específica de la especie para modelos murinos y segura para el consumo humano ya que el estómago de la especie humana no es sensible a este antioxidante. Se llevaron a cabo más ensayos en murinos hasta 2011, cuando la EFSA revisó la literatura y publicó una ingesta diaria aceptable (IDA) revisada, la cual no era probable que fuera propasada por la población (Carocho et al., 2015; EFSA, 2011a; Jeong et al., 2005; Ramadan & Suzuki, 2012; Vandghanooni et al., 2013). Nuestros resultados con respecto a la toxicidad y antitoxicidad de este aditivo en el modelo *D. melanogaster* mostraron una tendencia de toxicidad dosis-dependiente, siendo la concentración IDA no significativa, y una falta de efecto protector frente a H₂O₂ en las concentraciones centrales ensayadas para dicho organismo. A nivel genómico, el BHA no indujo ningún efecto tóxico ni protector significativo con respecto al control para la concentración IDA.

En cuanto a los resultados *in vitro* en células tumorales HL-60, este aditivo es capaz de inhibir la viabilidad celular induciendo apoptosis a concentraciones muy elevadas. Por otro lado, este antioxidante muestra potencial para desmetilar significativamente en secuencias repetitivas situadas de forma aleatoria por el genoma de células de leucemia humana. Debido a la gran controversia por el consumo de BHA y los diversos resultados obtenidos en estudios científicos, hay que continuar analizando los posibles efectos que este aditivo causa al ser consumido.

3) BHT

El BHT presenta significativamente, con respecto a su control, mayor grado de toxicidad a concentraciones medias-bajas y ningún efecto protector frente a toxinas cuando nuestro organismo modelo *in vivo* es tratado. A nivel genómico y poblacional, no se observa ningún tipo de efecto de este aditivo alimentario con respecto al control.

Por otro lado, a nivel *in vitro* el BHT muestra un efecto citotóxico dosis-dependiente llegando a inducir apoptosis a concentraciones muy altas. Analizando estudios previos, observamos controversia de resultados con respecto al efecto del BHT sobre la salud: muchos estudios señalan el BHT como un aditivo carcinógeno y con efecto nocivo sobre la salud humana y murina, mientras que otros han demostrado sus efectos anticancerígenos (Botterweck, Verhagen, Goldbohm, Kleinjans, & Van den Brandt, 2000; Carochi & Ferreira, 2013; EFSA, 2012; Engin, Bukan, Kurukahvecioglu, Memis, & Engin, 2011; McFarlane et al., 1997; Williams, Iatropoulos, & Whysner, 1999).

- Conservantes

Los Nitratos y Nitritos son aditivos conservantes antimicrobianos que se añaden a los alimentos con dos propósitos: 1) para controlar el deterioro natural de los alimentos (control de alimentos) y/o 2) para evitar/controlar la contaminación por microorganismos, incluidos los patógenos (por motivos de seguridad alimentaria) (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010).

Si bien los Nitratos se usaron ampliamente en el pasado, hoy en día su uso está restringido al curado lento de la carne. Por otro lado, los Nitritos se utilizan en la carne para la formación del color, la mejora del sabor y para impedir la actividad antimicrobiana, siendo el único aditivo alimentario que puede inhibir el desarrollo de la toxina botulínica, lo que justifica su uso en una escala de evaluación beneficio/riesgo en la industria alimentaria. Además de ser utilizados como conservantes de alimentos, los Nitritos también están presentes en cantidades considerables en frutas y verduras no tratadas, debido a la absorción de estos compuestos iónicos de la naturaleza en el ciclo del nitrógeno (Speijers, 1996). También se sabe que estos compuestos participan en la formación de nitrosaminas (moléculas cancerígenas resultantes de la reacción de Nitritos con aminas secundarias) que representan una amenaza para los consumidores (Gøtterup et al., 2007; Honikel, 2008; Iammarino, Di Taranto, & Cristino, 2013; Sebranek & Bacus, 2007; Sindelar & Milkowski, 2012; Watson & Preedy, 2009).

1) Nitritos

Algunos autores consideran que los Nitritos son cancerígenos, mientras que otros refutan esta posibilidad (Boink, Vleeming, Dormans, & Speijers, 1999), incluso algunos consideran que los Nitritos vegetales son importantes para algunas funciones fisiológicas, como el apoyo a la salud cardiovascular y la función inmune gastrointestinal (Hord, Tang, & Bryan, 2009). Además, varios estudios en humanos han demostrado que la suplementación dietética con nitrato inorgánico lleva a una reducción en el consumo de oxígeno en el ejercicio máximo y a mantener o incluso aumentar el rendimiento laboral (Schiffer, Larsen, Lundberg, Weitzberg, & Lindholm, 2013). Aunque la evidencia respalda ambas teorías, se acepta ampliamente que la ingesta excesiva de Nitrito es peligrosa y tiene efectos nocivos para la salud humana, por oxidación de la oxihemoglobina a ferrihemoglobina, lo que conduce a la metahemoglobinemia (Cammack et al., 1999).

2) Nitratos

Los Nitratos se consideran sustancias con poca toxicidad para los investigadores, pero debido a que son el producto final de la nitrificación, pueden acumularse en grandes cantidades (Thurston, Russo, & Smith, 1978). Estas sustancias pueden causar efectos letales o subletales, o incluso actuar de forma sinérgica con otras formas de nitrógeno, llegando a ser extremadamente importante estudiar sus los efectos tóxicos en diferentes especies (Poersch, Santos, Miranda Filho, & Wasielesky Junior, 2007), aunque, por otra parte, Hernández et al. (2012) han mostrado que los Nitratos en la dieta mejoran el manejo del calcio.

Nuestros resultados *in vivo* e *in vitro* para los conservantes alimentarios estudiados están relacionados con otros estudios previos realizados, donde un exceso de concentración de estos aditivos puede resultar nocivo para los organismos modelo estudiados y, consecuentemente, potencialmente para los humanos.

Los ensayos *in vivo* de toxicidad y antitoxicidad mostraron una tendencia dosis-dependiente, siendo la concentración más alta de Nitrito de Sodio; y por otra parte las concentraciones más altas Nitrato de Potasio y Nitrato de Sodio, las únicas que presentaron un efecto tóxico y antitóxico significativo para *Drosophila* con respecto al control, respectivamente. A nivel genómico en individuos vivos, no se mostró ningún efecto significativo en la inducción de mutaciones, aunque tampoco protección frente a genotoxina, a excepción del Nitrito de Potasio y Nitrito de Sodio que mostraron un efecto mutagénico en los tratamientos combinados. Los ensayos de longevidad y calidad de vida en nuestro organismo modelo eucariota mostraron resultados muy heterogéneos con respecto al control, siendo el Nitrato de Potasio el aditivo que muestra una mayor mejoría dosis-dependiente significativa en la extensión de vida de las moscas, y el Nitrito de Potasio el que presenta una mayor reducción significativa en la calidad de vida de los individuos tratados.

Con respecto a los estudios *in vitro*, ambos Nitratos estudiados y el Nitrito de Sodio fueron capaces de inducir muerte de células tumorales HL-60 a las concentraciones

máximas ensayadas. Sin embargo, si tenemos en cuenta la dosis establecida como IDA, ninguno de estos aditivos estudiados presentó capacidades citotóxicas, sino por el contrario han llegado incluso a estimular el crecimiento de las células de leucemia humana en dichas concentraciones. Tampoco se produjeron daños a nivel genómico en las células HL-60; aunque en el estudio de metilación ambos Nitratos y el Nitrito de Potasio presentaron actividades metilantes positivas y significativas con respecto al control.

Analizando todos nuestros resultados desde un punto de vista cuantitativo para los distintos ensayos y aditivos (Tabla 9), a la concentración IDA, tan sólo observamos efectos beneficiosos en los ensayos de toxicidad, genotoxicidad, antigenotoxicidad y calidad de vida de *Drosophila* y efecto neutral para los ensayos de longevidad en dicho organismo modelo *in vivo*. Sin embargo para el resto de ensayos, el efecto que producen los aditivos estudiados es perjudicial tanto a nivel de individuo como celular.

Si analizamos los resultados obtenidos por aditivos, todos muestran efectos negativos para los distintos ensayos llevados a cabo. Excepciones del Glutamato, Nitrato de Potasio y Nitrato de Sodio, los cuales muestran una suma total positiva para la concentración IDA en los ensayos *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo; y Tartrazina, Indigotina y Nitrito de Potasio que no muestran efectos significativos totales.

Como conclusión, podemos decir que nuestros aditivos ensayados mostraron ser seguros para *Drosophila melanogaster* exceptuando Tartrazina y BHT. Con respecto al potencial nutracéutico, Tartrazina y Nitrato de Sodio, seguidos de Glutamato, Indigotina, Ácido Cítrico y BHT mostraron efectos beneficiosos para los ensayos *in vivo*; mientras que Eritrosina, seguido de Ácido Carmínico, BHA, Nitrito de Potasio y Nitrito de Sodio mostraron un potencial nutracéutico negativo para *Drosophila*. Finalmente, tan sólo Nitrato de Potasio mostró potencial quimiopreventivo positivo en los ensayos *in vitro* llevados a cabo.

Estos resultados, parcialmente controvertidos con respecto a los datos conocidos actuales que respaldan el consumo seguro de aditivos, pueden deberse a las distintas condiciones de ensayo: posibles respuestas diferenciales del organismo usado frente a cada sustancia y distinto nivel biológico en el que hemos controlado el efecto; tipo de línea celular usada, condiciones *in vitro* e *in vivo* o rango de concentraciones.

Debido al elevado consumo que los distintos aditivos alimentarios tienen hoy en día y la diversidad de resultados obtenidos, es necesario que se continúen llevando a cabo estudios científicos y revisiones estrictas por la EFSA que confirmen una dosis y un uso totalmente seguro para cada aditivo.

Tabla 9. Resultados obtenidos en la presente tesis desde un punto de vista cuantitativo.

Aditivo	Ensayos <i>In vivo</i>										Ensayos <i>In vitro</i>				TOTAL (2) (1)				
	Seguridad			Potencial Nutracéutico							Potencial Quimiopreventivo								
	Toxicidad (1)	Geno- toxicidad (1)		Anti- toxicidad (1)	Antigeno- toxicidad (1)	Longevidad (1)	Calidad de vida (1)				Cito- toxicidad (1)	Fragmentación de ADN (1)	Cometa (1)	Estado de Metilación (1)					
Riboflavina	5	1	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	
Tartrazina	2	0	0	0	0	1	3	1	4	1	0	0	6	1	1	1	2	0	0
Ácido Carmínico	1	1	0	0	0	0	6	1	0	0	3	1	6	1	1	0	15	3	3
Eritrosina	1	1	1	2	0	1	4	1	1	0	3	1	6	1	1	1	17	4	4
Indigotina	6	1	1	3	0	1	0	0	2	0	1	0	6	1	1	1	0	0	0
Azul Brillante FCF	2	1	1	2	0	1	3	1	0	0	5	1	6	1	1	0	5	1	1
Glutamato	2	1	1	0	0	1	1	0	5	1	1	0	6	1	1	1	3	3	3
Ácido Cítrico	2	1	1	1	0	0	0	0	2	1	0	0	5	1	1	2	4	1	1
BHA	4	1	1	3	1	1	1	0	1	1	2	0	5	1	1	2	5	3	3
BHT	2	0	0	6	1	1	1	0	0	0	1	0	5	1	1	0	7	2	2
Nitrito de Potasio	3	1	1	0	0	1	2	0	2	0	3	1	6	1	1	2	5	0	0
Nitrato de Potasio	4	1	1	1	0	0	3	0	3	0	1	0	6	1	1	3	9	3	3
Nitrito de Sodio	2	1	0	2	0	1	1	0	0	0	1	0	6	1	1	1	3	3	3
Nitrato de Sodio	4	1	1	2	1	1	1	0	2	1	1	1	6	1	1	1	4	3	3
TOTAL ⁽³⁾	40	12	10	6	1	2	2	0	10	3	10	5	76	14	14	3			

Aproximación cuantitativa de los resultados obtenidos: en verde se representan valores positivos significativos, en rojo valores negativos significativos y en naranja los valores no significativos.

⁽¹⁾ Resultados cuantitativos correspondientes a la concentración establecida como IDA para cada aditivo. ⁽²⁾ Total de puntos obtenidos de cada aditivo. ⁽³⁾ Total de puntos obtenidos en cada ensayo.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los distintos ensayos *in vivo* e *in vitro* sobre la seguridad, potencial nutracéutico y potencial quimiopreventivo de nuestros aditivos, las conclusiones más destacables para la IDA de los aditivos estudiados en la presente tesis quedan reflejadas a continuación:

- 1.- Los aditivos alimentarios tienen un carácter seguro. Ninguno de los aditivos ensayados alcanza la DL_{50} , ni tampoco induce mutaciones genéticas cuando *Drosophila melanogaster* es alimentada a distintas concentraciones.
- 2.- Cuatro de los aditivos mostraron capacidad protectora frente a un agente tóxico (Nitrato de Sodio, Tartrazina, Indigotina y Glutamato); cuatro mostraron resultados perjudiciales (Eritrosina, Azul Brillante FCF, Nitrito de Potasio y Nitrito de Sodio), el resto no mostraron efectos significativos, tanto a nivel de individuo como genómico.
- 3.- La mayoría de los aditivos mostraron un potencial nutracéutico bien significativamente positivo (Tartrazina, Azul Brillante FCF, Glutamato, Ácido Cítrico y Nitrato de Sodio) o bien neutro sobre la expansión de vida de *Drosophila*, siendo solo tres de ellos (Ácido Carmínico, Eritrosina y BHA) los que acortaron significativamente la longevidad .
- 4.- Tan solo resultó tener potencial quimiopreventivo uno de los compuestos estudiados (Nitrato de Potasio); el resto de aditivos indujo crecimiento celular y no fue capaz de ejercer daño genómico en las células de leucemia humana HL-60 tratadas.

De forma general, podemos destacar el escaso potencial nutracéutico y el casi nulo potencial quimiopreventivo que los aditivos ensayados muestran, para las concentraciones IDA extrapolables establecida, en nuestros ensayos *in vivo* e *in vitro*. Por todo lo anterior comentado, además de hacer un uso y consumo responsable de alimentos que contengan dichos compuestos, y continuar con las evaluaciones periódicas por los diferentes comités alimentarios, también se necesitan más estudios que nos permitan dilucidar las actividades biológicas y el potencial nutracéutico de los aditivos alimentarios estudiados con mayor claridad.

BIBLIOGRAFÍA

- Aboel-Zahab, H., El-Khyat, Z., Sidhom, G., Awadallah, R., Abdel-Al, W., & Mahdy, K. (1997). Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Bollettino chimico farmaceutico*, 136(10), 615-627.
- Abraham, S. K. (1994). Antigenotoxicity of coffee in the Drosophila assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis*, 9(4), 383-386.
- Almeida-Lima, J., Costa, L. S., Silva, N. B., Melo-Silveira, R. F., Silva, F. V., Cansanco Felipe, M. B. M., . . . Rocha, H. A. O. (2010). Evaluating the possible genotoxic, mutagenic and tumor cell proliferation-inhibition effects of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan. *Journal of Applied Toxicology*, 30(7), 708-715.
- Amin, K., Hameid II, H. A., & Elsttar, A. A. (2010). Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2994-2999.
- Anter, J., Romero-Jiménez, M., Fernández-Bedmar, Z., Villatoro-Pulido, M., Analla, M., Alonso-Moraga, A., & Muñoz-Serrano, A. (2011). Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *Journal of medicinal food*, 14(3), 276-283.
- Atkins, P., & Bowler, I. (2016). *Food in society: economy, culture, geography*: Routledge.
- Axon, A., May, F. E., Gaughan, L. E., Williams, F. M., Blain, P. G., & Wright, M. C. (2012). Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity. *Toxicology*, 298(1-3), 40-51.
- Aziz, A. A., Shouman, S. A., Attia, A. S., & Saad, S. (1997). A study on the reproductive toxicity of erythrosine in male mice. *Pharmacological research*, 35(5), 457-462.
- Babich, H. (1982). Butylated hydroxytoluene (BHT): a review. *Environmental Research*, 29(1), 1-29.
- Bhatia, M. S. (2000). Allergy to tartrazine in psychotropic drugs. *The Journal of clinical psychiatry*, 61(7), 473-476.
- Boink, A., Vleeming, W., Dormans, J., & Speijers, G. (1999). Effects of nitrates and nitrites in experimental animals *Managing Risks of Nitrates to Humans and the Environment* (pp. 317-326): Elsevier.
- Borzelleca, J., Depukat, K., & Hallagan, J. (1990). Lifetime toxicity/carcinogenicity studies of FD & C Blue No. 1 (brilliant blue FCF) in rats and mice. *Food and Chemical Toxicology*, 28(4), 221-234.
- Borzelleca, J., & Hallagan, J. (1987). Lifetime toxicity/carcinogenicity study of FD & C Red No. 3 (erythrosine) in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 25(10), 735-737.
- Borzelleca, J., & Hogan, G. (1985). Chronic toxicity/carcinogenicity study of FD & C Blue No. 2 in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 23(8), 719-722.
- Botterweck, A., Verhagen, H., Goldbohm, R., Kleinjans, J., & Van den Brandt, P. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and

- stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*, 38(7), 599-605.
- Branen, A. L., Davidson, P. M., Salminen, S., & Thorngate, J. (2001). *Food additives*: CRC Press.
- Cammack, R., Joannou, C., Cui, X.-Y., Martinez, C. T., Maraj, S. R., & Hughes, M. N. (1999). Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1411(2-3), 475-488.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(4), 377-399.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284-295.
- Collins, T., & Long, E. (1976). Effects of chronic oral administration of erythrosine in the mongolian gerbil. *Food and cosmetics toxicology*, 14(4), 233-248.
- Commission of the European Communities. Scientific Committee for Food. (1975). *Reports of the Scientific Committee for Food* (No. 1-10). Office for official publications of the European Communities.
- Cornforth, D. P. (1996). Role of nitric oxide in treatment of foods. *Nitric oxide: Principles and actions*, 259-287.
- Chen, X., Lv, Q., Liu, Y., & Deng, W. (2014). Study on injury effect of food additive citric acid on liver tissue in mice. *Cytotechnology*, 66(2), 275-282.
- Chequer, F. M. D., de Paula Venâncio, V., Bianchi, M. d. L. P., & Antunes, L. M. G. (2012). Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine B, a xanthene food dye, on HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3447-3451.
- Davies, J., Burke, D., Olliver, J., Hardie, L., Wild, C., & Routledge, M. (2007). Methylene blue but not indigo carmine causes DNA damage to colonocytes in vitro and in vivo at concentrations used in clinical chromoendoscopy. *Gut*, 56(1), 155-156.
- Deininger, P. L., Moran, J. V., Batzer, M. A., & Kazazian Jr, H. H. (2003). Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current opinion in genetics & development*, 13(6), 651-658.
- DiCello, M. C., Myc, A., Baker Jr, J. R., & Baldwin, J. L. (1999). *Anaphylaxis after ingestion of carmine colored foods: two case reports and a review of the literature*. Paper presented at the Allergy and asthma proceedings.
- Dixit, A., & Goyal, R. (2013). Evaluation of Reproductive toxicity caused by Indigo carmine on male swiss albino mice. *Pharmacology*, 1, 218-224.
- Durnev, A., Oreshchenko, A., & Kulakova, A. (1995). Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Voprosy meditsinskoi khimii*, 41(5), 50-53.
- EFSA. (2009). Scientific Opinion on the re-evaluation Tartrazine (E 102)'. *EFSA Journal* 2009, 7(11), 1331.

- EFSA. (2010). Panel on Food Additives Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive. *EFSA Journal*, 8(11), 1853.
- EFSA. (2011a). Panel on Food Additives Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole–BHA (E 320) as a food additive. *EFSA Journal*, 9(10), 2392.
- EFSA. (2011b). Panel on Food Additives Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of Erythrosine (E 127) as a food additive. *EFSA Journal*, 9(1), 1854.
- EFSA. (2012). Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA Journal*, 10(3), 2588.
- EFSA. (2013a). Panel on Food Additives Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of riboflavin (E 101 (i)) and riboflavin-5'-phosphate sodium (E 101 (ii)) as food additives. *EFSA Journal*, 11(10), 3357.
- EFSA. (2013b). Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings Processing Aids. Scientific Opinion on the safety evaluation of the active substances citric acid (E330) and sodium hydrogen carbonate (E500ii), used as carbon dioxide generators, together with liquid absorbers cellulose and polyacrylic acid sodium salt crosslinked, in active food contact materials. *EFSA Journal*, 11(4), 3152.
- EFSA. (2014). Panel on Food additives Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of Indigo Carmine (E 132) as a food additive. *EFSA Journal*, 12(7), 3768.
- EFSA. (2015). Panel on Food Additives Nutrient Sources added to Food. Scientific Opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive. *EFSA Journal*, 13(11), 4288.
- EFSA. (2017a). Panel on Food Additives Nutrient Sources added to Food Mortensen. Re-evaluation of glutamic acid (E 620), sodium glutamate (E 621), potassium glutamate (E 622), calcium glutamate (E 623), ammonium glutamate (E 624) and magnesium glutamate (E 625) as food additives. *EFSA Journal*, 15(7), e04910.
- EFSA. (2017b). Panel on Food Additives Nutrient Sources added to Food Mortensen. Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA Journal*, 15(6), e04786.
- EFSA. (2017c). Panel on Food Additives Nutrient Sources added to Food Mortensen. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA Journal*, 15(6), e04787.
- Ehrlich, M. (2002). DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *The Journal of nutrition*, 132(8), 2424S-2429S.
- El Hamss, R., Analla, M., Campos-Sanchez, J., Alonso-Moraga, A., Munoz-Serrano, A., & Idaomar, M. (1999). A dose dependent anti-genotoxic effect of turmeric.

- Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 446(1), 135-139.
- Elhkim, M. O., Héraud, F., Bemrah, N., Gauchard, F., Lorino, T., Lambré, C., . . . Poul, J.-M. (2007). New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine: an update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(3), 308-316.
- Elmadfa, I. (2009). 8. Health and Lifestyle Indicators in the European Union *European Nutrition and Health Report 2009* (Vol. 62, pp. 157-201): Karger Publishers.
- Engin, A. B., Bukan, N., Kurukahvecioglu, O., Memis, L., & Engin, A. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene (E321) pretreatment versus L-arginine on liver injury after sub-lethal dose of endotoxin administration. *environmental toxicology and pharmacology*, 32(3), 457-464.
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews genetics*, 8(4), 286-298.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148-1159.
- EU Commission. (2011a). Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Off J Eur Union*, 12, 1-89.
- EU Commission. (2011b). Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union L*, 295(4), 12.11.
- Eweka, A., Igbigbi, P., & Ucheya, R. (2011). Histochemical studies of the effects of monosodium glutamate on the liver of adult Wistar rats. *Annals of medical and health sciences research*, 1(1), 21-30.
- Fabiani, R., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Fuccelli, R., & Morozzi, G. (2012). Genotoxicity of alkene epoxides in human peripheral blood mononuclear cells and HL60 leukaemia cells evaluated with the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 747(1), 1-6.
- Fairbairn, D. W., & O'Neill, K. L. (1995). Necrotic DNA degradation mimics apoptotic nucleosomal fragmentation comet tail length. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 171-173.
- Ferrer, D., Marco, F. M., Andreu, C., & Sempere, J. M. (2005). Occupational asthma to carmine in a butcher. *International archives of allergy and immunology*, 138(3), 243-250.
- Fleck, R., Romero-Steiner, S., & Nahm, M. (2005). Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12(1), 19-27.
- Fleming, J., Reveillaud, I., & Niedzwiecki, A. (1992). Role of oxidative stress in Drosophila aging. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 267-279.
- Flora, S. J., Mehta, A., Satsangi, K., Kannan, G. M., & Gupta, M. (2003). Aluminum-induced oxidative stress in rat brain: response to combined administration of

- citric acid and HEDTA. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134(3), 319-328.
- Ford, G., Gopal, T., Grant, D., Gaunt, I., Evans, J., & Butler, W. (1987). Chronic toxicity/carcinogenicity study of carmine of cochineal in the rat. *Food and Chemical Toxicology*, 25(12), 897-902.
- Frei, H., & Würgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4), 297-308.
- Frei, H., & Würgler, F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 334(2), 247-258.
- Friedrich, M., & Kuchlewska, M. (2013). Assessing the effect, on animal model, of mixture of food additives, on the water balance. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 12(1), 81-90.
- Fukuwatari, T., Kuzuya, M., Satoh, S., & Shibata, K. (2009). Effects of excess vitamin b1 or vitamin b2 on growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in weaning rats. *Shokuhin eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 50(2), 70-74.
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., . . . Ruscetti, F. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia.
- Ganesan, L., & Buchwald, P. (2013). The promiscuous protein binding ability of erythrosine B studied by metachromasy (metachromasia). *Journal of Molecular Recognition*, 26(4), 181-189.
- Ganesan, L., Margolles-Clark, E., Song, Y., & Buchwald, P. (2011). The food colorant erythrosine is a promiscuous protein–protein interaction inhibitor. *Biochemical pharmacology*, 81(6), 810-818.
- Gao, Y., Li, C., Shen, J., Yin, H., An, X., & Jin, H. (2011). Effect of food azo dye tartrazine on learning and memory functions in mice and rats, and the possible mechanisms involved. *Journal of food science*, 76(6), T125-T129.
- García-Bellido, A., & Merriam, J. R. (1971). Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental biology*, 24(1), 61-87.
- Gaur, S., Sorg, T., & Shukla, V. (2003). Systemic absorption of FD&C blue dye associated with patient mortality. *Postgraduate medical journal*, 79(936), 602-603.
- Gonzalez, C. (2013). *Drosophila melanogaster*: a model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 13(3), 172-183.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knöchel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., & Møller, J. K. (2007). Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International journal of food microbiology*, 120(3), 303-310.

- Graf, U., Abraham, S. K., Guzmán-Rincón, J., & Würgler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2), 203-209.
- Graf, U., Heo, O.-S., & Ramirez, O. O. (1992). The genotoxicity of chromium (VI) oxide in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* is over 90% due to mitotic recombination. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 266(2), 197-203.
- Graf, U., Würgler, F., Katz, A., Frei, H., Juon, H., Hall, C., & Kale, P. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental mutagenesis*, 6(2), 153-188.
- Gürsoy, S. (2002). *Besinlerde katkı maddelerinin kullanımı ve sitrik asit toksisitesi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*. MSc Thesis.
- Hagiwara, M., Watanabe, E., Barrett, J. C., & Tsutsui, T. (2006). Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603(2), 111-120.
- Hansen, W., Fitzhugh, O., Nelson, A., & Davis, K. (1966). Chronic toxicity of two food colors, brilliant blue FCF and indigotine. *Toxicology and applied pharmacology*, 8(1), 29-36.
- Harris, P., & Ralph, P. (1985). Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *Journal of leukocyte biology*, 37(4), 407-422.
- Helal, E. G., Zaahkouk, S. A., & Mekkawy, H. A. (2000). Effect of Some Food Colorants (Synthetic and Natural products) of Young Albino Rats. *The Egyptian journal of Hospital medicine*, 1(1), 103-113.
- Hernández, A., Schiffer, T. A., Ivarsson, N., Cheng, A. J., Bruton, J. D., Lundberg, J. O., . . . Westerblad, H. (2012). Dietary nitrate increases tetanic [Ca²⁺] and contractile force in mouse fast-twitch muscle. *The Journal of physiology*, 590(15), 3575-3583.
- Hiasa, Y., Ohshima, M., Kitahori, Y., Konishi, N., Shimoyama, T., Sakaguchi, Y., . . . Kato, Y. (1988). The promoting effects of food dyes, erythrosine (Red 3) and rose bengal B (Red 105), on thyroid tumors in partially thyroidectomized N-bis (2-hydroxypropyl)-nitrosamine-treated rats. *Japanese journal of cancer research*, 79(3), 314-319.
- Honikel, K.-O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat science*, 78(1-2), 68-76.
- Hord, N. G., Tang, Y., & Bryan, N. S. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American journal of clinical nutrition*, 90(1), 1-10.
- Husseini, G. A., El-Fayoumi, R. I., O'Neill, K. L., Rapoport, N. Y., & Pitt, W. G. (2000). DNA damage induced by micellar-delivered doxorubicin and ultrasound: comet assay study. *Cancer letters*, 154(2), 211-216.

- Iammarino, M., Di Taranto, A., & Cristino, M. (2013). Endogenous levels of nitrites and nitrates in wide consumption foodstuffs: Results of five years of official controls and monitoring. *Food chemistry*, 140(4), 763-771.
- Ibáñez, F., Torre, P., & Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. *Área de Nutrición y Bromatología, Universidad Pública de Navarra*, 3-5.
- Inomata, N., Osuna, H., Fujita, H., Ogawa, T., & Ikezawa, Z. (2006). Multiple chemical sensitivities following intolerance to azo dye in sweets in a 5-year-old girl. *Allergology International*, 55(2), 203-205.
- Issa, J.-P. J., & Kantarjian, H. M. (2009). Targeting DNA methylation. *Clinical Cancer Research*, 15(12), 3938-3946.
- Jacociunas, L. V., Dihl, R. R., Lehmann, M., Reguly, M. L., & de Andrade, H. H. R. (2010). Recombinagenic activity of water and sediment from Sinos River and Araçá and Garças Streams (Canoas, Brazil), in the *Drosophila* wing spot test. *Science of the total environment*, 408(3), 571-577.
- JECFA. (1996). *Toxicological evaluation of certain food additives*. Paper presented at the The forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives and contaminants.
- Jeong, S.-H., Kim, B.-Y., Kang, H.-G., Ku, H.-O., & Cho, J.-H. (2005). Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. *Toxicology*, 208(1), 49-62.
- Joint, F.A.O., & WHO Expert Committee on Food Additives. (2010). *Evaluation of Certain Food Additives: Seventy-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (Vol. 71): World Health Organization.
- Juhlin, L., Michaëlsson, G., & Zetterström, O. (1972). Urticaria and asthma induced by food-and-drug additives in patients with aspirin hypersensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 50(2), 92-98.
- Kastenbaum, M. A., & Bowman, K. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, 9, 527-549.
- Kilbey, B., MacDonald, D., Auerbach, C., Sobels, F., & Vogel, E. (1981). The use of *Drosophila melanogaster* in tests for environmental mutagens. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 85(3), 141-146.
- Komisvonu, A. (1994). European Parliament and Council Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. *Off. JL*, 237, 0013-0029.
- Kumaravel, T., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2009). Comet assay measurements: a perspective. *Cell biology and toxicology*, 25(1), 53-64.
- Lan, W., Lan, W., Chan, C., Hsieh, C., Chang, M., & Jeng, J. (1999). The effects of extracellular citric acid acidosis on the viability, cellular adhesion capacity and protein synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *Australian dental journal*, 44(2), 123-130.
- Lau, K., McLean, W. G., Williams, D. P., & Howard, C. V. (2006). Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. *Toxicological sciences*, 90(1), 178-187.
- Lee, C., Wevrick, R., Fisher, R., Ferguson-Smith, M., & Lin, C. (1997). Human centromeric dnas. *Human genetics*, 100(3-4), 291-304.

- Li, S., Chen, K., Li, X., Zhang, X., & Liu, S. V. (2010). A new cultivation system for studying chemical effects on the lifespan of the fruit fly. *Experimental gerontology*, 45(2), 158-162.
- Li, X., Zhou, A., Yu, W., & Chen, X. (2000). Effect of lanthanum citrate on two cell lines: human lung cancer cells PG and human gastric carcinoma cells BGC2823. *J. Chin. Rare Earths Soc*, 18, 156-159.
- Liloglou, T., Bediaga, N. G., Brown, B. R., Field, J. K., & Davies, M. P. (2014). Epigenetic biomarkers in lung cancer. *Cancer letters*, 342(2), 200-212.
- Lindsley, D. L., & Zimm, G. G. (2012). *The genome of Drosophila melanogaster*: Academic Press.
- Link, A., Balaguer, F., & Goel, A. (2010). Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: promising role for epigenetics. *Biochemical pharmacology*, 80(12), 1771-1792.
- Lints, F. A., & Soliman, M. H. (1988). *Drosophila as a model organism for ageing studies*: Springer.
- Lucarelli, M. R., Shirk, M. B., Julian, M. W., & Crouser, E. D. (2004). Toxicity of food drug and cosmetic blue no. 1 dye in critically ill patients. *Chest*, 125(2), 793-795.
- Lucová, M., Hojerová, J., Pažoureková, S., & Klimová, Z. (2013). Absorption of triphenylmethane dyes Brilliant Blue and Patent Blue through intact skin, shaven skin and lingual mucosa from daily life products. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 19-27.
- Lugo, E. B. (2008). Nitritos y Nitratos: Su uso, control y alternativas en embutidos cárnicos. *Nacameh*, 2(2), 160-187.
- MacDougall, D. (2002). *Colour in food: improving quality*: Woodhead Publishing.
- Maekawa, A., Matsuoka, C., Onodera, H., Tanigawa, H., Furuta, K., Kanno, J., . . . Ogiu, T. (1987). Lack of carcinogenicity of tartrazine (FD & C Yellow No. 5) in the F344 rat. *Food and Chemical Toxicology*, 25(12), 891-896.
- Manual de Procedimiento del Codex Alimentarius (1989). Comisión del Codex Alimentarius: FAO-OMS.
- Masannat, Y. A., Hanby, A., Horgan, K., & Hardie, L. J. (2009). DNA damaging effects of the dyes used in sentinel node biopsy: possible implications for clinical practice. *Journal of Surgical Research*, 154(2), 234-238.
- Masuda, K., Katoh, N., Mizutani, H., & Kishimoto, S. (2009). Anaphylaxis to vitamin B2 added to an energy drink. *Clinical and Experimental Dermatology: Viewpoints in dermatology*, 34(7), e263-e264.
- Mateo-Fernández, M. (2019). In vivo and in vivo biological activity of cola beverages and different additives.
- Mateo-Fernández, M., Merinas-Amo, T., Moreno-Millán, M., Alonso-Moraga, Á., & Demyda-Peyrás, S. (2016). In vivo and in vitro genotoxic and epigenetic effects of two types of cola beverages and caffeine: A multiassay approach. *BioMed research international*, 2016.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., . . . Prince, E. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and

- 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The lancet*, 370(9598), 1560-1567.
- McFarlane, M., Price, S., Cottrell, S., Grasso, P., Bremmer, J., Bomhard, E., & Hinton, R. (1997). Hepatic and associated response of rats to pregnancy, lactation and simultaneous treatment with butylated hydroxytoluene. *Food and Chemical Toxicology*, 35(8), 753-767.
- Mekkawy, H., Massoud, A., & El-Zawahry, A. (2000). Mutagenic effects of the food color erythrosine in rats. *Probl. Forensic Sci*, 43, 184-191.
- Merinas-Amo, T., Merinas-Amo, R., & Alonso-Moraga, A. (2017). A clinical pilot assay of beer consumption: Modulation in the methylation status patterns of repetitive sequences. *Sylwan*, 161, 134-156.
- Merinas-Amo, T., Merinas-Amo, R., Valenzuela-Gómez, F., Haro Bailón, A. d., Lozano, M. D., Mateo-Fernández, M., . . . Alonso Moraga, Á. (2016). Toxicological in vivo and in vitro evaluation of three diet abundant phenols: Tyrosol, ferulic and vanillic acids.
- Merinas-Amo, T., Tasset-Cuevas, I., Díaz-Carretero, A. M., Alonso-Moraga, A., & Calahorro, F. (2017). Role of choline in the modulation of degenerative processes: In vivo and in vitro studies. *Journal of medicinal food*, 20(3), 223-234.
- Merinas-Amo, T., Tasset-Cuevas, I., Díaz-Carretero, A. M., Alonso-Moraga, Á., & Calahorro, F. (2016). In vivo and in vitro studies of the role of lyophilised blond lager beer and some bioactive components in the modulation of degenerative processes. *Journal of Functional Foods*, 27, 274-294.
- Miyachi, T., & Tsutsui, T. (2005). Ability of 13 chemical agents used in dental practice to induce sister-chromatid exchanges in Syrian hamster embryo cells. *Odontology*, 93(1), 24-29.
- Moraga, A. A., & Graf, U. (1989). Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis*, 4(2), 105-110.
- Moutinho, I., Bertges, L., & Assis, R. (2007). Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow n° 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Brazilian journal of biology*, 67(1), 141-145.
- Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulou, P., Kareli, D., Poliliou, S., . . . Lialiaris, T. (2010). Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2934-2944.
- Msagati, T. A. (2012). *The chemistry of food additives and preservatives*: John Wiley & Sons.
- Mulero-Navarro, S., & Esteller, M. (2008). Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. *Epigenetics*, 3(4), 210-215.
- Nanditha, B., & Prabhasankar, P. (2008). Antioxidants in bakery products: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49(1), 1-27.

- Navarro-Escobar, E., González-Rodríguez, M.-P., & Ferrer-Luque, C.-M. (2010). Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, *15*(1), e90-94.
- Nettis, E., Colanardi, M., Ferrannini, A., & Tursi, A. (2003). Suspected tartrazine-induced acute urticaria/angioedema is only rarely reproducible by oral rechallenge. *Clinical & Experimental Allergy*, *33*(12), 1725-1729.
- Nikolaidis, G., Raji, O. Y., Markopoulou, S., Gosney, J. R., Bryan, J., Warburton, C., . . . Liloglou, T. (2012). DNA methylation biomarkers offer improved diagnostic efficiency in lung cancer. *Cancer research*, *72*(22), 5692-5701.
- Novembre, E., Dini, L., Bernardini, R., Resti, M., & Vierucci, A. (1992). Unusual reactions to food additives. *La Pediatria medica e chirurgica: Medical and surgical pediatrics*, *14*(1), 39-42.
- Oettel, H., Frohberg, H., Nothdurft, H., & Wilhelm, G. (1965). Testing of some synthetic dyes for their suitability as food coloring agents. *Archiv fur Toxikologie*, *21*(1), 9.
- Park, M., Park, H. R., Kim, S. J., Kim, M.-S., Kong, K. H., Kim, H. S., . . . Lee, B. M. (2009). Risk assessment for the combinational effects of food color additives: neural progenitor cells and hippocampal neurogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *72*(21-22), 1412-1423.
- Poe, B. S., & O'Neill, K. L. (1997). Caffeine modulates heat shock induced apoptosis in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Cancer letters*, *121*(1), 1-6.
- Poersch, L. H. d. S., Santos, M. H. S., Miranda Filho, K. C., & Wasielesky Junior, W. (2007). Efeito agudo do nitrato sobre alevinos da tainha *Mugil platanus* (Pisces: Mugilidae).
- Postlethwait, J. (1978). Clonal analysis of *Drosophila* cuticular pattern. *The genetics and biology of Drosophila*(2), 359-441.
- Poul, M., Jarry, G., Elhkim, M. O., & Poul, J.-M. (2009). Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *47*(2), 443-448.
- Prosperini, A., Juan-García, A., Font, G., & Ruiz, M. (2013). Beauvericin-induced cytotoxicity via ROS production and mitochondrial damage in Caco-2 cells. *Toxicology letters*, *222*(2), 204-211.
- Ramadan, A., & Suzuki, T. (2012). Detection of Genotoxicity of Phenolic Antioxidants, Butylated hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone in Multiple Mouse Organs by the Alkaline Comet Assay. *Life Science Journal*, *9*(1).
- Ren, N., Charlton, J., & Adler, P. N. (2007). The flare gene, which encodes the AIP1 protein of *Drosophila*, functions to regulate F-actin disassembly in pupal epidermal cells. *Genetics*, *176*(4), 2223-2234.
- Reyes, F., Valim, M., & Vercesi, A. (1996). Effect of organic synthetic food colours on mitochondrial respiration. *Food Additives & Contaminants*, *13*(1), 5-11.
- Rezaei, R., Knabe, D. A., Tekwe, C. D., Dahanayaka, S., Ficken, M. D., Fielder, S. E., . . . Wu, G. (2013). Dietary supplementation with monosodium glutamate is safe and improves growth performance in postweaning pigs. *Amino acids*, *44*(3), 911-923.

- Richardson, H. E., Willoughby, L., & Humbert, P. O. (2001). Screening for Anti-cancer Drugs in *Drosophila*. *eLS*, 1-14.
- Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Agirre, X., Castillejo, J. A., Navarro, G., San Jose-Eneriz, E., . . . Prosper, F. (2008). Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of chronic myeloid leukemia. *Leukemia research*, 32(3), 487-490.
- Romero-Jiménez, M., Campos-Sánchez, J., Analla, M., Muñoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, Á. (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 585(1-2), 147-155.
- Rowe, K. S., & Rowe, K. J. (1994). Synthetic food coloring and behavior: a dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study. *The journal of pediatrics*, 125(5), 691-698.
- Rudrapatna, V. A., Cagan, R. L., & Das, T. K. (2012). *Drosophila* cancer models. *Developmental Dynamics*, 241(1), 107-118.
- Saltmarsh, M., & Saltmarsh, M. (2013). *Essential guide to food additives*: Royal Society of Chemistry.
- Sanabria, E., Pereira, M., Dolnikoff, M., Andrade, I., Ferreira, A., Cavalheiro, E., & Fernandes, M. (2002). Deficit in hippocampal long-term potentiation in monosodium glutamate-treated rats. *Brain research bulletin*, 59(1), 47-51.
- Sarıkaya, R., Selvi, M., & Erkoç, F. (2012). Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere*, 88(8), 974-979.
- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., . . . Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1-2), 103-119.
- Scotter, M., & Castle, L. (2004). Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food additives and contaminants*, 21(2), 93-124.
- Schiffer, T. A., Larsen, F. J., Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Lindholm, P. (2013). Effects of dietary inorganic nitrate on static and dynamic breath-holding in humans. *Respiratory physiology & neurobiology*, 185(2), 339-348.
- Sebranek, J. G., & Bacus, J. N. (2007). Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat science*, 77(1), 136-147.
- Shi, Z., Luscombe-Marsh, N. D., Wittert, G. A., Yuan, B., Dai, Y., Pan, X., & Taylor, A. W. (2010). Monosodium glutamate is not associated with obesity or a greater prevalence of weight gain over 5 years: findings from the Jiangsu Nutrition Study of Chinese adults. *British journal of nutrition*, 104(3), 457-463.
- Sigler, W. A., & Bauder, J. (2012). Nitrate y nitrito. *Universidad Estatal de Montana Programa de Extensión en Calidad del Agua Departamento de Recursos de la Tierra y Ciencias Ambientales*.
- Sindelar, J. J., & Milkowski, A. L. (2012). Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric oxide*, 26(4), 259-266.

- Singh, K., & Ahluwalia, P. (2012). Effect of monosodium glutamate on lipid peroxidation and certain antioxidant enzymes in cardiac tissue of alcoholic adult male mice. *Journal of cardiovascular disease research*, 3(1), 12-18.
- Soh, J. W., Hotic, S., & Arking, R. (2007). Dietary restriction in *Drosophila* is dependent on mitochondrial efficiency and constrained by pre-existing extended longevity. *Mechanisms of ageing and development*, 128(11-12), 581-593.
- Speijers, G. (1996). Nitrite. *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food*, 269-324.
- Steingruber, E. (2000). Indigo and indigo colorants. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Stevens, L. J., Burgess, J. R., Stochelski, M. A., & Kuczek, T. (2015). Amounts of artificial food dyes and added sugars in foods and sweets commonly consumed by children. *Clinical Pediatrics*, 54(4), 309-321.
- Suzuki, M. M., & Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature reviews genetics*, 9(6), 465-476.
- Swaroop, V., Roy, D. D., & Vijayakumar, T. (2011). Genotoxicity of synthetic food colorants. *Journal of Food Science and Engineering*, 1(2), 128.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21(9), 1199-1218.
- Tanaka, T. (2001). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of erythrosine administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 39(5), 447-454.
- Tanaka, T. (2006). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology*, 44(2), 179-187.
- Tanaka, T., Takahashi, O., Inomata, A., Ogata, A., & Nakae, D. (2012). Reproductive and neurobehavioral effects of brilliant blue FCF in mice. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 95(6), 395-409.
- Tanaka, T., Takahashi, O., Oishi, S., & Ogata, A. (2008). Effects of tartrazine on exploratory behavior in a three-generation toxicity study in mice. *Reproductive toxicology*, 26(2), 156-163.
- Tasset-Cuevas, I., Fernández-Bedmar, Z., Lozano-Baena, M. D., Campos-Sánchez, J., de Haro-Bailón, A., Muñoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, Á. (2013). Protective effect of borage seed oil and gamma linolenic acid on DNA: in vivo and in vitro studies. *PloS one*, 8(2).
- Thurston, R. V., Russo, R. C., & Smith, C. E. (1978). Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat trout fry. *Transactions of the American Fisheries Society*, 107(2), 361-368.
- Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., & Sasaki, Y. F. (2001). DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological sciences*, 61(1), 92-99.
- Tsujita, J. (1979). Comparison of protective activity of dietary fiber against the toxicities of various food colors in rats.

- Tuormaa, T. E. (1994). The adverse effects of food additives on health: a review of the literature with a special emphasis on childhood hyperactivity. *Journal of Orthomolecular Medicine*, 9, 225-225.
- Vandghanooni, S., Forouharmehr, A., Eskandani, M., Barzegari, A., Kafil, V., Kashanian, S., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2013). Cytotoxicity and DNA fragmentation properties of butylated hydroxyanisole. *DNA and cell biology*, 32(3), 98-103.
- Vedanthan, P. K., Menon, M. M., Bell, T. D., & Bergin, D. (1977). Aspirin and tartrazine oral challenge: incidence of adverse response in chronic childhood asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 60(1), 8-13.
- Villatoro-Pulido, M., Font, R., De Haro-Bravo, M. I., Romero-Jiménez, M., Anter, J., De Haro Bailon, A., . . . Del Río-Celestino, M. (2008). Modulation of genotoxicity and cytotoxicity by radish grown in metal-contaminated soils. *Mutagenesis*, 24(1), 51-57.
- Walker, R., & Lupien, J. R. (2000). The safety evaluation of monosodium glutamate. *The Journal of nutrition*, 130(4), 1049S-1052S.
- Watson, R. R., & Preedy, V. R. (2009). *Bioactive foods in promoting health: fruits and vegetables*: Academic Press.
- Weiner, A. M. (2002). SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Current opinion in cell biology*, 14(3), 343-350.
- Weisenberger, D. J., Campan, M., Long, T. I., Kim, M., Woods, C., Fiala, E., . . . Laird, P. W. (2005). Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic acids research*, 33(21), 6823-6836.
- Whysner, J., & Williams, G. M. (1996). Butylated hydroxyanisole mechanistic data and risk assessment: conditional species-specific cytotoxicity, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacology & therapeutics*, 71(1-2), 137-151.
- Wiirgler, F., & Vogel, E. (1986). In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila*. In de Serres. FJ. *Chemical Mutagens*, 10, 1-72.
- Willett, W. C. (1994). Diet and health: what should we eat? *Science*, 264(5158), 532-537.
- William, W. J., Carvalho, G. B., Mak, E. M., Noelle, N., Fang, A. Y., Liang, J. C., . . . Benzer, S. (2007). Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), 8253-8256.
- Williams, G., Iatropoulos, M., & Whysner, J. (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food and Chemical Toxicology*, 37(9-10), 1027-1038.
- Worm, M., Vieth, W., Ehlers, I., Sterry, W., & Zuberbier, T. (2001). Increased leukotriene production by food additives in patients with atopic dermatitis and proven food intolerance. *Clinical & Experimental Allergy*, 31(2), 265-273.
- Wüthrich, B., Kägi, M., & Stücker, W. (1997). Anaphylactic reactions to ingested carmine (E120). *Allergy*, 52(11), 1133-1137.
- Wyllie, A., Kerr, J. R., & Currie, A. (1980). Cell death: the significance of apoptosis *International review of cytology* (Vol. 68, pp. 251-306): Elsevier.

- Yan, J., Huen, D., Morely, T., Johnson, G., Gubb, D., Roote, J., & Adler, P. N. (2008). The multiple-wing-hairs gene encodes a novel GBD–FH3 domain-containing protein that functions both prior to and after wing hair initiation. *Genetics*, *180*(1), 219-228.
- Zhang, Z., Liu, Y., Deng, W., & Lv, Q. (2011). Effect of citric acid on oxidative stress of liver in mice. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, *20*, 16-19.
- Zordan, M., Costa, R., & Levis, A. (1991). Perspectives in the use of *Drosophila melanogaster* in genotoxicity testing. *Progress in clinical and biological research*, *372*, 423.

ANEXO

Article

Biological Effects of Food Coloring in In Vivo and In Vitro Model Systems

Rocío Merinas-Amo, María Martínez-Jurado, Silvia Jurado-Güeto, Ángeles Alonso-Moraga and Tania Merinas-Amo * 

Department of Genetics, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; rocio.merinas@gmail.com (R.M.-A.); martinezjurado.maria@gmail.com (M.M.-J.); silviajuradogueto@gmail.com (S.J.-G.); ge1almoa@uco.es (Á.A.-M.)

* Correspondence: tania.meram@gmail.com

Received: 18 April 2019; Accepted: 22 May 2019; Published: 24 May 2019



Abstract: (1) Background: The suitability of certain food colorings is nowadays in discussion because of the effects of these compounds on human health. For this reason, in the present work, the biological effects of six worldwide used food colorings (Riboflavin, Tartrazine, Carminic Acid, Erythrosine, Indigotine, and Brilliant Blue FCF) were analyzed using two model systems. (2) Methods: In vivo toxicity, antitoxicity, and longevity assays using the model organism *Drosophila melanogaster* and in vitro cytotoxicity, DNA fragmentation, and methylation status assays using HL-60 tumor human cell line were carried out. (3) Results: Our in vivo results showed safe effects in *Drosophila* for all the food coloring treatments, non-significant protective potential against an oxidative toxin, and different effects on the lifespan of flies. The in vitro results in HL-60 cells, showed that the tested food colorings increased tumor cell growth but did not induce any DNA damage or modifications in the DNA methylation status at their acceptable daily intake (ADI) concentrations. (4) Conclusions: From the in vivo and in vitro studies, these results would support the idea that a high chronic intake of food colorings throughout the entire life is not advisable.

Keywords: additives; food coloring; *Drosophila melanogaster*; leukemia cells; toxicity; antitoxicity; longevity; cytotoxicity; DNA damage; methylation status

1. Introduction

A food coloring is a dye, pigment, or substance that, when added to food, drugs, or cosmetics, is able to provide color. The Food and Drugs Administration (FDA) is responsible for regulating dyes to assure their safety. Dyes are classified on the basis of their necessity of certification. According to the FDA, dyes are used to confer color to food that has lost it and to improve the color or provide it to uncolored food to make it attractive [1].

A food additive is defined as “any substance not normally consumed as food by itself and not normally used as a typical ingredient of food, whether or not it has nutritive value, the intentional addition of which to food for a technological (including organoleptic) purpose in the manufacture, processing, preparation, treatment, packing, packaging, transport, or holding of such food results, or may be reasonably expected to result (directly or indirectly), in it or its by-products becoming a component or otherwise affecting the characteristics of such food” [2].

Additives are found in many types of food that we often consume not knowing that they are present, so it is very important to study the biological consequences of using food coloring. Moreover, because of the well-known relationship between diet and health and the increasing awareness of people about their quality of life, a great deal of studies have been performed to determine which dyes may be harmful for health, promoting, for instance, childhood hyperactivity, urticaria, asthma [3], and rhinitis [4]. Information about the most consumed food coloring is reported below:

- Riboflavin (E-101) is part of the vitamin B group. It is a yellow-orange solid substance with poor solubility in water. This food coloring is present in a wide range of foods, with liver, milk, meat, and fish being the most important sources [5]. Riboflavin can be obtained by controlled fermentation using a genetically modified strain of *Bacillus subtilis* or the fungus *Ashbya gossypii* [6]. Riboflavin was evaluated by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) in 1969, which established an acceptable daily intake (ADI) of 0.5 mg/kg·body weight (bw)/day on the basis of limited data [5]. No adverse toxic, genotoxic, cytotoxic, or allergic effects have been related to Riboflavin in different organisms [7,8].
- Tartrazine (E-102) is a synthetic lemon-yellow azo dye primarily used as a food coloring. Its presence is allowed in various foodstuffs and beverages [9]. Both the JECFA and the EU Scientific Committee for Food (SCF) established an ADI of 7.5 mg/kg·bw/day in 1996 [10]. Controversial studies about the effects of Tartrazine on health have been reported. The most adverse effects have been related to DNA damage [11], hyperactivity [12], changes in the central nervous system [13], and allergic reactions [14–18].
- Carminic Acid (E-120) is a natural red colorant which comes from *Datylolopius coccus*, an insect which lives on *Opuntia coccinellifer*. In order to obtain this dye, it is necessary to dry and spray the body of pregnant females of these insects [19]. The JECFA and SCF committees established an ADI of 5 mg/kg·bw/day for Carminic Acid [20]. This dye is called by the FDA “cochineal extract” or “carmine” and is classified as exempt from certification. According to the FDA, it is used in food, drugs, and cosmetics [1]. Despite the absence of genotoxic or cytotoxic effects described for Carminic Acid, it has been related to anaphylactic reactions, asthma, urticaria, and angioedema [19,21–23]. Furthermore, impairment in renal function has been demonstrated in male albino rats [24].
- Erythrosine (E-127) is a cherry-pink synthetic food colorant with a polyiodinated xanthene structure [25]. It is widely used to color children’s sweets [26], as well as to determine the presence of dental plate in Odontology [27]. The ADI of Erythrosine was established by the JECFA and SCF in 0.1 mg/kg·bw/day [28]. Regarding the FDA, it allows the use of Erythrosine both for food and drugs [1]. Some studies suggested a relationship between Erythrosine consumption and altered cognition and behavior in children, which could be due to the inhibition of dopamine receptors [29]. Moreover, different studies suggested the induction of chromosome aberrations and an increase in the incidence of thyroid tumors by Erythrosine consumption [11,30,31].
- Indigotine (E-132) is one of the earliest known natural dyes. Originally, it was obtained from the leaves of the plants *Indigofera tinctoria*, *Indigofera sui-fruticosa*, and *Isatis tinctoria*, where it occurs as indican, a glycoside of indoxyl [32]. In 1975, the JECFA and SCF established an ADI of 5 mg/kg·bw/day for this blue additive [33]. Only a subacute toxicity study performed with adult male Swiss albino mice showed severe adverse effects of Indigotine on the testis [34].
- Brilliant Blue FCF (E-133) is a triarylmethane synthetic food coloring authorized as a food additive. In 2017, the JECFA revised the ADI to 6 mg/kg·bw/day for this blue additive [35]. Brilliant Blue FCF has recently been evaluated and approved as a cosmetic colorant by the Scientific Committee on Cosmetic Products (SCCP) [35]. Current databases show no adverse effects of Brilliant Blue FCF in any organism assayed for any biological test carried out [11,36–39].

Considering the available information about the toxicological effects of food coloring on health, our main goal was to evaluate the biological and nutritional effects that the mentioned additives have on time-related degenerative processes, as well as to add new scientific data. For that purpose, an integrative study of the biological activity at the individual, cellular, and molecular levels based on in vivo and in vitro assays was carried out using two model systems. The *Drosophila* animal model is known to have more than 75% of human disease homologous genes [40] related to different human degenerative illnesses, such as Parkinson’s and Alzheimer’s diseases, and allergic diseases, among others. For this reason, it is a reliable system to test toxicity, antitoxicity, longevity, and many other processes [41]. Moreover, using an in vitro model of human leukemia cells (HL-60), we studied the effect of this compound on cell growth inhibition, DNA damage (internucleosomal fragmentation

as double-strand breaks leading to DNA laddering associated with the activation of the apoptotic pathway in cells), and the modulation of the methylation status. The purpose of the present study was to extend knowledge and provide new scientific data in this area for future clinical studies.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

Six different types of food coloring were selected for this study according to their high consume and abundance in the diet. A range of six concentrations were tested for each food coloring in order to better understand their biological activity at different endpoints in in vivo and in vitro assays.

The concentrations of the food colorings were established taking into account the average daily food intake of *Drosophila melanogaster* (1 mg/day) and the average body weight of *D. melanogaster* individuals (1 mg) [42]. The concentration range for all tested substances was calculated in order to make it comparable with their ADI in humans, as it summarized in Table 1.

Table 1. Food coloring information.

Food Coloring		ADI (Mg/Kg)	Tested Concentrations in <i>Drosophila</i> (mg/mL) *					
			1	2	3	4	5	6
E-101	Riboflavin	0.5	0.0000025	0.000025	0.00025	0.0025	0.025	0.25
E-102	Tartrazine	7.5	0.0000375	0.000375	0.00375	0.0375	0.375	3.75
E-120	Carminic Acid	5	0.000025	0.00025	0.0025	0.025	0.25	2.5
E-127	Erythrosine	0.1	0.0000005	0.000005	0.00005	0.0005	0.005	0.05
E-132	Indigotine	5	0.000025	0.00025	0.0025	0.025	0.25	2.5
E-133	Brilliant Blue FCF	6	0.0000005	0.000005	0.00005	0.0005	0.005	0.05

* numbers 1 to 6 represent the value, in mg/mL, of the different dilutions assayed in the in vivo and in vitro assays for each food coloring; the concentration corresponding to number 3 is the equivalent quantity of ADI in humans.

2.2. In Vivo Assays

The value of using *Drosophila* to investigate fundamental biological processes is increasingly evident. This organism is revealing itself as an appropriate system as it is a complex multicellular organism in which many aspects of gene expression are parallel to those of humans. *Drosophila* substitute mammals in experiments with the distinct goal of uncovering insights directly relevant to human beings, because it is a model for many human diseases, including cancer and ageing [43–45].

In the present study, two *Drosophila* strains were used, each with a hair marker in the third chromosome: (i) *mwh/mwh*, carrying the recessive mutation *mwh* (multiple wing hairs) that in homozygosis produces multiple tricommas per cell instead of one per cell [46], and (ii) *flr³/In (3LR) TM3, rip^psep bx^{34e} e^s Bd^S*, where the *flr³* (flare) marker is a homozygous recessive lethal mutation that produces deformed tricommas but is viable in homozygous somatic cells once larvae start development. All in vivo treatments were carried using the offspring of the reciprocal crosses of the two strains, to finally use the emerging trans-heterozygous individuals (*mwh·flr³/mwh⁺·flr³*) for the different toxicity, antitoxicity, and longevity assays [47].

2.2.1. Toxicity and Antitoxicity Assays

The survival percentages of treated *Drosophila* were determined in toxicity assays ((number of individuals born in each treatment group/number of individuals born in the negative control group) × 100). The antitoxicity tests consisted of combining treatments with food colorings at the same concentrations as in the toxicity assays with H₂O₂ at 0.12 M (Sigma; H1009) [48]. The negative controls were prepared with *Drosophila* Instant Medium (Formula 4-24, Carolina Biological Supply, Burlington, NC) and distilled water, and the positive controls with medium and H₂O₂.

Three independent experiments were carried out for each assay. Chi-square test in Microsoft Office Excel 2007 was used to determine if the tested compounds significantly affected fly survival,

with respect to the control. In the toxicity assay, statistical chi-square values ($p < 0.05$) for the different concentrations tested were obtained by comparing the effects of different concentrations with those of the negative control, whereas statistical chi-square values of antitoxicity assays were obtained by comparing the effects of the different concentrations with those of the positive control [49].

A wide range of researches are found on the effects of hydrogen peroxide: it can interact directly with DNA or modulate transcription and suppress genomic repair pathways; induce microsatellite instability in germ cells of *D. melanogaster* [50]; produce genetic damage due to the generated electrophilic compounds [51]. Also, it is well established that hydrogen peroxide is an endogenous mutagen responsible for some of the highest cancer risks associated with persistent inflammation [52,53]. Oxy-radicals derived from hydrogen peroxide can act on the genome either directly, causing chromosome damage that induces oncogenic mutations [54,55], or indirectly, by modulating gene transcription [56,57] or by suppressing genome repair pathways [58,59]. Moreover, a study of genotoxicity induced by hydrogen peroxide using the *in vivo* *Drosophila* assay [60] indicated that the oxidative agent is able to induce somatic mutations and mitotic recombination (concentrations ranged from 0.12 M to 0.48 M). The relative contribution of the recombinational events to the total clone induction was estimated by comparing the frequency of *mwh* spots on the marker wings with the frequency of *mwh* spots in the balancer wings, concluding that an average of 60% of clones showed a genetic recombinational origin.

2.2.2. Lifespan Assays

All experiments were carried out at 25 °C according to the procedure described in Tasset-Cuevas, et al. [61]. Sets of 25 individuals of the same gender were selected and placed into sterile vials containing 0.21 g of *Drosophila* Instant Medium and 1 mL of different concentrations of solutions of the food coloring to be tested. Two replicates were followed during the complete life extension for each control and concentration established. Alive animals were counted, and the respective nourishment renewed twice a week.

In order to know the quality of life of the treated *Drosophila* in the longevity trials, the upper 25% of lifespan survival curves was studied. This part of the lifespan is considered as the healthspan of a curve, characterized by low and more or less constant age-specific mortality rate values [62].

The statistical treatment of the survival data for each control and concentration was carried out with the SPSS Statistics 17.0 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), applying the Kaplan–Meier method to obtain the survival curves. The significance of the curves was determined using the Log-Rank method (Mantel-Cox).

2.3. In Vitro Assays

The *in vitro* model of human leukemia cells (HL-60) was used to study the effect of food coloring on growth inhibition of the tumor cells, DNA damage (internucleosomal fragmentation as double-strand breaks leading to DNA laddering associated with the activation of the apoptotic pathway), and modulation of DNA methylation status.

The promyelocytic human leukemia HL-60 cell line was grown in RPMI-1640 medium (Sigma, R5886) supplemented with heat-inactivated fetal bovine serum (Linus, S01805), L-glutamine at 200 mM (Sigma, G7513), and an antibiotic–antimycotic solution (Sigma, A5955). The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ [63]. The cultures were plated at 2.5×10^4 cells/mL density in 10 mL culture bottles and passed every two days.

2.3.1. Cytotoxicity Assays

HL-60 cells were placed in 96-well culture plates (2×10^4 cells/mL), cultured for 72 h, and supplemented with the food colorings at different concentrations. This allowed the assessment of a wide range of concentrations in the *in vitro* cytotoxicity assays, with the aim to predict acute *in vivo* lethality. Although a continuous evaluation of the cytotoxic effects was studied, only the results at 72 h allowed us to acquire more knowledge about the *in vitro* lethality of the tested food colorings at the different concentrations assayed, because the IC₅₀ was reached for most of them at that time-point.

Cell viability was determined by the trypan blue dye exclusion test. Trypan blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, T8154) was added to the cell cultures at a 1:1 volume ratio, and 20 μL of cell suspension was loaded into a Neubauer chamber. The cells were counted with an inverted microscope at 100 \times magnification (AE30/31, Motic). Curves were plotted as the average survival percentage of three independent experiments with respect to the control growing for 72 h.

2.3.2. Determination of DNA fragmentation

HL-60 cells ($1 \times 10^6/\text{mL}$) were treated with different concentrations of food coloring for 5 h.

The treated cells were collected and centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and DNA was extracted according to the procedure described in Merinas-Amo, et al. [64]. Briefly, the cell pellet was resuspended in lysis buffer and incubated in an SDS 10% and proteinase K solution. DNA precipitation with NaCl and isopropanol was followed by washing with 70% ethanol DNA and incubation with RNase overnight. For the negative control, RPMI was used as the cell medium; as a routine positive control, a concentration of 62.5 mg/mL of a lyophilized blond beer (LBB) was used [64].

DNA was quantified with a spectrophotometer (Nanodrop ND-1000), and 1200 ng of DNA was subjected to 2% agarose gel electrophoresis at 85 mA for 25 min, stained with GelRed, and visualized under UV light.

2.3.3. Methylation Status

Genomic DNA was isolated in the same way as described in the DNA fragmentation section. Bisulphite-modified DNA from food coloring treatments, using the EZ DNA Methylation-Gold Kit, was used as a template for fluorescence-based real-time quantitative Methylation-Specific PCR (qMSP). qMSP was carried out according to the protocol described by Merinas-Amo, et al. [65] in 48-well plates in a MiniOpticon Real-Time PCR System (MJ Mini Personal Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) and was analyzed by the Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software. Briefly, the final reaction mixture with a total volume of 10 μL consisted of: 2 μL of deionized water, 5 μM of each forward and reverse primer, 2 μL of iTaqTM Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, containing antibody-mediated hot-start iTaq DNA polymerase, dNTPs, MgCl_2 , SYBR[®] Green I dye, enhancers, stabilizers, and a blend of passive reference dyes including ROX and fluorescein), and 25 ng of bisulphite-converted genomic DNA. qMSP conditions were as follows: one step at 95 $^\circ\text{C}$ for 3 min, 45 cycles at 95 $^\circ\text{C}$ for 10 s, 60 $^\circ\text{C}$ for 15 s, 72 $^\circ\text{C}$ for 15 s, another step at 95 $^\circ\text{C}$ for 30 s, followed by a 65 $^\circ\text{C}$ step during 30 s and finally a boost step from 65 $^\circ\text{C}$ to 95 $^\circ\text{C}$ for 95 s, increasing the temperature of 0.5 $^\circ\text{C}$ each 0.05 s.

Repetitive elements were selected in order to analyze a wide range of human genomic DNA. While Alu and LINE sequences are interspersed throughout the genome, satellites are confined to the centromere areas [66–69]. All sequences were obtained from Isogen Life Science. Alu M1, LINE-1, and Sat- α sequences were used (see Table 2 for detailed information) [70].

The relative yield results were normalized with respect to the housekeeping sequence Alu C4 using the Nikolaidis, et al. [71] and Liloglou, et al. [72] comparative C_T method:

- C_T of the target gene was normalized with respect to the referent gene (ΔC_T).
- ΔC_T of each experimental sample or reference ($\Delta C_{T,r}$) were compared with ΔC_T of the calibrator sample ($\Delta C_{T,cb}$), $\Delta\Delta C_T$.
- The relative value of each sample was defined using the formula:

$$2^{-(\Delta C_{T,r} - \Delta C_{T,cb})} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Each sample was analyzed in triplicate. One-way ANOVA and post hoc Tukey's tests were used to evaluate the differences among the tested compounds, repetitive elements, and concentrations.

Table 2. Primers information.

Reaction ID	GenBank Number	Amplicon Start	Amplicon End	Forward Primer Sequence 5' to 3' (N)	Reverse Primer Sequence 5' to 3' (N)	GC Content (%)	
						Forward	Reverse
Alu C4	Consensus Sequence	1	98	GGTTAGGTATAGTGGTTTATATTGTAATTTTAGTA (36)	ATTAACATAAACTAATCTTAAACTCCTAACCTCA (33)	25	27.3
Alu M1	Y07755	5059	5164	ATTATGTIAGTTAGGATGTTTCGATTTT (29)	CAATCGACCGAACGCGA (17)	27.6	58.8
LINE-1	X52235	251	331	GGACGTATTGGAAAATCGGG (21)	AATCTCGGATACGCCGTT (19)	47.6	52.6
Sat- α	M38468	139	260	TGATGGAGTATTTTAAAAATACGTTTGTAGT (34)	AATTCTAAAAATTCCTCTTCAATTACGTAAA (33)	23.5	21.2

Source: Weisenberger, Campan, Long, Kim, Woods, Fiala, Ehrlich and Laird [70].

3. Results

3.1. In Vivo

3.1.1. Toxicity and Antitoxicity

Figure 1 shows the relative percentage of emerging adults after toxicity treatments with different concentrations of food colorings. Our results showed that Riboflavin and Indigotine were non-toxic at any assayed concentration. Tartrazine showed a significant dose-independent survival percentage at the assayed concentrations, being toxic at the fourth highest concentrations with respect to the control. Moreover, a significant survival rate compared with the control was shown for individuals treated with the red additives, except for the concentration numbered as 3, with a decreasing rate of *Drosophila* survival lower than 80%. Brilliant Blue FCF also showed a significant diminution of the survival of *Drosophila* at the two highest and the two lowest concentrations tested with respect to the control.

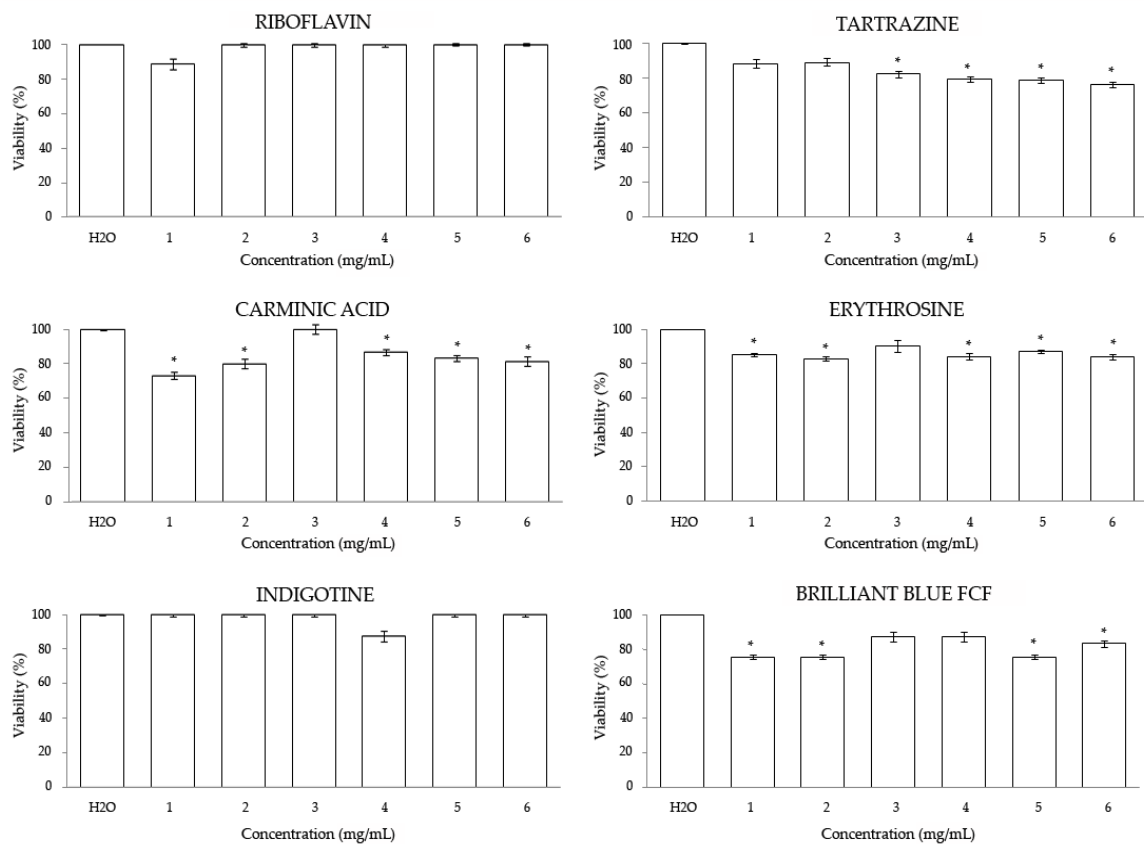


Figure 1. Toxicity levels of food coloring in *Drosophila melanogaster*. Data are expressed as percentage of surviving adults with respect to 300 untreated 72 h-old larvae from three independent experiments treated with different concentrations of food colorings. Values represent the mean \pm SE from three independent experiments. * Indicates significant differences with respect to the control. 1–6 numbers indicate the different dilutions tested (see Table 1).

On the whole, any food coloring Figure 2 assayed concentration reached the lethal dose (LD₅₀) which is considered toxic. This fact confirms that the concentrations assayed for the whole the AD (red and Carminic Acid showed) established by the JECFA for combined colorings is a safe dose [5,10,28,33,34] with respect to the positive control. On the other hand, extremes concentrations of Riboflavin and Erythrosine showed the lowest concentration ability of the Brilliant Blue FCF shows a protective effect against stress induced with the data in the highly dose concentration as a *Drosophila* thermore, Tartrazine and Carminic Acid showed a significant effect in the toxicity result in terms of Carminic Acid, Erythrosine, and Brilliant Blue FCF could be due to the fact that each substance might exhibit antioxidant or prooxidant activities in a competitive manner against the effect of hydrogen peroxide when combined with it [73].

concentrations tested with respect to the positive control. On the other hand, extremes concentrations of Riboflavin and Erythrosine and the lowest concentration of Brilliant Blue FCF showed a toxic synergic effect when combined with the oxidative toxicant hydrogen peroxide in *Drosophila*.

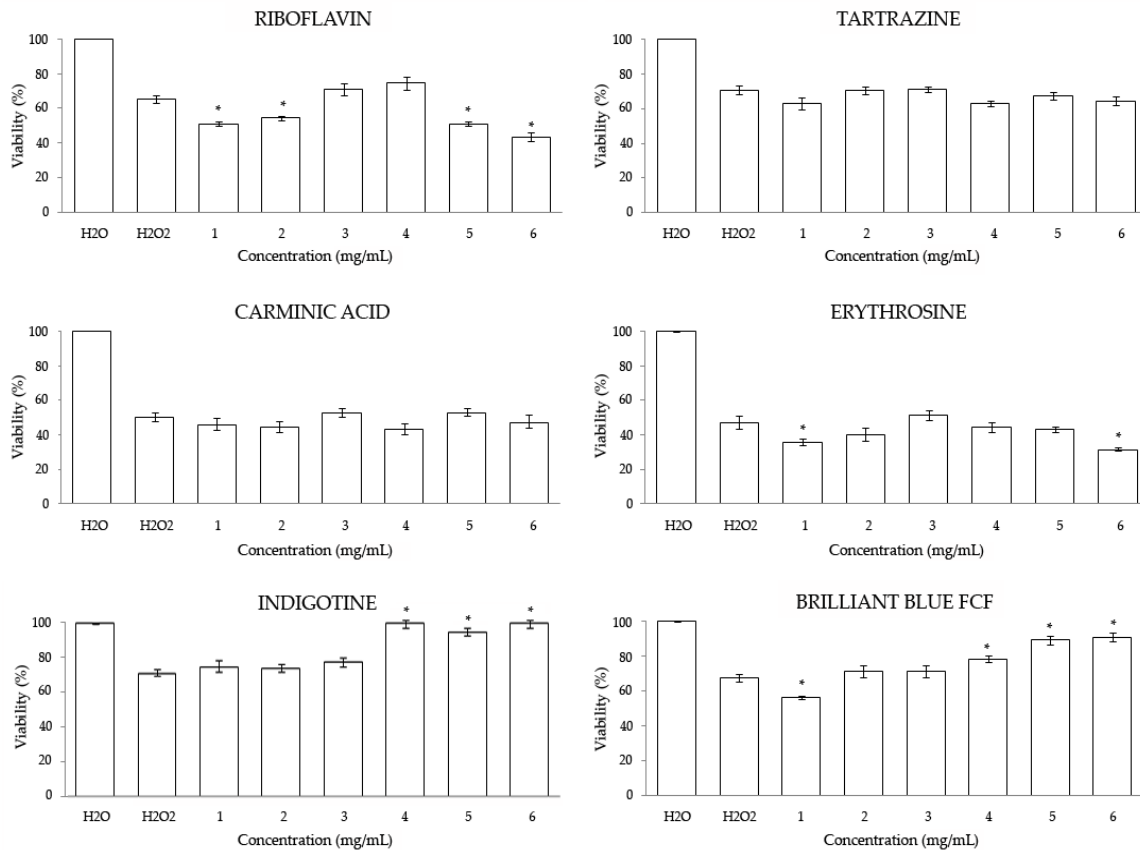


Figure 2. Antitoxicity levels of food coloring in *D. melanogaster*. Data are expressed as percentage of surviving adults with respect to 300 untreated 72 h-old larvae from three independent experiments treated with different concentrations of food colorings combined with 0.12 M H₂O₂. Values represent the mean ± SE from three independent experiments. * Indicates significant differences with respect to the positive control. 1–6 numbers indicate the different dilutions tested (see Table 1).

3.1.1. **The absence** of a relationship between the toxicity and the antitoxicity results in Tartrazine, Carminic Acid, Erythrosine, and Brilliant Blue FCF could be due to the fact that each substance might exhibit antioxidant or prooxidant activities in a competitive manner against the effect of hydrogen peroxide when combined with it [73].

3.1.2. **Lifespan**

The entire lifespan curves obtained by the Kaplan–Meier method for each substance and concentration are shown in Figure 3. Tartrazine and Brilliant Blue FCF induced a lifespan extension in *D. melanogaster* at the three highest concentrations tested and at the concentrations numbered 2 to 4, corresponding to 5–10 and 5–8 days, respectively, with respect to their control (Table 3). On the other hand, all concentrations of Carminic Acid and Erythrosine, except the lowest one, showed a significant decrease of longevity corresponding to 9–14 and 12–13 days, respectively, compared with their control, except for the lowest concentration (Table 3). With respect to Riboflavin and Indigotine, no significant effect on *Drosophila* longevity was observed at any assayed concentration.

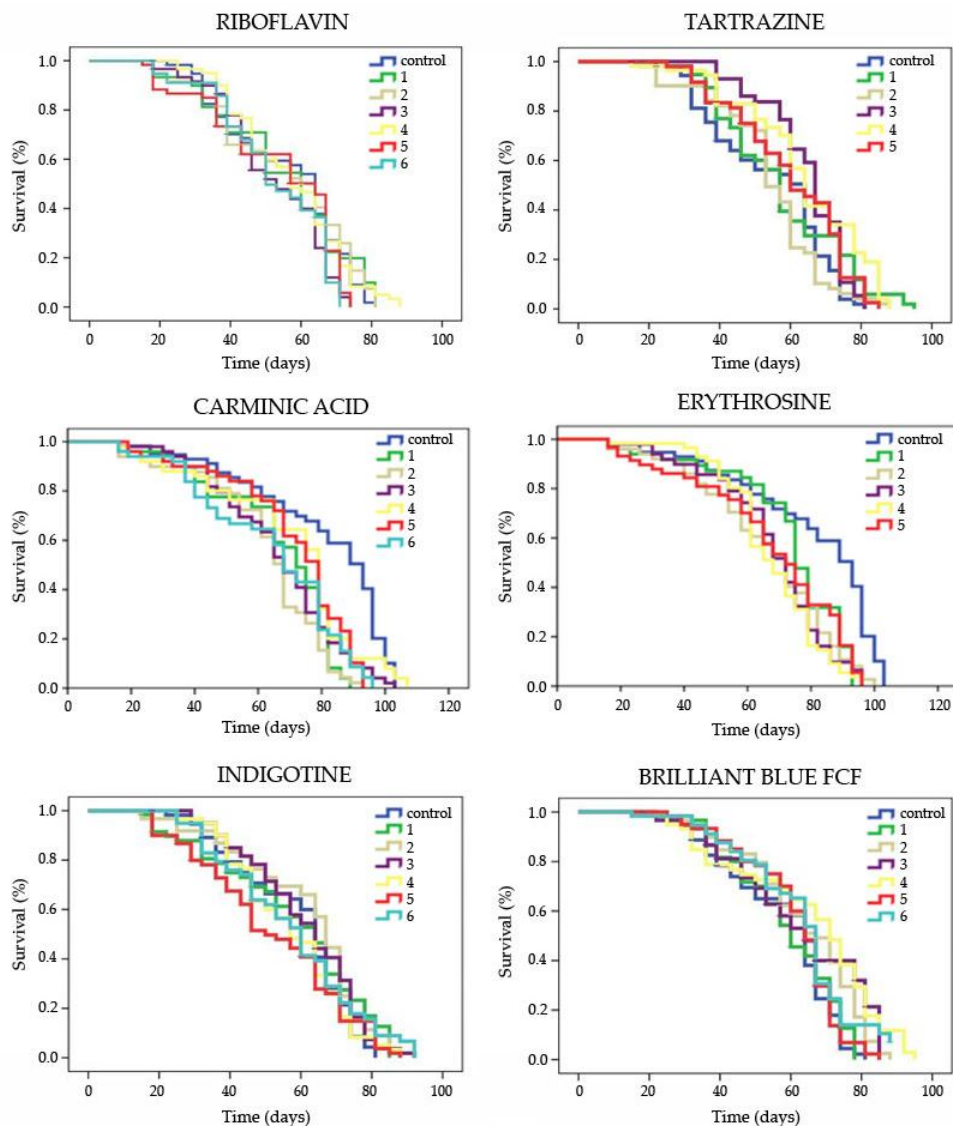


Figure 3. Complete survival curves of *Daphnia magna* exposed to food with different concentrations of food coloring. The numbers indicate the different dilutions (see Table 1). The curves were obtained by the Kaplan-Meier method and significance was determined by the Log-Rank (Mantel-Cox).

The healthspan results (upper 25% portion of the lifespan curves) are shown in Table 3. Tartrazine induced a significant increase of the 25% portion of the lifespan when compared with the fladiv & control, with the exception of the increase of the healthspan in the E2, whose effect was similar to that of the control. However, with the exception of the food addition ranged between 2, 4 and 20 days. On the other hand, the highest concentration of Erythrosine assayed in this addition ranged between 2 and 12 days of Daphnia showed a significant reduction in the quality of life of *Daphnia* after 6 and 6 days, respectively. All 5 remaining food colorings showed no significant differences in the life of *Daphnia* of healthspan of the treated fishes. With respect to the food colorings, no significant differences in the mean survival of the fish were observed with respect to the different food colorings studied, suggesting a visible dose-effect relationship has been shown in the different cohorts. The data provided in this research can matter by the present study can be related to the controversial results observed in the database about food coloring [5,10,20,28,33,35].

Table 3. Mean and significances of lifespan and healthspan curves.

Food Coloring	Concentration	Mean Lifespan ¹ (days)		Mean Healthspan ¹ (days)	
Riboflavin	Control	55.985		31.399	
	1	55.019	ns	27.607	ns
	2	55.864	ns	29.110	ns
	3	52.534	ns	29.966	ns
	4	57.067	ns	32.714	ns
	5	53.341	ns	25.500	ns
	6	52.660	ns	27.222	ns
Tartrazine	Control	54.375		31.399	
	1	57.664	ns	36.154	*
	2	54.037	ns	32.681	ns
	3	64.618	*	43.571	*
	4	63.860	*	35.760	*
	5	59.989	*	37.252	*
Carminic Acid	Control	62.345		38.509	
	1	44.958	*	35.630	ns
	2	43.215	*	29.000	ns
	3	45.515	*	37.067	ns
	4	46.998	*	39.320	ns
	5	48.211	*	40.000	ns
	6	44.236	*	30.530	ns
Erythrosine	Control	62.345		38.015	
	1	55.487	ns	27.614	ns
	2	49.589	*	34.276	ns
	3	49.847	*	35.051	ns
	4	50.011	*	43.333	ns
	5	50.214	*	22.501	*
Indigotine	Control	58.433		32.988	
	1	57.791	ns	27.019	*
	2	61.547	ns	29.182	ns
	3	61.181	ns	33.857	ns
	4	57.067	ns	32.714	ns
	5	52.024	ns	27.189	*
	6	57.570	ns	31.068	ns
Brilliant Blue FCF	Control	57.526		32.988	
	1	58.686	ns	34.333	ns
	2	63.513	*	31.286	ns
	3	62.664	*	33.000	ns
	4	65.095	*	32.877	ns
	5	61.074	ns	30.800	ns
	6	62.466	ns	31.984	ns

Means were calculated by the Kaplan–Meier method, and significance of the curves was determined by the Log-Rank method (Mantel-Cox). ¹ ns: non-significant, * significant ($p < 0.05$); numbers 1–6 indicate the different dilutions tested (see Table 1).

3.2. In Vitro

3.2.1. Cytotoxicity

In general, the red and yellow additives showed a dose-dependent response, with an increase of the cytotoxicity level according to the increased concentration of the food coloring. All food colorings reached an inhibitory concentration 50 (IC₅₀) between the concentration numbered as 5 and 6 in HL-60 cells, except for Riboflavin that was the only dye able to induce total death of the tumor cells at the concentration numbered as 5.

3.2.1. Cytotoxicity

In general, the red and yellow additives showed a dose-dependent response, with an increase of the cytotoxicity level according to the increased concentration of the food coloring. All food colorings reached an inhibitory concentration 50 (IC₅₀) between the concentration numbered as 5 and 6 in HL-60 cells, except for Riboflavin that was the only dye able to induce total death of the tumor cells at the concentration numbered as 5.

In relation to the blue additives, Indigotine showed a slight (51%) growth inhibition at the highest concentration tested. No inhibition was observed for Brilliant Blue G2B at any concentration tested, with respect to the control but, contrarily, a tendency to promote cell growth was observed. The concentration numbered as 4 and 5 were the closest to the established ADI for Brilliant Blue G2B; we found that, although their viability-promoting effect was higher than the corresponding effect of the control, it was nonetheless lower than the effect of the other concentrations tested for this food coloring suggesting their low chemopreventive potential in tumor cells (Figure 4).

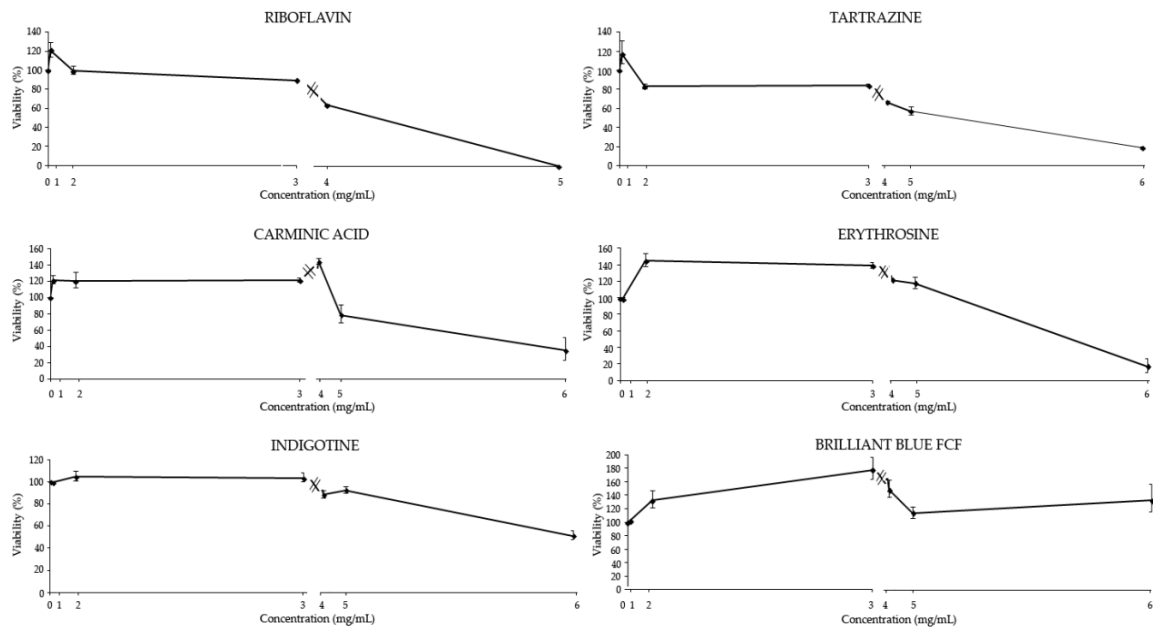


Figure 4 Effect of 6 food colorings in HL-60 cells viability. Viability of the promyelocytic leukemia cells (HL-60) treated with different concentrations of food colorings for 72 h. The points in the graphs represent the growth percentage with respect to the control values reported. Values are presented as the mean \pm SE of independent experiments. Number of differentiations tested (see Table 1).

3.2.2. DNA Fragmentation

Figure 5 shows electrophoresis experiments of the genomic DNA of HL-60 cells treated with different concentrations of food colorings. The results showed that the propylated landmark DNA internucleosomal fragmentation was only observed at the highest concentration of Riboflavin assayed. The rest of the food colorings assayed did not induce internucleosomal fragmentation.

3.2.3. Methylation Status

The relative normalized expression of three repetitive sequences (Alu M1, LINE-1, and Sat- α) studied in HL-60 cells treated with different concentrations of food colorings and RPMI as a control is shown in Figure 6. The food colorings did not modulate the methylation status at the assayed concentrations. After one-way ANOVA and post-hoc Tukey's test, the statistical results showed a methylation level in the treated samples similar to that of the normalized control.

Despite of the non-significant results in the methylation status for any food coloring tested, Riboflavin exhibited a tendency to hypomethylate the genomic randomly distributed sequences of HL-60 cells (Alu M1 and LINE-1). Taking into account that methylation of repetitive sequences is considered a genomic protective mechanism [70,74], this yellow additive could have inhibitory effects on tumor cells and could be an interesting chemopreventive compound.

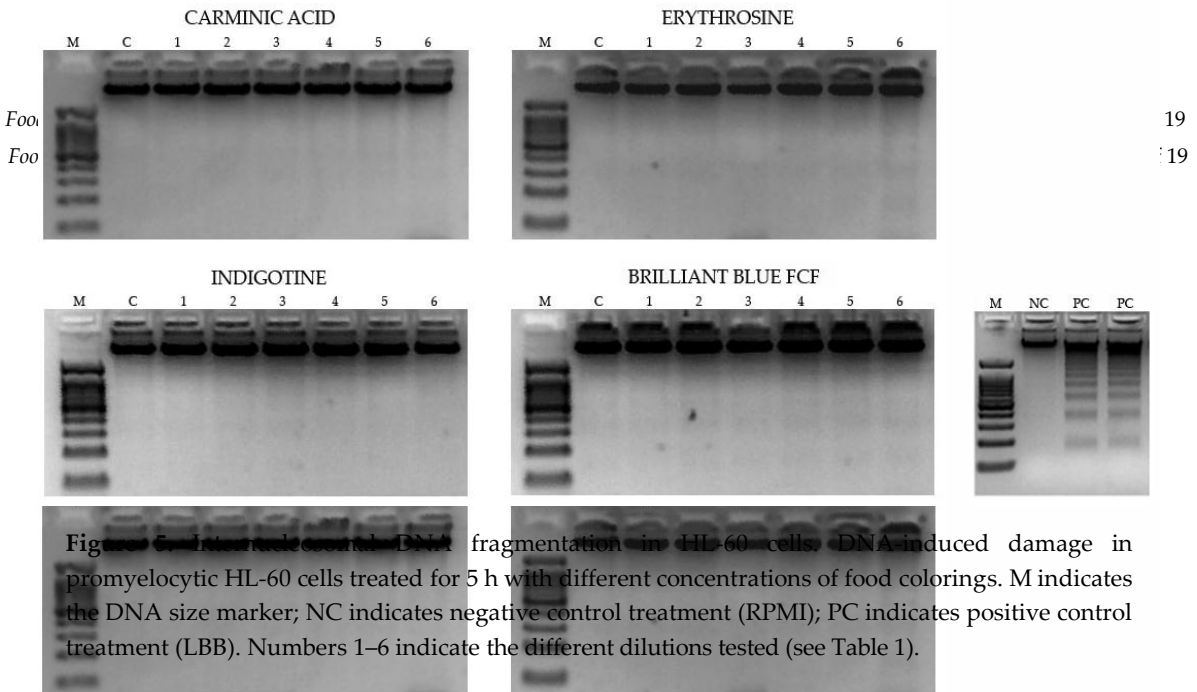


Figure 5. Induced overall DNA fragmentation in HL-60 cells. DNA induced damage in promyelocytic HL-60 cells treated for 5 h with different concentrations of food colorings. M indicates the DNA size marker; NC indicates negative control treatment (RPMI); PC indicates positive control treatment (LBB). Numbers 1–6 indicate the different dilutions tested (see Table 1).

3.2.3. Methylation Status

The relative normalized expression of three repetitive sequences (Alu M1, LINE-1, and Sat- α) studied in HL-60 cells treated with different concentrations of food coloring and RPMI as a control is shown in Figure 6. The food colorings did not modulate the methylation status at the assayed concentrations. After one-way ANOVA and post-hoc Tukey's test, the statistical results showed a methylation level in the treated samples similar to that of the normalized control.

Despite of the non-significant results in the methylation status for any food coloring tested, Riboflavin exhibited a tendency to hypomethylate the genomic randomly distributed sequences of HL-60 cells (Alu M1 and LINE-1). Taking into account that methylation of repetitive sequences is considered a genomic protective mechanism [70,74], this yellow additive could have inhibitory effects on tumor cells and could be an interesting chemopreventive compound.

3.2.3. Metl

The r studied in is shown : concentr methylation. Desp Riboflavin HL-60 cell considere effects on

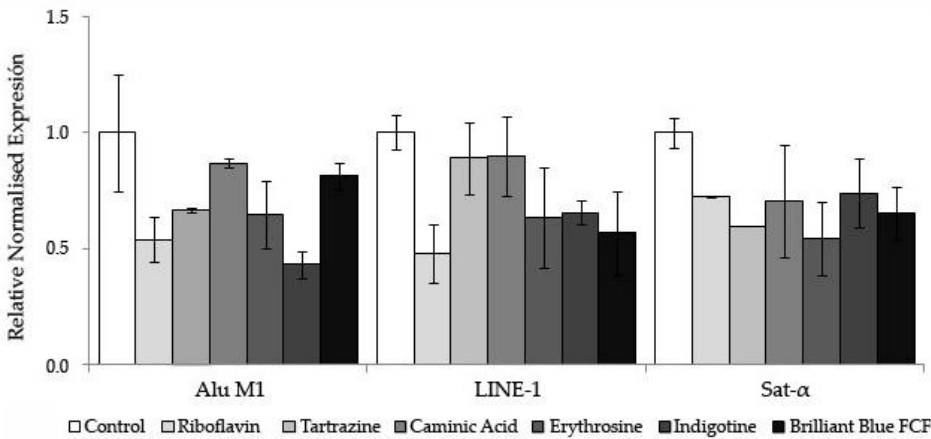


Figure 6. Methylation status of food colorings in HL-60 cells. Relative normalized expression data of each repetitive element (Alu M1, LINE-1, and Sat- α). Values represent the mean \pm SE from three independent experiments. Untreated cells grown in RPMI were used as a control.

4. Discussion

4.1. In Vivo

According to the toxicity assay, none of the food colorings at any of the assayed concentrations reached the lethal dose 50 (LD₅₀) in *D. melanogaster*, which is considered as the toxic level for any substance. Our results are in agreement with the wide variety of researches showing the absence of toxic effects for Riboflavin [75], Tartrazine [11], Carminic Acid [24], Indigotine [76–78], and Brilliant Blue FCF [36,79,80] in mice, rats, rabbits, and dogs models. On the other hand, statistically significant

□ Control □ Riboflavin □ Tartrazine ■ Caminic Acid ■ Erythrosine ■ Indigotine ■ Brilliant Blue FCF

severe adverse effects on the testis were described in a subacute toxicity study (45 day) performed on adult male Swiss albino mice treated with oral doses of Indigo of 0, 17, and 39 mg/kg·bw/day [34]. No data were found about Erythrosine toxicity.

Regarding the protective effects of food colorings, no previous data about antioxidative effects were found. Taking into account the concentration corresponding to the equivalent ADI for humans (concentration numbered as 3), no significant results were obtained for any food coloring tested. This fact is in agreement with the results of Scotter and Castle [81], who suggested that, in general, the majority of color additives are unstable in combination with oxidizing and reducing agents in food. Moreover, since color depends on the existence of a conjugated unsaturated system within a dye molecule, any substance which modifies this system (e.g., oxidizing or reducing agents, sugars, acids, and salts) will affect the color [81].

To our knowledge, no previous studies assessing the effects on lifespan and healthspan have been published. Our results indicated that the highest concentrations of Tartrazine and medium quantities of Brilliant Blue FCF induced a significant life extension with respect to the controls, whereas both red food colorings showed significantly negative effects on the longevity of *Drosophila*. Furthermore, quality of life was only improved by Tartrazine and, even, it worsened at some concentrations of Erythrosine and Indigotine.

On the whole, a non-visible dose–effect relationship for the food colorings could be appreciated in the different assays. This could be explained by the possible differential responses of the organism against each substance and by the biological level at which it was acting.

4.2. In Vitro

A dose-dependent cytotoxic effect was observed for the food colorings assayed in HL-60 cells, except for both types of blue dyes which did not reach the inhibitory concentration 50 (IC₅₀) or even increased tumor cells' growth. Our results fit with those that demonstrated that Tartrazine, Carminic Acid, and Erythrosine did not have any potential to induce tumor cells' growth. The available carcinogenicity studies have demonstrated that Tartrazine does not induce benign or malignant neoplasia [82,83]. Moreover, in a combined chronic toxicity/carcinogenicity study involving in utero exposure of Wistar rats to Carminic Acid, the general pattern of tumor incidence in the treated animals did not significantly differ statistically from those of the controls [84]. Besides, studies about Erythrosine treatments in mice [78], rats [85], and gerbils [86] showed no significant adverse effects of this food coloring. On the other hand, our Indigotine and Brilliant Blue FCF results are not in agreement with those of different researches that indicated no carcinogenetic and tumor potential of this food coloring: exposure of mice to Indigo did not demonstrate carcinogenic or toxic effects [77]; subcutaneous injections of 10 doses of Brilliant Blue FCF, 4 mg each, followed by 50 doses of 6 mg showed no tumor production after 78 weeks in mouse [35]. These controversial results may be due to differences in the organisms used, the cell line studied, or the range of concentrations tested. No data about Riboflavin cytotoxicity were found.

Effects on the DNA damage at the internucleosomal level in HL-60 cells did not appear in our study, with the exception of the highest concentration of Riboflavin. The Indigotine results are supported by in vitro studies using MCF-7 breast cancer cells [87] and the human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo2 cells) [88], which demonstrated a lack of statistical significance in DNA damaging. Similar results were obtained in ddY male mice treated with Brilliant Blue FCF, showing not statistically significant increases in DNA damage in glandular stomach, colon, liver, kidney, urinary bladder, lung, brain, and bone marrow [11]. In contrast, our results for Tartrazine and Erythrosine are not in agreement with those of Sasaki, Kawaguchi, Kamaya, Ohshita, Kabasawa, Iwama, Taniguchi, and Tsuda [11] and Tsuda, et al. [89], who demonstrated the effect of Tartrazine on nuclear DNA electrophoretic migration in the mouse and the induction of DNA damage in the stomach at doses of 10 and 2000 mg/kg·bw without a dose–effect relationship, and a dose-related induction of DNA damage by Erythrosine in the glandular stomach, colon, and urinary bladder after oral administration of 100 mg/kg·bw and

2000 mg/kg-bw and in the lung following administration of 2000 mg/kg-bw in mice. To our knowledge, no previous results about the effects of Riboflavin and Carminic Acid on DNA damage were published.

Finally, no significant modification of the DNA methylation status was found compared with the control. This means that modifications of the DNA epigenome are not induced, which is in agreement with studies showing no chromosome aberrations upon Riboflavin [5], Tartrazine [90], and Erythrosine [91] treatments in Chinese hamster ovary cells, mice bone marrow cells, and Syrian Hamster Embryo, respectively.

To sum up, no beneficial effects of food coloring were shown in the different in vitro tests with tumor cells. These controversial data with respect to the current well-known data supporting the safe consumption of additives may be due to the variety of conditions used: cell line, in vitro conditions, range of concentrations, or even the tests conditions.

5. Conclusions

Additives are found in many types of food, and we often consume them unknowingly; therefore, it is very important to study the biological consequences of using food coloring. Nowadays, people are becoming more aware of the possible danger of these additives that have no nutritional value.

Two model systems (in vivo and in vitro) were used to carry out the different screening tests. *D. melanogaster* is a well-known insect with a large scientific history in biological sciences that has highly contributed to understanding developmental biology, evolutionary concepts, and, recently, toxicology [92–96]. The unique characteristics that *Drosophila* possesses, such as a rapid and short life cycle (10–12 days at 25 °C), reliability, cost-efficiency, easy maintenance and manipulation, and consistent genetic similarity to humans, make this eukaryote an ideal model organism [40,97]. On the other hand, the human model HL-60 cell line was originated from a female patient with acute myeloid leukemia [98]. The promyelocytic human leukemia cell line HL-60 is used worldwide for many toxicity and cancer scientific purposes [63].

In conclusion, and taking into account the concentration indicated as the equivalent ADI for humans, the in vivo toxicity assays showed safe effects for all food colorings, as shown by the fact that the LD₅₀ was not achieved by any of the additives. Nevertheless, no significant differences were shown for any compound in the combined antitoxicity assays with respect to the controls, since they did not protect against oxidative damage by hydrogen peroxide. However, the longevity assays showed a differential behavior of the six food colorings, being Tartrazine and Brilliant Blue FCF the only colorants that significantly improved the longevity of *Drosophila*, whereas the red additives reduced significantly the lifespan of *Drosophila*. On the other hand, the in vitro results demonstrated that, despite the dose-dependent cytotoxic effects shown by the yellow and red additives, none of them reached the IC₅₀ at their ADI concentration. Moreover, red and blue food colorings induced an increasing of tumor cell growth. Besides, no DNA damage was observed by the internucleosomal fragmentation apoptotic assay, and no methylation status modification was found for any food coloring. To our knowledge, this is the first time that an integrative study with a wide range of in vivo and in vitro screening tests has been carried out in the model systems *D. melanogaster* and HL-60 tumor cells with food colorings. Several checkpoints to evaluate the biological activity of such important food additives have been established at the molecular (DNA internucleosomal proapoptotic clastogenicity and epigenetic status), unicellular (cytotoxicity), and individual (toxicity, antitoxicity, and longevity) levels. Although more scientific researches are needed to understand the effects that these highly consumed additives could have on our health, these results represent the first step and may encourage additional studies.

On the whole and despite the safe use suggested by the different assays carried out with food colorings, the overall results would support the idea that a high chronic intake of these additives throughout the entire life is not advisable, and more research on the biological effects that different concentrations of food colorings could have in model systems is warranted.

Author Contributions: Conceptualization, Á.A.-M.; Formal analysis, T.M.-A.; Investigation, R.M.-A., M.M.-J., S.J.-G., and T.M.-A.; Methodology, R.M.-A. and T.M.-A.; Project administration, Á.A.-M. and T.M.-A.; Supervision, Á.A.-M. and T.M.-A.; Validation, Á.A.-M.; Writing – original draft, R.M.-A., Á.A.-M., and T.M.-A.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Food and Drug Administration (FDA). Available online: <https://www.fda.gov/1> (accessed on 1 May 2019).
2. Swaroop, V.; Roy, D.D.; Vijayakumar, T. Genotoxicity of synthetic food colorants. *J. Food Sci. Eng.* **2011**, *1*, 128.
3. Juhlin, L.; Michaëlsson, G.; Zetterström, O. Urticaria and asthma induced by food-and-drug additives in patients with aspirin hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1972**, *50*, 92–98. [[CrossRef](#)]
4. Vedanthan, P.K.; Menon, M.M.; Bell, T.D.; Bergin, D. Aspirin and tartrazine oral challenge: Incidence of adverse response in chronic childhood asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **1977**, *60*, 8–13. [[CrossRef](#)]
5. EFSA. Scientific Opinion on the Re-Evaluation of Riboflavin (e 101 (i)) and Riboflavin-5'-Phosphate Sodium (e 101 (ii)) as Food Additives. *EFSA J.* **2013**, *11*, 3357.
6. Elmadfa, I. *European Nutrition and Health Report 2009*; Karger Medical and Scientific Publishers: Vienna, Austria, 2009; Volume 62.
7. Kale, H.; Harikumar, P.; Kulkarni, S.; Nair, P.; Netrawali, M. Assessment of the genotoxic potential of riboflavin and lumiflavin: B. Effect of light. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **1992**, *298*, 17–23. [[CrossRef](#)]
8. Unna, K.; Greslin, J.G. Studies on the toxicity and pharmacology of riboflavin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1942**, *76*, 75–80.
9. Komisyonu, A. European parliament and council directive 94/36/ec of 30 june 1994 on colours for use in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union L* **1994**, *237*, 13–29.
10. EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation tartrazine (e 102). *EFSA J.* **2009**, *7*, 1331. [[CrossRef](#)]
11. Sasaki, Y.F.; Kawaguchi, S.; Kamaya, A.; Ohshita, M.; Kabasawa, K.; Iwama, K.; Taniguchi, K.; Tsuda, S. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis* **2002**, *519*, 103–119. [[CrossRef](#)]
12. McCann, D.; Barrett, A.; Cooper, A.; Crumpler, D.; Dalen, L.; Grimshaw, K.; Kitchin, E.; Lok, K.; Porteous, L.; Prince, E. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: A randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet* **2007**, *370*, 1560–1567. [[CrossRef](#)]
13. Novembre, E.; Dini, L.; Bernardini, R.; Resti, M.; Vierucci, A. Unusual reactions to food additives. *Pediatr. Med. Chir. Med. Surg. Pediatrics* **1992**, *14*, 39–42.
14. Elhkim, M.O.; Héraud, F.; Bemrah, N.; Gauchard, F.; Lorino, T.; Lambré, C.; Frémy, J.M.; Poul, J.M. New considerations regarding the risk assessment on tartrazine: An update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in france. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *47*, 308–316. [[CrossRef](#)]
15. Bhatia, M.S. Allergy to tartrazine in psychotropic drugs. *J. Clin. Psychiatry* **2000**, *61*, 473–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nettis, E.; Colanardi, M.; Ferrannini, A.; Tursi, A. Suspected tartrazine-induced acute urticaria/angioedema is only rarely reproducible by oral rechallenge. *Clin. Exp. Allergy* **2003**, *33*, 1725–1729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Worm, M.; Vieth, W.; Ehlers, I.; Sterry, W.; Zuberbier, T. Increased leukotriene production by food additives in patients with atopic dermatitis and proven food intolerance. *Clin. Exp. Allergy* **2001**, *31*, 265–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Inomata, N.; Osuna, H.; Fujita, H.; Ogawa, T.; Ikezawa, Z. Multiple chemical sensitivities following intolerance to azo dye in sweets in a 5-year-old girl. *Allergol. Int.* **2006**, *55*, 203–205. [[CrossRef](#)]
19. Wüthrich, B.; Kägi, M.; Stücker, W. Anaphylactic reactions to ingested carmine (e120). *Allergy* **1997**, *52*, 1133–1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation of cochineal, carminic acid, carmines (e 120) as a food additive. *EFSA J.* **2015**, *13*, 4288.
21. Sarıkaya, R.; Selvi, M.; Erkoç, F. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. *Chemosphere* **2012**, *88*, 974–979. [[CrossRef](#)]

22. DiCello, M.C.; Myc, A.; Baker, J.R., Jr.; Baldwin, J.L. *Anaphylaxis after Ingestion of Carmine Colored Foods: Two Case Reports and a Review of the Literature, Allergy and Asthma Proceedings*; OceanSide Publications: East Providence, RI, USA, 1999.
23. Ferrer, D.; Marco, F.M.; Andreu, C.; Sempere, J.M. Occupational asthma to carmine in a butcher. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2005**, *138*, 243–250. [[CrossRef](#)]
24. Helal, E.G.; Zaahkouk, S.A.; Mekkawy, H.A. Effect of some food colorants (synthetic and natural products) of young albino rats. I–liver and kidney functions. *Egypt. J. Hosp. Med.* **2000**, *1*, 103–113.
25. Chequer, F.M.D.; de Paula Venâncio, V.; Bianchi, M.d.L.P.; Antunes, L.M.G. Genotoxic and mutagenic effects of erythrosine b, a xanthene food dye, on hepg2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 3447–3451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Tuormaa, T.E. The adverse effects of food additives on health: A review of the literature with a special emphasis on childhood hyperactivity. *J. Orthomol. Med.* **1994**, *9*, 225.
27. Mpountoukas, P.; Pantazaki, A.; Kostareli, E.; Christodoulou, P.; Kareli, D.; Poliliou, S.; Mourelatos, C.; Lambropoulou, V.; Lialiaris, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2934–2944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation of erythrosine (e 127) as a food additive. *EFSA J.* **2011**, *9*, 1854. [[CrossRef](#)]
29. Ganesan, L.; Margolles-Clark, E.; Song, Y.; Buchwald, P. The food colorant erythrosine is a promiscuous protein–protein interaction inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 810–818. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hagiwara, M.; Watanabe, E.; Barrett, J.C.; Tsutsui, T. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: Ability to induce chromosome aberrations in syrian hamster embryo cells. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis* **2006**, *603*, 111–120. [[CrossRef](#)]
31. Mekkawy, H.A.; Massoud, A.; El-Zawahry, A. Mutagenic effects of the food color erythrosine in rats. *Probl. Forensic Sci.* **2000**, *43*, 184–191.
32. Steingruber, E. Indigo and indigo colorants. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2000.
33. EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation of indigo carmine (e 132) as a food additive. *EFSA J.* **2014**, *12*, 3768. [[CrossRef](#)]
34. Dixit, A.; Goyal, R. Evaluation of reproductive toxicity caused by indigo carmine on male swiss albino mice. *Pharmacology* **2013**, *1*, 218–224.
35. EFSA. Scientific opinion on the re-evaluation of brilliant blue fcf (e 133) as a food additive. *EFSA J.* **2010**, *8*, 1853. [[CrossRef](#)]
36. Aboel-Zahab, H.; El-Khyat, Z.; Sidhom, G.; Awadallah, R.; Abdel-Al, W.; Mahdy, K. Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Boll. Chim. Farm.* **1997**, *136*, 615–627. [[PubMed](#)]
37. Lau, K.; McLean, W.G.; Williams, D.P.; Howard, C.V. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. *Toxicol. Sci.* **2005**, *90*, 178–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Borzelleca, J.; Depukat, K.; Hallagan, J. Lifetime toxicity/carcinogenicity studies of fd & c blue no. 1 (brilliant blue fcf) in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* **1990**, *28*, 221–234.
39. Lucarelli, M.R.; Shirk, M.B.; Julian, M.W.; Crouser, E.D. Toxicity of food drug and cosmetic blue no. 1 dye in critically ill patients. *Chest* **2004**, *125*, 793–795. [[CrossRef](#)]
40. Bier, E. *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 9. [[CrossRef](#)]
41. Graf, U.; Würzler, F.; Katz, A.; Frei, H.; Juon, H.; Hall, C.; Kale, P. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagenesis* **1984**, *6*, 153–188. [[CrossRef](#)]
42. Ja, W.W.; Carvalho, G.B.; Mak, E.M.; de la Rosa, N.N.; Fang, A.Y.; Liang, J.C.; Brummel, T.; Benzer, S. Prandiology of *Drosophila* and the cafe assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8253–8256. [[CrossRef](#)]
43. Gonzalez, C. *Drosophila melanogaster*: A model and a tool to investigate malignancy and identify new therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 172–183. [[CrossRef](#)]
44. Lints, F.A.; Soliman, M.H. *Drosophila as a Model Organism for Ageing Studies*; Springer: Boston, MA, USA, 1988.
45. Rudrapatna, V.A.; Cagan, R.L.; Das, T.K. *Drosophila* cancer models. *Dev. Dyn.* **2012**, *241*, 107–118. [[CrossRef](#)]
46. Yan, J.; Huen, D.; Morely, T.; Johnson, G.; Gubb, D.; Roote, J.; Adler, P.N. The multiple-wing-hairs gene encodes a novel gbd-fh3 domain-containing protein that functions both prior to and after wing hair initiation. *Genetics* **2008**, *180*, 219–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

47. Ren, N.; Charlton, J.; Adler, P.N. The flare gene, which encodes the *aip1* protein of *Drosophila*, functions to regulate f-actin disassembly in pupal epidermal cells. *Genetics* **2007**, *176*, 2223–2234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Anter, J.; Campos-Sanchez, J.; Hamss, R.E.; Rojas-Molina, M.; Munoz-Serrano, A.; Analla, M.; Alonso-Moraga, A. Modulation of genotoxicity by extra-virgin olive oil and some of its distinctive components assessed by use of the *Drosophila* wing-spot test. *Mutat. Res.* **2010**, *703*, 137–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Merinas-Amo, T.; Tasset-Cuevas, I.; Díaz-Carretero, A.M.; Alonso-Moraga, A.; Calahorro, F. Role of choline in the modulation of degenerative processes: In vivo and in vitro studies. *J. Med. Food* **2017**, *20*, 223–234. [[CrossRef](#)]
50. López, A.; Xamena, N.; Marcos, R.; Velázquez, A. Germ cells microsatellite instability: The effect of different mutagens in a mismatch repair mutant of *Drosophila* (*spel1*). *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis* **2002**, *514*, 87–94. [[CrossRef](#)]
51. Allen, R.; Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *28*, 463–499. [[CrossRef](#)]
52. Veal, E.A.; Day, A.M.; Morgan, B.A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* **2007**, *26*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Fitzpatrick, F.A. Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int. Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 1651–1667. [[CrossRef](#)]
54. Burcham, P.C. *Genotoxic Lipid Peroxidation Products: Their DNA Damaging Properties and Role in Formation of Endogenous DNA Adducts*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1998.
55. Feig, D.I.; Reid, T.M.; Loeb, L.A. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1890–1894.
56. Vivancos, A.P.; Castillo, E.A.; Biteau, B.; Nicot, C.; Ayte, J.; Toledano, M.B.; Hidalgo, E. A cysteine-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates h₂O₂-sensing by the antioxidant pap1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8875–8880. [[CrossRef](#)]
57. Cerda, S.; Weitzman, S. Influence of oxygen radical injury on DNA methylation. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* **1997**, *386*, 141–152. [[CrossRef](#)]
58. Ghosh, R.; Mitchell, D.L. Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3213–3218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Hu, J.J.; Dubin, N.; Kurland, D.; Ma, B.L.; Roush, G.C. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutat. Res.* **1995**, *336*, 193–201. [[CrossRef](#)]
60. Romero-Jiménez, M.; Campos-Sánchez, J.; Analla, M.; Muñoz-Serrano, A.; Alonso-Moraga, A. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagenesis* **2005**, *585*, 147–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Tasset-Cuevas, I.; Fernandez-Bedmar, Z.; Lozano-Baena, M.D.; Campos-Sanchez, J.; de Haro-Bailon, A.; Munoz-Serrano, A.; Alonso-Moraga, A. Protective effect of borage seed oil and gamma linolenic acid on DNA: In vivo and in vitro studies. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e56986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Soh, J.W.; Hotic, S.; Arking, R. Dietary restriction in *Drosophila* is dependent on mitochondrial efficiency and constrained by pre-existing extended longevity. *Mech. Ageing Dev.* **2007**, *128*, 581–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gallagher, R.; Collins, S.; Trujillo, J.; McCredie, K.; Ahearn, M.; Tsai, S.; Metzgar, R.; Aulakh, G.; Ting, R.; Ruscetti, F.; et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (hl-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* **1979**, *54*, 713–733.
64. Merinas-Amo, T.; Tasset-Cuevas, I.; Díaz-Carretero, A.M.; Alonso-Moraga, A.; Calahorro, F. In vivo and in vitro studies of the role of lyophilised blond lager beer and some bioactive components in the modulation of degenerative processes. *J. Funct. Foods* **2016**, *27*, 274–294. [[CrossRef](#)]
65. Merinas-Amo, T.; Merinas-Amo, R.; Alonso-Moraga, A. A clinical pilot assay of beer consumption: Modulation in the methylation status patterns of repetitive sequences. *Sylwan* **2017**, *161*, 134–156.
66. Deininger, P.L.; Moran, J.V.; Batzer, M.A.; Kazazian, H.H. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2003**, *13*, 651–658. [[CrossRef](#)]
67. Ehrlich, M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2424S–2429S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Lee, C.; Wevrick, R.; Fisher, R.; Ferguson-Smith, M.; Lin, C. Human centromeric dnas. *Hum. Genet.* **1997**, *100*, 291–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Weiner, A.M. Sines and lines: The art of biting the hand that feeds you. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2002**, *14*, 343–350. [[CrossRef](#)]
70. Weisenberger, D.J.; Campan, M.; Long, T.I.; Kim, M.; Woods, C.; Fiala, E.; Ehrlich, M.; Laird, P.W. Analysis of repetitive element DNA methylation by methylight. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6823–6836. [[CrossRef](#)]

71. Nikolaidis, G.; Raji, O.Y.; Markopoulou, S.; Gosney, J.R.; Bryan, J.; Warburton, C.; Walshaw, M.; Sheard, J.; Field, J.K.; Liloglou, T. DNA methylation biomarkers offer improved diagnostic efficiency in lung cancer. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5692–5701. [[CrossRef](#)]
72. Liloglou, T.; Bediaga, N.G.; Brown, B.R.; Field, J.K.; Davies, M.P. Epigenetic biomarkers in lung cancer. *Cancer Lett.* **2014**, *342*, 200–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Anter, J.; Romero-Jimenez, M.; Fernandez-Bedmar, Z.; Villatoro-Pulido, M.; Analla, M.; Alonso-Moraga, A.; Munoz-Serrano, A. Antigenotoxicity, cytotoxicity, and apoptosis induction by apigenin, bisabolol, and protocatechuic acid. *J. Med. Food* **2011**, *14*, 276–283. [[CrossRef](#)]
74. Roman-Gomez, J.; Jimenez-Velasco, A.; Agirre, X.; Castillejo, J.A.; Navarro, G.; San Jose-Eneriz, E.; Garate, L.; Cordeu, L.; Cervantes, F.; Prosper, F. Repetitive DNA hypomethylation in the advanced phase of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.* **2008**, *32*, 487–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Fukuwatari, T.; Kuzuya, M.; Satoh, S.; Shibata, K. Effects of excess vitamin b1 or vitamin b2 on growth and urinary excretion of water-soluble vitamins in weaning rats. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **2009**, *50*, 70–74. [[CrossRef](#)]
76. Oettel, H.; Frohberg, H.; Nothdurft, H.; Wilhelm, G. Die prüfung einiger synthetischer farbstoffe auf ihre eignung zur lebensmittelfärbung. *Arch. Toxicol.* **1965**, *21*, 9–29.
77. Borzelleca, J.; Hogan, G. Chronic toxicity/carcinogenicity study of fd & c blue no. 2 in mice. *Food Chem. Toxicol.* **1985**, *23*, 719–722. [[PubMed](#)]
78. Borzelleca, J.; Hallagan, J. Lifetime toxicity/carcinogenicity study of fd & c red no. 3 (erythrosine) in mice. *Food Chem. Toxicol.* **1987**, *25*, 735–737. [[PubMed](#)]
79. Tsujita, J. Comparison of protective activity of dietary fiber against the toxicities of various food colors in rats. *Nutr. Rep. Int.* **1979**, *20*, 635–642.
80. Hansen, W.; Fitzhugh, O.; Nelson, A.; Davis, K. Chronic toxicity of two food colors, brilliant blue fcf and indigotine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1966**, *8*, 29–36. [[CrossRef](#)]
81. Scotter, M.; Castle, L. Chemical interactions between additives in foodstuffs: A review. *Food Addit. Contam.* **2004**, *21*, 93–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Maekawa, A.; Matsuoka, C.; Onodera, H.; Tanigawa, H.; Furuta, K.; Kanno, J.; Jang, J.; Hayashi, Y.; Ogiu, T. Lack of carcinogenicity of tartrazine (fd & c yellow no. 5) in the f344 rat. *Food Chem. Toxicol.* **1987**, *25*, 891–896.
83. Moutinho, I.; Bertges, L.; Assis, R. Prolonged use of the food dye tartrazine (fd&c yellow n° 5) and its effects on the gastric mucosa of wistar rats. *Braz. J. Biol.* **2007**, *67*, 141–145.
84. Ford, G.; Gopal, T.; Grant, D.; Gaunt, I.; Evans, J.; Butler, W. Chronic toxicity/carcinogenicity study of carmine of cochineal in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **1987**, *25*, 897–902. [[CrossRef](#)]
85. Hiasa, Y.; Ohshima, M.; Kitahori, Y.; Konishi, N.; Shimoyama, T.; Sakaguchi, Y.; Hashimoto, H.; Minami, S.; Kato, Y. The promoting effects of food dyes, erythrosine (red 3) and rose bengal b (red 105), on thyroid tumors in partially thyroidectomized n-bis (2-hydroxypropyl)-nitrosamine-treated rats. *Jpn. J. Cancer Res.* **1988**, *79*, 314–319. [[CrossRef](#)]
86. Collins, T.; Long, E. Effects of chronic oral administration of erythrosine in the mongolian gerbil. *Food Cosmet. Toxicol.* **1976**, *14*, 233–248. [[CrossRef](#)]
87. Masannat, Y.A.; Hanby, A.; Horgan, K.; Hardie, L.J. DNA damaging effects of the dyes used in sentinel node biopsy: Possible implications for clinical practice. *J. Surg. Res.* **2009**, *154*, 234–238. [[CrossRef](#)]
88. Davies, J.; Burke, D.; Olliver, J.; Hardie, L.; Wild, C.; Routledge, M. *The Induction of DNA Damage by Methylene Blue but Not by Indigo Carmine in Human Colonocytes In Vitro and In Vivo, Mutagenesis*; Oxford Univ Press Great Clarendon St: Oxford, UK, 2006.
89. Tsuda, S.; Murakami, M.; Matsusaka, N.; Kano, K.; Taniguchi, K.; Sasaki, Y.F. DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicol. Sci.* **2001**, *61*, 92–99. [[CrossRef](#)]
90. Durnev, A.; Oreshchenko, A.; Kulakova, A. Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Vopr. Meditsinskoi khimii* **1995**, *41*, 50–53.
91. Miyachi, T.; Tsutsui, T. Ability of 13 chemical agents used in dental practice to induce sister-chromatid exchanges in syrian hamster embryo cells. *Odontology* **2005**, *93*, 24–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Bhargav, D.; Singh, M.P.; Murthy, R.C.; Mathur, N.; Misra, D.; Saxena, D.K.; Chowdhuri, D.K. Toxic potential of municipal solid waste leachates in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacz): Hsp70 as a marker of cellular damage. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2008**, *69*, 233–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

93. Coulom, H.; Birman, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 10993–10998. [[CrossRef](#)]
94. Dean, B.J. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **1985**, *154*, 153–181. [[CrossRef](#)]
95. Hosamani, R. Acute exposure of *Drosophila melanogaster* to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2013**, *83*, 25–40. [[CrossRef](#)]
96. Siddique, Y.H.; Fatima, A.; Jyoti, S.; Naz, F.; Khan, W.; Singh, B.R.; Naqvi, A.H. Evaluation of the toxic potential of graphene copper nanocomposite (gcnc) in the third instar larvae of transgenic *rDrosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) bg 9. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80944. [[CrossRef](#)]
97. Lloyd, T.E.; Taylor, J.P. Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, *1184*. [[CrossRef](#)]
98. Collins, S.J. The hl-60 promyelocytic leukemia cell line: Proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* **1987**, *70*, 1233–1244. [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



UNIVERSIDAD DE CORDOBA