



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA Y  
SU INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD ALIMENTARIA DE *Cyprinus  
carpio*”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:  
GERARDO HEREDIA GARCÍA

DIRIGIDA POR  
DR. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA  
DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN  
DRA. HARIZ ISLAS FLORES



TOLUCA, MÉXICO, JULIO DE 2019

## ÍNDICE GENERAL

	Pág
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
I. MARCO TEÓRICO	2
1.1 El agua y contaminación	2
1.2 Contaminantes emergentes	3
1.3 Edulcorantes	4
1.4 Sucralosa	6
1.4.1 Transformaciones bióticas y abióticas de la sucralosa	7
1.4.2 Presencia y estudios de sucralosa	8
1.4.3 Concentración ambiental prevista y concentración prevista sin efecto	10
1.5 Bioindicador	11
1.6 Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	11
1.6.1 Hábitat y desarrollo de carpa común	11
1.6.2 Rasgos biológicos	12
1.6.3 Importancia comercial de <i>Cyprinus carpio</i> en México	12
1.6.4 Composición nutrimental de la carpa <i>Cyprinus carpio</i>	13
1.7 Genotoxicidad y citotoxicidad	15
1.8 Propiedades funcionales de las proteínas en músculo de pescado	18
1.8.1 Solubilidad	18
1.8.2 Propiedades gelificantes	19
1.8.3 Capacidad de retención de agua	20
1.8.4 Perfil de textura	21
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	27
2.1 Sustancia de prueba	27
2.2 Obtención y mantenimiento de <i>Cyprinus carpio</i>	27
2.3 Diseño experimental	27
2.4 Ensayo para evaluar el daño al ADN	28
2.4.1 Electroforesis unicelular en gel (Ensayo cometa)	28
2.4.2 Ensayo de micronúcleos	29

2.5	Ensayos para evaluar la apoptosis	29
2.5.1	Actividad de caspasa-3	29
2.5.1.1	Preparación del extracto celular	29
2.5.1.2	Ensayo colorimétrico	30
2.5.2	Ensayo de TUNEL	30
2.6	Ensayos para determinar la calidad alimentaria de <i>Cyprinus carpio</i>	31
2.6.1	Medición de Ph	31
2.6.2	Capacidad de retención de agua (CRA)	31
2.6.3	Solubilidad	31
2.6.4	Determinación de grupos sulfhídrido	32
2.6.5	Identificación de proteínas, concentración de proteína	32
2.7	Determinación de SUC en agua y plasma de carpa común	33
2.8	Análisis estadístico	34
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
3.1	Resultados de alteraciones al ADN	35
3.1.1	Ensayo cometa	35
3.1.2	Prueba de micronúcleos en sangre de <i>C. carpio</i> expuesta a SUC	36
3.2	Resultados de apoptosis en células sanguíneas de <i>C. carpio</i> expuesta a SUC	37
3.2.1	Resultados de actividad de caspasa 3 en sangre de <i>C. carpio</i> expuesta a SUC	37
3.2.2	Resultados de la prueba de TUNEL en sangre de <i>C. carpio</i> expuesta a SUC	38
3.3	Resultados de pruebas fisicoquímicas en músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	39
3.3.1	Determinación de pH	39
3.3.2	Solubilidad	39
3.3.3	Determinación de grupos sulfhídrido	40
3.3.4	Capacidad de retención de agua	41
3.2.4	Análisis de textura (TPA)	41
3.4	Discusión	43
IV	CONCLUSIONES	50
V	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
VI	ANEXOS	56

## INDICE DE FIGURAS

	Pág
1. Estructura química de la sucralosa (4-cloro-4-desoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosido de 1,6-dicloro-1,6-didesoxi- $\beta$ -D-fructofuranósilo).	7
2. Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	12
3. Curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron	21
4. Determinación del daño al ADN mediante ensayo cometa en células sanguíneas de <i>Cyprinus carpio</i>	35
5. Frecuencia de micronúcleos en células sanguíneas de <i>Cyprinus carpio</i>	36
6. Actividad de caspasa-3 en células sanguíneas de <i>Cyprinus carpio</i>	37
7. Porcentaje de células TUNEL-positivas en células sanguíneas de <i>Cyprinus carpio</i>	38
8. Determinación de pH en músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	39
9. Comportamiento de la solubilidad en músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	40
10. Contenido de grupos sulfhídricos en músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	40
11. Porcentaje de capacidad de retención de agua en músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	41

## INDICE DE TABLAS

	Pág
1. Clasificación de edulcorantes	4
2. Composición química de la carpa en 100g de porción comestible	13
3. Propiedades funcionales de las proteínas	18
4. Análisis de perfil de textura en músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	42

## RESUMEN

La ocurrencia de la sucralosa (SUC) ha sido demostrada mediante la determinación de concentraciones en agua que van desde ng/L hasta µg/L. Un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación demostró que la SUC, es capaz de inducir estrés oxidativo en *Cyprinus carpio* a concentraciones ambientalmente relevantes. Con los antecedentes previamente expuestos, el propósito de esta investigación fue evaluar si este edulcorante es capaz de inducir alteraciones al ADN y apoptosis en sangre de *C. carpio*, así como observar su relación en la calidad alimentaria de este organismo. Se expuso a *Cyprinus carpio* a concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa (0.05 y 155 µg/L) a diferentes tiempos (12, 24, 48, 72 y 96 horas). Al tiempo de 72 h se produjo un aumento en el número de células micronucleadas (MN) y células anormales (ensayo cometa); mientras que al tiempo de 96 h se observó una mayor actividad de caspasa-3 y un incremento de cuerpos apoptóticos (ensayo de TUNEL) respecto al control. Al evaluar la calidad alimentaria se observaron cambios significativos con respecto al control en pH, acidez, solubilidad, capacidad de retención de agua (CRA) y formación de grupos sulfhídrido, viéndose afectados también los parámetros de textura. Finalmente se observó una correlación entre los biomarcadores de daño al ADN y apoptosis y los biomarcadores para evaluar la calidad alimentaria. Con los datos obtenidos podemos concluir que la SUC a concentraciones ambientalmente relevantes, fue capaz de generar alteraciones al ADN y apoptosis en carpa común y afectar la calidad alimentaria de este organismo.

## ABSTRACT

The occurrence of sucralose (SUC) has been demonstrated by determining concentrations in water ranging from ng/L to µg/L. A previous study conducted by our research group showed that SUC is able to induce oxidative stress in *Cyprinus carpio* at environmentally relevant concentrations. With the previously exposed antecedents, the purpose of this investigation was to evaluate if this sweetener is able to induce alterations to the DNA and apoptosis in blood of *C. carpio*, as well as to observe its relation in the alimentary quality of this organism. *Cyprinus carpio* was exposed to environmentally relevant concentrations of sucralose (0.05 and 155 µg/L) at different times (12, 24, 48, 72 and 96 hours). At the time of 72 h there was an increase in the number of micronucleated cells (MN) and abnormal cells (comet assay); while at the time of 96 h, an increased caspase-3 activity and an increase in apoptotic bodies (TUNEL test) were observed with respect to the control. When evaluating the food quality, significant changes were observed with respect to the control in pH, acidity, solubility, water retention capacity (CRA) and formation of sulfhydryl groups, also affecting the texture parameters. Finally, a correlation was observed between biomarkers of DNA damage and apoptosis and biomarkers to assess food quality. With the data obtained we can conclude that the SUC at environmentally relevant concentrations, was able to generate alterations to DNA and apoptosis in common carp and affect the food quality of this organism.

## INTRODUCCIÓN

El agua es esencial para el desarrollo de la vida ya que interviene en los procesos biológicos de los organismos y se emplea en las actividades antropogénicas como la agricultura, la producción industrial y la generación de energía, estando sujeta a cambios provocados por estas actividades (Bossingham et al., 2005).

La contaminación de los efluentes naturales terrestres y subterráneos con diferentes especies químicas bioacumulables ha causado un desequilibrio ecológico notable, como es el uso de endulzantes artificiales, si bien el uso y consumo de estos se encuentra regulado, no existe un claro estudio de su comportamiento sobre los ecosistemas acuáticos. El alto uso de éstos ha sido tomado en cuenta como un potencial contaminante debido a sus múltiples usos en alimentos, medicamentos y productos sanitarios y ha sido considerado como un contaminante emergente, como consecuencia han sido introducidos al medio ambiente por diversas vías, afectando la vida acuática (Zuccato et al., 2005).

Los edulcorantes artificiales son utilizados como sustitutos de azúcar en cantidades considerables y cada vez más en los alimentos y bebidas, especialmente para aquellas personas que son diabéticas o padecen obesidad (Weihrauch y Diehl, 2004). Ziye (2013), estudió la presencia de los edulcorantes artificiales como: acesulfame, ciclamato, sacarina y sucralosa, en un sistema de costa abierta encontrando una concentración de esta última que va de 0.05 a 155 µg/L, observando que la sucralosa es uno de los productos más persistentes a la fotodegradación afectando de esta manera los ecosistemas acuáticos. La presencia y efecto de estos xenobióticos pueden ser evaluados a través de la determinación del estrés oxidativo (Ron van der Oost et al., 2003). Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (EROs) están involucradas en los procesos de daño a nivel genético, no solo porque son capaces de interactuar de manera directa sobre el ADN, sino también porque afectan la transducción de señales, la proliferación celular y la comunicación intercelular (Medeiros, 2008).

Se ha visto en estudios previos que la sucralosa es capaz de provocar estrés oxidativo en especies acuáticas, por lo que es posible que pueda observarse un daño a nivel genético y celular.

El objetivo de estudio de este trabajo fue determinar la toxicidad producida por sucralosa usando como bioindicador a *Cyprinus carpio* a través de biomarcadores de daño genético y celular, y la determinación de las propiedades fisicoquímicas y texturales en el músculo de esta especie.

## **I. MARCO TEÓRICO**

### **1.1. El agua y contaminación**

El agua es considerada como fuente de vida debido a que es esencial en los procesos biológicos, además es importante en la alimentación, higiene y actividades humanas. (Bossingham et al., 2005).

Los ecosistemas acuáticos mantienen una gran diversidad de organismos, incluso mayor a los terrestres, por lo que los impactos como la contaminación inducen a cambios en la estructura de las comunidades, la función biológica de los sistemas acuáticos y al propio organismo, afectando a su ciclo de vida, crecimiento y su condición reproductiva (Bartram y Ballance, 1996 citado en Vázquez et al., 2006).

Los peces son considerados buenos indicadores de la calidad del medio por lo que una gran diversidad y abundancia de peces, indica que es un ambiente sano para todas las demás formas de vida (De la lanza, 2000).

El desarrollo de la sociedad conlleva al incremento de la actividad industrial y, por consiguiente, a la creación de una gran cantidad de sustancias químicas contaminantes como plaguicidas, hidrocarburos, productos para cuidado personal, alcoholes, detergentes, fármacos y desechos orgánicos, teniendo como destino final los cuerpos de agua pudiendo causar un impacto sobre las especies acuáticas (Zuccato et al., 2005). Los desechos orgánicos como los edulcorantes no han sido ampliamente estudiados dentro de

un ecosistema y es de interés conocer su comportamiento y efecto sobre los organismos que habitan en el mismo.

## **1.2. Contaminantes emergentes**

El término de contaminantes emergentes (CE) generalmente se utiliza para referirse a compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medio ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración, por lo que pasan inadvertidos; no obstante, ahora están siendo ampliamente detectados y tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud (Barceló et al., 2007; Stuart et al., 2012). Una característica de estos contaminantes es que no necesitan ser persistentes para causar un efecto adverso sobre las especies, ya que, su entrada al ambiente se da de forma continua (Barceló et al., 2007).

Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial, de los residuos de las plantas de tratamiento, de los efluentes hospitalarios, de las actividades agrícolas y ganaderas y de los tanques sépticos, los cuales contienen un gran número de componentes orgánicos específicos y las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos; motivo de preocupación científica y para las entidades ambientales reguladoras.

Los contaminantes emergentes comprenden una amplia gama de compuestos químicos, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, agentes tensoactivos, plastificantes y aditivos industriales, que no están incluidos en el monitoreo actual de programas de tratamiento de aguas; también incluyen la síntesis de nuevos compuestos químicos o cambios en el uso y disposición de los productos químicos ya existentes, de los cuales existe una limitada información disponible sobre el efecto que puede causar en la salud humana y en la ecología. Por estas razones, la mayoría de las nuevas investigaciones han centrado sus estudios en la aparición de estos contaminantes orgánicos en aguas superficiales, como las utilizadas en actividades domésticas, que luego reciben tratamiento químico; en aguas de arroyos; aguas residuales con tratamiento biológico, y

en agua potable (de consumo humano), entre otras, ya que estas son más susceptibles de contener concentraciones mayores de contaminantes emergentes que las aguas subterráneas.

### 1.3. Edulcorantes

Los edulcorantes, hacen referencia a aquellos aditivos alimentarios que son capaces de igualar el sabor dulce del azúcar y que, adicionalmente, aportan menor energía. Algunos de ellos son extractos naturales mientras que otros son sintéticos, en este último caso se denominan edulcorantes artificiales (García-Almeida et al., 2013).

Los edulcorantes son definidos como aditivos alimentarios, que son usados en todo el mundo como sustitutos de azúcar en comidas, bebidas, y también en medicamentos o productos sanitarios como la pasta dental (Kroger et al., 2006; Zygler et al., 2009). A su vez estos edulcorantes también son usados como tratamiento para la obesidad, mantener el peso corporal, control de la diabetes y para prevenir la caries dental (Bassoli et al., 2003; Yebra et al., 2005). En la tabla 1 se observa la clasificación de los edulcorantes.

**Tabla 1.** Clasificación de edulcorantes

<b>Calóricos</b>	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa y trehalosa, tagatosa
		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco, jarabe de sorgo
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alto fructosa, caramelo, azúcar invertido
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol, maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol
	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías	Luo Han Guo, stevia, taumatina, pentadina, monelina, brazzeína

<b>No calóricos</b>	Artificiales	Edulcorantes artificiales	Aspartamo, sucralosa, sacarina, neotamo, acesulfame K, ciclamato, neohesperidina DC, alitamo, advantamo
---------------------	--------------	---------------------------	---

Fuente: FDA (2014)

Los edulcorantes artificiales son altamente consumidos, particularmente en E.E.U.U, con un incremento de las tendencias de consumo, especialmente después de la introducción de la sucralosa en 1998. El mercado global de endulzantes artificiales alcanza los \$5.1 billones, de los cuales E.U y Europa actualmente representan un 65% (Bennett, 2008).

En México la producción total de edulcorantes alcanzó la cifra de 6.1 millones de toneladas en este último año, según datos de la CONADESUCA (2011) y la SAGARPA (2017) el consumo de edulcorantes artificiales ha crecido en un 10.7% anual y ocupan un consumo del 5.5%. Estos productos se han incrementado en los últimos años a una tasa mayor que el consumo de azúcar, logrando consolidarse en más de un cuarto del mercado de edulcorantes en México. Lo anterior, también resulta apegado al comportamiento internacional del mercado de edulcorantes; es decir, una gradual penetración y consolidación del jarabe de maíz rico en fructosa en el mercado que antes ocupaba el azúcar. Lo anterior, se caracteriza como un proceso prácticamente irreversible, dado que los niveles de consumo de azúcar no han logrado volver a ocupar su participación en el mercado de edulcorantes.

Los edulcorantes artificiales más conocidos son: aspartame, neotame, acesulfame, sacarina, ciclamato, sucralosa y neoespiridina dihidrocalcona. De esta variedad de endulzantes solo el acesulfame, sacarina, ciclamato y sucralosa han sido estudiados en cuerpos de agua (Lange et al., 2012).

Los edulcorantes artificiales se producen, consumen y se liberan en el medio ambiente en cantidades considerables y han sido recientemente identificados como contaminantes emergentes (Kokotou et al., 2012; Lange et al., 2012). Después de la ingesta un alto porcentaje de estos edulcorantes, pasan a través del cuerpo humano sin ser alterados

(Renwick, 1986; Roberts et al., 2000) depositándose en cuerpos de agua. Varios estudios de concentraciones en el medio ambiente han mostrado la amplia distribución de acesulfame, ciclamato, sacarina y sucralosa en el ciclo del agua (Van Stempvoort et al., 2011).

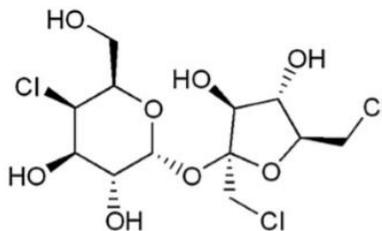
Aunque desde el principio de su uso ha habido controversias sobre su riesgo como carcinógenos potenciales (Weihrauch and Diehl, 2004), estos compuestos endulzantes son generalmente considerados como seguros para su uso en alimentos (Cohen et al., 2008). Además, debido a que estos compuestos son metabólicamente inertes en el cuerpo humano se ha creído que también son inertes en el medio ambiente. Sin embargo en años recientes la preocupación está cambiando de preocupaciones a la salud a preocupaciones de los ecosistemas (Sang et al., 2014).

La excreción después del consumo humano es indudablemente una fuente importante de edulcorantes artificiales en el medio ambiente, pero seguramente no es la única (Kokotou et al., 2012). De los hogares y las industrias, todos los edulcorantes artificiales entran en plantas de tratamiento de aguas residuales, donde en la mayoría de los casos pasan sin ningún cambio a través de estos procesos, por lo que eventualmente residen en cuerpos de agua (Houtman, 2010). En adición por las descargas directas de las industrias, hogares, actividades agrícolas cargan las superficies de agua con estos edulcorantes (Houtman, 2010).

#### **1.4. Sucralosa**

La sucralosa ( $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$ ) (Figura 1), se obtiene del azúcar a través de un proceso de elaboración patentado, mediante el cual se sustituyen selectivamente tres grupos hidroxilo de la molécula de azúcar con tres átomos de cloro, del cual se obtiene 4-cloro-4-desoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosido de 1,6-dicloro-1,6-didesoxi- $\beta$ -D-fructofuranósilo (Mortensen, 2006). La presencia de cloro en la sucralosa produce un edulcorante que no tiene energía, pero que es 600 veces más dulce que el azúcar. En apariencia es un polvo blanco, sin olor, termoestable y de pH neutro. Tiene un claro sabor dulce, rápidamente perceptible, que no deja un sabor desagradable. Asimismo, la sucralosa retiene su sabor

dulce durante todos los procesos de fabricación de alimentos y bebidas, y esto permite que se utilice prácticamente en cualquier actividad en que se emplea el azúcar, incluyendo cocinar y hornear (Grotz et al., 2009).



**Figura1.** Estructura química de la sucralosa (4-cloro-4-desoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosido de 1,6-dicloro-1,6-didesoxi- $\beta$ -D-fructofuranósilo). Fuente: Sánchez (2013).

Fórmula química: C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

Peso molecular: 397.633 mol/g

pKa= 11.91

Solubilidad en agua: 12.9 mg/mL

El organismo no utiliza la sucralosa para obtener energía, por lo que pasa rápidamente a través del cuerpo prácticamente inalterada, la mayoría de la ingesta oral de sucralosa es excretada sin cambio aparente del compuesto, con menos del 1% de la dosis oral original, excretada como dos glucoronidos (Sims et al., 2000). La sucralosa ha sido sometida a extensas pruebas durante un período de 20 años y se ha comprobado que es segura y un ingrediente inerte. Puede parecer un extraño compuesto para ser incluido como un contaminante emergente, pero ahora se encuentra en aguas ambientales y es extremadamente persistente (Richardson, 2010).

#### **1.4.1. Transformaciones bióticas y abióticas de la sucralosa**

Después de la ingesta de sucralosa, esta es excretada de forma inalterada. Debido a la estabilidad conferida por los grupos cloro en su estructura, es un compuesto persistente para las enzimas glucosídicas que normalmente degradan a los carbohidratos en el

intestino (EC, 2000). Únicamente dos metabolitos polares han sido tentativamente identificados, lo que significa no más del 10% de la sucralosa total administrada de forma oral. Dichos metabolitos fueron identificados en perro, ratón y el hombre sin diferencias significativas entre especies, mientras que no fueron identificadas en conejo (John et al., 2000; Roberts et al., 2000; Wood et al., 2000). En el estudio de Grice y Goldsmith (2000) no encontraron señales de dechloración después de ser ingerida. Se encontró que los metabolitos fueron aún más polares que la molécula original, dichos compuestos fueron identificados como 4-cloro-4-desoxi-galactosa (4-CG) y 1,6-dicloro-1,6-didesoxifruktosa (1,5-DCF), ambos productos de la hidrólisis del edulcorante (NICNAS, 2001) ambos metabolitos presentan características de glucurónidos de SUC. Roberts et al. (2000) observaron una pronunciada termolabilidad de uno de los metabolitos encontrados en humanos con la técnica de espectrometría de masas en termospray; en test de incubación la hidrólisis de la sucralosa ocurrió rápidamente, concluyendo que este metabolito de SUC es un monoglucurónido con sustitución en la posición de uno de los cuatro hidroxilos secundarios debido a que el compuesto es fácilmente hidrolizado y la sustitución en una única posición primaria habría resultado en un metabolito más estable, asimismo, en experimentos con perros administrados con SUC de forma oral e intravenosa el segundo metabolito fue tentativamente identificado mediante experimentos de fragmentación iónica, este segundo metabolito es probablemente un glucurónido de SUC generado a partir de la conjugación con ácido glucurónico en la posición 6 del residuo 4-CG de la sucralosa, todo esto se comprobó al utilizar un estándar que el metabolito potencial sucralosa-6-ácido carboxílico no se forma.

#### **1.4.2. Presencia y estudios de sucralosa**

La sucralosa es considerada segura para el consumo humano (la ingesta diaria recomendada de sucralosa es de 5 mg/kg de peso corporal por día) (Brusick et al., 2010; Grotz and Munro, 2009), pero sus efectos en los ecosistemas no han sido estudiados a profundidad, ya que se dispone de datos ecotoxicológicos limitados.

La sucralosa ha sido detectada en una gran variedad de ecosistemas acuáticos. Un estudio sueco informó que las concentraciones de sucralosa en el efluente tratado eran de  $\leq 11$   $\mu\text{g/L}$ , mientras que las concentraciones de agua superficial fueron de  $\leq 3.6$   $\mu\text{g/L}$  (Brorstrom-Lunden et al., 2008). Otros estudios han medido la sucralosa en efluentes de aguas superficiales a concentraciones de  $\leq 2.5$   $\mu\text{g/L}$  (Ferrer and Thurman, 2010). 120 muestras fueron tomadas de ríos en 27 países de Europa y se encontró arriba de 1  $\mu\text{g/L}$  de sucralosa (Richardson and Ternes, 2011). En el estudio realizado por Lillicrap (2011) se evaluó el riesgo de la sucralosa como un compuesto que conduce a una bioacumulación sobre tres organismos de agua dulce; el alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), el crustáceo (*Daphnia magna*) y el pez cebra (*Danio rerio*). Las pruebas del alga y el crustáceo se realizaron en sistemas cerrados durante 48 horas y la prueba sobre el pez cebra se realizó durante 48 h en un sistema semi estático, a concentraciones de (10 y 100 mg/L), el estudio mostró un factor de bioacumulación considerablemente bajo, concluyendo que la sucralosa no se bioacumula a diferentes niveles de la red alimentaria.

En el estudio de Huggett y Stoddard (2011) en el que observaron los efectos de la sucralosa sobre la supervivencia, crecimiento y reproducción de *Daphnia magna* y *Americamysis bahia*, llegaron a la conclusión de que las concentraciones de sucralosa detectadas en el medio ambiente están muy por debajo de la requerida para provocar efectos crónicos en agua dulce o cuerpos de agua marinos. Sin embargo, en otro estudio sobre crustáceos mostró por primera vez que la exposición a la sucralosa (0.0001-5 mg/L) podría afectar la fisiología y movilidad de los organismos. Estos autores sugieren que la exposición a la sucralosa puede inducir mecanismos neurológicos y oxidativos con consecuencias potencialmente importantes para el comportamiento y la fisiología de *D. magna* (Eriksson-Wiklund et al., 2014).

Mientras que en el estudio de Saucedo-Vence (2016) en el que se utilizó la especie *Cyprinus carpio* para la evaluación de estrés oxidativo y bioacumulación se realizaron estudios en: sangre, cerebro, hígado, branquias y músculo. Los organismos fueron expuestos a dos concentraciones de sucralosa (0.05  $\mu\text{g/L}$  y 155  $\mu\text{g/L}$ ) durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Se observó acumulación de sucralosa en todos los órganos y tejidos

expuestos en ambas concentraciones pero se concluyó que estas concentraciones no tienen un valor significativo de acumulación. Por otro lado se menciona que la sucralosa modificó el nivel normal de enzimas antioxidantes, induciendo daño oxidativo en lípidos y proteínas de *Cyprinus carpio*, los órganos que mostraron más daño fueron las branquias, músculo, cerebro e hígado en orden decreciente, y la sangre fue el único tejido con efectos despreciables.

Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) están involucradas en los procesos de daño a nivel genético, no solo porque son capaces de interactuar de manera directa sobre el ADN, sino también porque afectan la transducción de señales, la proliferación celular y la comunicación intercelular (Medeiros, 2008). También el daño al ADN induce la expresión de la proteína p53, generando apoptosis o muerte celular. Por lo antes mencionado es posible inducir genotoxicidad a especies en las que se genere estrés oxidativo.

#### **1.4.3. Concentración ambiental prevista y Concentración prevista sin efecto**

Basado en la medición de los datos reportados en aguas superficiales se determinó que la Concentración Ambiental Prevista (Predicted environmental concentration, PEC) de la sucralosa es de 10 µg/L (Tollefsen et al., 2012).

En términos de evaluación del riesgo tradicional, la concentración prevista sin efecto propuesta para organismos acuáticos (PNEC) ha sido determinada en 0.93 mg/L, basado en la concentración de efecto no observado (NOEC) de un estudio de toxicidad crónica con camarón mysida y con la aplicación de un valor de seguridad de 100 (Tollefsen et al., 2012).

Se determinó que el cociente resultante de PEC/PNEC es claramente menor de 1 (PEC/PNEC=0.08), indicando de este modo un riesgo al medio ambiente limitado utilizando enfoques tradicionales de evaluación de riesgo toxicológico (Tollefsen et al., 2012).

## **1.5. Bioindicador**

Las especies bioindicadoras se definen como aquellas que por sus características (sensibilidad a las perturbaciones ambientales, distribución, abundancia, dispersión, éxito reproductivo, entre otras) pueden ser usadas como estimadoras del estatus de otras especies o condiciones ambientales de interés que resultan difíciles, inconvenientes o costosas de medir directamente (Heink y Kowarik 2010). A partir de esta definición se puede fácilmente derivar que no cualquier taxón puede ser un bioindicador. Para ello, deben ser:

- 1) Estenoicos, es decir, con una tolerancia reducida respecto a uno o más factores ambientales porque de ser muy resistentes, los daños causados por los estresores pasarían desapercibidos.
- 2) Aportar información biológicamente relevante; en otras palabras, mediante sus respuestas debe ser posible discriminar entre las perturbaciones en el medio ambiente y las variaciones naturales (Holt y Miller 2011).

## **1.6. Carpa común *Cyprinus carpio***

### **1.6.1. Habitat y desarrollo de carpa común**

La FAO reporta que la carpa común silvestre vive en las corrientes medias y bajas de los ríos, en áreas inundadas y en aguas confinadas poco profundas, tales como lagos, meandros y embalses de agua. La gama de pH óptimo es de 5-9. La especie puede sobrevivir bajas concentraciones de oxígeno (0.3-0.5 mg/L) así como súper saturación. Las carpas son omnívoras, con una gran tendencia hacia el consumo de alimento animal, tal como insectos acuáticos, larvas de insectos, gusanos, moluscos y zooplancton. El crecimiento diario de la carpa puede llegar a ser 2 a 4 por ciento del peso corporal. Las carpas pueden alcanzar 0,6 a 1,0 kg de peso corporal dentro de una estación en los estanques de cría de peces en policultivo de áreas subtropicales/tropicales. El crecimiento es mucho más lento en la zona temperada: ahí los peces alcanzan pesos corporales de 1 a 2 kg después de dos a cuatro estaciones de crianza.

El desarrollo embrionario de la carpa común demora alrededor de tres días a 20-23 °C (60-70 grados-días). Bajo condiciones naturales, los peces eclosionados se pegan al sustrato. Alrededor de tres días después de la eclosión se desarrolla la parte posterior de la vejiga natatoria, las larvas nadan horizontalmente y comienzan a consumir alimento externo con un tamaño máximo de 150-180  $\mu\text{m}$  (principalmente rotíferos).

### **1.6.2. Rasgos biológicos**

La carpa *Cyprinus carpio*, se caracteriza por poseer cuerpo alargado y algo comprimido. Labios gruesos. Dos pares de barbillas en el ángulo de la boca, las más cortas sobre el labio superior. Base de la aleta dorsal larga con 17-22 rayos ramificados y una espina dorsal fuerte y dentada en el frente; contorno de la aleta dorsal cóncavo anteriormente. Aleta anal con 6-7 rayos blandos; borde posterior de la 3ª espina de las aletas dorsal y anal con espínulas filudas. Línea lateral con 32 a 38 escamas. Dientes faríngeos 5:5, dientes con coronas aplanadas. Color variable, las carpas silvestres son de color parduzco verdoso sobre el dorso y parte superior de los costados, con tonalidad amarillodorada ventralmente (Camarero, 2006). Las aletas son oscuras, ventralmente con un matiz rojizo, como puede apreciarse en la figura 2.



**Figura 2.** Carpa común *Cyprinus carpio*

### **1.6.3. Importancia comercial de *Cyprinus carpio* en México**

En México, el cultivo de carpa tiene gran importancia porque el manejo de su cultivo es sencillo, económico y de gran impacto social; independientemente de que el 78% de la superficie de los cuerpos de agua epicontinentales reúnen las características limnológicas

adecuadas en donde se han creado importantes pesquerías que basan su producción en la explotación semi intensiva de carpas, dentro de las cuales la especie *Cyprinus carpio* es la más abundante (Aragones, 1995). En el 2009, la carpa común ocupó en la producción pesquera nacional el 17° lugar, mientras que en el Estado de México la carpa es una de las principales especies que se producen (CONAPESCA, 2009).

#### 1.6.4. Composición nutrimental de la carpa *Cyprinus carpio*

La carpa presenta un contenido graso de algo más de 5 g/100 g de porción comestible, por lo que se engloba dentro del grupo de pescados semigrasos; además de poseer proteínas de alto valor biológico. Su contenido vitamínico (algunas del complejo B: B2, B6, B12 y Vitamina E) representa cantidades poco significativas; sin embargo, la vitamina A está presente en cantidades destacadas en relación con el resto de pescados. En cuanto a los minerales, la carpa es uno de los pescados más ricos en hierro, aunque su valor se encuentra por debajo del que contienen las carnes. En relación con el fósforo, es el pescado más rico en este mineral, sólo por debajo del pez espada. En la Tabla 2 se puede ver reducidamente la composición nutrimental de la carpa (Miranda, 2011).

**Tabla 2.** Composición química de la carpa en 100g de porción comestible

<b>Composición</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Humedad	77.7
Proteína	15.1
Grasa	4.2
Cenizas	1.2

Fuente: Miranda (2011)

El músculo de pescado puede ser de dos tipos: rojo y blanco; ambos son parecidos en composición, pero el músculo rojo tiene un mayor contenido de hemopigmentos, tales como la mioglobina para el transporte de oxígeno y más lípidos no estructurales para proveer energía, reflejando su papel en una fuerte actividad natatoria de especies como el atún o la caballa. El músculo rojo está situado a lo largo de los laterales del cuerpo, debajo de la piel, seguido por el músculo blanco.

Dependiendo su función y solubilidad, las proteínas del músculo del pescado se pueden dividir en tres grupos:

1. Proteínas estructurales (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), que constituyen el 65-80% de la proteína total, las cuales dan al músculo su estructura y actividad. Estas proteínas son solubles en disoluciones salinas de concentración superior a 0.3 M.
2. Proteínas sarcoplásmicas (mioalbúmina, globulina y enzimas), que son solubles en agua y se encuentran normalmente en el plasma de las células, constituyendo entre el 18-20% del total de proteínas musculares.
3. Proteínas del tejido conectivo (estroma), representan alrededor del 3-5% del total de las proteínas, son solubles en disoluciones salinas muy concentradas, o mediante la cocción.

La propia naturaleza de los diferentes tipos de músculo refleja su importancia en la elaboración de productos marinos. Las proteínas sarcoplásmicas, al ser muy solubles, no contribuyen a la formación de geles, a diferencia de las proteínas miofibrilares, que confieren la estructura de geles por acción del calor; mientras que las proteínas del estroma, que se solubilizan por calor, pueden ser componentes “inertes” en los productos finales (Estrada, 2005). De igual manera, el músculo de pescado, contiene un intervalo de 1-5 % de lípidos, del cual, el 90% son fosfolípidos. Los lípidos en los alimentos provenientes del mar, tienen significativamente niveles más altos de ácidos grasos omega-3.

El agua, principal componente de la fracción comestible de los peces, siendo mayor la retención de agua en el pescado fresco, pues durante la cocción se pierde aproximadamente un cuarto de humedad.

Posee Vitaminas y Nutrientos inorgánicos: vitaminas hidrosolubles, el complejo B y C; vitaminas liposolubles A, D, K y E (Estrada, 2005).

## 1.7. Genotoxicidad y citotoxicidad

El daño genético se define con mayor precisión en términos de lesiones estructurales específicas que se producen a lo largo del ADN. Existen tres clasificaciones principales de los daños:

1. La mutagénesis se refiere a mutaciones de un gen, que son cambios en la secuencia de ADN dentro de un gen
2. Clastogénesis refiere a los cambios en la estructura de los cromosomas, por lo general resulta en una ganancia, pérdida o reordenamiento de piezas cromosómicas
3. Aneuploidia se refiere a la ganancia o pérdida de cromosomas intactos (Houk, 1992).

Diversos contaminantes pueden causar lesiones al ADN de organismos acuáticos, dentro de las que se incluyen rupturas de cadena, daño en azúcares, modificaciones en las bases y entrecruzamientos, causando efectos adversos en la estabilidad del ecosistema, por lo que se han establecido diferentes métodos para evaluar alteraciones en el ADN:

a) El ensayo de cometa o electroforesis unicelular en gel es una técnica rápida y sensible en especies acuáticas ya que detecta un amplio espectro de lesiones en el ADN (Frenzilli et al, 2009).

b) El ensayo de micronúcleos (MN) es uno de los métodos más utilizados para medir los cambios cromosómicos estructurales y numéricos en diferentes sistemas in vitro e in vivo (Bolognesi and Cirillo, 2014). El daño cromosómico después de la replicación celular representa un efecto asociado con la exposición a productos químicos genotóxicos. El ensayo de MN puede ser realizado en cualquier población de células en proliferación (Bolognesi y Hayashi 2011).

La citotoxicidad es la evaluación in situ de la función celular en respuesta a una sustancia tóxica (Goguen and Kedersha, 1993). El daño al ADN induce la expresión de la proteína p53, la cual detiene el ciclo celular evitando la proliferación de células anormales, el

incremento de esta proteína provoca la expresión de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Bax y PUMA), las cuales tienen como blanco la mitocondria en donde se induce al citocromo C. Este compuesto sale de la mitocondria y activa la cascada de caspasas (Macip et al., 2003). Las caspasas son una familia de proteínas pertenecientes al grupo de las cistein-proteasas, mediadores esenciales de los procesos de apoptosis.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico, caracterizada por distintos cambios morfológicos, que incluyen condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular. La célula se rompe en pequeños fragmentos rodeados de membrana conocidos como “cuerpos apoptóticos”, los cuales son eliminados por fagocitosis, sin iniciar una respuesta inflamatoria (Kurokawa y Kornbluth, 2009).

Por lo anterior, uno de los métodos que se usan para la identificación de células en apoptosis es el marcaje in situ del ADN fragmentado o marcación de cortes terminales con dUTP-biotinilados mediada por TdT (técnica de TUNEL) (Formigari et al., 2007), la cual se basa en el marcaje de los extremos 3'OH libres generados durante la fragmentación del ADN en la muerte apoptótica, dicho marcaje se hace con nucleótidos acoplados a isocianato de fluoresceína (FITC), debido a la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) (Negoescu et al., 1997).

Los resultados obtenidos en relación con la geno y citotoxicidad son considerados como indicadores útiles de los efectos de los contaminantes sobre los ecosistemas acuáticos, ya que este tipo de efectos puede asociarse con trastornos orgánicos que pueden afectar a la fecundidad, la salud y el ciclo de vida de los organismos involucrados, y en el caso de organismos destinados al consumo disminuir su calidad alimentaria por dichos efectos (Theodorakis et al., 2000).

Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden interactuar con el ADN y eventualmente producir mutaciones. Para identificar compuestos genotóxicos, se emplean biomarcadores específicos en el ADN de organismos expuestos. Estos estudios forman parte de las investigaciones toxicológicas y

se les denominan “estudios especiales”. Su objetivo es correlacionar a los factores de riesgo y el incremento en el daño al ADN. La identificación de marcadores de genotoxicidad es útil para definir un estado de prepatogénesis, de vital importancia para la prevención. Si se induce un daño genético, este puede ser visualizado mediante técnicas citogenéticas o moleculares (Pastor, 2002).

Se puede decir que todo agente que provoque lesión celular originará enfermedad, si su acción es lo suficientemente extensa para abarcar un número grande de células. El daño casi siempre es precedido por una lesión inicial bioquímica, que afecta alguno de los sistemas básicos para la supervivencia de la célula, su destrucción o alteración funcional resultará en anormalidades en los tejidos, que a su vez integran órganos más o menos vitales, cuya función se verá deteriorada, el daño genético, por ejemplo, se traduce en modificaciones severas de la síntesis proteica (Vindas *et al.*, 2004).

La pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timina así como la ruptura de una de o dos hebras de ADN, son eventos que ocurren normalmente, siendo su tasa de producción muy baja pero continua (Hangsber, 2002). Sin embargo, dichos eventos pueden ser inducidos, elevando su tasa de producción por efecto de las ERO's. Ejemplo de ello es el radical hidroxilo (OH) que tiene gran reactividad y la capacidad de desunir átomos de hidrógeno de la molécula de DNA, así como unirse a las bases formando aductos (Koningsberg, 2008).

La heterogeneidad de la molécula del ADN permite al hidroxilo (\*OH) atacar tanto a las bases púricas o pirimídicas, y a la desoxirribosa generando rupturas en su cadena. El oxígeno O<sub>2</sub> es más selectivo e interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, siendo el producto principal la 8-hidroxiguanina; ésta a su vez puede unirse al OH, pudiendo ocasionar la ruptura de la hebra, puede hacer puentes de hidrogeno con una adenina en lugar de una citosina, o bien con una guanina en lugar de una timina. Otros radicales hidroxilo pueden reaccionar con uniones de azúcarfosfato de ADN causando lesiones, incluyendo sitios sin purinas, donde las bases han sido removidas, oxidación del azúcar o fragmentación de desoxirribosa (Valavanidis *et al.*, 2006).

## 1.8. Propiedades funcionales de las proteínas en músculo de pescado

Por lo general las proteínas tienen una gran influencia sobre los atributos sensoriales del alimento, por ejemplo: las propiedades texturales y organolépticas de los productos cárnicos dependen en buena medida de las proteínas musculares (miosina y actina). La funcionalidad de las proteínas alimentarias se define como aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el procesado, el almacenamiento, la preparación y el consumo (Vera, 2010).

En otras palabras, las propiedades funcionales de las proteínas para el procesado son atributos que, a concentración adecuada del componente respectivo o aditivos y en condiciones apropiadas, proveen de ciertas características deseables al producto. Estas propiedades de las proteínas son el resultado de su interacción con el disolvente que las rodea, iones, otras proteínas, sacáridos, y lípidos, y en fenómenos de superficie (Miranda, 2011). En la tabla 3 se muestran las propiedades funcionales de las proteínas.

**Tabla 3.** Propiedades funcionales de las proteínas

Interacciones de proteínas con		
Agua	Agua y proteínas	Lípidos o gases
Hinchamiento	Inducción de viscosidad	Capacidad de emulsificación
Rehidratación	Gelificación	Estabilidad de emulsificación
Retención de agua	Formación de fibras	Habilidad espumante
Solubilidad	Formación de masas	Estabilidad espumante

Fuente: Miranda (2011)

### 1.8.1. Solubilidad

Es una de las propiedades funcionales más importante en alimentos, ya sea para aumentarla o evitarla. Sin embargo, debido a su tamaño, las proteínas no forman soluciones en el sentido estricto, sino suspensiones o soles. En muchos casos, como en los productos emulsificados, la proteína debe ser soluble para ser funcional (Hall, 1996).

Los aminoácidos presentes en las cadenas proteicas van a determinar la solubilidad, debido a las interacciones energéticas que estos tienen dentro de la estructura. La superficie de una proteína soluble en agua está cubierta por aminoácidos polares que favorecen la interacción con el agua; las proteínas insolubles en agua tienen más grupos hidrofóbicos en la superficie (Creighton, 1993).

Las variables que pueden alterar la solubilidad de la proteína son: el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Estas variables afectan la solubilidad de las proteínas por que causan alteraciones en los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como en las interacciones presentes en la estructura molecular de la proteína (Miranda, 2011). La solubilidad de las proteínas se ve incrementada a temperaturas de entre 0 y 50°C.; sin embargo, al elevar la temperatura, se da un incremento de la energía cinética afectando las interacciones no covalentes que mantienen estable tanto las estructuras secundarias como terciarias de la proteína provocando con esto su desnaturalización, exponiendo los grupos hidrofóbicos que se encontraban en su interior los cuales interaccionan entre sí, provocando que se dé una disminución de la solubilidad y así precipitando (Miranda, 2011).

### **1.8.2. Propiedades gelificantes**

Un gel es un sistema coloidal donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida. Técnicamente se define como un sistema sustancialmente diluido que exhibe un flujo de estado no estacionario, está formado por un entrecruzamiento de gruesas moléculas (polímeros) reticuladas por las uniones transversales (enlaces covalentes o no covalentes) formando una red inmersa en un líquido. Esta propiedad depende de la interacción agua-proteína. En esta estructura, el líquido impide que la red se rompa y por otro parte, la red mantiene atrapado al líquido; por lo cual las proteínas no pueden moverse. Esta transformación se ve facilitada por el calor, las enzimas o los cationes divalentes, en condiciones adecuadas. El papel de polímero es asumido por las proteínas miofibrilares, y el del solvente por el agua y sales minerales (Bucharles *et al.*, 1991).

Las proteínas globulares con pesos moleculares menores a 23,000 Da, no pueden formar un gel inducido por tratamiento térmico, a ninguna concentración razonable de proteína a

no ser que contengan, por lo menos, un grupo sulfhídrico o un enlace disulfuro. El pH óptimo para la formación de geles es de 7-8, para la mayor parte de las proteínas (Fennema, 2010).

### **1.8.3. Capacidad de retención de agua**

La capacidad de retención de agua (CRA) se define como la facultad de la carne de conservar el agua que le es propia o el agua añadida, bajo el efecto de una tensión cualquiera (Bucharles *et al.*, 1991). El tejido muscular contiene un 75% de agua, en donde el principal responsable de la retención del agua es el componente proteico. La mayor parte de agua en el músculo está en las miofibrillas.

Esta propiedad se ve afectada por varios factores ambientales como la concentración de iones, presencias de ATP, pH, temperatura, tipo de sales y la conformación proteica. Las proteínas exhiben su hidratación mínima a su punto isoeléctrico, al que las interacciones proteína-proteína minimizan la interacción con el agua (Fennema, 2010).

La retención de agua de los concentrados proteicos aumenta en el intervalo de 20 a 100°C, en muchos casos, esto es debido a la formación de geles proteicos, en los que el agua se asocia con la superficie de las proteínas por puentes de hidrógeno y se atrapa dentro de los poros de la res proteica (Foegeding, 1989)

Las proteínas en las fibras musculares se asocian por cargas en la superficie de las moléculas proteicas. Al aumentar la concentración de sal, los iones de sodio y cloro se unen a los grupos cargados de las proteínas debilitando las interacciones entre fibras, lo que permite que entre más agua debido a que hay menos interacciones proteína-proteína y más interacciones proteína-agua (Vojdani, 1996).

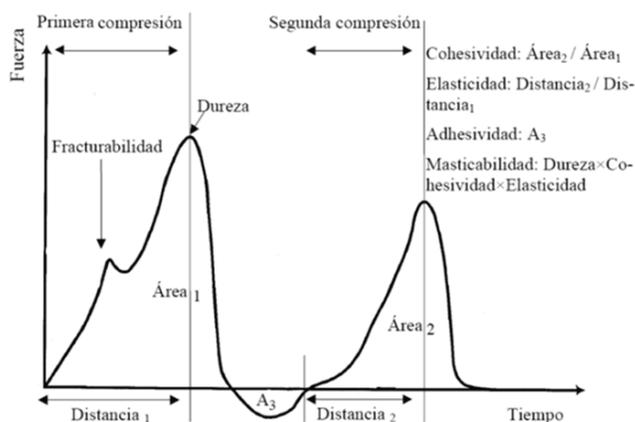
Por este motivo la retención de sal tiene una gran influencia en la retención de agua. En los homogeneizados musculares aumenta la concentración de sal de 0 a 2 M NaCl a pH 6.0, las muestras homogeneizadas sin sal pierden agua, mientras que las homegeneizadas con 0.65M NaCl retienen más su peso en agua (Matsumura y Mori, 1996)

El pH de la solución también afecta a la retención de agua. Al igual que con la solubilidad, el pH influye en las cargas. En un homogeneizado muscular la retención de agua disminuye al mínimo en el punto isoeléctrico (pH 5.0, aproximadamente) (Chinacht, 2000).

#### 1.8.4. Perfil de textura

Una práctica común empleada para evaluar la vida de anaquel de cierto producto, es determinar los cambios que ocurren sobre sus características de calidad durante un periodo de tiempo. El análisis de perfil de textura (TPA) es un método objetivo correlacionado con el análisis sensorial de la textura. El ensayo comprende la compresión de una muestra dos veces seguidas, imitando el proceso de masticación.

Un pequeño cilindro de gel (aproximadamente 2cm de diámetro y 0.8cm de altura) se coloca sobre la plataforma de un texturómetro tipo prensa Instron, o similar. Sobre el mismo actúa un plato plano que lo comprime hasta una altura predeterminada. La determinación del perfil de textura involucra dos compresiones sucesivas del material a una velocidad constante durante las cuales se registra la evolución de la fuerza. En la figura 3 se muestra la curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron.



**Figura 3.** Curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron

- Dureza. Fuerza máxima que tiene lugar en cualquier tiempo durante el primer ciclo de compresión. Se refiere a la fuerza requerida para comprimir un alimento entre los molares o entre la lengua y el paladar. Se expresa en unidades de fuerza, N o ( $\text{Kg m/s}^2$ ).
- Cohesividad. Cociente entre el área positiva bajo la curva de fuerza de la segunda compresión (Área 2) y el área bajo la curva de la primera compresión (Área 1). Representa la fuerza con la que están unidas las partículas, límite hasta el cual se pueden deformar antes de romperse. Es adimensional.
- Elasticidad. Es la altura que recupera el alimento durante el tiempo que recorre el primer ciclo y el segundo ( $D_2/D_1$ ). Mide cuanta estructura original del alimento se ha roto por la compresión inicial. Es adimensional, una longitud dividida por otra longitud.
- Gomosidad. La energía requerida para desintegrar un alimento semisólido de modo que esté listo para ser tragado. Procto de la dureza por la Cohesividad. Se expresa en ( $\text{Kg m/s}^2$ ).
- Masticabilidad. Producto de la dureza por la Cohesividad.

La calidad de un alimento es un concepto que el consumidor actual busca cuando adquiere cualquier tipo de producto alimenticio. Exceptuando la calidad nutricional y microbiológica de los alimentos, la calidad de estos se define como las características fisicoquímicas y funcionales de los mismos. Las principales características fisicoquímicas de la carne son: color, textura, sabor y olor; y se relacionan con el pH y Capacidad de Retención de Agua, la composición química, la degradación proteica, la interacción entre componentes y el grado de oxidación de las grasas.

Por otro lado, Las propiedades funcionales de la carne se dividen en: propiedades de hidratación dependientes de las interacciones proteína-agua (retención de agua, adhesión); propiedades relacionadas con las interacciones

proteína-proteína (formación de geles); y propiedades de superficie (emulsificación). Las más importantes, debido a su aplicación en la industria alimenticia, son la emulsificación

de grasa (EG) y la gelificación (GC), capacidad de retención de agua (CRA). Ésta última se define como la capacidad que tiene la carne para retener agua, tanto propia como añadida, al someterse a una fuerza externa; el agua es retenida en el seno de una red de fibras musculares. Su importancia radica en estar directamente relacionada con la suavidad, la jugosidad y el color; depende del pH, los cambios *postmortem* y la presencia de sales. La EG se refiere a la habilidad de las proteínas cárnicas como agentes emulsificantes. Los productos de pasta fina se consideran como emulsiones del tipo aceite en agua, afectados por factores *pre* y *post rigor*, así como por el tipo y concentración de proteínas, y la relación proteína-grasa. La GC es el resultado de la desnaturalización y agregación de proteínas para formar una red ordenada; la miosina, la actina y en algunos casos la paramiosina, son las principales proteínas responsables de la formación de geles. La temperatura, el pH y las sales, al modificar la estructura cuaternaria o la distribución de la carga neta de las proteínas, afectan el grado de unión de las proteínas, alteran la naturaleza y la estructura de un gel.

Estas características se conjugan entre sí para producir la calidad tanto textural como sensorial. La textura se define por la forma en que los componentes estructurales de un material se arreglan en forma micro y macroscópica, y la manifestación externa de este arreglo. Por ejemplo, la Cohesividad se refleja en la habilidad cementante de las proteínas miofibrilares en productos tales como jamones reestructurados (cocidos); el masajeo forma una película proteica alrededor de trozos de carne, la cual se torna cohesiva durante el calentamiento. El *sabor* es el resultado de una mezcla compleja de sensaciones percibidas por los sentidos del gusto y olfato, aunque en varias ocasiones se acompaña de estímulos visuales, táctiles y sonoros. El *sabor* y *olor* se producen por los compuestos volátiles liberados durante el procesamiento de la carne, y por los no volátiles encontrados en las partes magra y grasa de la carne. El *sabor* y *olor* a la vez están generados por precursores, por las interacciones entre los componentes químicos de la carne, y directamente por algunos compuestos.

Por otro lado, la sucralosa está relacionada con la calidad de la carne, se han hecho estudios, en los cuales se muestra que cuando este tipo de especies está en contacto no

solo con aditivos, medicamentos y con metales pesados, presentan una licuefacción del cerebro, por lo que se cree que también afecta la calidad fisicoquímica, textural y sensorial de su carne.

## JUSTIFICACIÓN

La presencia de nuevos contaminantes es preocupante debido a que no existen datos claros acerca de su interacción con los organismos, tal es el caso de la sucralosa que es un compuesto que persiste en el medio ambiente y puede encontrarse en los cuerpos de agua, pudiendo afectar a los organismos que residen ahí, estudios han demostrado la generación de especies reactivas de oxígeno que dañan lípidos, proteínas y ADN, por el mecanismo de estrés oxidativo lo cual induce un daño a nivel genético y celular que podría alterar las propiedades fisicoquímicas y de textura en el músculo de *Cyprinus carpio* además de no existir datos sobre su efecto genotóxico y citotóxico que tiene este endulzante artificial sobre *Cyprinus carpio*.

## **HIPÓTESIS**

Se sabe que la sucralosa en aguas induce estrés oxidativo en sangre y tejidos de *Cyprinus carpio*, por lo tanto, es posible que al exponer a este organismo a estas concentraciones de sucralosa se genere cito y genotoxicidad influyendo sobre la calidad alimentaria de esta especie.

## **OBJETIVOS**

### General

Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad inducida por sucralosa en *Cyprinus carpio* y la influencia en su calidad alimentaria.

### Específicos

1. Evaluar el daño genotóxico inducido por sucralosa en sangre de *Cyprinus carpio*, mediante la determinación del daño al ADN por medio de electroforesis celular o ensayo cometa y a través del ensayo de micronúcleos.
2. Evaluar el efecto citotóxico inducido por sucralosa en sangre de *Cyprinus carpio*, mediante la determinación de la actividad de la caspasa-3 y el porcentaje de células apoptóticas por medio de la prueba de TUNEL.
3. Evaluar la calidad alimentaria mediante la concentración proteica, solubilidad, capacidad de retención de agua, capacidad de gelificación, análisis de perfil de textura (TPA) y perfil de pesos moleculares en músculo de *Cyprinus carpio*.

## II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

### 2.1. Sustancia de prueba

La estándar de sucralosa (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido) utilizada en el estudio fue comprada a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), el grado de pureza del estándar fue ≥98%, C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>8</sub>, con un peso molecular de 397.63 (Número CAS 56038-13-2).

Para la determinación de la SUC en agua y sangre los reactivos empleados fueron grado HPLC. El ácido fórmico para análisis LC-MS fue comprado a Merck (Darmstadt, Alemania) y el gas nitrógeno se obtuvo de la empresa INFRA, S.A. de C.V. (CDMX, México). El agua ultrapura se obtuvo utilizando un sistema de purificación de agua provisto por Merck Millipore. El acetonitrilo fue comprado de Sigma-Aldrich. Los reactivos empleados en los biomarcadores de daño a ADN, apoptosis y calidad alimentaria fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) a menos que se indique lo contrario.

### 2.2. Obtención y mantenimiento de *Cyprinus carpio*

El organismo de prueba empleado fue la carpa común *Cyprinus carpio* y fue obtenida del centro acuícola Tiacaque, Estado de México transportada en bolsas de polietileno con agua y oxígeno hasta el laboratorio de Toxicología de la Facultad de Química de la UAEM. Posteriormente los organismos se mantuvieron en peceras de vidrio de 160 L de capacidad por un tiempo de adaptación de veinte días, a temperatura ambiente con periodos de luz y oscuridad natural de 12 horas, aireación continua, pH de 7.4 y alimentación diaria (Gómez-Oliván et al., 2017).

### 2.3. Diseño experimental

Para el desarrollo experimental, se utilizaron organismos de 12.01 ± 0.27 cm de largo y un peso de 28.13 ± 1.4 g. Los ensayos de toxicidad consistieron en la incorporación de SUC a concentraciones ambientalmente relevantes de 0.005 µg/L y 155 µg/L (Arbeláez et al., 2015). Para dicho fin, se colocaron quince sistemas de prueba con 7 litros cada uno y cinco peces: cinco de ellos fueron para la concentración 1 (0.05 µg/L), cinco para la

concentración 2 (155  $\mu\text{g/L}$ ) y cinco correspondientes al grupo control (sin SUC). Los tiempos de exposición fueron 12, 24, 48, 72 y 96 h. El estudio se realizó por triplicado. En el experimento fueron empleados un total de 225 organismos de prueba. Al finalizar cada tiempo de exposición, los organismos de cada sistema fueron colocados en una pecera con solución de eugenol (0.02 mg/mL), con el fin de anestésarlos y obtener las muestras sanguíneas de la vena caudal con una jeringa hipodérmica de 1 mL previamente heparinizada y una muestra de músculo para llevar a cabo los análisis fisicoquímicos. Con las muestras sanguíneas se realizaron los ensayos para determinar el daño al ADN (ensayo cometa y micronúcleos) y de apoptosis (actividad de caspasa-3 y prueba de TUNEL), empleando las metodologías que a continuación se describen:

## **2.4. Ensayo para evaluar el daño al ADN**

### **2.4.1. Electroforesis unicelular en gel (Ensayo cometa)**

Para evaluar el daño al ADN se empleó la metodología descrita por Tice et al., (2000), se colocaron 300  $\mu\text{L}$  de agarosa de alto punto de fusión sobre los portaobjetos y se secaron a temperatura ambiente, una vez obtenida la muestra sanguínea, 20  $\mu\text{L}$  fueron mezclados con 150  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión al 0.7 %. Se extendieron 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla sobre los portaobjetos previamente preparados y se solidificaron en hielo. Una vez secos, se procedió a la extracción de ADN, los portaobjetos se sumergieron en vasos copplin que contenían solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, Triton X-100 al 1%) a pH ajustado de 10 y 4 °C durante una hora. Los portaobjetos fueron transferidos a una cámara de electroforesis a 300 mA y 25 V (4 °C, intensidad de campo: 0.8 V  $\text{cm}^{-1}$ ) con solución alcalina (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM) pH 13 durante 20 min. y se detuvo con un buffer de neutralización (Trizma base 0.4 M pH 7.4). Finalmente se tiñó el ADN con 50  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) para ser observado en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiophot-1 equipado con una cámara digital Zeiss AxioCam HRc.

### **2.4.2. Ensayo de micronúcleos**

El ensayo de micronúcleos consistió en la incorporación y extensión de 10  $\mu$ L de muestra sanguínea en los portaobjetos, la cual fue fijada con etanol puro. Posteriormente fue teñida con giemsa al 10 % durante 10 min seguido de un lavado con agua corriente. Los portaobjetos fueron observados en un microscopio óptico, determinando el número de células micronucleadas por cada 1000 células (Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005).

Los criterios utilizados para determinar la presencia de micronúcleos (MN) fueron la no vinculación de los pequeños núcleos ovoides o redondos con el núcleo principal, color e intensidad de tinción similar al núcleo principal (Kim and Hyun, 2006) y el diámetro de 1/5-1/20 del núcleo principal (Bolognesi et al., 2006).

## **2.5. Ensayos para evaluar la apoptosis**

### **2.5.1. Actividad de la caspasa-3**

#### **2.5.1.1 Preparación del extracto celular**

Con el fin de obtener el control positivo, se cultivaron células Jurkart (ATCC # TIB-152), se ajustó a la densidad de  $10^6$  células por mL y se añadieron 50 ng/mL de anti-Fas mAb (clone # CH-11, MBL International, Cat. # SY-001) para inducir apoptosis. Para obtener el control negativo, se preparó otra solución de células Jurkart y se añadió al mismo tiempo el anti-Fas mAb y 125  $\mu$ L de inhibidor de apoptosis Z-VAD-FMK (carbобензохи-валил-аланил-аспартил-(O-metil)-fluorometilcetona).

Ambas muestras se incubaron en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> durante 16 h a 37 °C seguido de una centrifugación a 450 rpm durante 10 min a 4°C. Las células obtenidas se mantuvieron en hielo y se realizó un lavado con PBS frío, se resuspendieron en buffer de lisis celular alcanzando una concentración de  $10^8$  células por mL. Las células lisadas se incubaron en hielo por 15 min y se centrifugó a 15 000 rpm durante 20 min a 4°C guardando el sobrenadante.

### **2.5.1.2 Ensayo colorimétrico**

Se siguieron las instrucciones del kit colorimétrico (CaspACETM, Promega, Madison, WI), empleando una microplaca de 96 pozos con fondo plano. El blanco se preparó con 32  $\mu$ L de buffer de caspasa [HEPES 312.5 mM, pH 7.5; sacarosa 31.25%; CHAPS 0.3125% (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato)], 2  $\mu$ L DMSO, 10  $\mu$ L ditioneitol (DTT; 100 mM) y 54  $\mu$ L de agua desionizada. En el grupo expuesto se añadieron 32  $\mu$ L de buffer de caspasa, 2  $\mu$ L de DMSO, 10  $\mu$ L de DTT, 24  $\mu$ L de muestra sanguínea y 54  $\mu$ L de agua desionizada. Finalmente para el control positivo y negativo se añadieron 32  $\mu$ L de buffer de caspasa, 2  $\mu$ L de DMSO, 10  $\mu$ L de DTT, 20  $\mu$ L de extracto celular (para cada caso) y 54  $\mu$ L de agua desionizada.

A todas las soluciones ya preparadas, se añadieron 2  $\mu$ L de sustrato DEVD-pNA, se cubrió la placa con parafilm y se incubó a 37°C durante 4 h. Se leyó la absorbancia a 405 nm y se calculó la actividad de caspasa-3. Los resultados se expresaron como nM de pNA libre h-1  $\mu$ g de proteína.

### **2.5.2 Ensayo de TUNEL**

Se siguieron las instrucciones del kit fluoresceína ApopTag S7110. 300  $\mu$ L sangre fueron centrifugados a 800 rpm durante 5 min a 4 °C, las células obtenidas se resuspendieron en 50  $\mu$ L de solución de montaje, se colocó 1  $\mu$ L de esta solución en un portaobjetos previamente preparado con poli-L-lisina y se secó a 60°C durante 5 min, una vez seco se fijaron las células con acetona fría por 10 min y se realizó la hidratación mediante lavados sucesivos con soluciones de xileno-etanol absoluto de 96, 80, 70, 60, 50 % (v/v) y con agua destilada. Se añadió 1  $\mu$ L de proteinasa K (20  $\mu$ g/mL) a las células hidratadas y se realizaron tres lavados de 1 min con PBS (0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl) pH 4, se añadieron 60  $\mu$ L de buffer de equilibrio y se incubaron con 65  $\mu$ L de enzima TdT durante 60 min a 37°C. Las células fueron lavadas con PBS y se añadió el conjugado anti-FICT durante 30 min a temperatura ambiente para el marcaje de células y se realizó un lavado con PBS.

Finalmente las células fueron teñidas con yoduro de propidio (1.5 µg/mL) para ser observadas en un microscopio de epifluorescencia equipado con cámara digital.

El control negativo se obtuvo como se describió previamente pero sin añadir TdT y el control positivo se obtuvo con células tratadas con DNasa (1 µL/mL). Se analizaron un total de 100 células por muestra, expresando a la apoptosis por el porcentaje de células TUNEL-positivas.

## **2.6. Ensayos para determinar calidad alimentaria de *Cyprinus carpio***

### **2.6.1 Medición pH**

Se tomó una porción de 10 g de músculo, se mezcló con 90 mL de agua destilada. Se licuó hasta obtener una pasta consistente y uniforme. Se ajustó la temperatura de la pasta a 20 °C ± 0.5 °C. Finalmente se realizó la lectura de pH con un potenciómetro previamente calibrado. (Método NMX-F-317- S-1978 “Determinación de pH en Alimentos”)

### **2.6.2 Capacidad de retención de agua (CRA)**

Se tomaron 10 g de músculo y se picaron. Se colocaron 5 g en un tubo de centrifuga y se añadieron 8mL de una disolución de NaCl 0.6 M. Se agitó con varilla de vidrio durante 1 min en baño de hielo, se dejó reposar 30 minutos. Se agitó 1 minuto. Se centrifugó durante 30 minutos a 2500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se midió el volumen. Se reportó el volumen de NaCl retenido por 100 g de muestra. Método Honikel y Hamm (1983) reportado en (Dublán, 2006).

### **2.6.3 Solubilidad**

Se extrajeron las proteínas (5 mg/mL, a pH 7) y se centrifugó a una temperatura de 4 °C para evitar su desnaturalización. Al sobrenadante extraído se le midió la concentración de proteínas mediante método biuret. Se reportó la solubilidad como la relación entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100 (Ternes, 2004).

#### **2.6.4 Determinación de grupos sulfhídrico**

Se mezcló 1 mL de la disolución proteica (5 mg/mL a pH 7) y 9 mL de urea 8 M disuelta en un amortiguador de Tris-Glicina-EDTA (10.4 g/L Tris; 6.9 g/L Glicina; 1.2 g/L EDTA; pH 8). Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Se tomaron 3 mL de la mezcla y se añadieron 50 mL de una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico (4 mg/mL en la misma disolución amortiguadora). Se dejó reposar durante 30 min en obscuridad. Se midió la absorbancia a 412 nm. Se transformó el valor de absorbancia empleando la siguiente ecuación. SS o ecuación 1.  $SHT = (75,53(DO1 - DO2) 10 / C$ .

Siendo:

SS o SHT la concentración de los disulfuros o sulfhídricos totales en la muestra ( $\mu$ moles SH o SS/g proteína)

DO1 la absorbancia a 412 nm de la muestra a los 15 min de agregarse el reactivo.

DO2 la absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos.

C es la concentración de proteína en la muestra (mg/mL).

Método Ellman (1959), reportado en (Dublán, 2006).

#### **2.6.5 Identificación de proteínas, concentración de proteína**

Utilizando tubos de ensayo se midió 1 mL de las disoluciones de proteína y se agregaron 3 mL del reactivo de biuret. Se homogeneizó y se dejó en reposo durante 30 minutos en la sombra sin contacto directo con la luz. Se midió la absorbancia de la muestra a una  $\lambda = 540$  nm. Los datos obtenidos se relacionaron con respecto a una curva patrón de Seroalbúmina-bovina de concentración 0-10 mg/mL. Reactivo de biuret de acuerdo a Gornall (1948). Se disolvió 1.5 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  y 6 g de tartrato de sodio y potasio ( $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ), se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 mL se disolvió con 500 mL de agua destilada, se agregaron 300 mL de hidróxido de sodio 10 % y se llevó a volumen con agua destilada. Método biuret reportado en (Dublán, 2006).

Formación de gel. Extraídas las proteínas, se vertieron en un contenedor adecuado. Se colocó el contenedor en un baño de agua. Se sometió a calentamiento gradual de 1 °C/min hasta alcanzar una temperatura interna del gel de 80 °C para inducir la gelificación. Se retiraron los contenedores y se colocaron en baño de hielo para enfriar. Se almacenó en refrigeración no mayor a 4 °C para madurar la estructura del gel. Se realizó prueba de penetración de geles. Se penetró la superficie del gel con un vástago de acrílico de 8 mm de diámetro a una velocidad de 25 mm/s.

Análisis de textura. Método García-Dublán (2006). Se realizó en geles elaborados a partir de carne de carpa los cuales fueron medidos instrumentalmente con un texturómetro. Se definieron los parámetros de la muestra como tamaño, temperatura y aplicación de la fuerza con respecto a la muestra. Se definieron los procesos de evaluación de textura estos pueden ser:

- 1.- Esfuerzo al corte por medio de la navaja Warner-Bratzler
- 2.- Análisis del perfil de textura (TPA), a través de 5 parámetros: dureza, cohesividad, masticabilidad, elasticidad, resiliencia y adhesividad.

## **2.7 Determinación de SUC en agua y plasma de carpa común**

Para determinar la concentración de SUC en agua y plasma de *Cyprinus carpio*, se empleó la metodología establecida por (Saucedo-Vence et al., 2015). Para lo cual, se preparó una solución stock del edulcorante (1000 µ/L), empleando metanol y agua ultrapura (50%/50%). Esta solución se almacenó a -20°C en botellas cubiertas de la luz. Para la determinación de este compuesto, se utilizó un equipo HPLC Agilent 1290 Infinity acoplada a un Agilent 6430 Triple Quadrupole MS equipado con ionización por electrospray (ESI). El volumen de inyección fue 50 µL. Las condiciones cromatográficas fueron: el proceso de separación se realizó con un gradiente de elución con agua ultrapura acidulada con ácido fórmico a pH 2.5 (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B) como fase móvil. El gradiente comenzó isocráticamente a 5% de B por 3 min y luego incrementó a 75% en 6 min, luego aumentó a 100% en 1 min, permaneció constante

durante 1 min y finalmente regresó a 5% de B en 1 min. Se emplearon columnas Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8 μm), la temperatura fue de 25°C y el caudal fue de 0.4 ml min<sup>-1</sup>. El periodo de elución de la SUC fue < 8 min. El análisis se realizó en modo negativo de ionización empleando el monitoreo de reacción múltiple (MRM) utilizando las transiciones de ión precursor/ producto 395/359.

Las condiciones ESI-MS empleadas fueron, presión del nebulizador de 45 psi, caudal de gas de secado (N<sub>2</sub>) de 11 L min<sup>-1</sup>, temperatura del gas de secado de 350 ° C y voltaje capilar de 4000 V.

Para la determinación de SUC en muestras de agua, se emplearon los sistemas utilizados en la sección 2.3 y de cada sistema se tomaron muestras de 10 mL, las muestras fueron acidificadas con HCl 1 M y la SUC se extrajo de muestras de agua de 1 ml con 5 ml de metanol: agua (1: 1). La mezcla se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min, y la capa orgánica obtenida se usó para el análisis. Para las muestras de plasma, a las muestras obtenidas en la sección 2.3, se les adicionó acetona fría y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. El sobrenadante se separó y se determinó la concentración de SUC.

## **2.8 Análisis estadístico**

Se estableció la normalidad de los datos y la homoscedasticidad mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Posteriormente se utilizó una prueba post hoc de Bonferroni para evaluar diferencias significativas. Para dicho análisis se empleó el programa Sigmatat v2.03.

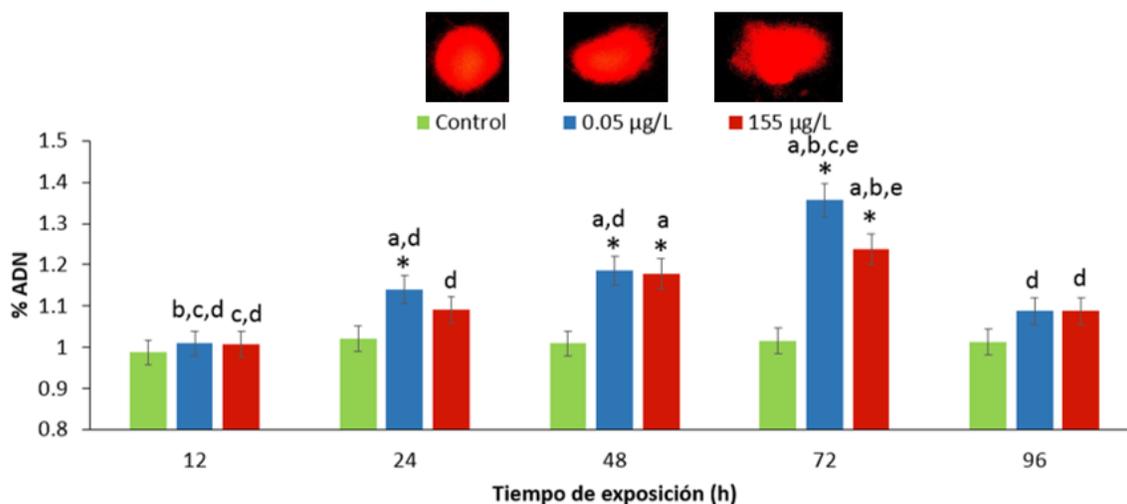
### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Resultados de alteraciones al ADN

##### 3.1.1 Ensayo cometa

En la figura 4, se puede observar que el porcentaje de daño al DNA incrementa respecto al tiempo desde las 24 horas y hasta las 72 horas. En ambas concentraciones se observa un incremento máximo del biomarcador a las 72 horas. En la C1 (0.05 µg/L) hubo un aumento significativo a las 24, 48 y 72 horas respecto al grupo control de 11.8, 18 y 35% respectivamente ( $p < 0.05$ ). En la C2 (155 µg/L) se observaron incrementos significativos a las 48 y 72 horas respecto al control de 17 y 23% respectivamente ( $p < 0.05$ ).

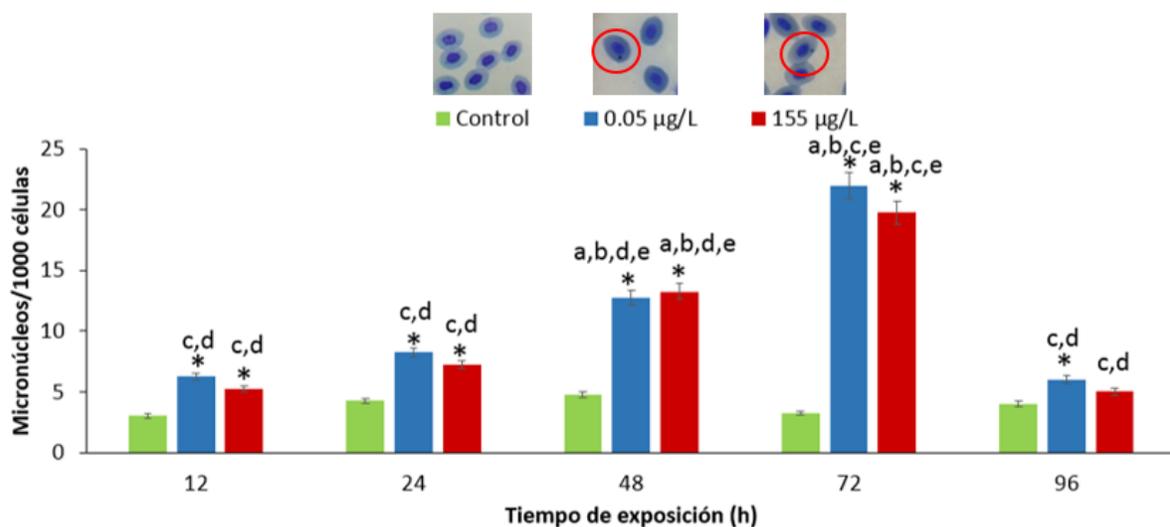
Al comparar los tiempos de exposición, se puede observar que en la C1 a las 72 horas se observaron decrementos significativos de 23.9, 18.4, 14.4 y 24.2% con respecto a las 12, 24, 48 y 96 h. En el caso de la C2, se observaron decrementos estadísticamente significativos a 12, 24 y 96 h con respecto a las 72 h de 22.1%, 13.9% y 13%, respectivamente.



**Figura 4.** Determinación del daño al ADN mediante ensayo cometa en células sanguíneas de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de SUC (0.05 y 155 µg/L) a diferentes tiempos de exposición. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de los valores del índice de daño de cinco especímenes por concentración y por tiempo de exposición. El ensayo se realizó por triplicado. Significativamente diferente de: \*grupo control; a12 h; b24 h; c48 h; d72 h; e96 h. (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.1.2 Prueba de micronúcleos en sangre de *C. carpio* expuesta a SUC

En la figura 5 observamos un aumento significativo progresivo en la presencia de MN desde las 12 horas de exposición y hasta las 72 horas con respecto al grupo control, en ambas concentraciones. En la C1 se observó un incremento significativo a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas respecto al grupo control de 108.3, 94.1, 168.4, 586 y 50% respectivamente ( $p < 0.05$ ). En la C2 se presentaron aumentos a las 12, 24, 48 y 72 horas respecto al control de 75, 52.6, 178.9 y 507 % respectivamente ( $p < 0.05$ ). Al comparar los tiempos de exposición, para la C1 observamos decrementos significativos a las 12, 24, 48 y 96 h con respecto a las 72 h de 252, 166.7, 72.5, y 206.7% ( $p < 0.05$ ). En la C2, observamos el mismo comportamiento decrementos del 276, 172, 49 y 295% a las 12, 24, 48 y 96 h con respecto a las 72 h, respectivamente.

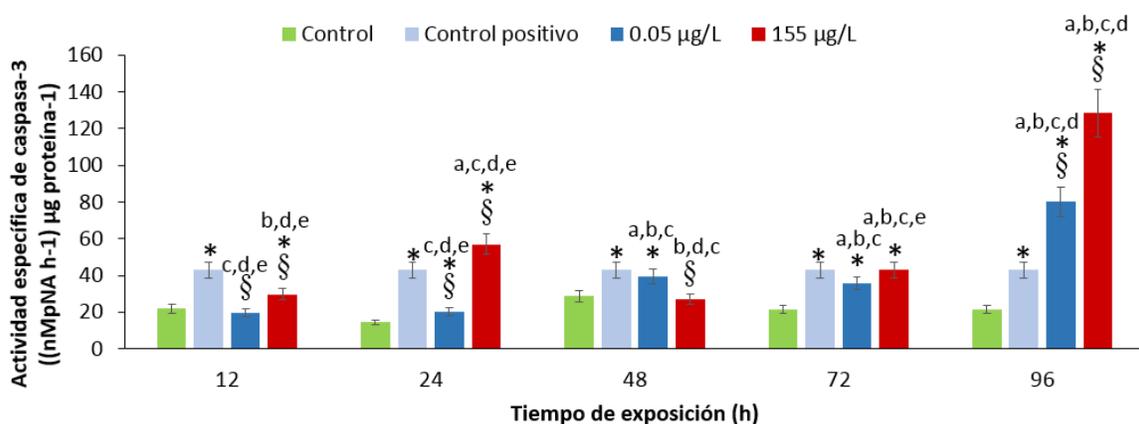


**Figura 5.** Frecuencia de micronúcleos en sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de SUC (0.05 y 155  $\mu$ /L) a diferentes tiempos de exposición. Los valores son la media de tres repeticiones  $\pm$  SEM. Significativamente diferente de: \* grupo control; a12 h; b24 h; c48 h; d72 h; e96 h. (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.2 Resultados de apoptosis en células sanguíneas de *C. carpio* expuesta a SUC

#### 3.2.1 Resultados de actividad de caspasa 3 en sangre de *C. carpio* expuesta a SUC

La figura 6 muestra la actividad de la caspasa-3. Como se puede observar en la C1 hubo un incremento estadísticamente significativo con respecto al grupo control a las 24, 48, 72 y 96 h de 40.6, 37.5, 65.3 y 271%, respectivamente ( $p < 0.05$ ). En la C2, se observó un incremento estadísticamente significativo a las 12, 24, 72 y 96 h de 36.1, 293.5, 98.3 y 493.5%, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Al comparar, el control positivo con la C1 se observaron decrementos estadísticamente significativos de 146.9, 140.2, 20.3, 34.7 a las 12, 24, 48 y 72 h respectivamente ( $p < 0.05$ ). Sin embargo a las 96 h, para la misma concentración se observó un incremento significativo de 63.5% ( $p < 0.05$ ). Cuando se comparó el control positivo con respecto a la C2 a las 12 y 48 se observó un decremento de 63.2 y 73.9%, respectivamente ( $p < 0.05$ ). En contraste a la 24 y 96 h se incrementó significativamente el biomarcador en 16.5 y 161.6% ( $p < 0.05$ ).

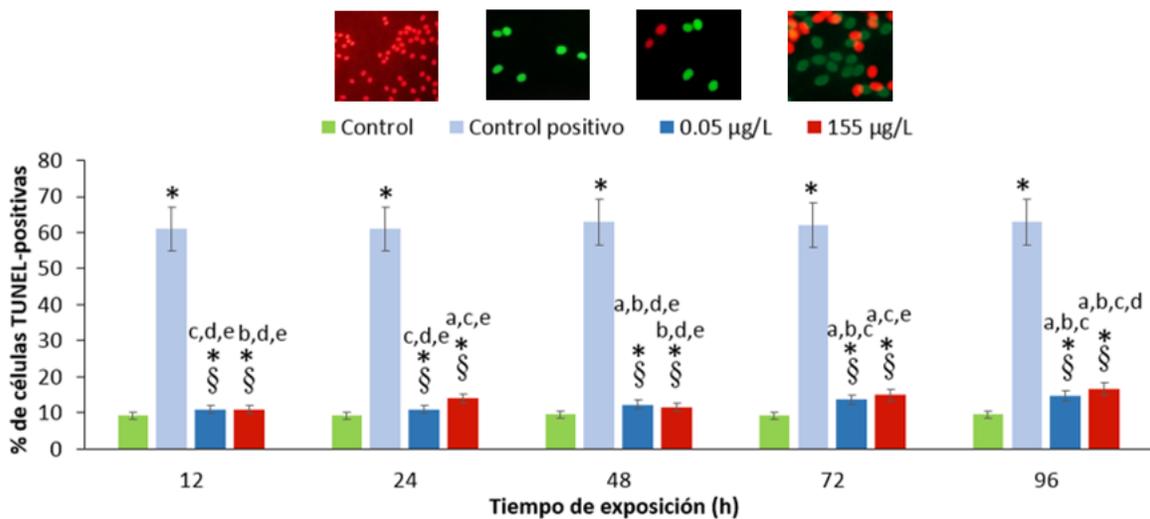


**Figura 6.** Actividad de caspasa-3 en sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de SUC (0.05 y 155  $\mu$ g/L) a diferentes tiempos de exposición. El ensayo

se realizó por triplicado. Significativamente diferente de: \*grupo testigo; §Control positivo a12 h; b24 h; c48 h; d72 h; e96 h. (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.2.2 Resultados de la prueba de TUNEL en sangre de *C. carpio* expuesta a SUC

La figura 7 muestra los resultados de las células apoptóticas positivas encontradas en la prueba de TUNEL. Como se puede apreciar, en la C1 se observaron incrementos significativos con respecto al grupo control de 17.9, 17.9, 27.6, 46.4 y 51.8% a las 12, 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente ( $p < 0.05$ ). En la C2 se pudo observar la misma tendencia en los tiempos de exposición al incremento en el biomarcador, en este caso dichos aumentos fueron de 17.9, 50.1, 20.7 60.8 y 72.9%, respectivamente ( $p < 0.05$ ). Al comparar el control positivo con la C1 se observaron decrementos significativos de 454.5, 463.6, 394.7, 336.6 y 322.9% a las 12, 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente ( $p < 0.05$ ). La comparación entre el control positivo y la C2 presentó la misma tendencia, sólo que con porcentajes de disminución de 454.5, 342.8, 423.2, 306.7 y 271%, respectivamente ( $p < 0.05$ )

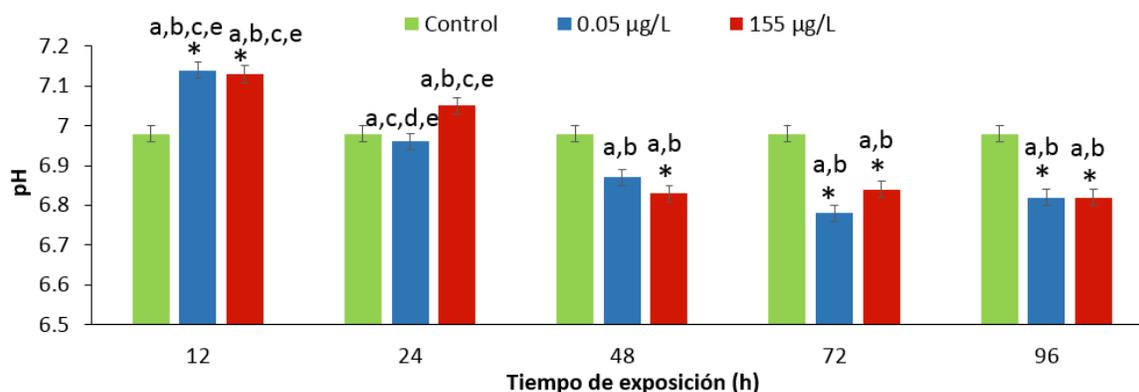


**Figura 7.** Porcentaje de células TUNEL-positivas en células sanguíneas de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de SUC (0.05 y 155 µg/L) a diferentes tiempos de exposición. El ensayo se realizó por triplicado. Significativamente diferente de: \*grupo testigo; §Control positivo a12 h; b24 h; c48 h; d72 h; e96 h. (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.3. Resultados de pruebas fisicoquímicas en músculo de *Cyprinus carpio*

#### 3.3.1 Determinación de pH

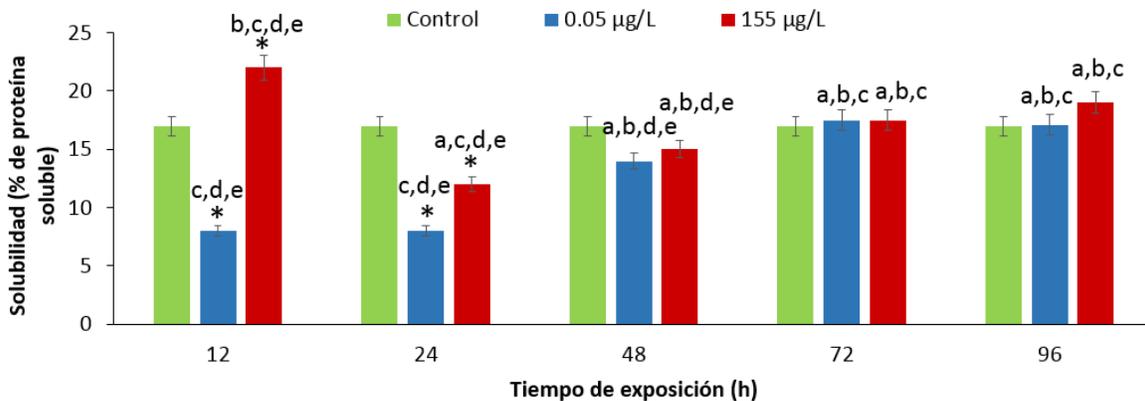
En la figura 8 se muestra el pH del músculo de *Cyprinus carpio* obtenido a los diferentes tiempos de exposición. En C1 se observa un aumento del 2.2 % ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control a las 12 h y una disminución significativa a las 72 y 96 horas de 2.8 y 2.2 % respectivamente ( $p < 0.05$ ); para C2 observamos un incremento a las 12 horas y disminuciones significativas a las 48, 72 y 96 horas de 2.1, 2.0 y 2.2% respectivamente ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8.** Determinación de pH en músculo de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de SUC (0.05 y 155 µg/L) a diferentes tiempos de exposición. El ensayo se realizó por triplicado. Significativamente diferente de: \*grupo testigo; a12 h; b24 h; c48 h; d72 h; e96 h. (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

#### 3.3.2 Solubilidad

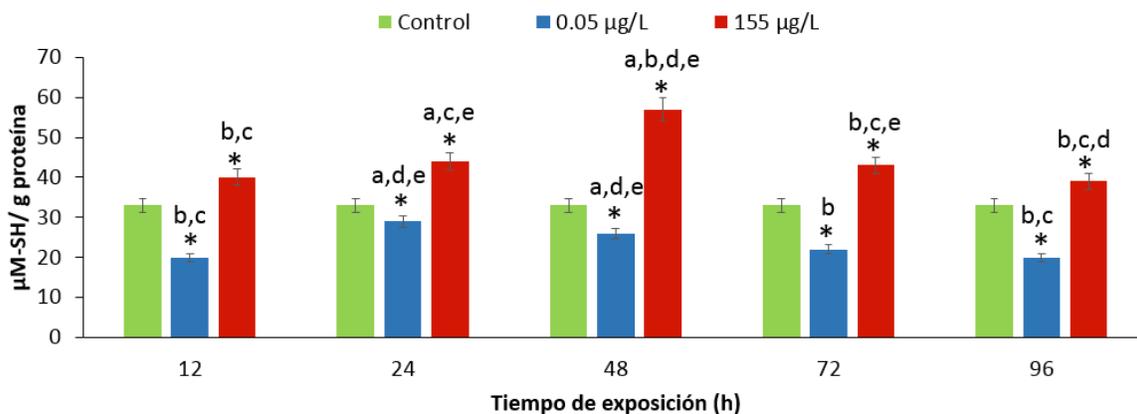
En la figura 9 observamos la solubilidad de las proteínas; mostrando una disminución significativa respecto al control; para C1 a las 12 y 24 horas de 52.9 y 52.9 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), a las 72 y 96 horas se mostró un incremento de 2.9 Y 0.5 % respectivamente ( $p < 0.05$ ); para C2 se observó un incremento a las 12, 72 y 96 horas teniendo valores de 29.4, 2.9 y 11.7 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), finalmente se observa un decremento a las 24 y 48 horas de 29.4 y 11.7 % respectivamente ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9.** Comportamiento de la solubilidad en músculo de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de SUC (0.05 y 155 µg/L) a diferentes tiempos de exposición. El ensayo se realizó por triplicado. Significativamente diferente de: \*grupo testigo; a12 h; b24 h; c48 h; d72 h; e96 h. (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.3.3 Determinación de grupos sulfhídrido

En la Figura 10 se muestra el contenido de grupos sulfhídricos; en C1 se observa una disminución significativa con respecto al control, a las 12, 24, 48, 72 y 96 h de 39.3, 12.1, 21.2, 33.3 y 39.3 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), a diferencia de C2, donde observamos un aumento significativo en todos los tiempos de exposición con respecto al control de 21.2, 33.3, 72.7, 30.3 y 18.1 % ( $p < 0.05$ ). Siendo el tiempo de 48 horas donde se observa un mayor contenido de grupos sulfhídrido ( $p < 0.05$ ).

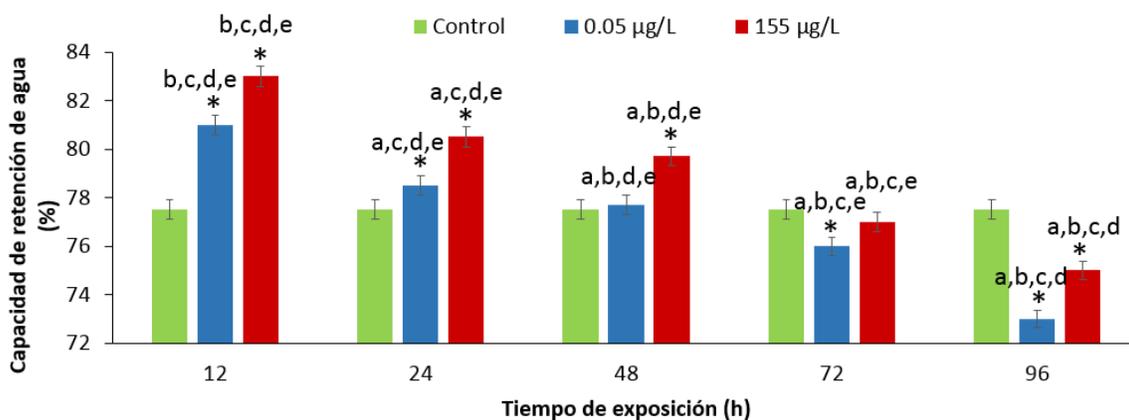


**Figura 10.** Contenido de grupos sulfhídricos en músculo de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de SUC (0.05 y 155 µg/L) a diferentes tiempos de

exposición. El ensayo se realizó por triplicado. Significativamente diferente de: \*grupo testigo; a12 h; b24 h; c48 h; d72 h; e96 h. (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.3.4 Capacidad de retención de agua

En la figura 11 observamos la capacidad de retención de agua por parte de las proteínas, mostrando para C1 un aumento significativo respecto al control a las 12 y 48 h de 4.2 y 1.2 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), posteriormente se observa una disminución significativa a las 72 y 96 h de 2.1 y 6.0 % ( $p < 0.05$ ). C2 siguió la misma tendencia con un incremento a las 12, 24 y 48 h de 6.8, 3.6 y 2.5 % respectivamente ( $p < 0.05$ ) y disminución significativa a las 96 h de 3.4 % ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11.** Porcentaje de capacidad de retención de agua en músculo de *Cyprinus carpio* expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de SUC (0.05 y 155 µg/L) a diferentes tiempos de exposición. El ensayo se realizó por triplicado. Significativamente diferente de: \*grupo testigo; a12 h; b24 h; c48 h; d72 h; e96 h. (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.3.5 Análisis de textura (TPA)

En la tabla 4 se observa el análisis de perfil de textura, en el cual se evaluaron cinco atributos: dureza, elasticidad, cohesividad, masticabilidad y gomosidad.

Para dureza, en C1 se observa un aumento significativo respecto al control a los tiempos de 48, 72 y 96 h de 9.1, 10.0 y 14.1 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), en C2 se observa esta

misma tendencia, con aumentos a las 48, 72 y 96 h de 2.5, 11.6 y 15 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), en ambas concentraciones el aumento máximo de dureza fue a las 96 horas.

Se observa un aumento de la elasticidad respecto al control para C1 en los tiempos de 12 y 24, y una disminución significativa a los tiempos de 48, 72 y 96 h de 5, 2.5 y 7.5 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), para C2 la tendencia es igual con disminuciones a las 48, 72 y 96 h de 7.5, 7.5 y 10% respectivamente ( $p < 0.05$ ).

La cohesividad para C1 aumentó significativamente a los tiempos de 24, 48, 72 y 96 h un 27.7, 27.7, 44.4 y 44.4 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), en C2 se observa un aumento significativo a las 48, 72 y 96 h de 33.3, 50 y 55.5 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), en los primeros tiempos de exposición no se observa diferencia significativa.

En lo que corresponde a gomosidad se observa un aumento significativo en C1 respecto al control a las 24, 48, 72 y 96 h de 27.5, 39.0, 58.7 y 64.5 % respectivamente ( $p < 0.05$ ), en C2 aumentó significativamente a las 12, 24, 48, 72 y 96 h un 11.1, 11.1, 36.5, 67.0 y 78.49 % respectivamente ( $p < 0.05$ ).

Finalmente la masticabilidad aumentó significativamente en C1 respecto al control a las 24, 48, 72 y 96 h un 26.1, 32.4, 54.9 y 52.2 % respectivamente, mientras que C2 muestra un aumento significativo respecto al control en todos los tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 h de 11.7, 17.1, 26.1, 54.9 y 61.2 % respectivamente.

**Tabla 4.** Análisis de perfil de textura en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 155  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Atributo	Muestra	Tiempo de exposición (h)				
		12	24	48	72	96
Dureza	Control	15.50	15.50	15.50	15.50	15.50
	0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$	15.41	15.52	16.91	17.05	17.67
	155 $\mu\text{g}/\text{L}$	15.51	15.51	15.88	17.29	17.82
Elasticidad	Control	0.40	0.41	0.40	0.40	0.41
	0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.41	0.40	0.38	0.39	0.37

	155 µ/L	0.40	0.42	0.37	0.37	0.36
<b>Cohesividad</b>	Control	0.18	0.19	0.18	0.18	0.18
	0.05 µ/L	0.19	0.23	0.23	0.26	0.26
	155 µ/L	0.20	0.20	0.24	0.27	0.28
<b>Gomosidad</b>	Control	2.79	2.94	2.79	2.79	2.79
	0.05 µ/L	2.92	3.56	3.88	4.43	4.59
	155 µ/L	3.10	3.10	3.81	4.66	4.98
<b>Masticabilidad</b>	Control	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11
	0.05 µ/L	1.19	1.40	1.47	1.72	1.69
	155 µ/L	1.24	1.30	1.40	1.72	1.79

### 3.4 Discusión

Por las actividades cotidianas, el estilo de vida actual y malos hábitos alimenticios, la población de todo el mundo está presentando enfermedades crónico degenerativas y peligrosas como el sobrepeso, obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares, hiperlipidemia e hipercolesterolemia (Jiang et al., 2016; Kim et al., 2019; Lee et al., 2011). Este panorama, ha generado preocupación en la población acerca del estilo de vida y la dieta equilibrada, que ha ocasionado como resultado, un incremento en el uso de productos light o dietéticos, y como consecuencia el consumo de edulcorantes. Sin embargo, aunque estos productos han sido considerados como seguros para los seres humanos, los efectos de su presencia en el ambiente y efectos biológicos en organismos acuáticos no han sido esclarecidos completamente y algunos datos son controversiales. Como se ha establecido previamente, la SUC es uno de los edulcorantes que se ha identificado previamente en cuerpos de agua y se ha estudiado en referencia a sus efectos toxicológicos en organismos acuáticos, aunque la información es limitada. En este trabajo, se indago la posibilidad de que la SUC a concentraciones ambientalmente relevantes generara alteraciones al ADN y apoptosis en células sanguíneas de la carpa común *Cyprinus carpio*.

El ensayo cometa es una prueba que detecta daños producidos por la ruptura simple o doble en el ADN, daño oxidativo inducido y entrecruzamientos de ADN-ADN/ADN-proteína (de Lapuente et al., 2015). Los resultados evidenciados por el ensayo cometa se muestran en la Fig. 4 y demostraron que las dos concentraciones probadas en este estudio generaron alteraciones al ADN, la máxima expresión en este biomarcador se observó a las 72h. Estos resultados, podrían ser explicados debido a la oxidación de bases [por ejemplo, 7,8-dihidrodeoxiguanosina (8-oxoG) y 8-oxoguanine] y por la generación de interrupciones en la cadena de ADN por la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS). Como fue previamente establecido por nuestro grupo de investigación la SUC a concentraciones de 0.05 y 155 µg/L fue capaz de inducir estrés oxidativo en sangre, hígado, cerebro, branquias y músculo de *Cyprinus carpio* (Saucedo-Vence et al., 2017). Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Eriksson Wiklund et al., (2014), quienes determinaron que SUC a concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, and 5000 µg L-1 generaron daño oxidativo evidenciado por incrementos significativos en los niveles de TBARS en *Daphnia magna*, así como un incremento en las concentraciones de acetilcolinesterasa provocando neurotoxicidad en el daphnido. El mismo grupo de investigación en 2012, había demostrado que concentraciones de 0.5, 5 and 500 µg L-1 de SUC afectaban la fisiología y la locomoción de *D. magna* y *G. zaddach* (Wiklund et al., 2012).

Es bien conocido, que las ROS, como el radical anión superóxido ( $O_2^*$ ) y el radical hidroxilo ( $*OH$ ) tienen la capacidad de abstraer protones o bien de atacar moléculas en sitios con alta densidad electrónica, generando especies radicalarias secundarias que son capaces de sufrir reordenamientos intramoleculares. En los ácidos nucleicos como el ADN, tanto las bases púricas y pirimidínicas, así como el azúcar son susceptibles a ataques de ROS, lo que conduce a modificaciones en las bases y rupturas en la cadena (Valavanidis et al., 2006; Zaremba and Oliński, 2010). En especial el radical hidroxilo  $*OH$ , tiene la capacidad de hidroxilar el C5 y C6 de las bases pirimidínicas y el C4, C5 y C8 de las bases púricas en las moléculas de DNA (Evans et al., 2004; Gruber et al., 2018). Los anteriores hallazgos,

explicarían los resultados observados en el ensayo cometa, sin embargo después de las 72 h, se observa un declive del biomarcador a las 96 h, lo que demostraría que en este tiempo se expresan los mecanismos de reparación en la carpa (Sassa et al., 2014).

En la evaluación de la genotoxicidad, también observamos (Fig. 5) que la presencia de micronúcleos tuvo un incremento máximo en ambas concentraciones de SUC probadas a las 72 h, y posteriormente a las 96 h se observó el mismo comportamiento que el ensayo cometa. La presencia de micronúcleos es un biomarcador de daño genético que ha sido ampliamente empleado en ecotoxicología (de Lima Cardoso et al., 2018). Los micronúcleos (MN) se forman debido a que durante el proceso de división celular, el ADN contenido en el núcleo, se replica y se divide equitativamente dando lugar a células hijas idénticas; cuando este proceso se produce de forma errónea debido a errores durante el proceso de replicación y posterior división, a rupturas cromosómicas o a sustancias genotóxicas (SUC), el material genético se desprende no se incorpora al núcleo de las células hijas y da origen a núcleos de menor tamaño que son los denominados MN (Hussain et al., 2017). Los resultados obtenidos en este biomarcador pueden deberse específicamente a la ruptura del ADN que ya fue demostrada en este estudio con los resultados del ensayo cometa o bien a la falta de la segregación de cromosomas que resulta en efectos aneugénicos y clastogénicos provocados por las ROS. Al igual que en el ensayo cometa, la disminución de MN, puede deberse a que inician los mecanismos de reparación en *C. carpio*.

El daño al DNA inducido por ROS, pueden generar mutagenicidad o citotoxicidad, dependiendo de si bloquean al DNA y/o RNA polimerasas, o no. Las consecuencias biológicas de las alteraciones al DNA, pueden ir desde inducción de muerte celular programada (apoptosis), o bien necrosis (Maynard et al., 2008).

En el presente trabajo, se demostró que también la SUC fue capaz de inducir apoptosis. Esto fue comprobado mediante dos biomarcadores la actividad de la caspasa-3 y la prueba de TUNEL. En ambos biomarcadores, se observaron incrementos significativos con respecto al control en las dos concentraciones empleadas (Fig 6 y 7), y una máxima respuesta a las 96 horas. La caspasa-3 es un importante biomarcador debido a que es una enzima ejecutora de la apoptosis que se encarga del desmantelamiento ordenado y muerte de la célula. Además, la vía intrínseca o mitocondrial y la vía extrínseca que implica a los receptores de la muerte como son el receptor 1 de TNF (TNFR-1) y Fas (CD95), convergen a nivel de la activación de la caspasa-3, para producir apoptosis (Wang et al., 2019; Zhou et al., 2019). Hasta el momento, una revisión exhaustiva de la literatura internacional no ha mostrado que la SUC esté involucrada en la inducción de la apoptosis en mamíferos y organismos acuáticos, sin embargo la presencia de ROS y daño al DNA si han sido asociados con activación de la caspasa-3 en organismos acuáticos (González-Pleiter et al., 2017; Selvaraj et al., 2013). La inducción de apoptosis por exposición a SUC fue corroborada por la prueba de TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) que es una técnica para detectar la fragmentación del ADN marcando el fragmento terminal de los ácidos nucleicos y además de ser una prueba confirmatoria de la apoptosis (Chen et al., 2018; Zeng et al., 2014). Así mismo, el ensayo de TUNEL es muy eficaz para identificar daño al ADN in situ, e identifica en las células sanguíneas las etapas iniciales de la apoptosis y los cuerpos apoptóticos dados por la exposición a sustancias xenobióticas (Quan et al., 2019). Como ya se mencionó previamente, las ROS generados por el fenómeno de estrés oxidativo por exposición a SUC en *Cyprinus carpio* (Saucedo-Vence et al., 2017) son las responsables de las alteraciones al ADN y del proceso de apoptosis en las células sanguíneas de la carpa común.

Aunque la SUC ha demostrado que no se biotransforma en seres humanos, esta ha demostrado tener una alta estabilidad y ser resistente en el medio ambiente (Grice and Goldsmith, 2000), que favorece su bioconcentración en sangre como fue demostrado en este estudio, ya que con el paso del tiempo la concentración de SUC va disminuyendo de

los sistemas de exposición, pero va aumentando su concentración en la sangre de la carpa. Estos datos, muestran una correlación directa, ya que al ir aumentando la concentración de SUC en la sangre van incrementando los biomarcadores de daño al ADN y de apoptosis.

Los resultados obtenidos en este estudio, permiten esclarecer de manera más exacta los mecanismos de toxicidad inducidos por este edulcorante en especies de interés económico como *Cyprinus carpio*. Sin embargo, sería importante valorar estas pruebas a mayores tiempos de exposición, que nos permitan saber en qué momento se activan los mecanismos de reparación o bien si los daños son irreversibles por la exposición a este xenobiótico.

## **pH**

En la figura 8 se observó una disminución del pH respecto al tiempo. Esto puede deberse a la fase post-mortem del organismo donde se lleva a cabo una glucólisis anaerobia que se lleva a cabo en el músculo, disminuyendo el pH por la producción de ácido láctico que tiene relación con la cantidad de glucógeno en los tejidos, la disminución de este compuesto es una respuesta del estrés inducido por pesticidas, metales y efluentes, incluyendo a los contaminantes emergentes (Cazenave 2014 et al ; Preto 2014 y Morachis 2014), Saucedo et al., (2016) corroboran que la carpa común presenta estrés oxidativo en presencia de sucralosa.

## **Solubilidad**

La miosina juega un papel fundamental en las propiedades funcionales del pescado, ya que es el componente mayoritario de las proteínas miofibrilares, la estabilidad de las funciones del alimento en carne de pescado está relacionada al comportamiento de la miosina, en estudios como el de Maitena et al. (2004) indican que el punto isoeléctrico del lado ácido de la miosina es producto de la pérdida de la carga de lisina por reacciones de oxidación con malonaldehído (Estevez, 2011).

En la figura 9 observamos la solubilidad de las proteínas; mostrando una disminución significativa respecto al control en los primeros tiempos de exposición, sin embargo, al tiempo de 72 y 96 horas existe un aumento en ambas concentraciones. Un aumento de la solubilidad puede interpretarse como un daño a las proteínas, debido a la presencia de especies reactivas de oxígeno que son generadas como mecanismo de las defensas antioxidantes ante una sustancia tóxica (Halliwell y Gutteridge, 1999), es decir, el daño a proteínas estaría obligando a la formación de nuevos enlaces entre la proteína, de tal manera que la proteína soluble disminuye para el caso de la especie expuesta a la 12 y 24 horas, probablemente llevando a cabo una conformación diferente de la estructura proteica.

La solubilidad de las proteínas (figura 9), van correlacionadas con la proteína soluble, ya que como se mencionó anteriormente, la presencia de sucralosa, puede actuar a nivel proteico, pudiéndose dar un cambio en la conformación de la proteína, formándose nuevos enlaces proteína-proteína, formación de nuevas redes, enlaces iónicos, enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro (Kinsella et al., 1985), de esta manera también podría existir una degradación proteica (Swaisgood, 1982) dando como consecuencia una mayor solubilidad.

### **Determinación de grupos sulfhídrico**

La presencia de grupos sulfhídrico disminuyó probablemente por la oxidación de grupos SH en puentes disulfuro, dicha conversión es uno de los primeros eventos observables durante la formación de radicales mediados por oxidación de proteínas. La cisteína presente en el núcleo catalítico de la cabeza de miosina es quizás el residuo más susceptible a los radicales de oxígeno y el primero en ser oxidado (Park et al., 2006). Por lo tanto, los enlaces disulfuro son de gran importancia en la conformación de la estructura terciaria de las proteínas, por lo que es termodinámicamente más estable cuando otras fuerzas de atracción son débiles confiriendo firmeza al músculo. Cuando se observa una mayor cantidad de enlaces disulfuro, las proteasas presentes son tal vez incapaces de

llevar a cabo su función, disminuyendo así la degradación de las propiedades funcionales (Pilosoff, 2000).

### **CRA**

La capacidad de retención de agua se define como la habilidad de la carne de mantener el agua propia o añadida después de ser aplicada una fuerza externa (Lun et al., 2008; citado en Lu 2016).

Es un parámetro cualitativo importante en la industria alimentaria para los atributos sensoriales, así como la influencia en el producto durante su procesamiento o almacenamiento, en la figura 11 se observó una disminución de la capacidad de retención de agua (CRA) a medida que incrementó el tiempo de exposición. Lu, Wang, Luo (2016), menciona que la oxidación proteica fue un factor restrictor importante para la capacidad de las miofibrillas de absorber agua, el incremento de la acción proteolítica y el entrecruzamiento de las proteínas miofibrilares ha demostrado que puede afectar negativamente la CRA del músculo.

Algunas investigaciones han encontrado una correlación negativa entre la capacidad de retención de agua y la dureza de músculo de pescado Gault, (1985), así mismo Hufflonergan y Lonergan (2005) demostraron que la acción proteolítica y el entrecruzamiento disminuyen la capacidad de retención de agua.

### **TPA**

La textura es uno de los atributos primarios que junto con el color, sabor y olor conforman la calidad sensorial de los alimentos. Es una de las características de calidad más apreciadas por el consumidor (ref. 10, 11).

Los resultados del análisis de perfil de textura (TPA) se observan en la tabla 4, donde existieron diferencias significativas respecto al control para los cinco atributos evaluados: dureza, elasticidad, cohesividad, gomosidad y masticabilidad. Badii y Howell (2002) mencionan que una disminución de la dureza, elasticidad y masticabilidad están

directamente relacionados con la desnaturalización de proteínas, donde hay un mayor número de enlaces de hidrógeno en la matriz proteica, dando como resultado una disminución en la capacidad de retención de agua. A partir de las 72 horas hubo un incremento en dureza cohesividad y masticabilidad lo que estaría indicando la formación de enlaces disulfuro.

#### **IV. CONCLUSIONES**

Los resultados de este estudio demuestran que las concentraciones de sucralosa utilizadas (0.05 µg/L y 155 µg/L) son capaces de inducir un daño a ADN y apoptosis. Además de que estos se relacionan con la calidad de la carne de *Cyprinus carpio*.

Los parámetros fisicoquímicos pH, solubilidad, grupos sulfhídrico, capacidad de retención de agua y del análisis de perfil de textura de la carne de *Cyprinus carpio* mostraron diferencia significativa en los diferentes tiempos de exposición analizados, lo que se encuentra en concordancia con los resultados de geno y citotoxicidad.

La presencia de sucralosa en cuerpos de agua va a tener un efecto en la calidad de la carne de la carpa común, afectando la funcionalidad de las proteínas y esto a su vez a modificaciones de los parámetros fisicoquímicos de la carne.

Se requieren más estudios acerca de los efectos de sucralosa sobre organismos acuáticos y como afectan las propiedades alimenticias de estos organismos.

## V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arbeláez, P., Borull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., (2015). Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A* 1393, 106–114.

Bennett D. (2008). The Intense Sweetener World, Ehrenberg Centre for Research in Marketing. [http://www.lsbu.ac.uk/bus-ehrenberg/documents/High Intensity Sweeteners.pdf](http://www.lsbu.ac.uk/bus-ehrenberg/documents/High%20Intensity%20Sweeteners.pdf).

Barceló Damiá y LÓPEZ, María J. (2007) Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona

Bassoli A., Merlini L., in: B. Caballero. (2003). (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed., Academic Press, Oxford, pp. 5688–5695.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248---254.

Brorstrom-Lunden, E., Svenson, A., Viktor, T., Woldegiorgis, A., Remberger, M., Kai, L., Dye, C., Bjerke, A., Schlabach, M., (2008). Measurements of sucralose in the Swedish screening program 2007 – part 2: Sucralose in biota and regional STP samples. IVL Report B1795. Sweden, Swedish Environmental Research Institute, Stockholm.

Brusick D., Grotz, V.L., Slesinki R., Kruger C.L., Hayes, A.W., (2010). The absence of genotoxicity of sucralose. *Food Chem. Toxicol.* 48 (11), 3067–3072.

Cavaş T., & Ergene---Gozukara S. (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74(3), 264-271.

Cohen S. M., Arnold L. L., Emerson J. L. (2008). Safety of saccharin. *Agro Food Industry Hitech* 19 (6), 24–28.

De la Lanza-Espino G., Pulido S. H., Pérez J. L. C. (2000). Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores): Plaza y Valdés. 633 p

Domitrovic, H.A. (1997) El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: evaluación de la especie *Aequidens portalegrensis* (Hensel, 1870). *Revista de Ictiología* 5 (1-2): 37- 42p.

Eriksson-Wiklund, A.K., Adolfsson-Erici, M., Liewenborg, B., Gorokhova, E., (2014). Sucralose induces biochemical responses in *Daphnia magna*. *PLoS ONE* 9 (4), e92771.

Ferrer, I., Thurman, E.M., (2010). Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 4127–4134.

Frenzilli, G.; Nigro, M.; Lyons, B.P. (2009) The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, 681(1), 80-92.

Goguen, B.; Kedersha, N. (1993) Clonogenic cytotoxicity testing by microdrop encapsulation *Nature*, 363(6425), 189-190.

Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, M., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N. (2014) Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* Early Online: 1-9.

Gougeon R. S. M., Lee K., Field C. J. (2004). Canadian Diabetes Association National Nutrition Committee Technical Review: non-nutritive intense sweeteners in diabetes management. *Canadian J Diab.*; 28:385-99.

Grotz V. L., Munro I. C. (2009) An overview of the safety of sucralose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.*;55(1):1-5.

Hidaka, I., Yokota, S., (1967) Taste receptor stimulation by sweet taste substances in the carp. *The Japanese Journal of Physiology*, 17(6): 652-666.

Houtman, C. J. (2010) Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *J. Integr. Environ. Sci.* 7 (4), 271–295.

Huggett, D.B., Stoddard, K.I., (2011) Effects of the artificial sweetener sucralose on *Daphnia magna* and *Americamysis bahia* survival, growth and reproduction. *Food Chem. Toxicol.* 49, 2575–2579.

Kokotou M. G., Asimakopoulos A. G., Thomaidis N. S. (2012) Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. *Anal Methods*: 4(10):3057–70.

Lange F.T., Scheurer M., Brauch H.J., (2012) Artificial sweeteners- a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (9), 2503–2518.

Lillicrap, A., Langford, K., Tollefsen, K.E., (2011) Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 673–681.

Medeiros, M.H.G. (2008) DNA damage. In: Konigsberg---Fainstein, M. (Ed.), *Free radicals and Oxidative Stress. Medical Applications. Manual Moderno*, Mexico, DF, pp. 119, 122, 124.

Mortensen A. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects (2006) Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association*. 2004; 104(2):255-75.

Renwick AG (1986) The metabolism of intense sweeteners. *Xenobiotica*; 16 (10–11): 1057–71.

Richardson, S.D., (2010) Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 82 (12), 4742–4774.

Roberts A., Renwick A. G., Sims J., Snodin D. J. (2000) Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food Chem Toxicol*; 38(Suppl. 2):S31–41.

Saucedo-Vence K., Elizalde-Velázquez A., Dublán-García O., Galar-Martínez M., Islas-Flores H., SanJuan-Reyes N., García-Medina S., Hernández-Navarro M.D., Gómez-Oliván L.M., (2016) Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 575, 347-357.

Sang Z., Jiang Y., Tsoi Y.K., Leung K. S. Y. (2014) Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities. *Water Res.* 52, 260–274.

Scheurer M, Brauch HJ, Lange FT. (2009) Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal Bioanal Chem* 394:1585–1594.

Sims, J., Roberts, A., Daniel, J.W., Renwick, A.G., (2000) The metabolic fate of sucralose in rats. *Food Chem. Toxicol.* 38, 115–121.

Stuart, Marianne; *et al.* (2012) Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *En: Science of the Total Environment.* Vol. 416. p. 21

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson, B. Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu, J. C., & Sasaki Y. F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.

Tollefsen, K. E., Nizzetto, L., Huggett, D. B. (2012) Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *Science of the total environment*, 438: 510-516.

Van Stempvoort D. R., Roy J. W., Brown S. J., Bickerton G. (2011) Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *J Hydrol*; 401(1–2):126–33.

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64:178-189.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13(2): 57–149.

Weihrauch M. R., Diehl V., (2004) Artificial sweeteners-do they bear a carcinogenic risk? *Ann. Oncologia* 15 (10), 1460–1465.

Yebra-Biurrun M. C., in: Worsfold P., Townshend A. C. (2005) Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier Academic, San Diego, pp. 562–572.

Zygler A., Wasik A., Namiesnik J. (2009) Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (9), 1082–1102.

## VI. ANEXOS

Thank you for your submission to Science of the Total Environment

¿Tienes demasiado correo? [Cancelar suscripción](#)

Science of the Total Environment <eesserver@eesmail.elsevier.com>  
Lun 13/05/2019 06:26 PM  
Leobardo Manuel Gomez Oliven; mlujam\_9@hotmail.com; Octavio Dublan Garcia; mgalarm@ipn.mx; or-manuel-123@hotmail.com; Hariz Islas Flores; gerardo\_yayu1992@hotmail.com y 2 más

\*\*\* Automated email sent by the system \*\*\*

Dear Leobardo,

Thank you for sending your manuscript Alterations to DNA and apoptosis induced by sucralose in blood cells of Cyprinus carpio for consideration to Science of the Total Environment. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?  
We publicly share the average editorial times for Science of the Total Environment to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can viewed here: [http://journalinsights.elsevier.com/journals/0048-9697/review\\_speed](http://journalinsights.elsevier.com/journals/0048-9697/review_speed)

What happens next?  
Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Science of the Total Environment, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review".

Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".

3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: [http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/160/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/)

How can I track the progress of my submission?  
You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/STOTEN>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: lmgomez@uaemex.mx

If you need to retrieve password details, please go to: [http://ees.elsevier.com/STOTEN/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/STOTEN/automail_query.asp)

2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Science of the Total Environment.

Kind regards,  
Science of the Total Environment

If you require further assistance, you are welcome to contact our Researcher Support team 24/7 by live chat and email or 24/5 by phone: <http://support.elsevier.com>

**Alterations to DNA and apoptosis induced by sucralose in blood cells of *Cyprinus carpio***

**Gerardo Heredia-García<sup>1</sup>, Leobardo Manuel Gómez Oliván<sup>1\*</sup>, José Manuel Orozco-Hernández<sup>1</sup>, Marlenee Luja-Mondragón<sup>1</sup>, Hariz Islas-Flores<sup>1</sup>, Nely SanJuan-Reyes<sup>2</sup>, Marcela Galar-Martínez<sup>2</sup>, Sandra García-Medina<sup>2</sup>, Octavio Dublán-García<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan, Colonia Residencial Colón, CP 50120, Toluca, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu s/n y cerrada Manuel Stampa, Col. Industrial Vallejo., Ciudad de México, CP, 07700, Mexico

\*Corresponding author:

**Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván**

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan, Colonia Residencial Colón, CP 50120, Toluca, Estado de México, México. Telephone +(52) 7222173890; fax +(52) 7222173890. E-mail: [imgomezo@uaemex.mx](mailto:imgomezo@uaemex.mx); [lgolivan74@gmail.com](mailto:lgolivan74@gmail.com)

## **Abstract**

The occurrence of sucralose (SUC) has been demonstrated through the determination of concentrations in water, which range from  $\text{ng L}^{-1}$  to  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A previous study carried out by our research team demonstrated that SUC is capable of inducing oxidative stress in *Cyprinus carpio* at environmentally-relevant concentrations. With the previously-exposed background, the objective of this research was to evaluate if this sweetener was capable of inducing alterations to DNA and apoptosis in the blood cells of *C. carpio*. The carps were exposed to two environmentally-relevant concentrations ( $0.05$  and  $155 \mu\text{g L}^{-1}$ ) of SUC, and the following biomarkers were determined: comet assay, micronuclei test (MN), caspase-3 activity and the TUNEL assay. The results obtained showed that SUC is capable of inducing damage to DNA. A maximum increase of 35% was observed for C1 at 72 h and 23% for C2 at 72 h in the comet assay; increases of 586% and 507.7% for C1 and C2, respectively, were found through the MN test. The activity of caspase-3 showed a greater response for C1 and C2 at 96 h, with 271% and 493.5%, respectively. The TUNEL assay also showed a maximum response at 96 h, with 51.8 for C1 and 72.9 for C2. A correlation between DNA damage biomarkers, apoptosis and plasma levels of SUC in both concentrations. With the data obtained, we can conclude that SUC, at environmentally-relevant concentrations, was capable of generating DNA alterations and blood cell apoptosis in common carp.

**Key words:** sweeteners, apoptosis, DNA alterations, common carp

## 1. Introduction

Sweeteners are defined as food additives and are used to confer a sweet taste to foods, drinks, medication and health products such as toothpaste, are synthetically-elaborated compounds, leaving common sugar as the most sweet and a lesser energy supply (García-Almeida et al., 2013). These products are employed for those who are overweight, in the treatment of obesity, maintaining body weight, control of diabetes and to prevent cavities (Calzada-León et al., 2013). The artificial sweeteners most employed globally are: aspartam, neotame, acesulfame, saccharine, cyclamate, SUC and neohesperidin dihydrochalcone: its high production and consumption by people all over the world makes it possible for these products to be released into bodies of water, mainly through municipal and industrial effluents. Recently, these products have been catalogued as emerging contaminants (Kokotou et al., 2012). Of the aforementioned, only acesulfame, saccharine, cyclamate and SUC have been studied in bodies of water (Lange et al., 2012). In literature, there are reports that refer to the fact that SUC enters wastewater treatment plants, without achieving its removal and favoring its presence in bodies of water (Houtman, 2010). The occurrence of this sweetener has been evidenced in different studies. For example, at the discharge point of a wastewater treatment plant,  $11 \mu\text{g L}^{-1}$  were detected; in surface waters,  $\leq 3.6 \mu\text{g L}^{-1}$  were found (Brorström-Lundén et al., 2008). In Holland's subterranean waters, concentrations of  $24 \mu\text{g L}^{-1}$  (Van Stempvoort et al., 2011). In 2009, concentrations of SUC in oceanic and open waters from North Carolina to Florida in intervals of  $67\text{-}392 \text{ ng L}^{-1}$  (Mead et al., 2009). In surface water effluents, in concentrations of  $\leq 2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  (Ferrer and Thurman, 2010; Loos et al., 2009; Neset et al., 2010; Scheurer et al., 2009; Torres et al., 2011), in rivers of 27 countries of Europe, concentrations above  $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$  (Richardson,

2009) were observed. More recently, Arbeláez et al. (2015) of Spain found river water concentrations of 0.05 and 155  $\mu\text{g L}^{-1}$ . In regard to the toxic effects of this compound, the information on toxicity is limited; however, some data reported in international literature concerning the toxicity of this sweetener are the following: Lillicrap et al. (2011) evaluated the capacity of bioaccumulation of SUC in algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*), the crustacean (*Daphnia magna*) and the zebra fish (*Danio rerio*) at concentrations of 10 and 100  $\text{mg L}^{-1}$ , obtaining low factors of bioaccumulation and concluding that SUC does not bioaccumulate in said aquatic life. Huggett and Stoddard (2011) employed concentrations of 93 and 180  $\text{mg L}^{-1}$  of SUC with species such as *Daphnia magna* and *Americamysis bahía*. The results obtained demonstrated that these concentrations of sweetener did not affect the survival, growth and reproduction of these species. In contrast, in another study with *D. magna* employed as a biomarker, it was reported for the first time that exposure to SUC at concentrations of 0.0001-5  $\text{mg L}^{-1}$  generated alterations in physiology and mobility of these organisms. These authors attributed responses to neurological and oxidative damage (Eriksson Wiklund et al., 2014). In recent times, our research team determined that SUC, at environmentally-relevant concentrations of 0.05 and 155  $\mu\text{g L}^{-1}$ , are capable of inducing oxidative stress in blood, gills, liver, brain and muscle of juveniles of *Cyprinus carpio* (Saucedo-Vence et al., 2017). The data previously mentioned and specially those obtained in the group led to the proposal of the present research, due to the fact that oxidative stress has been associated with DNA alterations and apoptosis (García-Medina et al., 2013, 2017; Gómez-Oliván et al., 2017; Islas-Flores et al., 2017). Reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative stress induced by SUC in carp are involved in the process of damage at the genetic level, not only because they are capable of interacting over

DNA in a direct manner, but also because they affect the transduction of signals, cell proliferation and intercellular communication; also, DNA damage is capable of inducing the expression of the p53 proteins, generating apoptosis or cell death (Canistro et al., 2012; Chen et al., 2018; Gómez-Oliván et al., 2014; SanJuan-Reyes et al., 2015; Schieber and Chandel, 2014). The alterations to DNA were monitored through the comet assay (unicellular electrophoresis) [Jha, 2008], micronuclei test (Bolognesi and Cirillo, 2014; Bolognesi and Hayashi, 2011) and apoptosis through caspase-3 activity (Kurokawa and Kornbluth, 2009; Macip et al., 2003) and the TUNEL assay (Formigari et al., 2007). It is important to note that, in this study, *Cyprinus carpio* was used as a biomarker, due to the fact that the species is easy to culture, maintain the laboratory and is sensitive to contaminants such as SUC (Formigari et al., 2007). For all the aforementioned, the objective of this study was to evaluate cellular and genetic damage induced by two different environmentally-relevant concentrations of SUC (0.05 and 155  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in the blood of the *C. carpio* sweetwater teleost fish using DNA damage and apoptosis biomarkers.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Test substance**

The sucralose standard (1,6-dichloro-1,6-dideoxy- $\beta$ -D-fructofuranosyl-4-chloro-4-desoxy- $\alpha$ -D-galactopyranoside) utilized in the study was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The purity of the standard was  $\geq 98\%$ ,  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{O}_8$ , with a molecular weight of 397.63 (CAS number 56038-13-2).

For the determination of SUC in water and blood, the reagents employed were HPLC-grade. The formic acid for LC-MS analysis was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and nitrogen gas was obtained from INFRA, S.A. de C.V. (Mexico City, Mexico). Ultrapure water was obtained using a water purification system provided by Merck Millipore. The acetonitrile was purchased from Sigma-Aldrich. The reagents employed in the DNA damage and apoptosis biomarkers were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless otherwise indicated.

## **2.2 Obtention and maintenance of the test organism**

The test organisms employed were common carp *Cyprinus carpio* and were obtained from the carp-breeding center at Tiacaque, State of Mexico, transported in polyethylene bags with water and oxygen, to the Lab. Of Environmental Toxicology of the Faculty of Chemistry of the Autonomous University of the State of Mexico. Posteriorly, the organisms were kept in 160-L-capacity fish tanks for an adaptation time of twenty days, at room temperature with 12-hour periods of natural light and obscurity, continuous oxygenation, 7.4 pH and daily feeding (Gómez-Oliván et al., 2017).

## **2.3 Experimental design in order to carry out the studies of DNA damage and apoptosis**

For the experimental design, organisms of  $12.01 \pm 0.27$  cm long and a weight of  $28.13 \pm 1.4$  g, were used. The toxicity tests consisted in the incorporation of SUC at environmentally-relevant concentrations of  $0.005 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $155 \mu\text{g L}^{-1}$  (Arbeláez et al., 2015).

For said end, fifteen test systems with 7 liters and fifteen fish each, were employed: five of them were for concentration 1 ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ), five of concentration 2 ( $155 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and five corresponding to the control group (without SUC). The times of exposure were 12, 24, 48, 72 and 96 h. The study was carried out in triplicate. In the experiment, a total of 225 organisms were employed. Once each exposure time had been finalized, the organisms of each system were placed in a tank of eugenol ( $0.02 \text{ mg mL}^{-1}$ ), with the finality of anesthetizing and obtaining the blood samples of the tail vein with a hypodermic needle of 1 mL, previously heparinized. With the blood samples, tests were carried out to determine the damage to DNA (comet assay and micronuclei test) and of apoptosis (caspase-3 activity and TUNEL assay), employing the methodologies described next:

## **2.4 Test to evaluate DNA damage**

### **2.4.1 Unicelular electrophoresis (comet assay)**

In order to evaluate DNA damage, the methodology employed, described by Tice et al. (2000), 300  $\mu\text{L}$  of high-fusion point agarose were placed over the slides and were dried at room temperature, once the blood samples are obtained. Twenty microliters were mixed with 150  $\mu\text{L}$  of low melting point agarose at 0.7%. One-hundred microliters of the mixture were extended over the slides previously prepared and were solidified in ice. Once dry, DNA extraction was carried out and slides were submerged in a Coplin jar which contained lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% dimethylsulfoxide (DMSO), 1% Triton X-100) at a pH adjusted to 10 and 4 °C for an hour. The slides were transferred to an electrophoresis chamber at 300 mA and 25 V (4 °C, field intensity:  $0.8 \text{ V cm}^{-1}$ ) with alkaline solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA) pH 13 for 20 min and was stopped

with a neutralization buffer (0.4 M pH 7.4 Trizma base). Lastly, the DNA was stained with 50  $\mu\text{L}$  of ethidium bromide ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in order to be observed through a Zeiss Axiophot-1 epifluorescence microscope equipped with a Zeiss AxioCam HRc digital camera.

#### **2.4.2 Micronuclei test**

The micronuclei test consisted in the incorporation and extension of 10  $\mu\text{L}$  of blood sample in the slide, which was fixed with pure ethanol. Posteriorly, it was stained with 10% Giemsa for 10 min, followed by a rinse with running water. The slides were observed through an optical microscope, determining the number of micronucleated cells for each 1000 cells (Çavaş and Ergene-Gözükara, 2005).

The criteria used for determining the presence of micronuclei (MN) were the non-linking of the small ovoid or round nuclei with the main nuclei, color and intensity of stain similar to the main nuclei (Kim and Hyun, 2006) and the diameter of 1/5-1/20 of the main nuclei.

### **2.5 Assays to evaluate apoptosis**

#### **2.5.1 Caspase-3 activity**

##### **2.5.1.1 Preparation of the cell extract**

With the finality of obtaining a positive control, Jurkart cells were cultured (ATCC # TIB-152). The culture was adjusted to a density of  $10^6 \text{ cells mL}^{-1}$  and  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  of anti-Fas mAb (clone # CH-11, MBL International, Cat. # SY-001) in order to induce apoptosis. In order to obtain the negative control, a solution of Jurkart cells was prepared. Simultaneously, anti-Fas mAb and 125  $\mu\text{L}$  of apoptosis inhibitor Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(O-methyl)-fluorometihyketone) were added.

Both samples were incubated in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> for 16 h at 37 °C, followed by a centrifugation at 450 x g for 10 min at 4 °C. The cells obtained were kept in ice and a rinse with cold PBS, was done; the cells were resuspended in cell lysis buffer, reaching a concentration of 10<sup>8</sup> cells mL<sup>-1</sup>. The lysed cells were incubated in ice for 15 min and were centrifuged at 15000 x g for 20 min at 4 °C, storing the supernatant.

#### **2.5.1.2 Colorimetric assay**

The instructions of the colorimetric kits were followed, (CaspACETM, Promega, Madison, WI) employing a 96-well microplate with a flat bottom. The blank was prepared with 32 µL of caspase buffer [312.5 mM HEPES, pH 7.5; 31.25% saccharose; 0.3125% CHAPS (3-[(3-Colamidepropyl)-dimethylammonium]-propano sulfonate)], 2 µL of DMSO, 10 µL of dithiothreitol (DTT; 100 mM) and 54 µL of deionized water. In the exposed group, 32 µL of caspase buffer, 2 µL of DMSO, 10 µL of DTT, 24 µL of blood sample and 54 µL of deionized water. Finally, for the positive and negative control, 32 µL of caspase buffer, 2 µL of DMSO, 10 µL of DTT, 20 µL of cell extract (for each case) and 54 µL of deionized water.

To all the solutions prepared, 2 µL of DEVD-pNA substrate were added, a plate was covered with parafilm and was incubated at 37 °C for 4 h. The absorbance was read at 405 nm and the caspase-3 activity was calculated. The results were expressed as nM of free pNA h<sup>-1</sup> µg of protein<sup>-1</sup>.

### **2.5.2 TUNEL assay**

The instructions of the ApopTag S7110 fluorescein kit were followed. Three-hundred of blood were centrifuged at 800 x g for 5 min at 4 °C, the cells obtained were resuspended in 50 µL of mounting solution, 1 µL of this solution was placed on a slide previously prepared with poly-L-lysine and was dried at 60 °C for 5 min. Once dry, the cells were fixed with cold acetone for 10 min and hydration was carried out through successive rinses with solutions of xylene-absolute ethanol of 96, 80, 70, 60, 50% (v/v) and with distilled water. One microliter of proteinase K (20 µg mL<sup>-1</sup>) was added to the hydrated cells and three rinses were carried out for 1 min with PBS (0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl) pH 4, 60 µL of equilibrium buffer were added and were incubated with 65 µL of TdT enzyme for 60 min at 37 °C. The cells were washed with PBS and the anti-FICT conjugate was added for 30 min at room temperature for the labelling of cells and a rinse with PBS was carried out. Finally, the cells were stained with propidium iodine (1.5 µL mL<sup>-1</sup>) to be observed in an epifluorescence microscope equipped with a digital camera.

The negative control was obtained as previously described, but without adding TdT, and the positive control was obtained with cells treated with DNase (1.5 µL mL<sup>-1</sup>). A total of 100 cells per sample were analyzed, expressing apoptosis through TUNEL-positive cells.

## **2.6 Determination of SUC in water and plasma of common carp by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS).**

In order to determine the concentration of SUC in water and plasma of *Cyprinus carpio*, the methodology established by Saucedo-Vence et al. (2017) was used, for which a stock solution of sweetener ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ), using methanol and ultrapure water (50%/ 50%). This solution was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in bottles covered from the light. For the determination of this compound, an Agilent 1290 Infinity HPLC system coupled to an Agilent 6430 Triple Quadrupole MS system capable of ionization by electrospray (ESI). The injection volume was  $50 \mu\text{L}$ . The chromatographic conditions were: the process of separation was carried out with an elution gradient with acidulated ultrapure water with formic acid at pH 2.5 (solvent A) and acetonitrile (solvent B) as a mobile phase. The gradient started isocratically at 5% of B for 3 min and later incremented to 75% at 6 min. Afterwards, it increased at 100% at 1 min, remained constant for 1 min and finally returned to 5% of B at 1 min. Eclipse Plus C18 columns ( $2.1 \times 50 \text{ mm}$ ,  $1.8 \mu\text{m}$ ) were employed. The temperature was of  $25^{\circ}\text{C}$  and the flow was of  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ . The elution period of SUC was  $< 8 \text{ min}$ . The analysis was carried out in negative ionization mode employing Multiple Reaction Monitoring (MRM) using the transitions of the ion precursor/product 395/359.

The ESI-MS conditions employed were: nebulizer pressure of 45 psi, drying gas flow ( $\text{N}_2$ ) of  $11 \text{ L min}^{-1}$ , drying gas temperature of  $350^{\circ}\text{C}$  and capillary voltage of 4000 V.

For the determination of SUC in water samples, the systems used in section 2.3 were employed, and of each system, 10-mL samples were taken. The samples were acidified with 1 M HCl and SUC was extracted from 1-mL water samples with 5 mL of methanol:water (1:1). The mixture was centrifuged at 1800 x g for 10 min, and the organic layer obtained was used for its analysis. For the plasma samples (the samples obtained in section 2.3), cold acetone was added and was centrifuged at 2500 x g for 5 min. The supernatant was separated and SUC concentration was determined.

### **2.7 Correlation between the plasma concentrations of SUC in *C. carpio* and the biomarkers of DNA damage and apoptosis**

Using the Pearson correlation test, the correlation between the plasma levels of SUC of both concentrations: C1 ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and C2 ( $155 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and the DNA damage biomarkers (comet assay and presence of MN) and those of apoptosis (caspase-3 activity and TUNEL assay). Relation was established through the use of the Sigmastat v2.03 program.

### **2.8 Statistical analysis**

The normality of the data was established and the homoscedasticity through the Shapiro-Wilk and Levene test, respectively. Posteriorly, a *Bonferroni post hoc* test was used to evaluate significative differences. For said analysis, the Sigmastat v2.03 was employed.

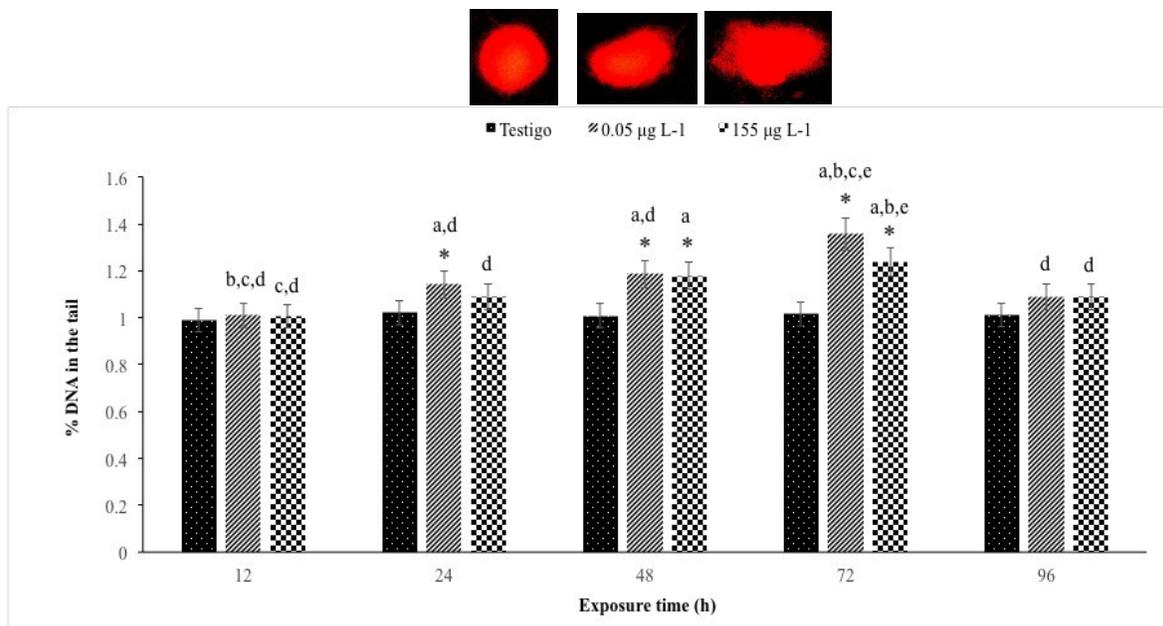
### **3. Results**

#### **3.1 Results of DNA alteration**

##### **3.1.1 Comet assay**

In figure 1, it can be observed that the percentage of DNA damage increased with regard to time from 24 hours, up to 72 hours. In both concentrations, a maximum increase of biomarker at 72 h. In C1 ( $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ), there was a significant increase at 24, 48 and 72 hours of 11.8, 18 and 35%, respectively ( $p < 0.05$ ), with regard to the control group. In C2 ( $155 \mu\text{g L}^{-1}$ ), significant increases of 17 and 23% were observed at 48 and 72 hours with regard to the control group, respectively ( $p < 0.05$ ).

After comparing exposure times, it can be observed that in C1 at 72 hours, significant decreases of 23.9, 18.4, 14.4 and 24.2% were observable with regard to 12, 24, 48 and 96 h. In the case of C2, statistically-significant decreases were observed at 12, 24 and 96 h of 22.1%, 13.9% and 13%, respectively, with regard to 72 h.

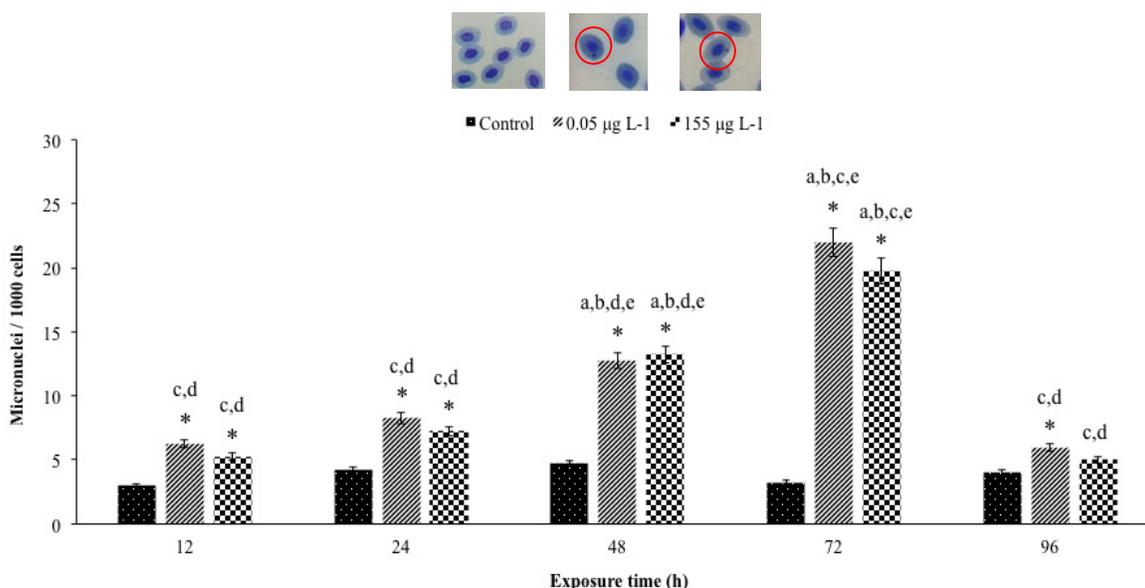


**Figure 1.** Determination of DNA damage through the comet assay in blood cells of *Cyprinus carpio* exposed to environmentally-relevant concentrations of SUC (0.05 and 155 µg L<sup>-1</sup>) at different exposure times. The bars represented the mean ± SEM of the damage index values of five specimens by concentration and by exposure time. The assay was carried out in triplicate. Significantly different from: \*control group; <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; <sup>e</sup>96 h (*Bonferroni post hoc*,  $p < 0.05$ ).

### 3.1.2 Micronuclei test in *C. carpio* blood cells exposed to SUC

In figure 2, we observed a significant progressive increase in the presence of MN from 12 hours of exposure, up to 72 hours, with regard to the control group in both concentrations. In C1, significant increases of 108.3, 94.1, 168.4, 586 and 50% at 12, 24, 48, 72 and 96 hours were observed with regard to the control group, respectively. In C2, increases of 75, 52.6, 178.9 and 507% at 12, 24, 48 and 72 hours were observed with regard to the control group, respectively ( $p < 0.05$ ). Comparing exposure times for C1, we observed significant decreases of 252, 166.7, 72.5 and 206.7% at 12, 24, 48 and 96 h with regard to 72 h,

respectively ( $p < 0.05$ ). In C2, we observed the same behavior, with decreases of 276, 172, 49 and 295% at 12, 24, 48 and 96 h with regard to 72 h, respectively ( $p < 0.05$ ).



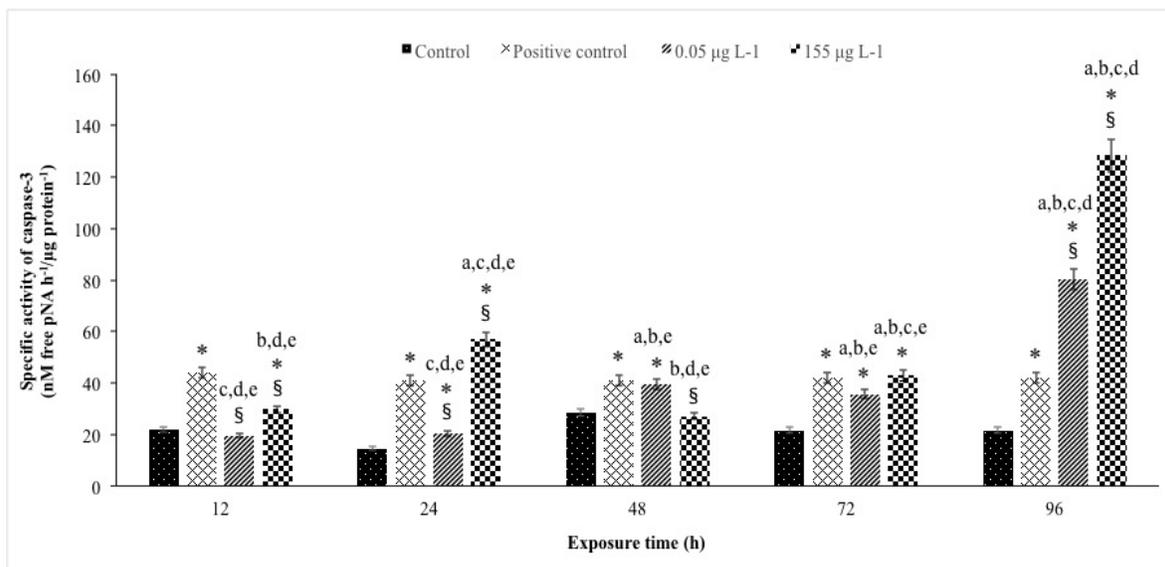
**Figure 2.** Frequency of micronuclei in blood cells of *Cyprinus carpio* exposed to environmentally-relevant concentrations of SUC (0.05 and 155 µg L<sup>-1</sup>) at different exposure times. The values are the mean of three repetitions ± SEM. Significantly different from: \*control group; <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; <sup>e</sup>96 h (*Bonferroni post hoc*,  $p < 0.05$ ).

### 3.2 Results of apoptosis in blood cells of *C. carpio* exposed to SUC

#### 3.2.1 Results of caspase-3 activity in blood cells of *C. carpio* exposed to SUC

Figure 3 showed the activity of caspase-3. As can be observed in C1, there was a statistically-significant increase of 40.6, 37.5, 65.3 and 271% at 24, 48, 72 and 96 h with regard to the control group, respectively ( $p < 0.05$ ). In C2, a statistically-significant increase of 36.1, 293.5, 98.3 and 493.5% at 12, 24, 72 and 96 h was observed with regard to the

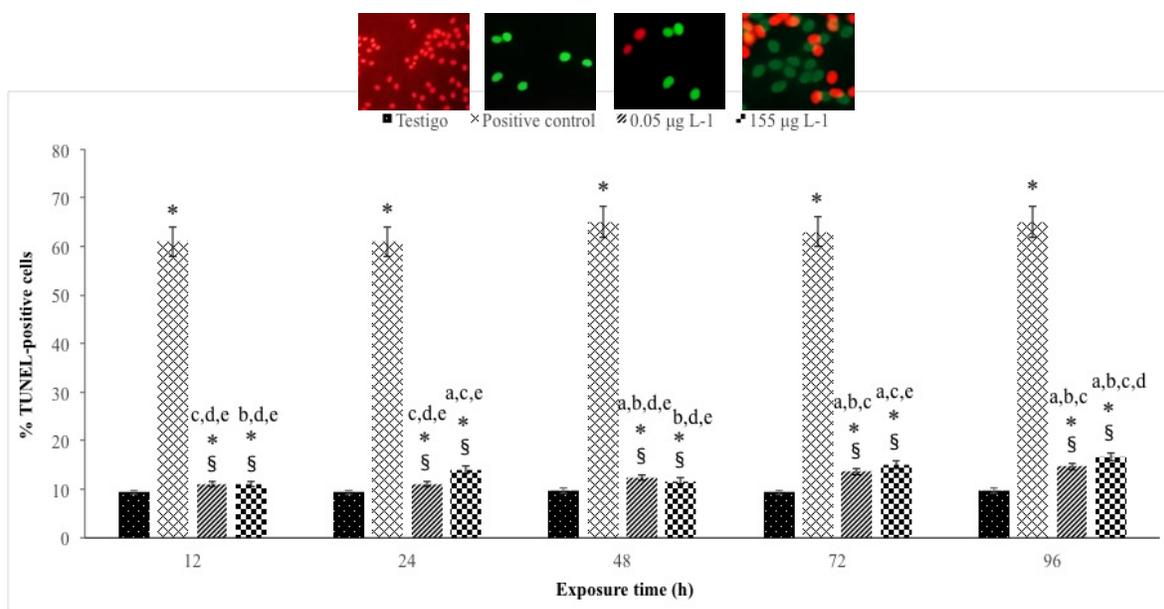
control group, respectively ( $p < 0.05$ ). After comparing the positive control with C1, statistically-significant decreases of 146.9, 140.2, 20.3, 34.7 were observed at 12, 24, 48 and 72 h, respectively ( $p < 0.05$ ). Nonetheless, at 96 h, for the same concentration, a significant increase of 63.5% was observed ( $p < 0.05$ ). When the positive control was compared with regard to C2 at 12 and 48 h, a decrease of 63.2 and 73.9% was observed, respectively ( $p < 0.05$ ). In contrast to 24 and 96 h, the biomarker significantly increased in 16.5 and 161.6% ( $p < 0.05$ ).



**Figure 3.** Activity of caspase-3 in blood cells of *Cyprinus carpio* exposed to environmentally-relevant concentrations of SUC (0.05 and 155 µg L<sup>-1</sup>) at different exposure times. The assay was carried out in triplicate. Significantly different from: \*control group; §Positive control <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; <sup>e</sup>96 h (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.2.2 Results of the TUNEL assay in blood cells of *C. carpio* exposed to SUC

Figure 4 shows the results of the positive apoptotic cells found in the TUNEL assay. As can be seen, in C1, there were significant increases of 17.9, 17.9, 27.6, 46.4 and 51.8% at 12, 24, 48, 72 and 96 h with regard to the control group, respectively ( $p < 0.05$ ). In C2, the same tendency in the rise of the biomarkers at the exposure times can be seen; in this case, said increases were of 17.9, 50.1, 20.7, 60.8 and 72.9%, respectively ( $p < 0.05$ ). Comparing the positive control with C1, there were significant decreases of 454.5, 463.6, 394.7, 336.6 and 322.9% at 12, 24, 48, 72 and 96 h, respectively ( $p < 0.05$ ). The comparison between the positive control and C2 presented the same tendency, though only with decreasing percentages of 454.5, 342.8, 423.2, 306.7 and 271%, respectively ( $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** Percentage of TUNEL-positive cells in blood cells of *Cyprinus carpio* exposed to environmentally-relevant concentrations of SUC (0.05 and 155 µg L<sup>-1</sup>) at different exposure times. The assay was carried out

in triplicate. Significantly different from: \*control group; §Positive control <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; 96 h (Bonferroni post hoc,  $p < 0.05$ ).

### 3.3 Determination of the concentration of SUC in water and plasma of *Cyprinus carpio*

The data of the concentrations of SUC present in water, within the different systems of exposure and the plasma levels in *C. carpio* are presented in table 1. As can be seen, the plasma concentrations of SUC rose up to 9% in C1 and 4.9% in C2. On the contrary, in water, the concentration of SUC decreased once the exposure periods have transpired; for C1, there was a decrease of 60% and 36.8% for C2, with regard to the initial quantity of the systems at 96 h.

**Table 1.** Concentrations of SUC in the water of the systems and plasma of common carp *C. carpio* at different exposure times.

Exposure concentration	Exposure time	SUC in water system ng L <sup>-1</sup>	SUC in blood carp <i>Cyprinus carpio</i> ng L <sup>-1</sup>
Control group	12	ND	ND
	24	ND	ND
	48	ND	ND
	72	ND	ND
	96	ND	Nd
C1 0.050 µg L <sup>-1</sup>	12	0.04 ± 0.005	1 x 10 <sup>-3</sup> ± 1 x10 <sup>-4</sup>
	24	0.04 ± 0.003	1 x 10 <sup>-3</sup> ± 1 x10 <sup>-4</sup>
	48	0.03 ± 0.004	2.5 x 10 <sup>-3</sup> ± 2 x10 <sup>-4</sup>
	72	0.03 ± 0.001	4.2 x 10 <sup>-3</sup> ± 3 x10 <sup>-4</sup>
	96	0.02 ± 0.003	4.5 x 10 <sup>-3</sup> ± 1 x10 <sup>-4</sup>
C2 155 µg L <sup>-1</sup>	12	131.9 ± 2.7	5.8 ± 0.6
	24	128.4 ± 3.1	6.1 ± 0.9
	48	121.4 ± 3.9	6.5 ± 0.5

	72	112.6 ± 4.1	7.6 ± 0.8
	96	97.9 ± 2.6	8.3 ± 0.7

### 3.4 Correlation of the DNA damage and apoptosis biomarkers with the plasma levels of SUC in common carp *C. carpio*

The correlation between the plasma levels of SUC and the DNA damage and apoptosis biomarkers are shown in table 2. As can be seen, for both concentrations, the correlations were similar; however, for the comet assay and the micronuclei test, the maximum effect was observed at 72 h. For apoptosis biomarkers such as caspase-3 activity and the TUNEL assay, the maximum response was observed at 96 h.

**Table 2.** Pearson's correlation between plasmatic SUC concentrations and DNA damage and apoptosis biomarkers in *C. carpio*. Correlation coefficients >0.5 are significant (shown in bold).

Biomarkers	Time (h)	SUC	
		0.05 g L <sup>-1</sup>	155 g L <sup>-1</sup>
Comet assay	12	-0.182	<b>-0.812</b>
	24	<b>-0.899</b>	0.198
	48	-0.111	<b>-0.755</b>
	72	<b>-0.923</b>	<b>0.545</b>
	96	0.081	<b>-0.589</b>
Micronucleus test	12	<b>-0.792</b>	<b>1.000</b>
	24	<b>-0.960</b>	<b>-0.981</b>
	48	<b>1.000</b>	<b>-0.924</b>
	72	<b>-0.519</b>	<b>0.866</b>
	96	<b>0.866</b>	0.277
Caspase-3 activity	12	<b>-0.990</b>	<b>-0.925</b>
	24	<b>0.501</b>	<b>1.000</b>
	48	<b>-0.812</b>	<b>1.000</b>
	72	<b>-0.501</b>	<b>1.000</b>
	96	<b>-0.501</b>	<b>-0.826</b>
TUNEL assay	12	<b>-0.501</b>	<b>0.501</b>
	24	<b>0.501</b>	-0.188
	48	0.327	-0.263
	72	-0.397	<b>-0.501</b>
	96	0.240	0.090

#### 4. Discussion

For daily activities, current lifestyle and bad eating habits, the global population has presented degenerative and dangerous chronic illnesses such as obesity, diabetes, hypertension, cardiovascular illnesses, hyperlipidemia and hypercholesterolemia (Jiang et al., 2016; Kim et al., 2019; Lee et al., 2011). This panorama has generated preoccupation in the population concerning lifestyle and an equilibrated diet, which has led to an increase in the use of “light” or diet products and, as a consequence, the consumption of sweeteners. However, although these products have been considered as safe for human beings, the toxicological effects of its presence in the environment and biological effects on aquatic life have not been completely cleared up and some data has been controversial. As has been previously established, SUC is one of the sweeteners which has been previously identified

in bodies of water and has been studied with regard to its toxicological effects in aquatic life although information is limited. In this work, the possibility that SUC, at environmentally-relevant concentrations, generated DNA alterations and apoptosis in blood cells of the common carp *Cyprinus carpio*, was inquired.

The comet assay is a test which detects damage produced by a single or double break in DNA, oxidative damage induced and cross-linking of DNA-DNA/DNA-protein (de Lapuente et al., 2015). The results evidenced by the comet assay are shown in Fig. 1 and demonstrated that the two tested concentrations in this study generated DNA alterations. The maximum expression in this biomarker was observed at 72 h. These results could be due to the oxidation of bases [for example, 7,8-dihydrodeoxyguanosine (8-oxoG) and 8-oxoguanine] and for the generation of interruptions in the DNA chain by the reactive oxygen species (ROS). As was previously established by our research team, SUC at concentrations of 0.05 and 155  $\mu\text{g L}^{-1}$  is capable of inducing oxidative stress in blood, liver, brain, gills and muscle of *Cyprinus carpio* (Saucedo-Vence et al., 2017). Those results are consistent with those obtained by Eriksson Wiklund et al. (2014), which determined that SUC, at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 and 5000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , generated oxidative damage, evidenced by significant increases in the levels of TBARS in *Daphnia magna*, as well as an increase in the concentrations of acetylcholinesterase, provoking neurotoxicity in the daphnid. The same research team, in 2012, had demonstrated that concentrations of 0.5, 5 and 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  of SUC affected the physiology and locomotion of *D. magna* and *G. zaddach* (Wiklund et al., 2012).

It is well-known that ROS, as well as the radical anion superoxide ( $\text{O}_2^*$ ) and the radical

hydroxyl ( $^*OH$ ) have the capacity of extracting protons or attacking molecules in sites of high electron density, generating secondary radical species which were capable of suffering intramolecular rearranging. In nucleic acids such as DNA, puric and pyrimidine bases, as well as sugar, are susceptible to ROS attacks, which lead to modifications in the bases and ruptures in the chain (Valavanidis et al., 2006; Zaremba and Oliński, 2010). Specially, the radical hydroxyl  $^*OH$  has the capacity of hydroxylating C5 and C6 of the pyrimidine bases and C4, C5 and C8 of the puric bases in the DNA molecules (Evans et al., 2004; Gruber et al., 2018). The prior findings explain the results observed in the comet assay; however, after 72 h, a decrease in the biomarker was observed at 96 h, which would demonstrate that, at this time, the reparation mechanisms in carp were expressed (Sassa et al., 2014).

In the evaluation of genotoxicity, we also observed (Fig. 2) that the presence of micronuclei had a maximum increase in both concentrations of SUC tested at 72 h, and posteriorly at 96 h; the same behavior that was observed in the comet assay. The presence of micronuclei is a genetic damage biomarker which has been widely employed in ecotoxicology (de Lima Cardoso et al., 2018). The micronuclei (MN) form due to the fact that during the process of cell division, the DNA contained in the nuclei replicates and equally divides, giving way to twin daughter cells; when this process is produced in an erroneous form due to errors during the process of replication and its posterior division, to chromosomic ruptures or to genotoxic substances (SUC), the genetic material that detaches does not incorporate itself into the nuclei of the daughter cells and give origin to nuclei of a smaller size which are denominated MN (Hussain et al., 2017). The results obtained in this biomarker can be specifically due to the rupture of DNA, which had been demonstrated in this study with the results of the comet assay or the lack of segregation of chromosomes which result in

aneugenic and clastogenic effects provoked by ROS. As in the comet assay, the decrease of MN could be due to *C. carpio* repair mechanisms.

The damage to DNA induced by ROS could generate mutagenicity or cytotoxicity, depending if DNA and/or RNA polymerases are blocked or not. The biological consequences of the DNA alterations could range from induction of programmed cell death (apoptosis) to necrosis (Maynard et al., 2008).

In the present work, it was demonstrated the SUC was also capable of inducing apoptosis. This was shown through the biomarkers of caspase-3 activity and the TUNEL assay. In both biomarkers, significant increases with regard to the control group in both of the concentrations employed, was observed, (Fig 3 y 4), with a maximum response at 96 hours. Caspase-3 is an important biomarker due to the fact that it is an executor enzyme of apoptosis, which is in charge of the organized dismantling and death of the cell. Also, the intrinsic or mitochondrial route and the extrinsic route, which implicate the receptors of death such as receptor 1 of TNF (TNFR-1) and Fas (CD95), converge at the level of caspase-3 activation in order to produce apoptosis (Wang et al., 2019; Zhou et al., 2019). Up to this moment, an exhaustive revision of international literature has not shown that SUC is involved in the induction of apoptosis in mammals and aquatic life; however, the presence of ROS and DNA damage have been associated with the activation of caspase-3 in aquatic organisms (González-Pleiter et al., 2017; Selvaraj et al., 2013). The induction of apoptosis by exposure to SUC was corroborated by the TUNEL assay (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling), which was a technique for detecting the fragmentation of DNA, labeling the terminal fragment of the nucleic acids and also a confirmatory test of apoptosis (Chen et al., 2018; Zeng et al., 2014). Likewise, the TUNEL assay is very efficient in identifying DNA damage *in situ*, and to identify in blood cells, the

initial stages of apoptosis and the apoptotic bodies due to exposure to xenobiotic substances (Quan et al., 2019).

As previously mentioned, ROS generated through this phenomenon of oxidative stress by exposure to SUC in *Cyprinus carpio* (Saucedo-Vence et al., 2017) are those responsible for the DNA alterations and the apoptosis process in the blood cells of common carp.

Although SUC has demonstrated that it does not biotransform in human beings, it has demonstrated having a high stability and being resistant to the environment (Grice and Goldsmith, 2000), which favors its bioconcentration in blood, as was demonstrated in this study since, with the passing of time, the concentration of SUC decreased within the exposure systems, but increased its concentration in the blood of the carp. These data show that there is a direct correlation, since increasing concentration of SUC in blood increases DNA damage and apoptosis biomarkers.

The results obtained in this study allow to clarify, in the most precise manner, the toxicity mechanisms induced by this sweetener in species of economic interest such as *Cyprinus carpio*; however, it would be important to carry out the tests at greater exposure times, which would allow us to know at which moment the reparation mechanisms are activated or the damages are irreversible because of the exposure to this xenobiotic.

## **5. Conclusions**

The results obtained in this study allow us to conclude that SUC, at environmentally-relevant concentrations of 0.05 and 155  $\mu\text{g L}^{-1}$ , was capable of inducing alterations to DNA and to generate apoptosis in blood cells of *Cyprinus carpio*. These phenomena are associated with the generation of oxidative stress by this sweetener. The comet assay, MN

test, caspase-3 activity and TUNEL assay demonstrated to be sensitive, dependable and fast bioassays of the exposure of this sweetener in common carp.

## 6. References

- Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2015. Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1393, 106–114. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.03.035>
- Bolognesi, C., Cirillo, S., 2014. Genotoxicity biomarkers in aquatic bioindicators. *Current Zoology* 60, 273–284. <https://doi.org/10.1093/czoolo/60.2.273>
- Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205–213. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *The Stavanger Workshop Biological Effects of Environmental Pollution (BEEP) in marine coastal ecosystem* 78, S93–S98. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.02.015>
- Brorström-Lundén, E., Svenson, A., Viktor, T., Woldegiorgis, A., Remberger, M., Kaj, L., Dye, C., Bjerke, A., Schlabach, M., 2008. Measurements of sucralose in the swedish screening program 2007 -PART I; Sucralose in surface waters and STP samples. Report No. B1769.
- Calzada-León, R., Ruiz-Reyes, M. de la L., Altamirano-Bustamante, N., Padrón-Martínez,

- M.M., 2013. Características de los edulcorantes no calóricos y su uso en niños. *Acta Pediátrica de México* 34, 141–153.
- Canistro, D., Melega, S., Ranieri, D., Sapone, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Rizzoni, M., Paolini, M., 2012. Modulation of cytochrome P450 and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed in situ to surface water treated with chlorine or alternative disinfectants in different seasons. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 729, 81–89.  
<https://doi.org/10.1016/J.MRFMMM.2011.09.008>
- Çavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74, 264–271.  
<https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2005.06.001>
- Chen, H., Wang, P., Du, Z., Wang, G., Gao, S., 2018. Oxidative stress, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*) induced by tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate. *Aquatic Toxicology* 194, 37–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.001>
- de Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S.A., Borrás, M., Martins, M.G., Costa, P.M., Pacheco, M., 2015. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Frontiers in Genetics* 6, 180. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00180>
- de Lima Cardoso, R., Carvalho-Neta, R.N.F., de Castro, A.C.L., Ferreira, C.F.C., Silva, M.H.L., de Jesus Azevedo, J.W., Sobrinho, J.R.S.C., Santos, D.M.S., 2018. Histological and genotoxic biomarkers in *Prochilodus lacustris* (Pisces, Prochilodontidae) for environmental assessment in a protected area in the northeast of

- Brazil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 101, 570–579.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-018-2464-8>
- Eriksson Wiklund, A.-K., Adolfsson-Erici, M., Liewenborg, B., Gorokhova, E., 2014. Sucralose induces biochemical responses in *Daphnia magna*. *PLOS ONE* 9, e92771.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092771>
- Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S., 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567, 1–61. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.11.001>
- Ferrer, I., Thurman, E.M., 2010. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part VI* 1217, 4127–4134.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.020>
- Formigari, A., Irato, P., Santon, A., 2007. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects.
- García-Almeida, J.M., M<sup>a</sup> Casado Fdez, G., García Alemán, J., 2013. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr Hosp* 28, 17–31.
- García-Medina, S., Núñez-Betancourt A. J., García-Medina, A. L., Galar-Martínez, M., Neri-Cruz, N., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., 2013. The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminum levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 96, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.010>
- García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L.M., Ruiz-Lara, K., Islas-Flores, H., Gasca-Pérez, E., 2017. Relationship between genotoxicity and oxidative stress induced by mercury on common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Aquatic Toxicology*

192, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.09.019>

Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Sanjuan-Reyes, N., 2014. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 164, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.04.004>

Gómez-Oliván, L.M., Mendoza-Zenil, Y.P., SanJuan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., Ramírez-Durán, N., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. del C., Rodríguez-Fariñas, N., Islas-Flores, H., Elizalde-Velázquez, A., García-Medina, S., Pérez-Pastén Borja, R., 2017. Geno- and cytotoxicity induced on *Cyprinus carpio* by aluminum, iron, mercury and mixture thereof. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135, 98–105. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.09.037>

González-González, E.D., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Jiménez-Vargas, J.M., Razo-Estrada, C., Pérez-Pastén, R., 2014. Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in water from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood, and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67, 281–295. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0048-0>

González-Pleiter, M., Rioboo, C., Reguera, M., Abreu, I., Leganés, F., Cid, Á., Fernández-Piñas, F., 2017. Calcium mediates the cellular response of *Chlamydomonas reinhardtii* to the emerging aquatic pollutant Triclosan. *Aquatic Toxicology* 186, 50–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.021>

Grice, H.C., Goldsmith, L.A., 2000. Sucralose--an overview of the toxicity data. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial*

Biological Research Association 38 Suppl 2, S1-6.

- Gruber, D.R., Toner, J.J., Miers, H.L., Shernyukov, A. V, Kiryutin, A.S., Lomzov, A.A., Endutkin, A. V, Grin, I.R., Petrova, D. V, Kupryushkin, M.S., Yurkovskaya, A. V, Johnson, E.C., Okon, M., Bagryanskaya, E.G., Zharkov, D.O., Smirnov, S.L., 2018. Oxidative damage to epigenetically methylated sites affects DNA stability, dynamics and enzymatic demethylation. *Nucleic Acids Research* 46, 10827–10839. <https://doi.org/10.1093/nar/gky893>
- Houtman, C.J., 2010. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences* 7, 271–295. <https://doi.org/10.1080/1943815X.2010.511648>
- Huggett, D.B., Stoddard, K.I., 2011. Effects of the artificial sweetener sucralose on *Daphnia magna* and *Americamysis bahia* survival, growth and reproduction. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2575–2579. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.073>
- Hussain, B., Sultana, T., Sultana, S., Al-Ghanim, K.A., Masood, S., Ali, M., Mahboob, S., 2017. Microelectrophoretic study of environmentally induced DNA damage in fish and its use for early toxicity screening of freshwater bodies. *Environmental Monitoring and Assessment* 189, 115. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5813-x>
- Islas-Flores, H., Manuel Gómez-Oliván, L., Galar-Martínez, M., Michelle Sánchez-Ocampo, E., SanJuan-Reyes, N., Ortíz-Reynoso, M., Dublán-García, O., 2017. Cytogenotoxicity and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to a mixture of ibuprofen and diclofenac. *Environmental Toxicology* 32, 1637–1650. <https://doi.org/10.1002/tox.22392>
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207–221. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen014>

- Jiang, S.-Z., Lu, W., Zong, X.-F., Ruan, H.-Y., Liu, Y., 2016. Obesity and hypertension. *Experimental and therapeutic medicine* 12, 2395–2399. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3667>
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.05.019>
- Kim, J.K., Ailshire, J.A., Crimmins, E.M., 2019. Twenty-year trends in cardiovascular risk among men and women in the United States. *Aging Clinical and Experimental Research* 31, 135–143. <https://doi.org/10.1007/s40520-018-0932-y>
- Kokotou, M.G., Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S., 2012. Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. *Analytical Methods* 4, 3057. <https://doi.org/10.1039/c2ay05950a>
- Kurokawa, M., Kornbluth, S., 2009. Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell* 138, 838–854. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.021>
- Lange, F.T., Scheurer, M., Brauch, H.-J., 2012. Artificial sweeteners—a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 2503–2518. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5892-z>
- Lee, J., Ji, K., Lim Kho, Y., Kim, P., Choi, K., 2011. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1216–1225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.014>
- Lillicrap, A., Langford, K., Tollefsen, K.E., 2011. Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 673–681. <https://doi.org/10.1002/etc.433>
- Loos, R., Gawlik, B.M., Boettcher, K., Locoro, G., Contini, S., Bidoglio, G., 2009.

- Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. *Journal of chromatography. A* 1216, 1126–31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.048>
- Macip, S., Igarashi, M., Berggren, P., Yu, J., Lee, S.W., Aaronson, S.A., 2003. Influence of Induced Reactive Oxygen Species in p53-Mediated Cell Fate Decisions. *Molecular and Cellular Biology* 23, 8576. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8576-8585.2003>
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N.C., Bohr, V.A., 2008. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30, 2–10. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn250>
- Mead, R.N., Morgan, J.B., Avery, G.B., Kieber, R.J., Kirk, A.M., Skrabal, S.A., Willey, J.D., 2009. Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States. *Marine Chemistry* 116, 13–17. <https://doi.org/10.1016/J.MARCHEM.2009.09.005>
- Morachis-Valdez, G., Dublán-García, O., López-Martínez, L.X., Galar-Martínez, M., Saucedo-Vence, K., Gómez-Oliván, L.M., 2015. Chronic exposure to pollutants in Madín Reservoir (Mexico) alters oxidative stress status and flesh quality in the common carp *Cyprinus carpio*. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 9159–9172. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-4061-7>
- Neset, T.-S.S., Singer, H., Longrée, P., Bader, H.-P., Scheidegger, R., Wittmer, A., Andersson, J.C.M., 2010. Understanding consumption-related sucralose emissions — A conceptual approach combining substance-flow analysis with sampling analysis. *Science of The Total Environment* 408, 3261–3269. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.04.003>
- Quan, Y., Gong, L., He, J., Zhou, Y., Liu, M., Cao, Z., Li, Y., Peng, C., 2019. Aloe emodin

- induces hepatotoxicity by activating NF- $\kappa$ B inflammatory pathway and P53 apoptosis pathway in zebrafish. *Toxicology Letters* 306, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.007>
- Richardson, S.D., 2009. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry* 81, 4645–4677. <https://doi.org/10.1021/ac9008012>
- SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., González-González, E.D., Cardoso-Vera, J.D., Jiménez-Vargas, J.M., 2015. NSAID-manufacturing plant effluent induces geno- and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment* 530–531, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.088>
- Sassa, A., Çağlayan, M., Dyrkheeva, N.S., Beard, W.A., Wilson, S.H., 2014. Base excision repair of tandem modifications in a methylated cpg dinucleotide. *Journal of Biological Chemistry* 289, 13996–14008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557769>
- Saucedo-Vence, K., Dublán-García, O., López-Martínez, L.X., Morachis-Valdes, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., 2015. Short and long-term exposure to diclofenac alter oxidative stress status in common carp *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology* 24, 527–539. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1401-9>
- Scheurer, M., Brauch, H.-J., Lange, F.T., 2009. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 1585–1594. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2881-y>
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB* 24, R453-62. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Selvaraj, V., Tomblin, J., Yeager Armistead, M., Murray, E., 2013. Selenium (sodium

- selenite) causes cytotoxicity and apoptotic mediated cell death in PLHC-1 fish cell line through DNA and mitochondrial membrane potential damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 87, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.09.028>
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Torres, C.I., Ramakrishna, S., Chiu, C.-A., Nelson, K.G., Westerhoff, P., Krajmalnik-Brown, R., 2011. Fate of Sucralose During Wastewater Treatment. *Environmental Engineering Science* 28, 325–331. <https://doi.org/10.1089/ees.2010.0227>
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 178–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>
- Van Stempvoort, D.R., Roy, J.W., Brown, S.J., Bickerton, G., 2011. Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *Journal of Hydrology* 401, 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2011.02.013>
- Wang, W., Chen, J., Liao, B., Xia, L., Hou, S., Wang, Z., Lu, Y., 2019. Identification and functional characterization of Histone-like DNA-binding protein in *Nocardia seriolae* (NsHLP) involved in cell apoptosis. *Journal of Fish Diseases* 42, 657–666. <https://doi.org/10.1111/jfd.12962>
- Wiklund, A.-K.E., Breitholtz, M., Bengtsson, B.-E., Adolfsson-Erici, M., 2012. Sucralose –

An ecotoxicological challenger? Chemosphere 86, 50–55.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.049>

Zaremba, T., Oliński, R., 2010. Oxidative DNA damage--analysis and clinical significance.

Postepy biochemii 56, 124–38.

Zeng, C., Sun, H., Xie, P., Wang, J., Zhang, G., Chen, N., Yan, W., Li, G., 2014. The role of apoptosis in MCLR-induced developmental toxicity in zebrafish embryos. Aquatic Toxicology 149, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.021>

Zhou, Z., Zhou, B., Chen, H., Tang, X., Wang, Y., 2019. Reactive oxygen species (ROS) and the calcium-(Ca<sup>2+</sup>) mediated extrinsic and intrinsic pathways underlying BDE-47-induced apoptosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadal cells. Science of The Total Environment 656, 778–788.

of The Total Environment 656, 778–788.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.306>