

**Universidad Autónoma de Baja California**

**Facultad de Ciencias**



T e s i s

---

**Alteraciones inducidas por exposición crónica a dosis relevantes al ambiente de arsénico durante el desarrollo de pez cebra (*Danio rerio*) en la generación parental**

---

Presenta:

**Selma Sofía Torres Valles**

Director:

**Dr. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas**

Febrero, 2019

Ensenada, B. C., México

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias

Licenciatura en Biología

Alteraciones inducidas durante el desarrollo en la generación parental de  
pez cebra (*Danio rerio*) por exposición crónica a dosis relevantes al  
ambiente de arsénico

Tesis Profesional

Que presenta:

Selma Sofía Torres Valles

Aprobado por:

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas

SINODAL

Dr. Gorgonio Ruiz Campos

SECRETARIO

Dr. Julio Enrique Valencia Suarez

Ensenada, B. C., México, a 5 de febrero de 2019

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

Selma Sofía Torres Valles

Presente.

Por este conducto le informamos a usted que después de haber leído su trabajo de tesis titulado “Alteraciones inducidas durante el desarrollo en la generación parental de pez cebra (*Danio rerio*) por exposición crónica a dosis relevantes al ambiente de arsénico”, consideramos que cumple con los requisitos para aprobar la fase escrita de su **examen reglamentario**.

Atentamente:



DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas



SINODAL

Dr. Gorgonio Ruiz Campos



SECRETARIO

Dr. Julio Enrique Valencia Suarez

## **Resumen**

El arsénico ( $As_i$ ) es una de las sustancias más tóxicas la cual se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente con efectos de salud generalizados en poblaciones humanas y en la biodiversidad. A pesar de que el  $As_i$  es un contaminante frecuente, es escasa la información relacionada a los efectos de la exposición crónica a concentraciones relevantes al ambiente en organismos acuáticos. En este estudio, estandarizamos las condiciones para una exposición a largo plazo utilizando el modelo del pez cebra y posteriormente investigamos el efecto del  $As_i$  sobre marcadores de embriotoxicidad, epigenéticos y morfométricos a través del desarrollo. Los organismos fueron expuestos de forma crónica a 50 y 500 ppb de  $As_i$  a partir de las 4 horas post-fertilización hasta los 150 días post-fertilización. Nuestros resultados indican que la exposición crónica a  $As_i$  causa alteraciones sobre el desarrollo del pez cebra, aumentando la letalidad, frecuencia cardíaca y muerte celular durante el desarrollo embrionario. Así mismo se observó una disminución significativa de parámetros morfométricos sobre las mediciones de la altura máxima, altura corporal y diámetro del ojo en diferentes estadios de desarrollo (30-150 dpf). Sin embargo no se observaron efectos sobre el porcentaje de metilación global de ADN genómico en larvas y adultos.

**Palabras clave:** arsénico inorgánico, exposición crónica, pez cebra, embriotoxicidad, morfometría, epigenética.

## Summary

Arsenic ( $As_i$ ) is one of the most toxic substances widely distributed in the environment with widespread health effects on human populations and biodiversity. Despite the fact that  $As_i$  is a frequent pollutant, information related to the effects of chronic exposure to concentrations relevant to the environment in aquatic organisms is scarce. In this study, we standardized the conditions for a long-term exposure using the zebrafish model, later we investigated the effect of  $As_i$  on embryotoxicity, epigenetic and morphometric markers through development. Organisms were chronically exposed to 50 and 500 ppb of  $As_i$  from 4 hours post-fertilization (hpf) and up to 150 days post-fertilization (dpf). Our results indicate that chronic exposure to  $As_i$  causes alterations in the development of zebrafish, increasing lethality, heart rare and cell death during embryonic development. Likewise, a significant decrease in morphometric parameters was observed on the measurements of maximum height, body height and eye diameter at different stages of development (30-150 dpf). However, no effects were observed on the methylation percentage of genomic DNA in larvae and adults.

**Key words:** inorganic arsenic, chronic exposure, zebrafish, embryotoxicity, morphometry, epigenetics.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al Dr. Ulises Bardullas por ser un excelente maestro y tutor a lo largo de mi formación académica. Por su apoyo, exigencia y tiempo dedicado para la culminación de mi tesis. Por invitarme como alumna pionera en sus proyectos de investigación, por confiarme tanto a lo largo de los mismos y por adentrarme al mundo de la investigación. Por permitirme conocer nuevas ciudades y personas. Y finalmente por compartir sus valiosas experiencias y consejos. Le admiro y le agradezco infinitamente.

A mi comité de tesis, el Dr. Julio Valencia Suárez y el Dr. Gorgonio Ruiz Campos por su disposición a enseñarme y apoyarme durante la realización de mi tesis. Así como a los integrantes del Laboratorio de Biología Integrativa, incluyendo al Dr. Carlos Flores y al Dr. Alejandro Carballo, que constantemente me dieron la oportunidad de hacer uso de su material y equipo. Y al CONACYT que bajo la beca No 25539 permitió que me pudiera dedicar a mi tesis de licenciatura.

A mis compañeros del proyecto Zebrafish, Jorge Hernández y Víctor Dipp que compartieron conmigo altibajos durante los experimentos y en quien no dudé en pedir o brindar ayuda. Especialmente a Mayra Cervantes, Lynneth Rivas, Irak Hernández, Aleydis Mendoza y a todos los compañeros de laboratorio que en algún momento compartieron horas de trabajo conmigo y que a lo largo de la carrera se convirtieron en grandes amigos.

A mi familia, por cuidarme y confiar en mí en todo momento. A mi pequeña hermana Alina por lidiar con mi ausencia, pero siempre con el objetivo de ser para ella un excelente ejemplo a seguir. Y especialmente a mi madre Ma. Ángeles Valles, por siempre estar a mi lado para apoyarme a superar cada meta y obstáculo de mi vida. Por hacer de mí una mujer de valores, por creer en mí y brindarme tanto amor. Pero principalmente por permitirme realizar mis estudios universitarios, pues sin ella esto no sería posible.

Y a Tere Paz por acompañarme durante toda mi carrera universitaria. Por motivarme a seguir adelante y siempre estar dispuesta a ayudarme durante largas horas de estudio. Por ayudarme a crecer y entender la vida como realmente es. Y por su paciencia y amor infinito.

# INDICE

---

	<b>Página</b>
Página de aprobación.....	i
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Agradecimientos.....	iv
 <b>Capítulo 1. Introducción</b>	
1.1 Arsénico.....	1
1.1.1 Distribución y exposición.....	1
1.1.2 Toxicidad del As <sub>i</sub> : Absorción, metabolismo y mecanismo de toxicidad.....	2
1.1.3 Efectos de la exposición crónica a As <sub>i</sub> en humanos.....	6
1.2 El pez cebra como modelo de estudio en la toxicología del As <sub>i</sub> .....	7
1.3 Efectos embriotóxicos por la exposición a As <sub>i</sub> en el pez cebra.....	8
1.3.1 Ontogenia del pez cebra.....	8
1.3.2 Efectos embriotóxicos por la exposición crónica a contaminantes ambientales.....	9
1.3.3 Efectos embriotóxicos en vertebrados por la exposición a As <sub>i</sub> .....	10
1.4 Efectos epigenéticos por exposición a As <sub>i</sub> .....	11
1.4.1 Mecanismos epigenéticos.....	11
1.4.2 Metilación de ADN.....	12
1.4.3 Modificaciones en el patrón de metilación de ADN inducidos por As <sub>i</sub> ...	12
1.5 Variaciones morfométricas por exposición a contaminantes ambientales.....	13
1.5.1 Análisis morfométrico como herramienta toxicológica.....	13
1.5.2 Variaciones morfométricas por la exposición a As <sub>i</sub> .....	14
1.6 Hipótesis.....	16
1.7 Objetivos.....	17
1.7.1 Objetivo general.....	17
1.7.2 Objetivos específicos.....	17

## Capítulo 2. Metodología

2.1 Reproducción de peces cebra adultos para la obtención de embriones.....	18
2.2 Sistema de exposición crónica con As <sub>i</sub> .....	19
2.3 Sistema de policultivo de rotíferos y cultivo de artemia para alimentación	20
2.4 Toxicidad embrionaria.....	22
2.4.1 Test de embrio-toxicidad.....	22
2.4.2 Tinción <i>in vivo</i> para marcaje de apoptosis celular.....	23
2.6 Metilación de ADN global.....	24
2.6.1 Extracción de ADN genómico.....	24
2.6.2 Ensayo de ELISA.....	25
2.7 Morfometría.....	26

## Capítulo 3. Resultados

3.1 Efectos de la exposición a As <sub>i</sub> durante el desarrollo embrionario del pez cebra .....	28
3.1.1 Efectos embriotóxicos por la exposición a As <sub>i</sub> en pez cebra.....	28
3.1.2 Efectos sobre el patrón de apoptosis celular por la exposición a As <sub>i</sub> en embriones de pez cebra.....	31
3.3 Efecto de la exposición a As <sub>i</sub> a través del desarrollo sobre niveles de metilación global de ADN genómico.....	33
3.4 Efecto de la exposición a As <sub>i</sub> a través del desarrollo del pez cebra sobre variables morfométricas.....	34
3.4.1 Efectos morfométricos de la exposición a As <sub>i</sub> durante la fase juvenil (30 dpf).....	34
3.4.2 Efectos morfométricos de la exposición a As <sub>i</sub> durante el estadio adulto (90 dpf).....	36
3.4.3 Efectos morfométricos de la exposición a As <sub>i</sub> durante el estadio adulto reproductor en hembras (150 dpf).....	38
3.4.4 Efectos morfométricos de la exposición a As <sub>i</sub> durante el estadio adulto reproductor en machos (150 dpf).....	41

## Capítulo 4. Discusión

4.1 Toxicidad del As <sub>i</sub> durante el desarrollo del pez cebra.....	45
----------------------------------------------------------------------------	----

4.1.1 Apoptosis celular por la exposición a $As_i$ durante el desarrollo embrionario del pez cebra.....	46
4.2 Variaciones sobre el patrón de metilación de ADN durante el desarrollo del pez cebra.....	47
4.3 Variaciones morfométricas por la exposición a $As_i$ durante el desarrollo del pez cebra.....	49
<b>Capítulo 5. Conclusiones</b>	<b>52</b>
<b>Capítulo 6. Perspectivas</b>	<b>53</b>
<b>Anexos</b>	<b>54</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>57</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Vía metabólica clásica del As <sub>i</sub> en mamíferos.....	4
2	Vía metabólica del As <sub>i</sub> de complejos arsénico-GSH.....	5
3	Ontogenia del pez cebra.....	9
4	Sistema de flujo continuo para la crianza y exposición a As <sub>i</sub> en peces cebra.....	20
5	Diseño experimental.....	22
6	Mediciones morfométricas registradas.....	27
7	Efectos tóxicos de la exposición a As <sub>i</sub> durante la fase embrionaria.....	29
8	Embriones de pez cebra representativos bajo exposición a As <sub>i</sub> en diferentes etapas de desarrollo.....	30
9	Embriones de pez cebra tratados con As <sub>i</sub> mostrando un patrón anormal de apoptosis.....	32
10	Promedio de porcentaje de citosinas metiladas en ADN genómico de tejido nervioso de pez cebra.....	33
11	Peces representativos para el análisis morfométrico de los grupos expuestos a As <sub>i</sub> .....	34
12	Diagramas de cajas y bigotes de los caracteres morfométricos significativos en el AFD durante estadio juvenil (30dpf).....	35
13	Plot de análisis canónico de los caracteres morfométricos durante estadio juvenil (30dpf).....	36

14	Diagramas de cajas y bigotes de los caracteres morfométricos significativos en el AFD durante etapa adulta (90dpf).....	37
15	Plot de análisis canónico de los caracteres morfométricos durante etapa adulta (90dpf).....	38
16	Diagramas de cajas y bigotes de los caracteres morfométricos significativos en el AFD durante etapa adulta en hembras (150dpf).....	39
17	Plot de análisis canónico de los caracteres morfométricos durante etapa adulta reproductiva en hembras (150dpf).....	40
18	Porcentaje gonadosomático en hembras adultas reproductivas (150 dpf).....	41
19	Diagramas de cajas y bigotes de los caracteres morfométricos significativos en el AFD durante etapa adulta en machos (150dpf).....	42
20	Plot de análisis canónico de los caracteres morfométricos durante etapa adulta reproductiva en machos (150dpf).....	43

## LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I Parámetros para la evaluación toxicológica en embriones de pez cebra.....	23
II Efectos embriotóxicos por la exposición a As <sub>i</sub> .....	31
III Significancia de las diferencias y las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los grupos tratados en estadio juvenil (30dpf).....	36
IV Significancia de las diferencias y las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los grupos tratados en etapa adulta (90dpf).....	38
V Significancia de las diferencias y las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los grupos tratados en hembras durante la etapa adulta (150dpf).....	40
VI Significancia de las diferencias y las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los grupos tratados en machos durante la etapa adulta (150dpf).....	43
VII Mediciones morfométricas relevantes para diferenciar el efecto de la exposición al As <sub>i</sub> sobre la forma del cuerpo.....	44

## **1. INTRODUCCION**

---

### **1.1 Arsénico**

#### 1.1.1 Distribución y exposición

El arsénico inorgánico ( $As_i$ ) es un metaloide ubicuo que se encuentra de forma natural en la corteza terrestre<sup>1</sup>. Este elemento se distribuye en suelos, sedimentos y ambientes acuáticos, y debido a procesos de absorción, también en diversos organismos<sup>2</sup>.

El  $As_i$  es un tóxico presente en los cuerpos de agua subterránea, su presencia está asociada a diversas fuentes geológicas como consecuencia de su disolución a partir de sedimentos con diferente composición y concentración, aunque en algunas regiones las actividades antropogénicas asociadas a la minería y la agricultura aportan  $As_i$  al ambiente<sup>3</sup>. En dichos sitios las concentraciones llegan a exceder los lineamientos establecidos por la Secretaria de Salud y la Organización Mundial de la Salud con valores de 25 y 10  $\mu\text{g/L}$  respectivamente<sup>4,5</sup>. Numerosos estudios señalan la presencia de  $As_i$  a altas concentraciones en diversos países entre los que destaca India (3.2 mg/L), Vietnam (3 mg/L), Taiwán (1.82 mg/L) y Bangladesh (2.5 mg/L), y otras regiones dispersas alrededor de todo el mundo<sup>6-13</sup>.

En México uno de los principales sitios afectados son La Comarca Lagunera, donde diversos estudios han reportado concentraciones tan altas como 624  $\mu\text{g/L}$ <sup>14</sup>, 740  $\mu\text{g/L}$ <sup>15</sup> y 865  $\mu\text{g/L}$ <sup>16</sup>, y el municipio de Matehuala en San Luis Potosí, donde se han registrado valores superiores (4.8-7 mg/L)<sup>17</sup>. Otros estados como Chihuahua (5-650  $\mu\text{g/L}$ ), Sonora

(2-305  $\mu\text{g/L}$ ), Hidalgo (14-1000  $\mu\text{g/L}$ ) y Baja California Sur (410  $\mu\text{g/L}$ ) presentan altas concentraciones del tóxico en agua subterránea<sup>18-21</sup>. Dichos estudios corroboran la relevancia de la presencia de  $\text{As}_i$  en México, pues se han registrado concentraciones similares o superiores a las máximas reportadas en otros países<sup>17</sup>.

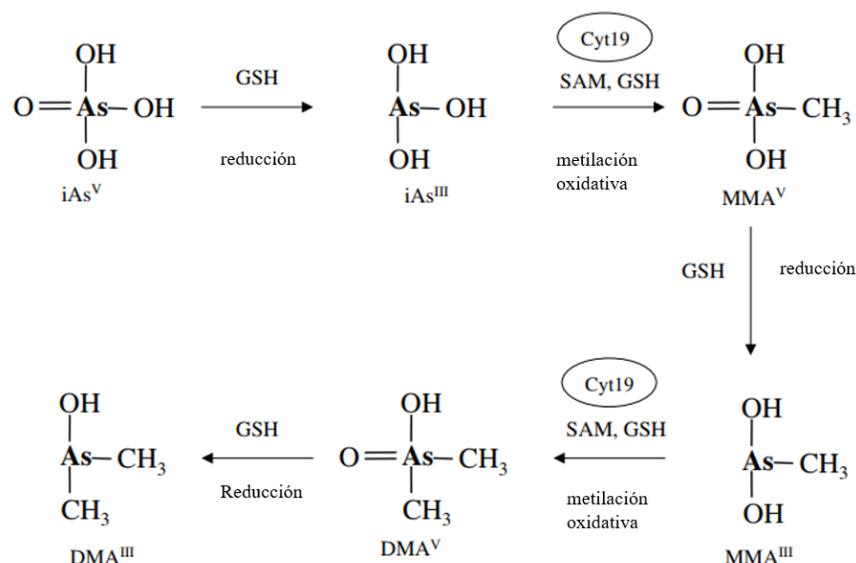
La presencia del  $\text{As}_i$  en cuerpos de agua que provienen de fuentes geológicas naturales es considerada una problemática ambiental a nivel mundial, pues este elemento ha sido detectado en asentamientos urbanos y zonas silvestres alrededor del mundo<sup>6,22</sup>. Investigaciones previas han demostrado que la ingesta de agua de dichas fuentes tiene efectos perjudiciales en la salud, manifestándose en desórdenes crónicos en la mayoría de las regiones del mundo y poniendo en riesgo de enfermedades a más de 140 millones de personas a nivel global<sup>23-25</sup>. Cabe mencionar que en México se han confirmado casos esporádicos en humanos de intoxicación por exposición crónica, sin embargo la información en acerca de sus efectos sobre la salud en el país aún es limitada<sup>26-29</sup>.

#### 1.1.2 Toxicidad del $\text{As}_i$ : Absorción, metabolismo y mecanismo de toxicidad

Existen dos especies inorgánicas de  $\text{As}_i$  relevantes en la naturaleza por su importancia biológica. El arsenato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) es la forma predominante debido a las condiciones aeróbicas del agua en el ambiente, mientras que el arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) es más escaso ya que está presente bajo condiciones anaeróbicas<sup>30</sup>. Estas formas difieren en su estado de oxidación modificando su nivel de toxicidad, siendo la forma trivalente la más tóxica<sup>5</sup>. Sin embargo, su proceso de metabolización también está asociado a su toxicidad.

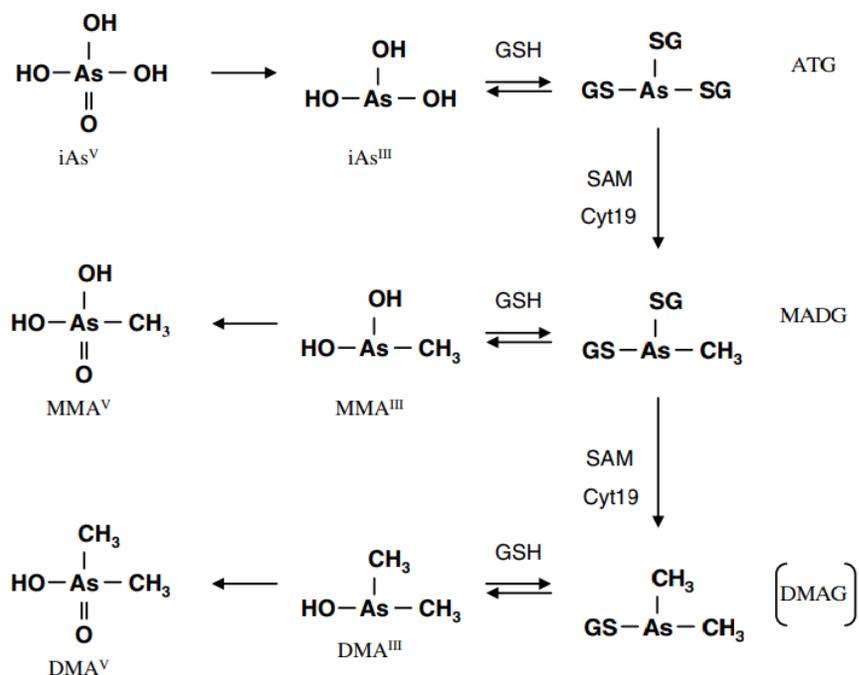
El  $\text{As}^{\text{V}}$  es la principal forma inorgánica ingerida por el consumo de agua contaminada con  $\text{As}_i$ . Cuando esto ocurre, aproximadamente el 90% es absorbido por el tracto gastrointestinal, posteriormente liberado en el torrente sanguíneo y finalmente captado por los hepatocitos donde ocurre su metabolización<sup>31,32</sup>. La captación celular del  $\text{As}_i$  depende de su estado de oxidación y del tipo celular. El  $\text{As}^{\text{V}}$  es la forma que ingresa con mayor frecuencia y facilidad a las células a través de los transportadores de fosfatos, mientras que el  $\text{As}^{\text{III}}$  debido a su mayor permeabilidad ingresa a través de las acuagliceroporinas<sup>33-36</sup>.

El  $\text{As}_i$  es metabolizado por los organismos a través de un proceso de metilación-reducción. Hasta la actualidad se han propuesto dos mecanismos sobre el proceso de metilación del  $\text{As}_i$ , vías importantes para su conversión a la forma orgánica. La primera es la vía metabólica clásica de metilación oxidativa que consiste en pasos alternados de reducción y metilación<sup>37,38</sup>. El  $\text{As}^{\text{V}}$  es reducido a  $\text{As}^{\text{III}}$  en presencia de glutatión S-transferasa omega (GST-omega) que sirve como donador de electrones<sup>39</sup>. Posteriormente el  $\text{As}^{\text{III}}$  es metilado por la enzima arsenito metiltransferasa (As3MT; o Cyt19, un homólogo de As3MT en humanos) que cataliza su conversión a ácido monometilarsónico ( $\text{MMA}^{\text{V}}$ ) en donde participa S-adenosil metionina (SAM) como cofactor donador del grupo metilo. El  $\text{MMA}^{\text{V}}$  es reducido a ácido monometilarsenioso ( $\text{MMA}^{\text{III}}$ ) por la enzima  $\text{MMA}^{\text{V}}$  reductasa. Finalmente  $\text{MMA}^{\text{III}}$  es metilado a ácido dimetilarsínico ( $\text{DMA}^{\text{V}}$ ) y reducido a ácido dimetilarsenioso ( $\text{DMA}^{\text{III}}$ ) (Figura 1)<sup>40</sup>.



**Figura 1.** Vía metabólica clásica del As<sub>i</sub> en mamíferos<sup>41</sup>.

La segunda vía de conjugación a glutatión por metilación reductiva, la cual ha sido propuesta de forma reciente, está basada en la formación de complejos As-glutatión<sup>41</sup>. Primero son formados los complejos arsénico tri-glutatión (ATG) y monometilarsónico di-glutatión (MADG) los cuales sirven como sustrato para CYT 19 el cual requiere SAM como donador. Los conjugados son secuencialmente metilados para generar MADG y dimetil arso-glutatión (DMAG) respectivamente. Finalmente los compuestos metilados son oxidados a MMA<sup>V</sup> y DMA<sup>V</sup>, los cuales son considerados como productos finales en esta propuesta y no solo intermediarios de la biotransformación del As<sub>i</sub> (Figura 2)<sup>41,42</sup>.



**Figura 2.** Nueva vía metabólica del  $\text{As}_i$  por medio de complejos arsénico-GSH<sup>41</sup>.

La biotransformación permite que un 70% de los metabolitos de  $\text{As}_i$  obtenidos sean excretados por la orina, incluyendo:  $\text{As}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{III}}$ ,  $\text{MMA}^{\text{V}}$  y  $\text{DMA}^{\text{V}}$ , siendo la forma dimetilada pentavalente la más abundante de todas<sup>31,43,44</sup>. Solo un porcentaje menor del  $\text{As}_i$  metabolizado es retenido en el organismo, el cual continuará contribuyendo con los efectos tóxicos.

Hasta años recientes la metilación del  $\text{As}_i$  se consideraba como un proceso de desintoxicación debido a que  $\text{MMA}^{\text{V}}$  y  $\text{DMA}^{\text{V}}$  es menos tóxico con respecto a las formas inorgánicas<sup>45,46</sup>. Sin embargo, actualmente se ha propuesto como un proceso de bioactivación ya que la toxicidad de los metabolitos intermediarios como  $\text{MMA}^{\text{III}}$  y  $\text{DMA}^{\text{III}}$  tienen mayor toxicidad respecto al  $\text{As}^{\text{III}}$ <sup>47,48</sup>, especialmente  $\text{MMA}^{\text{III}}$  que es considerada la forma más tóxica<sup>49</sup>.

Asimismo, se ha demostrado que el mecanismo de toxicidad del  $\text{As}^{\text{III}}$  es el resultado de su habilidad de ejercer toxicidad sobre la mitocondria. Este tóxico es capaz de alterar el potencial de membrana pues es un compuesto que reacciona fácilmente con enzimas mitocondriales con grupos tiol. La unión del  $\text{As}^{\text{III}}$  a estos grupos tiol es capaz de inhibir eventos bioquímicos importantes, tal como la alteración de la respiración celular, lo que puede conducir a toxicidad celular<sup>50,51</sup>

El piruvato deshidrogenasa (PDH) es un complejo de múltiples subunidades que requiere el factor ácido lipoico, un ditiol, para la actividad enzimática. La presencia de  $\text{As}^{\text{III}}$  y  $\text{MMA}^{\text{III}}$  este último siendo la forma más potente y tóxico que el  $\text{As}_i$ , inhiben la PDH quizá por la unión al ácido lipoico. La PDH se encarga de oxidar el piruvato a acetil-CoA, un precursor de los intermedios del ciclo del ácido cítrico. En el ciclo se degradan los intermedios, lo que proporciona equivalentes reductores al sistema de transporte de electrones para la producción de ATP. Por lo tanto la inhibición de la PDH puede llevar a una disminución de la producción de ATP y como consecuencia a la pérdida de energía por la célula metabolizadora. La inhibición de enzimas puede llegar a alterar el estado redox celular y eventualmente conducir a la citotoxicidad<sup>51</sup>.

### 1.1.3 Efectos de la exposición crónica a $\text{As}_i$ en humanos

Diversos estudios en humanos han asociado la exposición crónica por la ingesta de agua contaminada con  $\text{As}_i$  con una alta prevalencia en diversos tipos cáncer y otros efectos sobre la salud tales como enfermedades del sistema cardiovascular, hipertensión, aumento

en la prevalencia se diabetes, hepatomegalia, disfunciones del sistema respiratorio y daño sobre el sistema nervioso central y periférico<sup>52-60</sup>.

## **1.2 El pez cebra como modelo de estudio en la toxicología del As<sub>i</sub>**

Diversos modelos de animales vertebrados como roedores y otros mamíferos, han permitido explicar los efectos de la exposición crónica a As<sub>i</sub> así como su toxicidad<sup>61</sup>. Sin embargo, experimentos desarrollados en otros modelos acuáticos como el pez cebra también ha proporcionado con precisión una simulación de los efectos tóxicos del As<sub>i</sub> similares a los inducidos en humanos<sup>62</sup>.

El pez cebra (*danio rerio*) ha sido utilizado en la investigación durante décadas, es un vertebrado teleósteo nativo de las aguas dulces del Rio Ganges en la India, donde las concentraciones de As<sub>i</sub> son naturalmente altas. Este es un modelo animal emergente en los estudios toxicológicos pues tiene características tales como fecundación externa, alta disponibilidad de embriones, desarrollo embrionario rápido, ciclo de vida relativamente corto. En adición a ello, es ideal para la observación de alteraciones teratogénicas letales y subletales durante estadios tempranos, pues su proceso de organogénesis es traslucido durante el desarrollo embrionario<sup>63,64</sup>. Además, los estudios toxicológicos con As<sub>i</sub> en peces tienen ventaja, pues es posible generar un ambiente controlado debido a la alta solubilidad (100 g/L) del tóxico en un medio acuoso y a la exposición directa del medio en las branquias del pez.

Estudios recientes revelaron aproximadamente un 70% de similitud del genoma entre el ser humano y el pez cebra y hasta un 80% en genes asociados a patologías<sup>65,66</sup>.

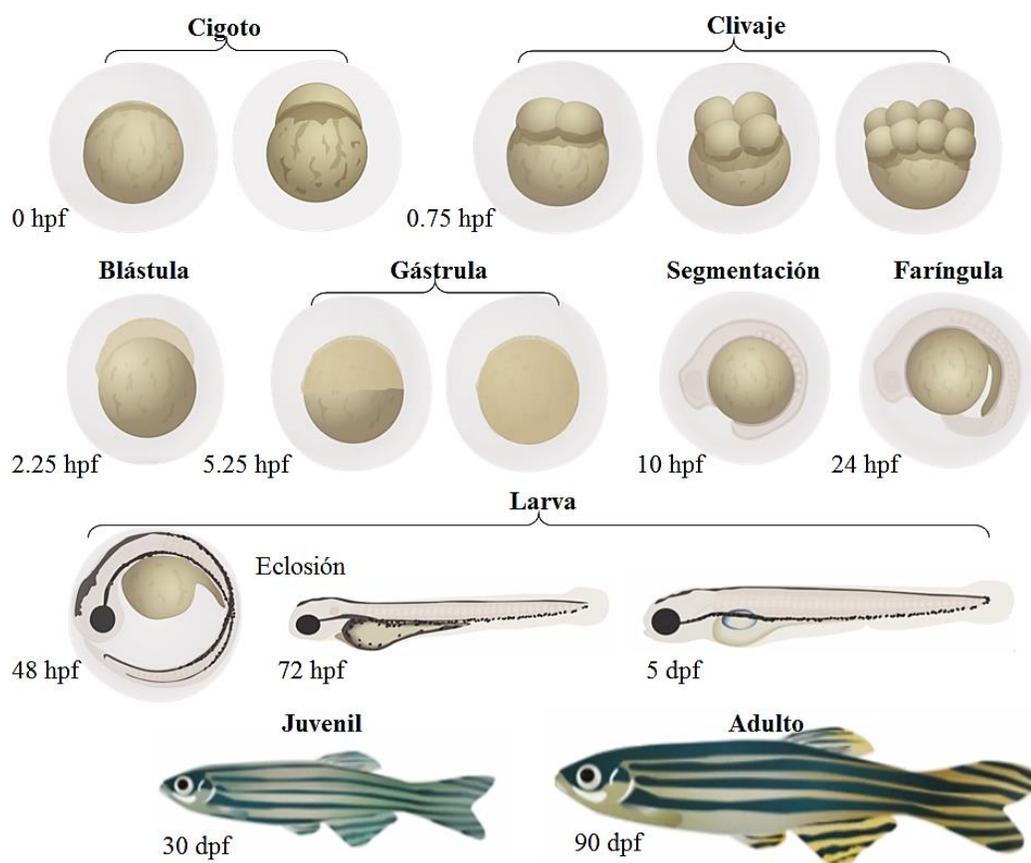
Notablemente, las rutas asociadas al metabolismo del arsénico se encuentran bien conservadas en el pez cebra<sup>67-69</sup>. En el estudio de Hamdi y colaboradores (2012), se demostró que en el pez cebra también existe la vía de metilación del  $As_i$ , pues en peces expuestos se identificó un homólogo de  $As_3MT$  dependiente de SAM, así como diferentes formas  $As_i$  orgánico incluyendo  $MMA^{III}$  y  $MMA^V$  como productos intermediarios y a  $DMA^V$  como producto final<sup>70</sup>. Estos estudios sugieren que el pez cebra es un modelo adecuado para la investigación dada la similitud en el metabolismo del  $As_i$  en relación al humano<sup>62</sup>.

### **1.3 Efectos embriotóxicos del $As_i$ en el pez cebra**

#### **1.3.1 Ontogenia del pez cebra**

El ciclo vital del pez cebra está dividido en cuatro periodos principales: embrión, larva, juvenil y adulto, proceso que conlleva un total de 90 días desde el inicio de la fecundación hasta el inicio del periodo reproductivo. El desarrollo temprano se produce a un ritmo rápido pero predecible, por lo que se han definido diferentes etapas dependiendo de las horas post-fertilización (hpf) o días post-fertilización (dpf) (Figura 3). Las primeras 24 hpf están divididas en cinco fases: cigoto (0 hpf), clivaje (0.75 hpf), blástula (2.25 hpf), gástrula (5.25 hpf) y segmentación (10 hpf). Posteriormente inicia la fase faríngrula (24 hpf) momento en el cual comienza la actividad del embrión y su latido cardiaco, mientras sigue desarrollándose hasta eclosionar (48 hpf) surgiendo directamente en el periodo larval aproximadamente a las 72 hpf<sup>71</sup>. Los nutrientes del embrión almacenados en el vitelo se van agotando rápidamente mientras la larva desarrolla estructuras especializadas

como la vejiga natatoria que está relacionada al nado. Dichas estructuras le permiten a la larva movilizarse y buscar su propia comida a partir de los 7 dpf <sup>72</sup>. Finalmente, a los 30 dpf el pez llega al periodo juvenil y a los 90 dpf a su adultez, momento en el cual será capaz de reproducirse <sup>73</sup>.



**Figura 3.** Ontogenia del pez cebra (Adaptado de JoVE, 2018).

### 1.3.2 Efectos embriotóxicos por la exposición crónica a contaminantes ambientales.

El desarrollo embrionario es un proceso que ha sido descrito en numerosos estudios como la base para la interpretación de los efectos causados por contaminantes ambientales, considerándose a la embriogénesis como un estadio muy sensible a la

exposición a tóxicos<sup>71,74,75</sup>. Como resultado se diseñó la prueba de toxicidad embrionaria por exposición crónica en peces entre ellos en el pez cebra, dado que las pruebas embrionarias son más sensibles y altamente predictivas en comparación a las realizadas en juveniles y adultos, además permite reemplazar las pruebas de toxicidad aguda en peces<sup>76-79</sup>.

La prueba de embrio-toxicidad en el pez cebra es un método muy común, ya que actualmente este organismo es uno de los modelos más importantes para el estudio de la biología del desarrollo y la toxicología<sup>73,80-82</sup>. La prueba de embrio-toxicidad permite valorar parámetros de letalidad, subletalidad y teratogénicos dentro de las primeras 120 hpf. Esta es una técnica rápida, simple y económica, misma que requiere tiempos cortos de incubación y pequeñas cantidades del tóxico, todo ello resultando apropiado para evaluar los efectos de la exposición crónica a contaminantes ambientales<sup>78,83</sup>.

### 1.3.3 Efectos embriotóxicos en vertebrados por la exposición a As<sub>i</sub>

Desde hace décadas, el As<sub>i</sub> se clasificó como una sustancia embriotóxica y teratogénica que provoca alteraciones por exposición aguda durante el desarrollo de vertebrados, incluyendo diversos mamíferos y humanos<sup>84-86</sup>. Estudios en humanos han reportado efectos tales como incremento del aborto espontáneo, parto prematuro, y decremento de peso en niños recién nacidos por la exposición a concentraciones elevadas de As<sub>i</sub> (>0.1 mg/L)<sup>87,88</sup>. Por otro lado, también se ha registrado un aumento de la letalidad fetal y neonatal y déficits intelectuales en niños por exposición a bajas concentraciones (<50 µg/L)<sup>60</sup>. En adición, otras investigaciones reportaron una relación entre la exposición a

As<sub>i</sub> y déficits cognitivos en niños de forma dependiente de la concentración con evaluaciones más bajas de memoria a largo plazo y abstracción lingüística<sup>89</sup>. Además existen evidencias que sugieren que la exposición a As<sub>i</sub> durante las primeras etapas de desarrollo incrementan los riesgos de salud durante la fase adulta<sup>90</sup>.

Por otro lado, diversos estudios han sugerido los efectos negativos del As<sub>i</sub> sobre el desarrollo embrionario en modelos animales, principalmente en roedores. Algunos de sus efectos son: disminución de peso, incremento de malformaciones en el sistema nervioso central y alteración del comportamiento postnatal<sup>91-94</sup>. También existe una variedad de estudios en pez cebra que han evaluado la embrio-toxicidad del As<sub>i</sub><sup>95-97</sup>.

## **1.4 Efectos epigenéticos por exposición a As<sub>i</sub>**

### 1.4.1 Mecanismos epigenéticos

Los mecanismos epigenéticos hacen referencia a los procesos de regulación reversible de la expresión de genes que ocurren independientemente de la secuencia de ADN. Estos procesos pueden darse por modificaciones en el patrón de metilación de ADN y por modificaciones en las colas de histonas, que en conjunto determinan la estructura de la cromatina involucrada en la regulación de la expresión de los genes<sup>98,99</sup>. Estos genes transcritos que se encuentran activos están asociados con regiones de cromatina accesibles (descondensados) mientras que los genes transcripcionalmente silenciados están generalmente localizados en regiones de cromatina inaccesibles (condensados).

### 1.4.2 Metilación de ADN debido a mecanismos epigenéticos

La metilación del ADN es el mecanismo epigenético más estudiado y es un factor determinante de la estructura de la cromatina. En este proceso se requiere que un grupo metilo se añada al ADN, la reacción ocurre al ser catalizada por la enzima ADN metiltransferasa (DNMT) la cual utiliza a SAM como donador del grupo metilo, esto permite a un grupo metilo añadirse al sitio CpG en la posición 5 del residuo de citosina<sup>100</sup>. Estos dinucleótidos CpG llegan a formar regiones densas conocidas como islas CpG, en donde se presentan los diferentes grados de metilación. Es frecuente que las islas CpG se encuentren en la región promotora de diversos genes en más del 50% del genoma<sup>101</sup>, cuando ocurre una hipermetilación de estas islas dentro de los sitios promotores comúnmente se asocia con el silenciamiento de un gen, y de manera contraria la hipometilación se asocia con la expresión del gen<sup>102</sup>. Al reprimir o permitir la expresión génica, la metilación del ADN proporciona control sobre los genes, cuya ventaja es la capacidad de transmitir estos cambios a las células hijas durante la replicación.

#### 1.4.3 Modificaciones en el patrón de metilación de ADN inducidos por As<sub>i</sub>

Por otra parte, se ha demostrado que el As<sub>i</sub> es capaz de inducir alteraciones epigenéticas en vertebrados y hasta la actualidad el principal mecanismo epigenético estudiado en relación a la exposición a este elemento tóxico es la metilación del ADN<sup>103-106</sup>. Este mecanismo se ve alterado cuando el organismo se encuentra expuesto a As<sub>i</sub> y tanto el proceso de metilación del tóxico como el de metilación del ADN están en funcionamiento. Debido a que ambos procesos requieren de SAM como donador del grupo metilo para su

funcionamiento, como consecuencia habrá escases de SAM y la actividad de la enzima DNMT se verá alterada, lo que generará hipometilación del ADN global<sup>107</sup>.

Diversos estudios han demostrado lo anterior tanto en modelos animales como en humanos<sup>108-111</sup>. En el presente estudio se determinaran las modificaciones en el patrón de metilación del ADN durante el desarrollo del pez cebra por la exposición crónica a concentraciones relevantes de As<sub>3</sub> en el ambiente.

## **1.5 Variaciones morfométricas por exposición a contaminantes ambientales**

### **1.5.1 Análisis morfométrico como herramienta toxicológica**

El análisis morfométrico ha sido una herramienta muy utilizada durante décadas en la taxonomía de diversos grupos de vertebrados principalmente de peces. Su aplicación permite diferenciar especies y poblaciones<sup>112-115</sup> a partir de la identificación de diferencias en su forma corporal<sup>116</sup>.

El análisis morfométrico es un conjunto de procedimientos estadísticos multivariados y discriminantes, realizados a partir de un análisis de imágenes digitales o de medidas somáticas estandarizadas que permiten determinar la variabilidad morfológica. Sin embargo, a pesar de ser un método confiable y ampliamente utilizado en la taxonomía, ha sido escasamente abordado en otras áreas de estudios. Trabajos previos demostraron la existencia de variaciones morfométricas como consecuencia de la exposición a diferentes temperaturas<sup>117</sup>. No obstante, estas herramientas no han sido utilizadas para la determinación de variaciones en la forma corporal producidas por la exposición a

contaminantes ambientales o en su caso las técnicas morfométricas utilizadas no han seguido un procedimiento estadístico riguroso.

### 1.5.2 Variaciones morfométricas por la exposición a $As_i$

Hasta la actualidad pocos estudios han logrado demostrar las variaciones morfométricas que el  $As_i$  causa durante el desarrollo. Existen estudios en humanos que han registrado alteraciones morfológicas, pues se ha demostrado que la exposición a altas concentraciones de  $As_i$  ( $\geq 288$  ppb) en niños causa una disminución en la altura corporal<sup>118-121</sup>.

El principal modelo de estudio animal ha sido el de los peces teleósteos del orden Cypriniformes, lo que supone una limitación de datos bibliográficos sobre variaciones en otros modelos animales. En dichas investigaciones se demuestran variaciones en la longitud total de diversos organismos, pues se observó que la exposición crónica a 0.75, 3 y 5ppm de  $As_i$  en el pez fundulído (*Fundulus heteroclitus*) desde la fase embrionaria hasta el estadio juvenil (4 semanas) disminuyó significativamente la longitud corporal de los mismos<sup>122</sup>. Por otro lado, se demostró que la exposición crónica a 4.3, 7.4 y 16.5 ppm de  $As_i$  durante los primeros 29 días de desarrollo de la carpita cabeza (*Pimephales promelas*) y la exposición a 4.1, 7.6 y 16.3 ppm durante 31 días en el pez bandera de Florida (*Jordanella floridae*) disminuye significativamente la longitud corporal de los mismos<sup>123</sup>. En adición a lo anterior, se ha observado el mismo efecto en embriones de pez cebra (*Danio rerio*) a las 72 y 96 hpf debido a la exposición a 2mM de  $As_i$ <sup>96</sup>. Esto abre las

puertas a la evaluación de los efectos sobre la forma corporal por exposición crónica a  $As_i$  en el modelo del pez cebrá desde la etapa embrionaria hasta la adultez.

Cabe mencionar que ninguna de las investigaciones previamente citadas sobre los efectos de la exposición a  $As_i$ , ha aplicado un método estadístico completo que utilice un amplio número de variables y que esté basado en la normalización de los datos biométricos lo cual permita obtener resultados más confiables. Por ello, en este estudio se demostrarán los efectos de la exposición crónica a dosis relevantes al ambiente de  $As_i$  sobre las variables morfológicas del pez cebrá con el uso de pruebas estadísticas robustas.

## **1.6 HIPOTESIS**

---

La exposición crónica a dosis relevantes al medio ambiente de  $As_i$  en la generación F0 afectará el desarrollo normal del pez cebra produciendo efectos embriotóxicos y morfológicos, así como modificaciones epigenéticas sobre el patrón de metilación de ADN genómico en tejido nervioso.

## **1.7 OBJETIVOS**

---

### **1.7.1 Objetivo general**

Evaluar la exposición crónica a dosis relevantes de  $As_i$  en el ambiente y sus efectos sobre marcadores embriotóxicos, morfológicos y epigenéticos, durante el desarrollo de la generación F0 del pez cebra.

### **1.7.2 Objetivos específicos**

1. Reproducción de peces cebra adultos para la obtención de embriones y su crianza hasta la fase adulta reproductiva.
2. Estandarización de un sistema de exposición crónica a concentraciones de  $As_i$  relevantes al ambiente.
3. Estandarización de sistema de policultivo de rotíferos para alimentación de larvas de pez cebra.
4. Evaluación de marcadores de toxicidad durante el desarrollo embrionario de peces cebra expuestos a concentraciones de  $As_i$  que son relevantes al ambiente.
5. Evaluación de variaciones morfométricas en peces cebra, juveniles y adultos machos y hembras expuestos a concentraciones de  $As_i$  relevantes al ambiente.
6. Evaluación del porcentaje de metilación del ADN genómico en tejido nervioso de larvas y adultos, machos y hembras de peces cebra expuestos a concentraciones de  $As_i$  relevantes al ambiente.

## **2. METODOLOGÍA**

---

### **2.1 Reproducción de peces cebra adultos para la obtención de embriones**

Se obtuvieron 90 peces cebra a través de un proveedor local, los cuales fueron utilizados para la obtención de la denominada generación parental. Los peces reproductores fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio por 1 mes previo a la reproducción ( $28\pm 1^\circ\text{C}$ , 14h/10h luz-obscuridad, pH a  $7.0 \pm 1.0$ , conductividad 300-1500 $\mu\text{S}$ ). Se reprodujeron 90 animales en una relación de 3 hembras por cada 2 machos. La reproducción se realizó en tanques de con 2 L de agua ( $28\pm 1^\circ\text{C}$ , pH a  $7.0 \pm 1.0$ , oxígeno disuelto  $>6.0$  mg/L, amonio  $<0.02$  mg/L, nitratos  $<50$  mg/L, nitritos  $<0.1$  mg/L, conductividad 300-1500 $\mu\text{S}$ )<sup>124</sup>, una noche previa se prepararon los tanques con canicas y plantas artificiales, para prevenir el canibalismo por los peces adultos hacia los embriones y para simular las condiciones naturales de reproducción. Se colocó una barrera transparente de plástico que separa machos y hembras para estimular la reproducción por medio de las feromonas liberadas durante la noche. Los tanques se mantuvieron en condiciones ideales de reproducción (agua limpia, temperatura y aireación constante) durante toda la noche. Las barreras fueron removidas a la mañana siguiente posterior al inicio del ciclo de luz, dejando desovar a los peces por 1 hora.

Posterior al desove, los huevos fecundados fueron tamizados, limpiados, seleccionados y distribuidos en grupos dentro de cajas Petri (50 individuos/caja) con exposición a  $\text{As}_i$  (50 y 500 ppb) en soluciones preparadas con medio E2 (7.5mM NaCl, 0.25mM KCl,

0.5mM MgSO<sub>4</sub>, 75μM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25μM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.35mM NaHCO<sub>3</sub>). Los animales fueron incubados durante la fase embrionaria (4 - 120hpf) a 28°C en un ciclo de 14h luz/10h oscuridad. Un grupo adicional sirvió como control y fue mantenido bajo las mismas condiciones que los grupos tratados. Diariamente las soluciones con As<sub>i</sub> fueron preparadas a pH 7.0 a partir de un stock (1000mg As<sub>i</sub>/L) y reemplazadas en cada caja Petri.

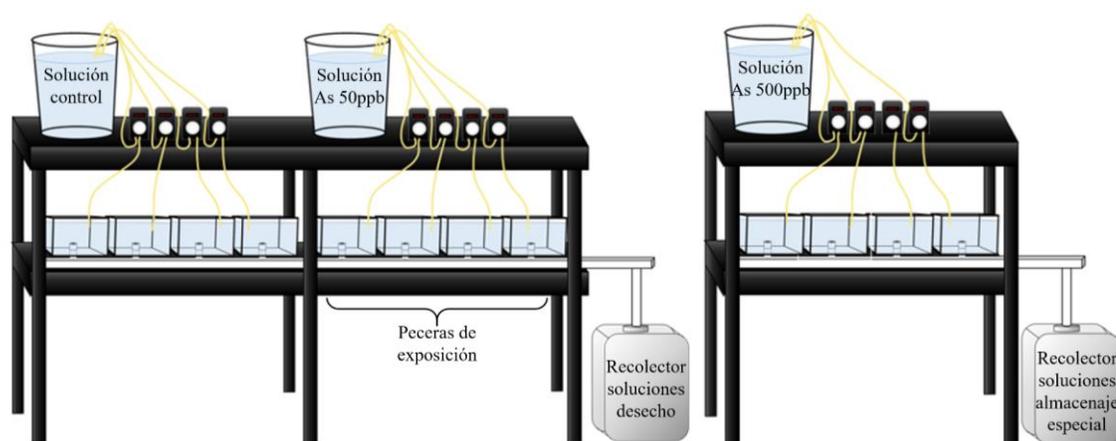
## **2.2 Sistema de exposición crónica con As<sub>i</sub>**

Para llevar a cabo la exposición crónica y evitar el estrés a los peces por la manipulación, se construyó un sistema de exposición de flujo continuo (Figura 4). A partir de los 5 dpf, las larvas fueron distribuidas según su tratamiento de manera aleatoria dentro del sistema de crianza en tanques de vidrio de 5 L en cuatro réplicas (100 larvas/tanque) con un volumen estático de 1 L de solución de exposición (control, As<sub>i</sub> 50 ppb y As<sub>i</sub> 500 ppb; las soluciones fueron preparadas a partir de un stock de 1000 mg As<sub>i</sub>/L, pH 7.0). La mitad del volumen total de cada tanque fue sustituido manualmente desde los 5 hasta los 9 dpf. A partir de los 10 dpf el volumen total de los tanques fue sustituido gradualmente cada 24 horas con la ayuda del sistema de bombas peristálticas, movilizándolo desde los reservorios hasta los tanques de crianza (Figura 4).

Para compensar el espacio ocupado por los peces en crecimiento durante su desarrollo, se disminuyó la densidad de cada grupo en su respectivo tanque aumentando el volumen de las soluciones. La densidad inicial a los 5 dpf fue de 100 individuos/L (1 L), posteriormente a los 10 dpf disminuyó a 50 individuos/L (2L) y finalmente a los 30 dpf a

20 individuos/L (5L)<sup>125</sup>. El recambio y la preparación de soluciones diarias continuó hasta finalizar la crianza a los 150 dpf.

Los parámetros físico-químicos del agua tales como pH, conductividad, salinidad, oxígeno disuelto, nitratos, nitritos y amonio fueron registrados semanalmente para mantener las condiciones ideales del medio.



**Figura 4.** Sistema de flujo continuo para la crianza y exposición a  $As_i$  de peces cebra.

### 2.3 Sistema de policultivo de rotíferos y cultivo de artemia para alimentación

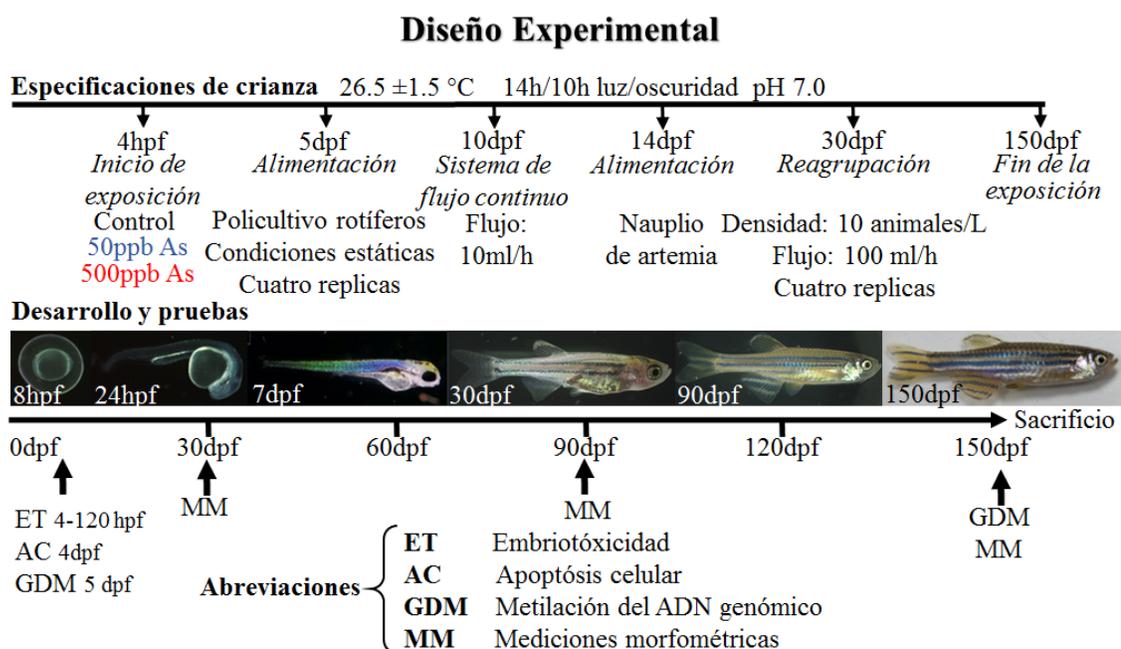
Para incrementar la sobrevivencia, las larvas fueron criadas en un sistema de policultivo bajo condiciones estáticas desde los 5 hasta los 9 dpf<sup>126</sup>. Para su aplicación previamente se mantuvo un sistema de cultivo compacto (Compact Culture System, Reef Nutrition, Campbell, CA) con 1 millón de rotíferos (*Brachionus plicatilis*, APBreed, Reef Nutrition). Las condiciones para su mantenimiento fueron: volumen total de 15 L de agua de mar (25 g/L, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) (Instant Ocean salt and fresh water, Instant Ocean), flujo de aire continuo, temperatura a 27°C y pH 7-8. Los rotíferos se alimentaron dos veces al día agregando 10 ml de concentrado de microalgas (RGComplete, APBreed, Reef Nutrition). Para

corroborar que las condiciones del cultivo eran ideales, diariamente se registró la densidad de los rotíferos agregando 100 µl en un cubreobjetos e incubando a 4°C por un par de minutos para inmovilizar los rotíferos y facilitar el conteo bajo el estereoscopio. Para obtener el valor de rotíferos/ml se multiplica la cantidad contada por 10. Cada dos días se limpió parcialmente el cultivo, para ello se filtró aproximadamente la mitad del volumen con una tela de 200 µm para recuperar los rotíferos, se lavaron los accesorios y las paredes del recipiente y se reemplazó el mismo volumen desechado con agua de mar recién preparada.

El policultivo permite que las algas sirvan de alimento para los rotíferos y éstos a su vez para las larvas, lo que brinda un alto nivel nutricional e incrementa las probabilidades de sobrevivencia de las larvas en hasta un 95%<sup>126</sup>. Para elaborar el policultivo, a partir de los 5 dpf de las larvas en crianza, se agregaron 500ml de solución de agua de mar con concentrado de algas y rotíferos en cada tanque. Para mantener las condiciones ideales para rotíferos y larvas, diariamente cada tanque fue limpiado manualmente con ayuda de un pipeteador automático para retirar los desechos y se agregaron 100 ml de concentrado de rotíferos con algas en agua de mar.

A partir de los 10 dpf hasta los 150 dpf, la dieta de los peces fue a base de nauplios de *Artemia salina*, agregando aproximadamente 10 ml de concentrado por pecera, dos veces al día. Los cultivos se mantuvieron en conos de 1 L en agua de mar (25 g/L) con luz continua hasta su eclosión y fueron filtrados y lavados para obtener el concentrado.

A los 30 dpf, los peces de los mismos grupos fueron mezclados y redistribuidos aleatoriamente en los 4 tanques con una nueva densidad de 10 peces/L para propiciar el crecimiento adecuado de los peces<sup>125</sup>. El diseño experimental se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Diseño experimental de la crianza y exposición de peces cebra (superior), así como las pruebas realizadas a lo largo del desarrollo (inferior).

## 2.4 Toxicidad embrionaria

### 2.4.1 Test de embrio-toxicidad

Embriones de 4 hpf durante la fase de blástula fueron colocados en cajas Petri (60 x 155 mm) previamente llenados con soluciones control, As<sub>i</sub> 50 ppb y As<sub>i</sub> 500ppb (n=12, 64 individuos). Las cajas fueron incubadas a 28°C en un ciclo de 14h luz/10h oscuridad. A partir de las 8 hpf se llevó a cabo la evaluación toxicológica, la tabla I muestra los parámetros evaluados a las 8, 24, 48, 72, 96 y 120 hpf. Para determinar variaciones en la

frecuencia cardíaca de latidos/seg se requirió del conteo de latidos durante 1 minuto por medio de la visualización.

Todas las cajas fueron colocadas en la incubadora hasta las 120 hpf, las soluciones control y de prueba fueron sustituidas de cada caja diariamente. El grado de embriotoxicidad de cada parámetro se expresó como el porcentaje en relación al número total de embriones expuestos al momento inicial del registro para cada grupo tratado.

A partir de las 8hpf, durante la prueba toxicológica, se realizó un registro fotográfico con ayuda de un estereoscopio (Stemi DV4, Zeiss) adaptado con cámara fotográfica (AxioCam ERc5s, Zeiss), luces LED y un adaptador de campo oscuro.

**TABLA I.** PARÁMETROS PARA LA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE  $As_i$  EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA <sup>78</sup>.

<i>Parámetros toxicológicos</i>		8 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf	96 hpf	120 hpf
<i>Efectos letales</i>	Mortalidad				+	+	+
	Coagulación	+	+	+			
	Desprendimiento cola		+	+	+		
	Frecuencia cardíaca		+	+			
<i>Efectos subletales/ desarrollo</i>	Gastrulación	+					
	Formación de somitas		+				
	Desarrollo de ojos		+	+			
	Pigmentación		+	+			
	Eclosión			+	+		
	Edema pericárdico			+	+	+	+
	Escoliosis				+	+	+

#### 2.4.2 Tinción *in vivo* para marcaje de apoptosis celular

Se realizó un ensayo para la identificación de células apoptóticas en embriones expuestos a  $As_i$ , por medio de la tinción con el fluoróforo Naranja de Acridina. Para ello, embriones de 96 hpf de cada tratamiento (control, 50 ppb y 500 ppb  $As_i$ ) fueron lavados

dos veces con solución Danieau al 30% preparado a partir de un stock (100%: NaCl 58mM, KCl 0.7mM, MgSO<sub>4</sub> 0.4mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0.6mM y HEPES 5mM, pH 7.4) y teñidos con el fluoróforo naranja de acridina (2μg/ml, solución Danieau 30%) durante 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. La solución fue desechada y se realizaron 3 lavados con solución Danieau al 30% durante 5 minutos. Los embriones teñidos fueron anestesiados con triclaína al 0.03% (MS-222) y montados en un portaobjetos con agar bacteriológico al 1% como base para evitar movimientos del embrión.

Los cúmulos de células apoptóticas en los embriones fueron identificados por microscopia de epifluorescencia (16X, AN 0.25) (Axio Zoom.V16.) bajo una longitud de onda de excitación de 488 nm. Todas las imágenes fueron capturadas bajo los mismos parámetros de exposición. Se obtuvieron secciones ópticas de cada imagen con iluminación estructurada, lo que permitió obtener un cribado de toda la muestra en forma multidimensional para evitar la pérdida de señal en los diferentes planos de la muestra.

## **2.6 Metilación de ADN global**

### **2.6.1 Extracción de ADN genómico**

Se extrajeron muestras de ADN genómico de tejido larvario (5dpf, n=3, 20 larvas/pool) y tejido nervioso de peces adultos (150 dpf, n=4-5) utilizando un kit de purificación de ADN genómico (PureLink Genomic DNA kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las muestras se homogenizaron en buffer de digestión y proteinasa K con ayuda de un motor inalámbrico adaptado a triturador de tejidos para tubos Eppendorf (Pellet pestles, Cordless Motor, Sigma-Aldrich). Los homogenizados se incubaron a 55°C durante 60 minutos con

vortexeo ocasional para promover la lisis. Los lisados fueron centrifugados a velocidad máxima (15,000 rpm) durante 3 min a temperatura ambiente para eliminar restos de partículas y el sobrenadante fue transferido a nuevos tubos. Las muestras fueron incubadas con RNasas por 2 min y consecutivamente se mezclaron con buffer de lisis y etanol (100%). La purificación de las muestras de ADN genómico se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante. La concentración y calidad de las muestras purificadas fueron evaluadas por espectrofotometría (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE), diluidas a la concentración deseada en TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) y almacenadas a -80° hasta su uso.

#### 2.6.2 Ensayo de ELISA

El porcentaje de metilación de citosinas de ADN global fue cuantificado con un kit colorimétrico (MethylFlash Methylated DNA Quantification Kit, Epigentek Group, Farmingdale, NY, USA) para la medición de los niveles de 5-metilcitosina (5-mC) en una microplaca de 96 pozos para prueba de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas por triplicado con 100 ng de ADN genómico por muestra. Las absorbancias fueron leídas con un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan TM GO system, Thermo Scientific) a 450 nm. El porcentaje de citosinas metiladas (5-mC) en ADN total se calculó según la fórmula: % metilación citosina =  $[(\text{OD muestra} - \text{OD control negativo} / 100\text{ng}) / (\text{OD control positivo} - \text{OD control negativo}) \times 2 / 5 \text{ ng}] \times 100$ ; OD es la absorbancia, 100ng es la cantidad de ADN por muestra,  $\times 2$  representa un factor para normalizar 5-metilcitosina en el control positivo a 100% pues solo contiene el 50% de citosinas metiladas. Todas las muestras se midieron por duplicado.

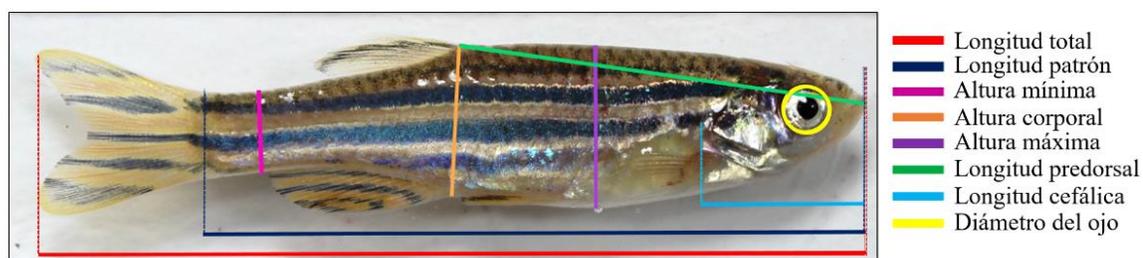
Los valores fueron comparados utilizando una prueba Kruskal-Wallis no paramétrica, seguido de una prueba Shapiro-Wilk. Los resultados fueron analizados por Sigma Plot 12.0 y presentados como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio (EEM). Significancia establecida como  $p \leq 0.05$ .

## 2.7 Morfometría

Peces cebra en fase juvenil (30 dpf), adulta (90 dpf) y adulta reproductiva (150dpf) fueron fotografiados de lado lateral con ayuda de un estereoscopio (Stemi DV4, Zeiss) equipado con una cámara fotográfica. Ocho mediciones lineales fueron consideradas para el análisis morfométrico (Figura 6): longitud total (LT), longitud patrón (LP), altura mínima ( $A_{min}$ ), altura corporal (AC), altura máxima ( $A_{max}$ ), longitud predorsal (LPD), longitud cefálica (LC) y diámetro del ojo (DO). Se aplicó el modelo de regresión de Elliott y colaboradores (1995) como método de estandarización para los datos morfométricos. Este modelo remueve el componente de tamaño de las mediciones (alometría) y homogeniza sus varianzas. Se define como:

$$Ms = Mo \left( \frac{Ls}{Lo} \right)^b$$

Donde  $M_s$  = medición estandarizada,  $M_o$  = longitud del carácter medido (mm),  $L_s$  = medición de referencia (media de LP (mm) para todos los individuos de todos los grupos de estudio),  $L_o$  = LP (mm) del espécimen, y “b” fue estimado para cada carácter de los datos observados utilizando la ecuación no-lineal. El parámetro “b” fue estimado como la pendiente de la regresión de  $\log M_o$  en  $\log L_o$ , utilizando cada pez en cada grupo.



**Figura 6.** Mediciones morfométricas registradas en juveniles y adultos de pez cebra.

Los valores morfométricos estandarizados para los dos grupos tratados y el grupo control fueron analizados y comparados por medio de análisis de función discriminante paso por paso hacia adelante (AFD), utilizando el software Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., USA, 2005). Este análisis multivariante permite determinar que combinación de variables (longitudes) se discrimina mejor entre los grupos expuestos y permite detectar diferencias significativas entre grupos. Las distancias de Mahalanobis entre grupos también fueron evaluados, la cual arroja los coeficientes de similitud entre dos variables multidimensionales. Las diferencias significativas de los caracteres morfométricos entre grupos se verificó por medio de análisis de variación ANOVA con el software SigmaPlot 12.0.

### 3. RESULTADOS

---

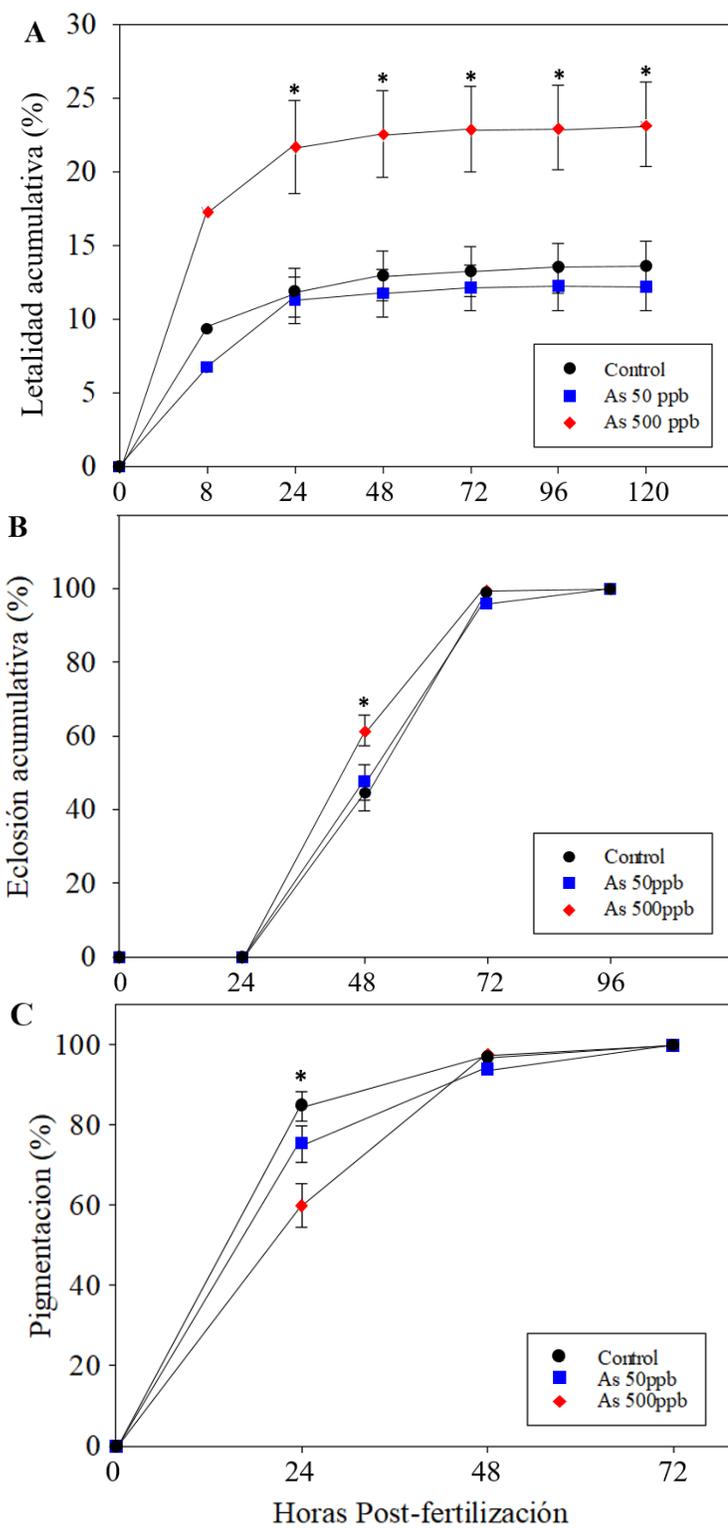
#### 3.1 Efectos de la exposición a $As_i$ durante el desarrollo embrionario del pez cebra

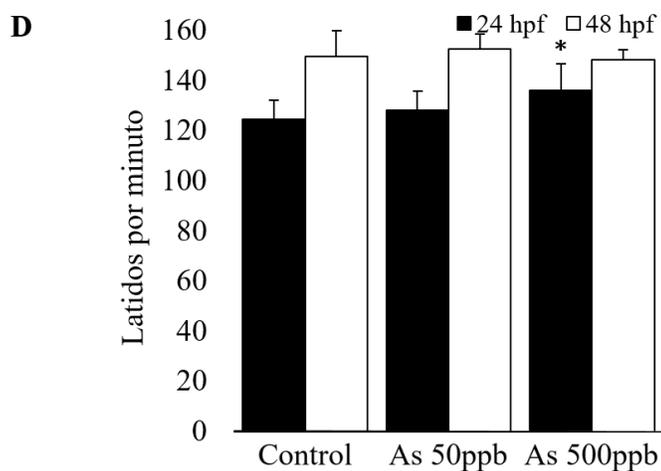
##### 3.1.1 Alteraciones embriotóxicas por la exposición a $As_i$ en pez cebra

En general, la exposición durante el desarrollo embrionario a 500 ppb de  $As_i$  se asoció a alteraciones sobre diversos parámetros embriotóxicos. El registro mostró un aumento de la letalidad acumulativa en el grupo expuesto a 500 ppb de  $As_i$  en comparación al grupo control a las 24 hpf [ $F(2,33) = 6.751, p < 0.05$ ], 48 hpf [ $F(2,33) = 7.274, p < 0.05$ ], 72 hpf [ $F(2,33) = 7.565, p < 0.05$ ], 96 hpf [ $F(2,33) = 7.723, p < 0.05$ ] y 120 hpf [ $F(2,33) = 8.059, p < 0.05$ ] (Figura 7A). Por otro lado, a las 48 hpf se registró un aumento del éxito de eclosión por la exposición a 500 ppb de  $As_i$  en comparación al grupo control [ $F(2,33) = 4.351, p < 0.05$ ] (Figura 7B). A las 24 hpf el grupo expuesto a 500 ppb de  $As_i$  representó un menor porcentaje de pigmentación con respecto al grupo control [ $F(2,33) = 7.277, p < 0.05$ ] (Figura 7C).

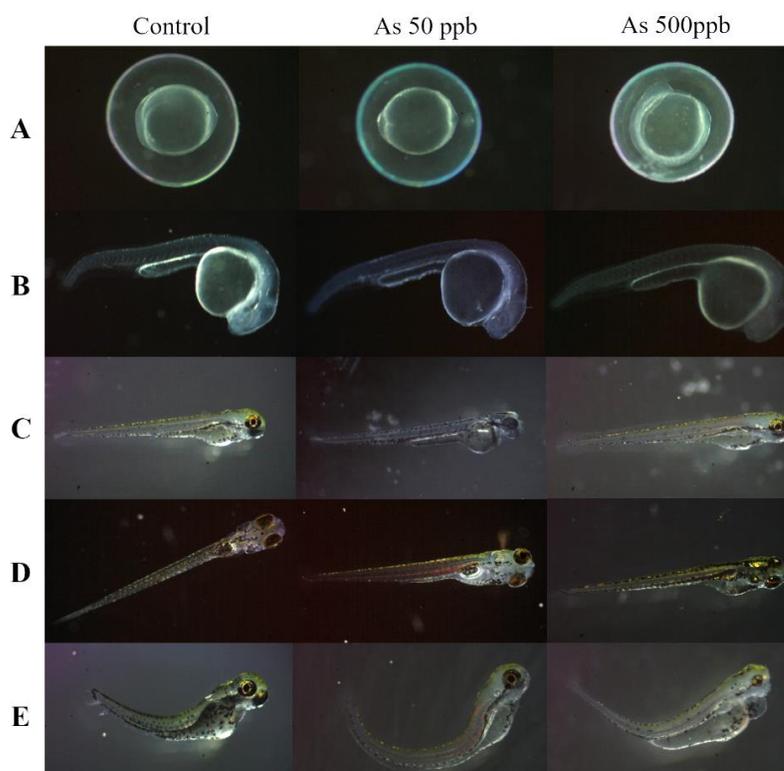
Con respecto a la frecuencia cardíaca, se observó un aumento por la exposición a 500 ppb  $As_i$  a las 24 hpf [ $F(2,27) = 3.914, p < 0.05$ ], sin embargo a las 48 hpf no hubo un cambio significativo [ $F(2,26) = 0.732, p > 0.05$ ] (Figura 7D). El desprendimiento de cola [ $X^2 = 0.0034, p > 0.05$ ], la formación de somitas [ $X^2 = 0, p > 0.05$ ], el desarrollo de ojos [ $X^2 = 0, p > 0.05$ ] y la escoliosis [ $X^2 = 0, p > 0.05$ ] fueron parámetros que no mostraron ningún tipo de alteración en los grupos tratados con  $As_i$ .

En la figura 8 se muestran los individuos representativos de los grupos expuestos en diferentes estadios embrionarios. La tabla de contingencia (Tabla II) muestra los datos de embrio-toxicidad y teratogenicidad.





**Figura 7.** Efectos tóxicos de la exposición a  $As_i$  durante la fase embrionaria (4-120hpf) de la generación F0: (A) Tasa de letalidad (n=12), (B) Eficiencia de eclosión (n=12), (C) Desarrollo de pigmentación (n=12) y (D) Frecuencia cardíaca (n=10,  $p < 0.05$ ). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  EEM. \* Denota las diferencias significativas del grupo de As 500 ppb con respecto al grupo control.



**Figura 8.** Embriones de pez cebra representativos bajo exposición a  $As_i$  en diferentes etapas de desarrollo. Individuos control y tratamiento indicados en imagen. A) Embrión a las 8 hpf; B) Embrión a 24 hpf; C) Larva a 72 hpf; D) Larva a 120 hpf. A-D) Animales sanos, E) Larvas con malformaciones (escoliosis y/o edema pericárdico). A-C, E (2X) y D (1.6X).

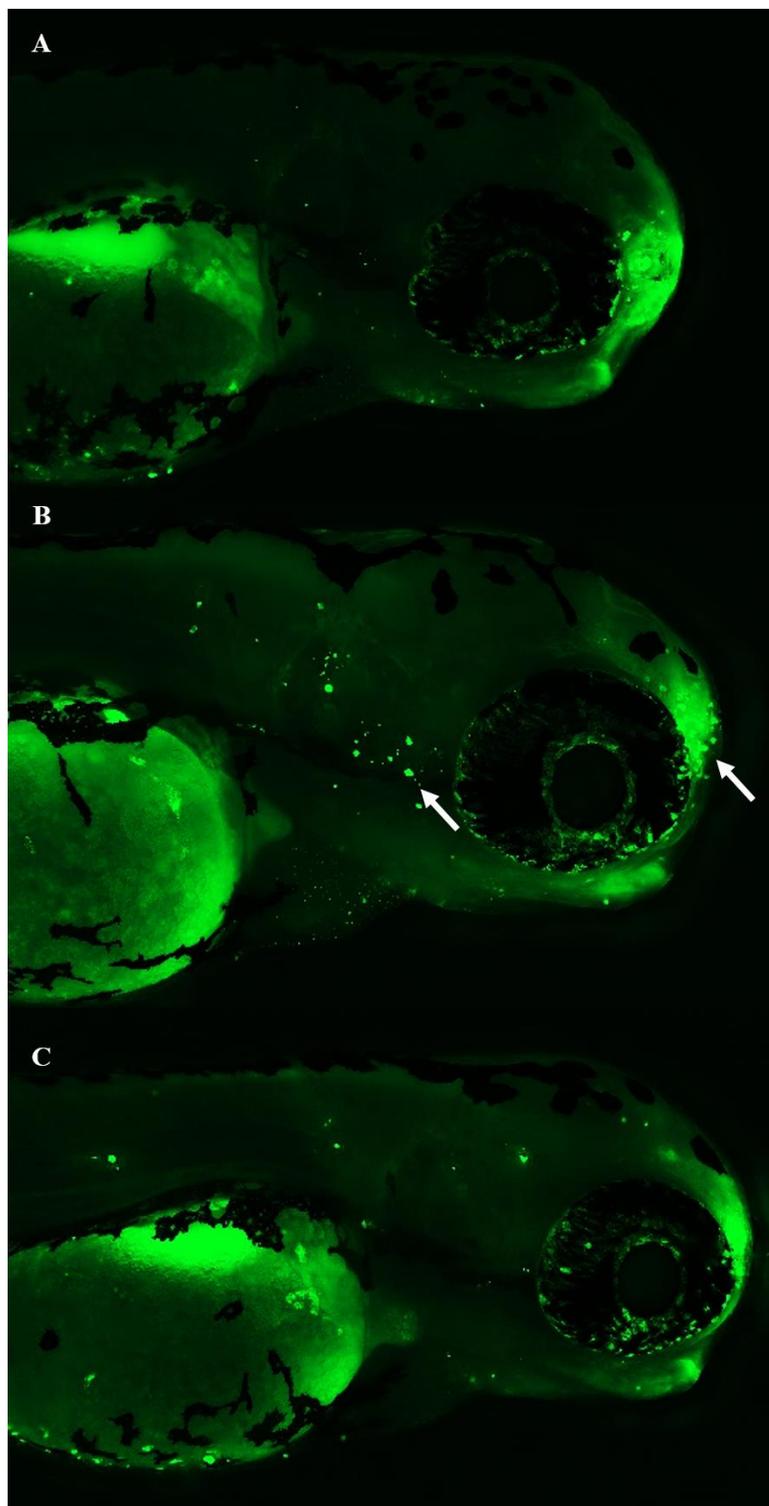
**TABLA II.** EFECTOS EMBRIOTÓXICOS POR LA EXPOSICIÓN A AS<sub>i</sub>.

<i>Parámetros</i>	<i>Tratamiento</i>	8	24	48	72	96	120
Coagulación (acumulativo)	Control	9	12	13	13	13	14
	As 50ppb	6	12	12	12	12	12
	As 500ppb	17	22	23	23	23	23
Desprendimiento de cola	Control	-	0	99.6	100	-	-
	As 50ppb	-	0	99.7	100	-	-
	As 500ppb	-	0	98.8	100	-	-
Gastrulación	Control	100	-	-	-	-	-
	As 50ppb	100	-	-	-	-	-
	As 500ppb	100	-	-	-	-	-
Formación de somitas	Control	-	98.7	-	-	-	-
	As 50ppb	-	98.2	-	-	-	-
	As 500ppb	-	98.6	-	-	-	-
Desarrollo de ojos	Control	-	99.6	99.9	99.9	100	-
	As 50ppb	-	100	100	100	100	-
	As 500ppb	-	99.9	99.9	99.9	99.9	-
Pigmentación	Control	-	84.6	96.9	100	-	-
	As 50ppb	-	75.3	93.8	100	-	-
	As 500ppb	-	60.0	95.8	100	-	-
Eficiencia de eclosión (acumulativo)	Control	-	-	44.2	99.3	100	-
	As 50ppb	-	-	47.4	96.1	100	-
	As 500ppb	-	-	61.5	98.8	100	-
Edema pericárdico	Control	-	0	0	0	0	0.3
	As 50ppb	-	0	0	0	0	0.6
	As 500ppb	-	0	0	0.2	0.3	0.4
Escoliosis	Control	-	-	-	0.9	1.2	1.4
	As 50ppb	-	-	-	1.1	1.3	0.9
	As 500ppb	-	-	-	1.4	1.4	0.9

Los valores se representan como el porcentaje de embriones que presentan el efecto dentro del grupo de exposición. n=64; - significa no aplicable.

### 3.1.2 Efectos sobre el patrón de apoptosis celular por la exposición a As<sub>i</sub> en embriones de pez cebra

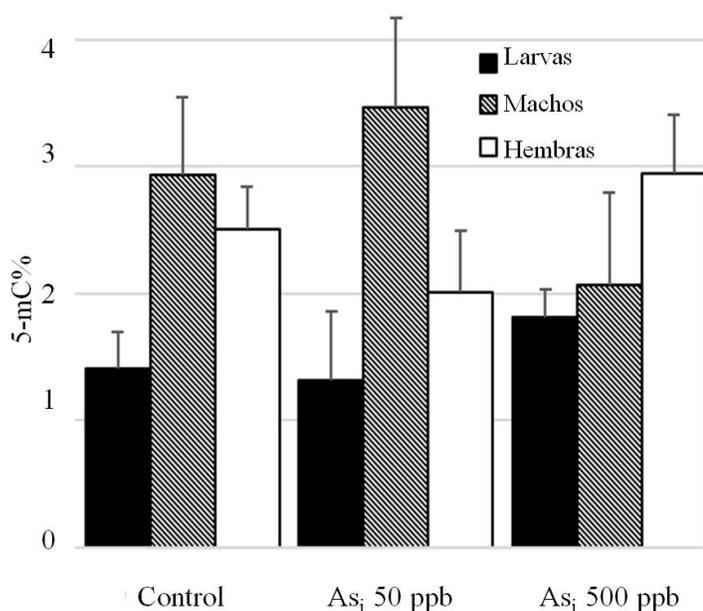
Para dicho ensayo de marcaje fluorescente, la tinción *in vivo* de células apoptóticas indicó la muerte celular en embriones de 96 hpf tratados con As<sub>i</sub> (50 y 500 ppb), siendo este representado por los puntos fluorescentes localizados en la zona media y frontal de la cabeza en comparación con el embrión del grupo control (Figura 9). El embrión expuesto a 50 ppb muestra mayor aumento con respecto al tratado con 500 ppb de As<sub>i</sub>.



**Figura 9.** Embriones de pez cebra (96 hpf) tratados con As<sub>i</sub> mostrando un patrón anormal de apoptosis (representada por cúmulos de puntos con fluorescencia) en comparación con el embrión control. A) Control, B) 50 ppb As<sub>i</sub> y C) 500 ppb As<sub>i</sub>.

### 3.3 Efecto de la exposición a $As_i$ a través del desarrollo sobre niveles de metilación global de ADN genómico

El promedio del porcentaje de citosinas metiladas en larvas (5 dpf) expuestas a 50 ppb de  $As_i$  (2.71%) disminuyó con respecto al grupo control (2.91%) e incrementó en larvas expuestas a 500 ppb (3.74%) ( $p>0.05$ ). Por otro lado, en machos adultos (150 dpf) expuestos a 50 ppb (3.47%) el porcentaje aumentó con respecto al grupo control (2.93%) y disminuyó en los expuestos a 500 ppb (2.07%) ( $p>0.05$ ). En cambio, el promedio en hembras adultas (150 dpf) expuestas a 50 ppb (2.0%) disminuyó con respecto al grupo control (2.51%) y aumentó en las expuestas a 500 ppb (2.94%) ( $p>0.05$ ). En la Figura 10 se muestra las alteraciones sobre el porcentaje de citosinas metiladas de todos los grupos analizados, sin embargo los resultados no fueron estadísticamente significativos.



**Figura 10.** Promedio de porcentaje de citosinas metiladas en ADN genómico de tejido nervioso de pez cebra (F0) en estadio larval y adulto (machos y hembras). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  EEM (n= 3-5).

### 3.4 Efecto de la exposición a $As_i$ a través del desarrollo del pez cebra sobre variables morfométricas

Los especímenes del pez cebra (*Danio rerio*) utilizados para el análisis morfológico fueron agrupados por etapa de desarrollo y por sexo en la etapa adulta (Figura 11). La estadística descriptiva (media, desviación estándar y coeficiente de variación) de los siete caracteres morfométricos para cada uno de los grupos de peces expuestos a  $As_i$  se muestran en el anexo 1 y en las figuras 12, 14, 16 y 19.

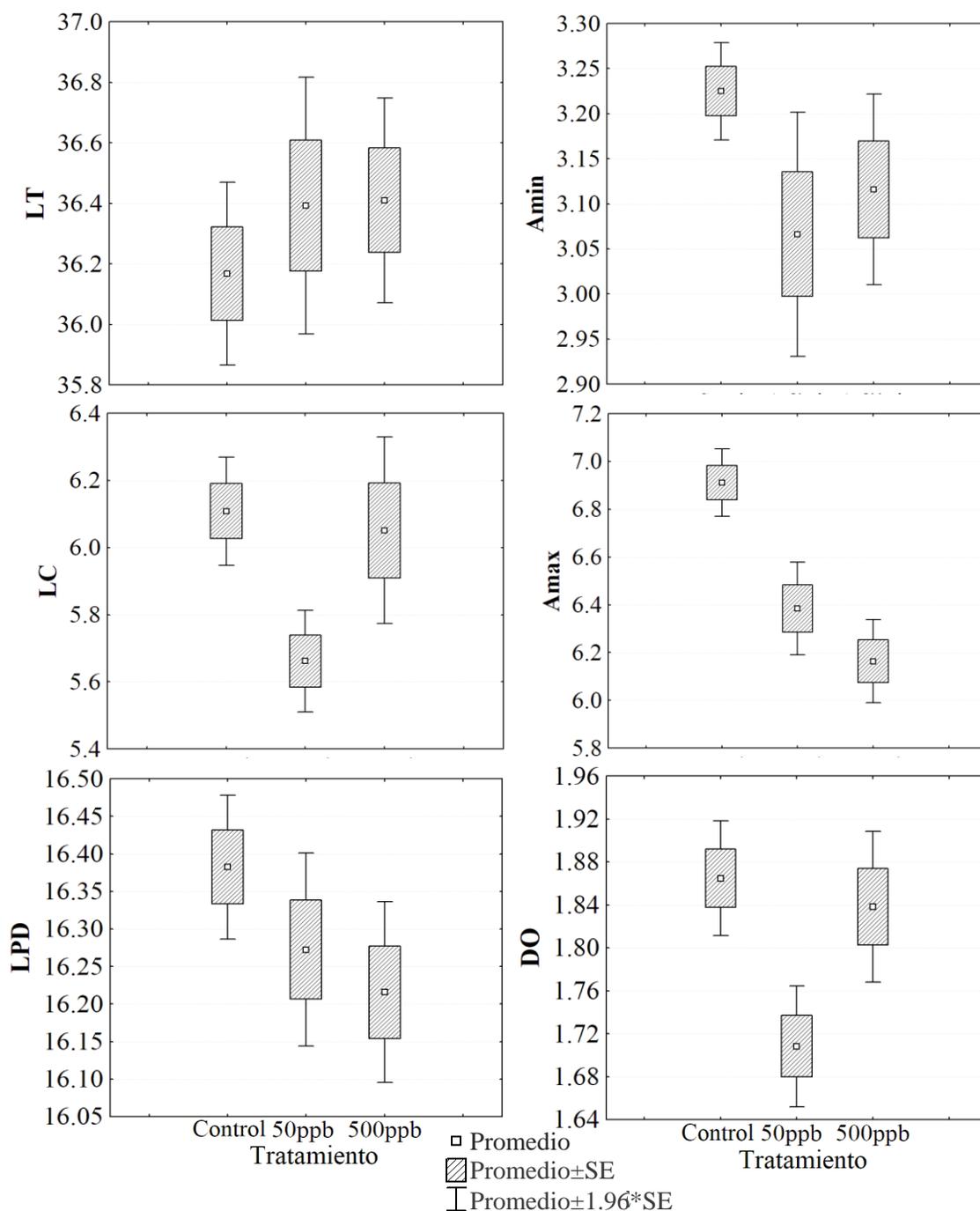


**Figura 11.** Peces representativos para el análisis morfométrico de los grupos expuestos a  $As_i$  durante el estadio juvenil (30 dpf) y adulto reproductor, hembra y macho (150 dpf).

#### 3.4.1 Efectos morfométricos de la exposición a $As_i$ durante la fase juvenil (30 dpf)

Para el estadio juvenil, el carácter con el coeficiente de variación (CV) más alto fue asociado con LC (8.73%) y el más bajo con LPD (1.67%) (Anexo 1). El AFD aceptó seis de los siete parámetros (Figura 12), de los cuales tres (Amax, LC, DO) fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.01$ , Anexo 2). En la Función canónica 1 se explica el X% de la variación observada entre los grupos comparados, donde tres caracteres ejercieron los mayores efectos: DO ( $Y1 = 1.5307$ ), Amax ( $Y1 = 1.2669$ ) y LC ( $Y1 = -1.4745$ ). En la Función canónica 2 se explica X% de la variación, siendo dos caracteres lineales

los que más contribuyeron a esta variación: AC ( $Y2=-0.8151$ ) y DO ( $Y2=-1.1183$ ) (Anexo 3).

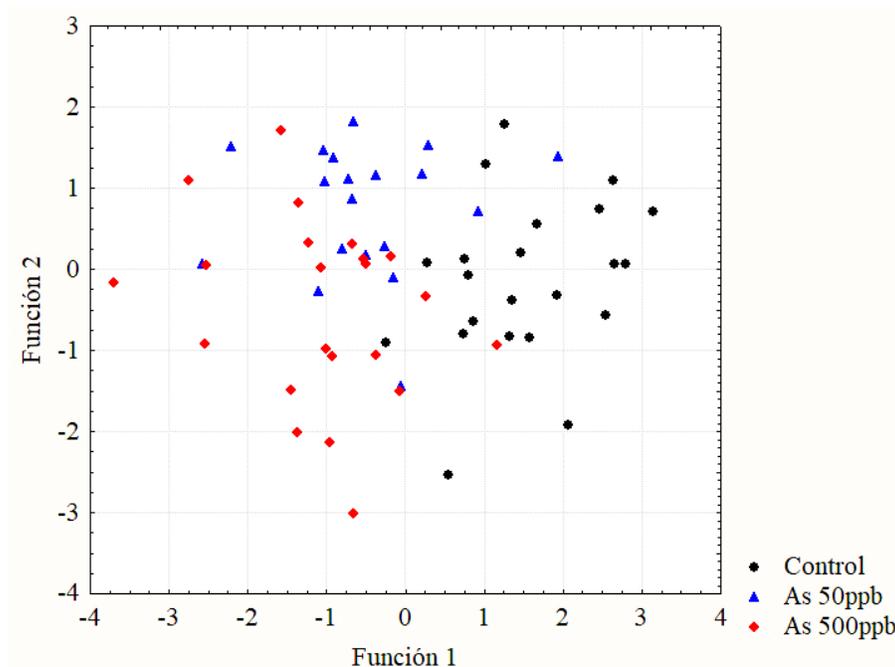


**Figura 12.** Diagramas de cajas y bigotes de los caracteres morfométricos estandarizados significativos en el AFD para los grupos en estadio juvenil (30dpf).

La significancia de las diferencias y las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los grupos tratados en estadio juvenil (30 dpf) muestran que cada uno de los grupos está bien diferenciado de los otros (Tabla 3, Figura 13).

**TABLA III.** VALOR  $P$  (\*\*\*,  $<0.001$ ) Y DISTANCIAS CUADRADAS DE MAHALANOBIS ENTRE GRUPOS EN ESTADIO JUVENIL (30DPF).

	Control	As 50ppb	As 500ppb
Control		***	***
As 50ppb	4.929820		0.015128
As 500ppb	6.984080	1.876409	

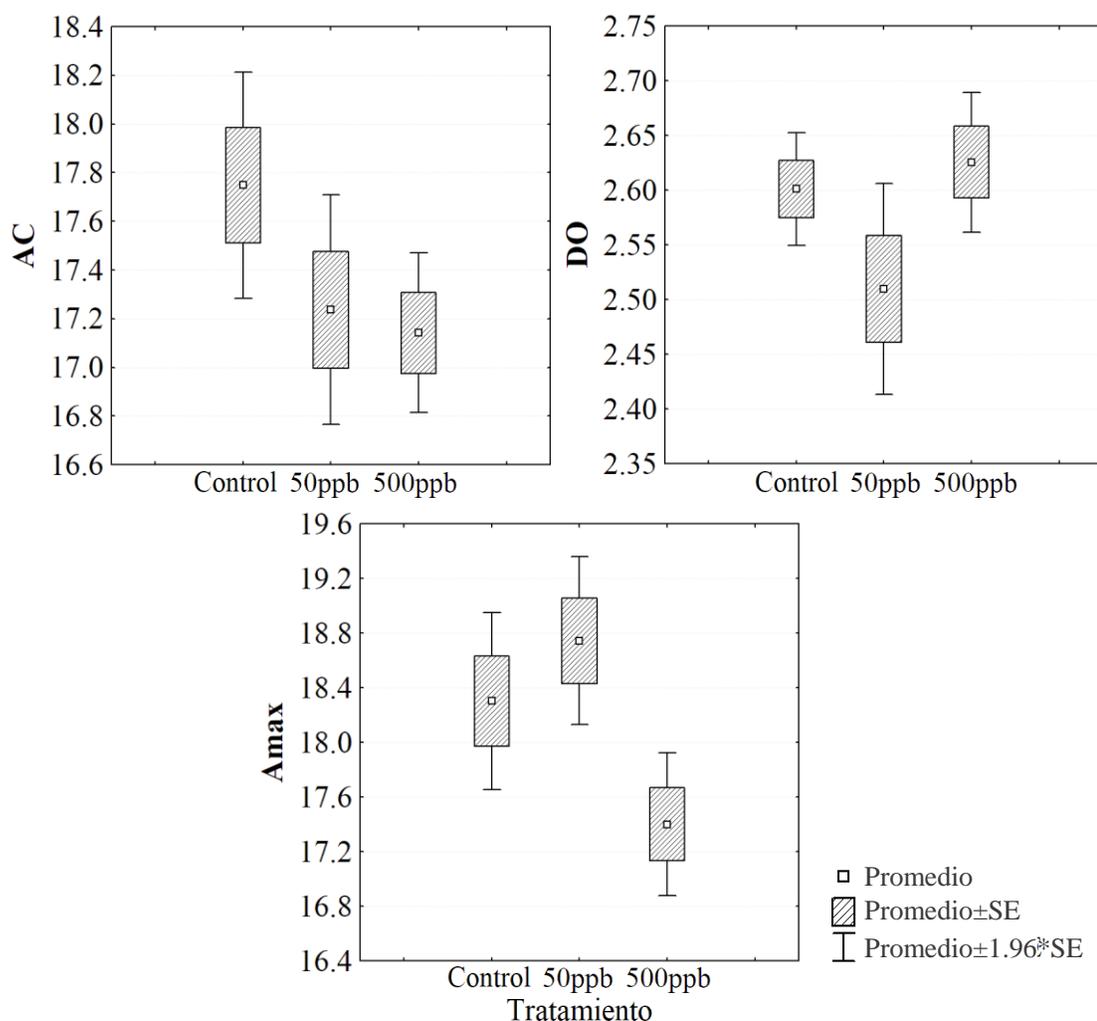


**Figura 13.** Proyección de los primeros 2 ejes del análisis canónico basado en los caracteres morfométricos de los grupos en estadio juvenil (30dpf). Las elipses representan áreas de confianza del 95%.

#### 3.4.2 Efectos morfométricos de la exposición a $As_i$ durante el estadio adulto (90 dpf)

Para esta etapa adulta, el carácter con el CV más alto fue asociado con Amin (9.04%) y el más bajo con LT (2.17%) (Anexo 1). El AFD aceptó tres de los siete parámetros (Figura 14), de los cuales tres (Amax, AC y DO) fueron estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ,

Anexo 2). En la Función canónica 1, dos caracteres ejercieron los mayores efectos: Amax ( $Y_1=1.1662$ ) y AC ( $Y=-0.8596$ ). En la Función canónica 2, un carácter lineal fue el más importante para explicar la variación: AC ( $Y=-0.8919$ ) (Anexo 3).

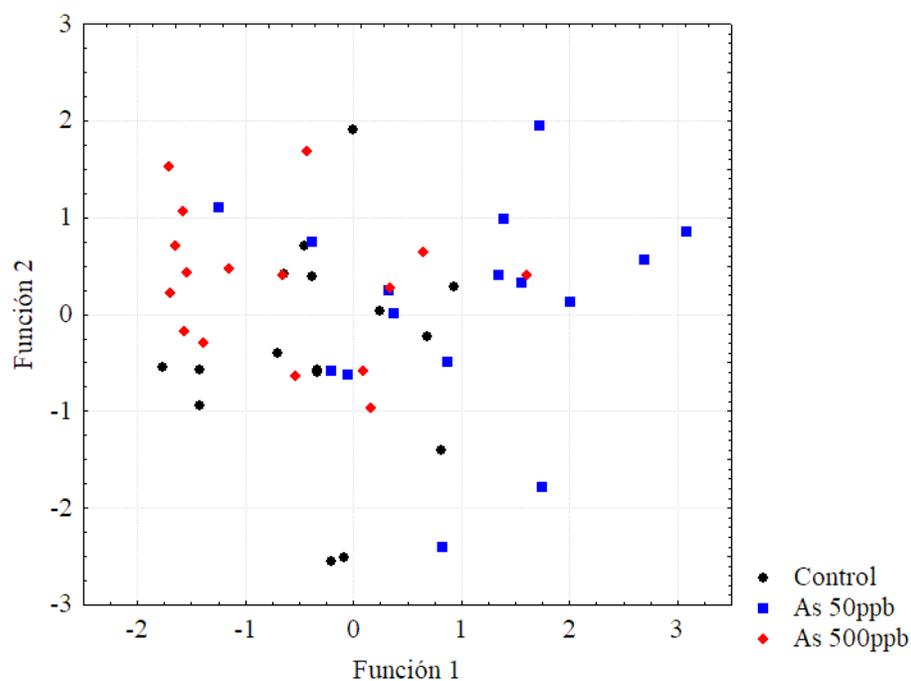


**Figura 14.** Diagramas de cajas y bigotes de los caracteres morfométricos estandarizados significativos en el AFD para los grupos en etapa adulta (90dpf).

La significancia de las diferencias y las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los grupos tratados en etapa adulta (90 dpf) muestran que cada uno de los grupos está bien diferenciado de los otros (Tabla IV, Figura 15).

**TABLA IV.** VALOR  $P$  (\*\*\*,  $<0.001$ ) Y DISTANCIAS CUADRADAS DE MAHALANOBIS ENTRE GRUPOS EN ETAPA ADULTA (90DPF).

	Control	As 50ppb	As 500ppb
Control		***	0.178890
As 50ppb	2.000467		***
As 500ppb	0.671559	2.922131	

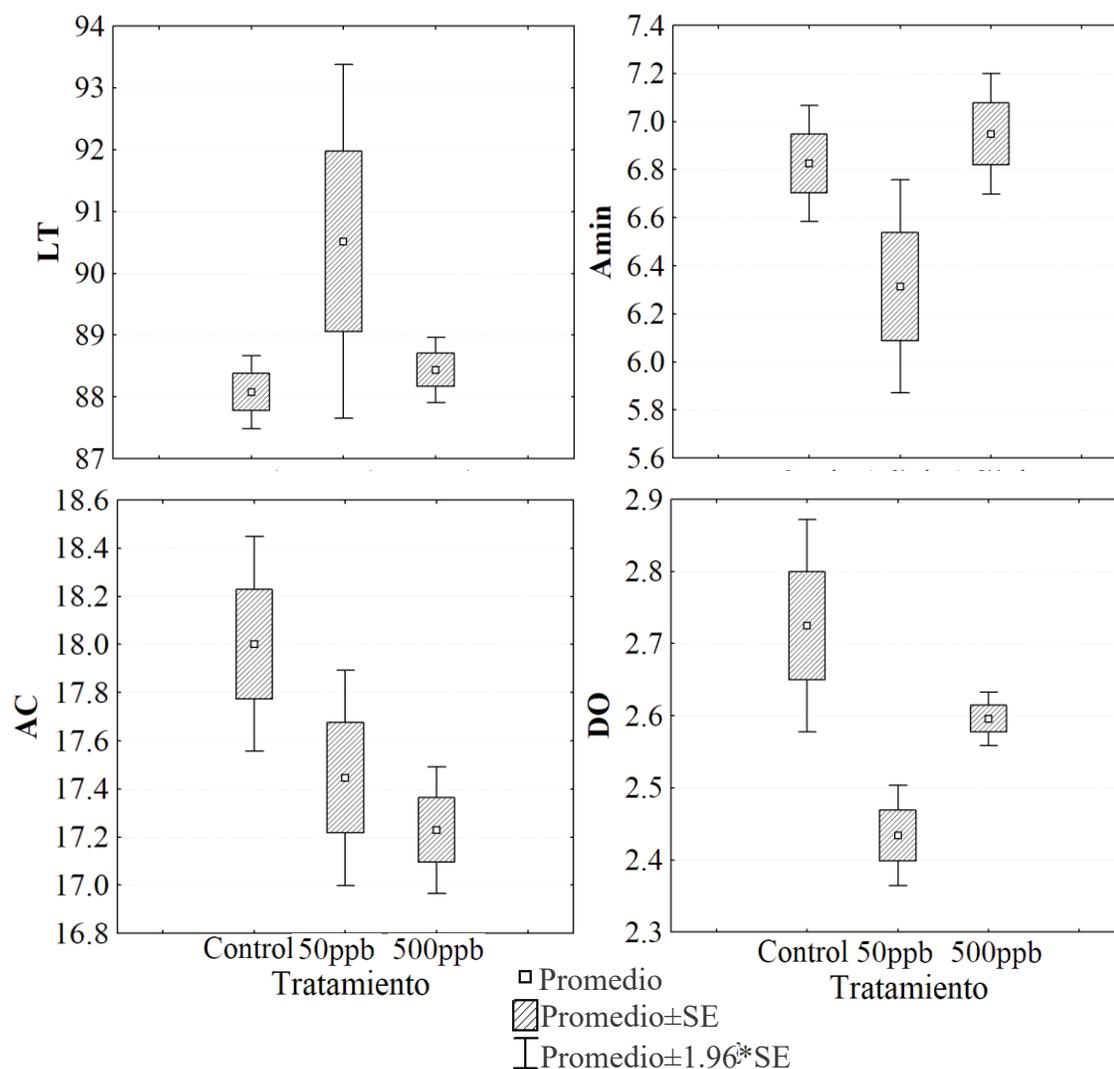


**Figura 15.** Proyección de los primeros 2 ejes de análisis canónico basado en los caracteres morfométricos de los grupos en etapa adulta (90dpf). Las elipses representan áreas de confianza del 95%.

### 3.4.3 Efectos morfométricos de la exposición a As<sub>i</sub> durante el estadio adulto reproductor en hembras (150 dpf)

Para esta etapa en hembras reproductoras adultas, los caracteres con el CV más alto fueron asociados con DO (9.05%) y con Amin (10.82%), mientras que el más bajo con LPD (2.20%) (Anexo 1). El AFD aceptó cuatro de los siete parámetros (Figura 16) los cuales fueron estadísticamente significativos (LT, AC, Amin, DO) ( $p < 0.05$ , Anexo 2). En

la Función canónica 1, un carácter ejerció el mayor efecto: DO ( $Y1=-0.8714$ ). En la Función canónica 2, dos caracteres lineares fueron los más importantes para explicar la variación: AC ( $Y2=1.0250$ ) y Amin ( $Y2=-0.9591$ ) (Anexo 4).

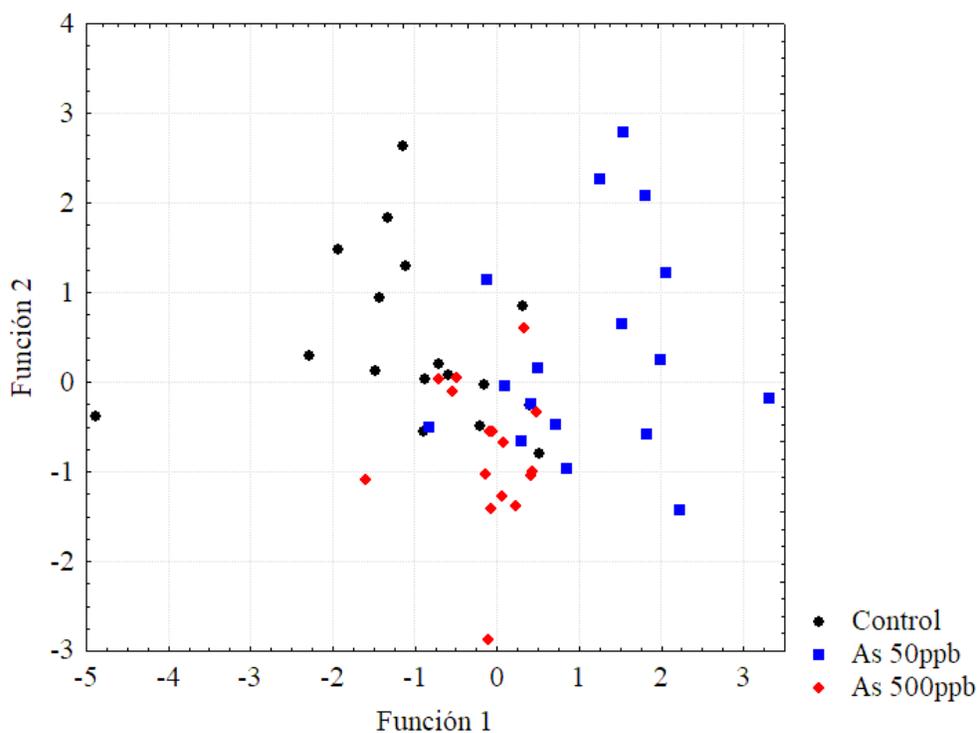


**Figura 16.** Diagramas de cajas y bigotes de los caracteres morfométricos estandarizados significativos en el AFD para los grupos de hembras en etapa adulta reproductiva (150dpf).

La significancia de las diferencias y las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los grupos tratados en hembras durante la etapa adulta reproductiva (150dpf) muestran que cada uno de los grupos está bien diferenciado de los otros (Tabla V, Figura 17).

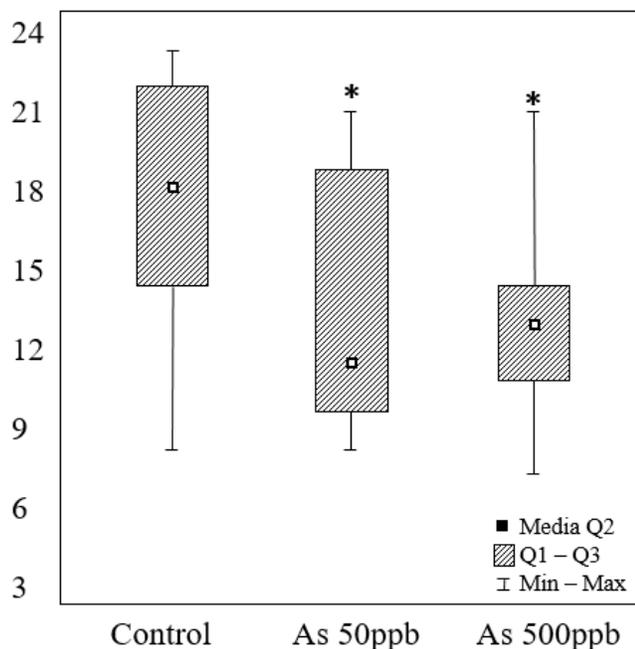
**TABLA V.** VALOR  $P$  (\*\*\*,  $<0.001$ ; \*\*,  $<0.01$ ) Y DISTANCIAS CUADRADAS DE MAHALANOBIS ENTRE GRUPOS EN HEMBRAS (150DPF).

	Control	As 50ppb	As 500ppb
Control		***	***
As 50ppb	4.803789		**
As 500ppb	2.358806	2.802776	



**Figura 17.** Proyección de los primeros 2 ejes de análisis canónico basado en los caracteres morfométricos de los grupos de hembras en etapa adulta reproductiva (150dpf). Las elipses representan áreas de confianza del 95%.

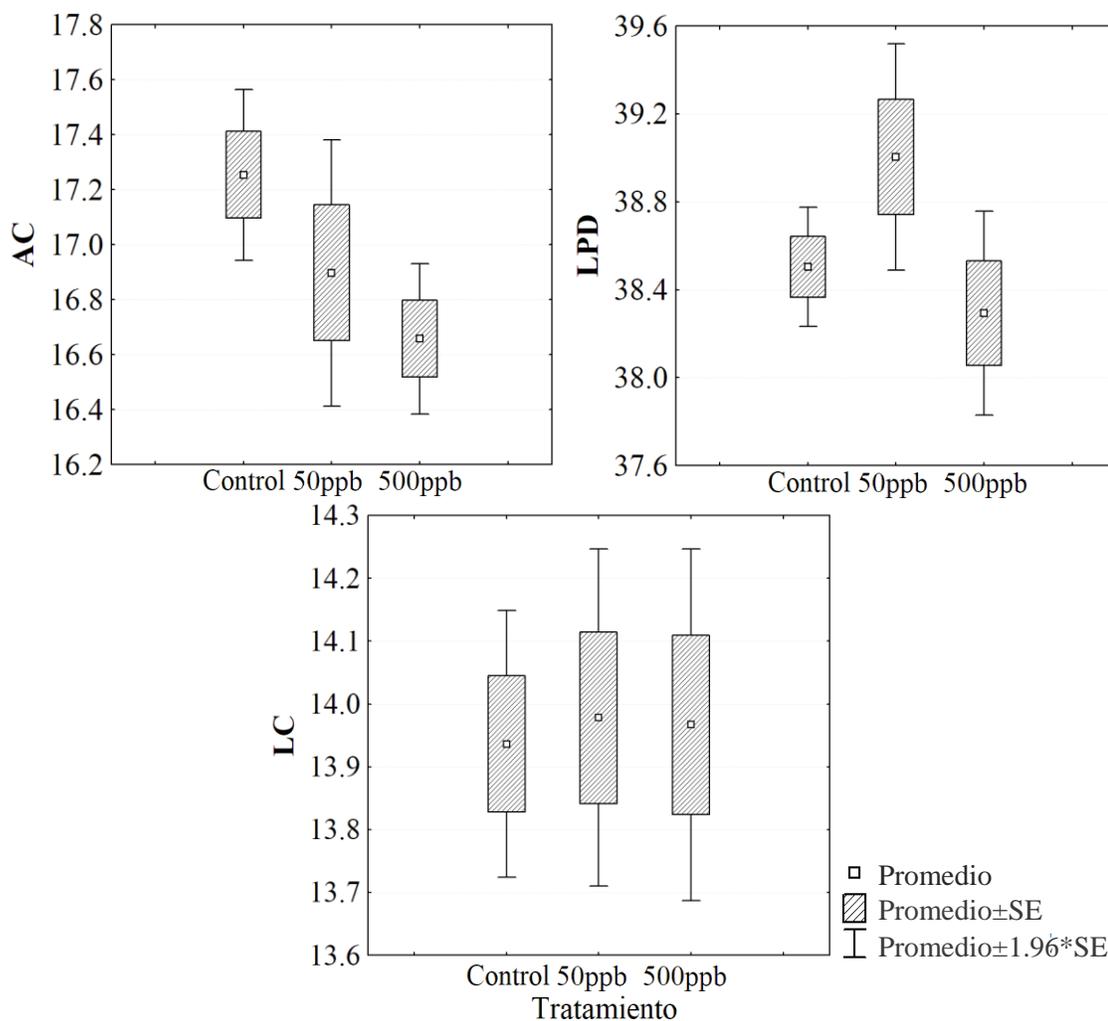
Como adición al análisis morfométrico, se desarrolló una prueba de índice gonadosomático (%) en hembras reproductivas (150 dpf). La exposición a 50 y 500 ppb de  $As_i$  disminuyó el porcentaje gonadosomático en relación al grupo control [ $F(2,33) = 3.970, p < 0.05$ ] (Figura 18).



**Figura 18.** Porcentaje gonadosomático en hembras adultas reproductivas (150 dpf) (n=13). \*diferente del grupo control  $p < 0.05$

#### 3.4.4 Efectos morfométricos de la exposición a $As_i$ durante el estadio adulto reproductor en machos (150 dpf)

Para esta etapa en machos reproductores adultos, el carácter con el CV más alto fue asociados con Amin (9.50%), mientras que el más bajo con LPD (2.29%) (Anexo 1). El AFD aceptó tres de los siete parámetros (Figura 19) sin diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ , Anexo 2). El valor de tolerancia varió para los diferentes caracteres examinados con valores altos ( $> 0.5$ ) para LT, AC, Amin, LPD, LC, DO. En la Función canónica 1, un carácter ejerció el mayor efecto: LC ( $Y_1 = 0.6197$ ). En la Función canónica 2, un carácter lineal fue el más importante para explicar la variación: AC ( $Y_2 = -0.6425$ ) (Anexo 3).

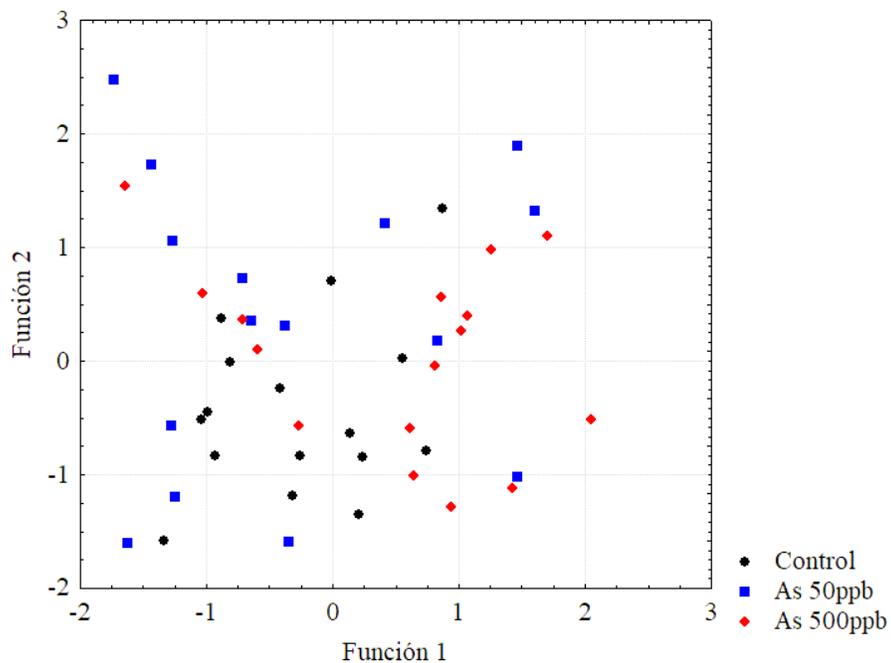


**Figura 19.** Diagramas de cajas y bigotes de los caracteres morfométricos estandarizados significativos en el AFD para los grupos de machos en etapa adulta reproductiva (150dpf).

No se detectaron diferencias significativas y las distancias cuadradas de Mahalanobis entre los grupos tratados en machos durante la etapa adulta reproductiva (150 dpf) muestran que los grupos no están bien diferenciados de los otros (Tabla V, Figura 20).

**TABLA VI.** VALOR  $P$  Y DISTANCIAS CUADRADAS DE MAHALANOBIS ENTRE GRUPOS EN MACHOS ADULTOS (150DPF).

	Control	As 50ppb	As 500ppb
Control		0.134381	0.074002
As 50ppb	0.575004		0.061460
As 500ppb	0.733139	0.788982	



**Figura 20.** Plot en los primeros 2 ejes de análisis canónico basado en los caracteres morfométricos de los grupos de machos en etapa adulta reproductiva (150dpf). Las elipses representan áreas de confianza del 95%.

La tabla VII resume los resultados del análisis discriminante sobre las alteraciones en la forma corporal de los peces a causa de la exposición a  $As_i$  para cada uno de los grupos expuestos en diferentes etapas de desarrollo.

**TABLA VII. MEDICIONES MORFOMÉTRICAS RELEVANTES PARA DIFERENCIAR EL EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL AS<sub>5</sub> SOBRE LA FORMA DEL CUERPO.**

Parámetro	Juvenil 30dpf		Adulto 90dpf		Adulto reproductor			
					Hembra 150 dpf		Macho 150 dpf	
	50ppb	500ppb	50ppb	500ppb	50ppb	500ppb	50ppb	500ppb
Longitud total	—	↑	—	—	↑	—	—	—
Altura máxima	↓	↓	—	↓	—	—	—	—
Altura corporal	—	—	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Altura mínima	↓	↓	—	—	↓	—	—	—
Longitud predorsal	↓	↓	—	—	—	—	↑	—
Longitud cefálica	↓	—	—	—	—	—	↑	—
Diámetro del ojo	↓	—	↓	—	↓	↓	—	—

Las comparaciones se realizan respecto al grupo control.

## 4. DISCUSIÓN

---

### 4.1 Toxicidad del As<sub>i</sub> durante el desarrollo del pez cebra

En este estudio se demostraron los efectos de las concentraciones relevantes al ambiente de As<sub>i</sub> en el desarrollo ontogénico del pez cebra, particularmente sobre marcadores embriotóxicos y morfológicos, aunque no se observó un efecto sobre la metilación global al ADN.

En la presente investigación de embrio-toxicidad en el pez cebra, la exposición a la concentración más baja (50 ppb) no generó cambios sustantivos en la mortalidad, mientras que la exposición a la concentración más alta de 500 ppb aumentó considerablemente la letalidad de los embriones y causó cambios sutiles en el desarrollo embrionario, incluyendo retraso en la eclosión, reducción de la pigmentación y aumento significativo de la frecuencia cardíaca.

Estudios previos donde se ha evaluado la toxicidad por la exposición a altas concentraciones de As<sub>i</sub> (0.8-10.0 mM) durante el desarrollo embrionario del pez cebra, reportan alteraciones tales como: aumento en la tasa de mortalidad, retraso de eclosión, desarrollo de escoliosis, reducción del crecimiento, anormalidades morfológicas y formación de edema pericárdico<sup>95,96</sup>. Por otro lado, también se han registrado alteraciones por la exposición a bajas concentraciones (50-500 ppb) sobre la frecuencia cardíaca de forma dependiente de la concentración durante el desarrollo embrionario<sup>62</sup>.

Así mismo, se ha comprobado que la exposición a  $As_i$  se relaciona con desórdenes cardiovasculares y enfermedades cardíacas en diversos vertebrados<sup>53</sup>. Pruebas realizadas en roedores demostraron que la exposición directa a  $As_i$  (10-50 $\mu$ M) inhibe de forma dosis-dependiente la relajación de las células endoteliales en los vasos sanguíneos por alteración en la transmisión de acetilcolina, por lo que se ha propuesto una pérdida de la capacidad del tono vasomotor inducido por  $As_i$  como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares<sup>127</sup>. En adición a ello, estudios en humanos han demostrado que la exposición crónica con  $As_i$  (10.6-77mM) induce alteraciones cardiovasculares en niños y jóvenes, estos síntomas van desde infarto de miocardio hasta la cardiomegalia los cuales se presentan con mayor severidad en niños de 0 a 5 años de edad<sup>128</sup>.

Dichas investigaciones nos permite relacionar los resultados previos con las alteraciones observadas en nuestra prueba de embrio-toxicidad, pues hay una tendencia similar en sus efectos. Sin embargo, hasta la actualidad no se ha corroborado que los mecanismos involucrados sean los mismos.

#### 4.1.1 Apoptosis celular por la exposición a $As_i$ durante el desarrollo embrionario del pez cebra

Investigaciones previas han mostrado que un factor clave durante la embriogénesis es la apoptosis celular, pues influye sobre el control del desarrollo durante la morfogénesis<sup>129,130</sup>. Este patrón apoptótico es un proceso fisiológico muy susceptible a la interferencia de factores ambientales<sup>131</sup>. Tal es el caso del  $As_i$ , pues se ha demostrado que actúa como un factor ambiental que altera el mecanismo de apoptosis<sup>132</sup> por la generación

de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la mitocondria<sup>133,134</sup>. Dicha producción de ROS promueve la liberación de citocromo C, lo que desencadena en la inducción de apoptosis celular temprana<sup>135</sup>.

En nuestro estudio se observó el patrón de apoptosis en embriones de pez cebra (96 hpf) por la exposición a As<sub>i</sub> (50 y 500 ppb). Empero, nuestros resultados no evidenciaron alteraciones sobre el patrón de apoptosis celular, por lo que consideramos que el número reducido de individuos analizados fue una limitante. Sin embargo, múltiples evidencias han demostrado que la exposición a As<sub>i</sub> genera apoptosis celular en el pez cebra<sup>96,136</sup>. Además, evidencias sugieren un incremento en el patrón de apoptosis celular en *Caenorhabditis elegans* con el uso de una técnica equivalente a la utilizada en el presente estudio<sup>137</sup>. Esta evidencia sustenta nuestra hipótesis, por lo que es plausible detectar el mismo efecto en embriones de pez cebra en futuros proyectos.

#### **4.2 Variaciones sobre el patrón de metilación de ADN durante el desarrollo del pez cebra**

El cambio en la metilación del ADN global es un mecanismo regulador importante durante la embriogénesis temprana que posiblemente podría relacionarse con un mecanismo potencial de toxicidad durante el desarrollo<sup>111,138</sup>. Estudios han revelado que los patrones de metilación sobre el ADN pueden ser alterados en diversos modelos animales por la presencia de As<sub>i</sub> y sus metabolitos<sup>106,110,139-141</sup>. Dichas alteraciones pueden generarse a nivel global o en genes específicos implicados en el desarrollo de ciertas

enfermedades, sin embargo aún no se ha confirmado si tienen consecuencias biológicas directas<sup>59,142</sup>.

En las pruebas realizadas en este estudio se utilizaron dos concentraciones relevantes al ambiente de  $As_i$  (50 y 500 ppb). Sin embargo, en contraste con nuestra hipótesis nuestros resultados no mostraron modificaciones sobre el patrón de metilación de ADN durante la etapa larvaria y adulta. Solo fue posible visualizar una tendencia de hipermetilación en larvas y hembras adultas, y una tendencia de hipometilación en adultos machos como consecuencia de la exposición a 500 ppb de  $As_i$ .

Para nuestro desarrollo experimental se consideró la aplicación de esta técnica a base de un ensayo de ELISA ya que la aplicación de este método es rápido y sencillo, y su uso en el modelo del pez cebra ha sido ampliamente reportado en la literatura<sup>143-145</sup>. Sin embargo, en una revisión realizada por Kurdyukov y Bullock (2016), reportan que los ensayos basados en ELISA tienen una alta variabilidad y mayor inespecificidad, lo que arroja solo una estimación aproximada de la metilación del ADN<sup>146</sup>. Este método, tiene un bajo poder de discriminación (1:1000) al comparar entre el ADN metilado y no metilado, y solo los cambios relativamente grandes (1.5-2 veces) se pueden resolver debido a la alta variabilidad. Por tanto, no es uno de los principales métodos para este tipo de análisis, por ello se considera que el ensayo aplicado en el presente estudio no fue el adecuado. Es probable que la baja discriminación de la técnica no nos permitió revelar los posibles cambios sutiles sobre el patrón de metilación por la exposición a  $As_i$ .

Existe una variedad de ensayos convenientes para la identificación del perfil de metilación global del ADN genómico. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-UV) es uno de ellos, en embargo es significativamente limitado, pues es necesario un laboratorio de equipo especializado que requiere grandes cantidades de muestras de ADN (3-10  $\mu\text{g}$ ) para ser analizados. Por otro lado se encuentra la cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem, es una alternativa al HPLC-UV pues requiere menores cantidades de muestras de ADN (50-100 ng), además el método no es afectado por ADN de mala calidad. Sin embargo, la experiencia necesaria y el equipo no están particularmente extendidos<sup>146</sup>. Asimismo es posible determinar los niveles de metilación de LINE-1 por pirosecuenciación pues refleja muy bien los cambios de metilación global de ADN. En nuestra investigación sería necesaria la selección de uno de estos ensayos, sin embargo eso depende totalmente de la calidad y cantidad de la muestra de interés y de la disponibilidad de equipos y reactivos necesarios.

#### **4.3 Variaciones morfométricas por la exposición a $\text{As}_i$ durante el desarrollo del pez cebra**

Los resultados del presente estudio muestran una variación en la forma del cuerpo de los grupos de peces con exposición crónica a  $\text{As}_i$  (50 y 500 ppb) durante las tres fases de desarrollo (30, 90 y 150 dpf) (Tabla VII). Los juveniles y hembras a parecen estar más afectados pues un mayor número de variables se vieron afectadas, lo que sugiere un efecto mayor durante estadios tempranos y adultos de forma sexo-dependiente. El efecto sexo-dependiente, podría ser consecuencia de una mayor expresión de transportadores acuagliceroporinas en hembras en comparación con los machos debido a la presencia de

As<sub>i</sub><sup>147</sup>. Se sugiere que el estrógeno facilita la transcripción de los transportadores en células hepáticas lo que facilita el ingreso del As<sup>III</sup> a las células y por lo tanto de su actividad tóxica. Sin embargo, no hay evidencias por lo cual la etapa juvenil también se ve afectada, pero de igual manera podría estar asociado a la actividad de los transportadores de membranas.

En nuestros resultados, las mediciones morfométricas más afectadas por la exposición a As<sub>i</sub> se presentan en la mitad posterior del cuerpo de los peces, con efectos evidentes sobre la disminución de la altura corporal y altura máxima de los individuos tratados en comparación los individuos control. Debido a lo anterior y al tipo de nado subcarangiforme del pez cebra que requiere del uso de la mitad posterior del cuerpo<sup>148</sup>, sugerimos que los cambios podrían derivar de alteraciones en el sistema músculo esquelético. En este aspecto, diversos estudios han demostrado que el As<sub>i</sub> es capaz de generar dichos efectos en la locomoción además de influir sobre la reducción del crecimiento<sup>149,150</sup>.

Los cambios sobre el sistema músculo esquelético influidos por factores ambientales podrían deberse a alteraciones en el desarrollo muscular, tanto a las diferencias en el tamaño de las fibras y la distribución relativa del tejido muscular<sup>117</sup>. En estudio realizado en el pez fundulido (*Fundulus heteroclitus*) se demostró que la exposición embrionaria a As<sub>i</sub> (0.8-25 ppm) hasta el momento de la eclosión, causó cambios transcripcionales de genes involucrados en el desarrollo de la musculatura reduciendo el diámetro de las fibras

musculares e incrementando su número, así como la reducción significativa de la longitud corporal<sup>122,151,152</sup>.

Por otra parte, en este estudio se denota que la influencia del As<sub>i</sub> sobre la maduración sexual del pez cebra se manifiesta en la alteración de la altura corporal de los peces que podría estar relacionada al cambio en el tamaño de las gónadas. Existe evidencia que corrobora la disminución del tamaño de las gónadas por la exposición al tóxico, pues se ha demostrado que la exposición durante 20 días a As<sub>i</sub> (4.45-8.9 mg/L) en el pez gato africano adulto (*Clarias gariepinus*) causa una correlación negativa sobre el índice gonadosomático<sup>153</sup>. Cabe mencionar que nuestros resultados mostraron una disminución del índice gonadosomático de hembras por la exposición a 50 y 500 ppb de As<sub>i</sub> (Figura 18). En conjunto, los datos previos y nuestros resultados sugieren que la exposición a As<sub>i</sub> disminuye considerablemente la capacidad reproductiva de los peces, y por tanto, los parámetros morfométricos relacionados a la altura corporal.

De igual manera, la exposición a As<sub>i</sub> generó una disminución del diámetro ocular en juveniles y hembras adultas de pez cebra. Hasta la actualidad no existen estudios que demuestren que el a As<sub>i</sub> sea capaz de inducir cambios en el tamaño ocular, sin embargo se ha demostrado que el ojo es un tejido con alta capacidad para captar As<sub>i</sub> tanto en roedores (Kleiman et al., 2016) como en peces (*Danio rerio* y *Tribolodon hakonensis*)<sup>68,154</sup>. Esto que sugiere que las células en los tejidos oculares podrían ser un blanco de los efectos deletéreos del As<sub>i</sub>, sin embargo se necesita más estudios al respecto.

## 5. CONCLUSIONES

---

- 1) El sistema de exposición crónica con  $As_i$  durante el desarrollo del pez cebra, permitió una exposición sostenida durante 5 meses con un mínimo de manipulación de soluciones tóxicas.
- 2) El sistema de policultivo de alimentación para pez cebra permitió mantener una alta sobrevivencia durante el desarrollo larvario.
- 3) La exposición a concentraciones relevantes al ambiente de  $As_i$  causó toxicidad durante el desarrollo embrionario del pez cebra. Sin embargo, los efectos sobre el patrón de apoptosis celular no fueron significativos.
- 4) Los efectos de exposición crónica a  $As_i$  sobre el porcentaje de metilación global de ADN genómico en larvas y adultos de pez cebra no fueron significativos.
- 5) La exposición crónica con  $As_i$  sobre variables morfométricas en pez cebra, arrojó diferencias en la mayoría de las mediciones realizadas, siendo más relevante en los grupos de peces juveniles, y de forma dependiente del sexo, en los grupos de hembras reproductivas.

## **6. PERSPECTIVAS**

---

Aún quedan diversos puntos que resolver sobre los efectos epigenéticos y las alteraciones morfométricas que permitirían discutir y defender con mejores bases los resultados obtenidos de esta investigación. Primeramente se espera determinar el resto de las alteraciones epigenéticas como efecto de la exposición crónica con  $As_i$  por la identificación de modificaciones postraduccionales en dos sitios específicos de la histona H3 (H3K4me3 y H3K4Ac). Y finalmente se mejorarían los datos obtenidos del análisis morfométrico con la identificación de alteraciones en la composición muscular de los sitios corporales con mayor alteración morfométrica. El objetivo global del estudio es carácter transgeneracional, por lo que se esperaría que los resultados de las pruebas realizadas en la generación F0 sobre embrio-toxicidad, variaciones morfométricas y modificaciones epigenéticas se mantengan en las generaciones F1 y F2. Finalmente, existe una carencia de información acerca de los efectos transgeneracionales de la exposición crónica del  $As_i$ , por lo que se espera aportar información valiosa al campo de la toxicología acuática.

## ANEXOS

**ANEXO I. PROMEDIOS Y COEFICIENTES DE VARIACIÓN (CV) DE LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS ESTANDARIZADAS PARA CADA UNA DE LAS ETAPAS DE DESARROLLO DE LOS GRUPOS DE ANIMALES EXPUESTOS (30DPF, 90DPF, 150DPF HEMBRAS (H) Y MACHOS (M)).**

Código	Grupos expuestos a As <sub>i</sub>															
	30 dpf			90 dpf			150 dpf H			150 dpf M						
	Ctr	As 50	As 500	Ctr	As 50	As 500	Ctr	As 50	As 500	Ctr	As 50	As 500				
LT	36.12	36.39	36.41	2.28	72.94	72.39	73.16	2.17	88.08	90.52	88.44	4.19	83.85	83.86	83.94	0.90
Amax	6.89	6.38	6.16	7.74	18.30	18.74	17.40	7.27	22.79	22.61	22.32	4.67	13.93	13.97	13.54	4.47
AC	6.96	6.76	6.63	8.21	17.75	17.24	17.14	5.14	18.00	17.45	17.23	5.00	17.29	16.90	16.66	4.47
Amin	3.22	3.07	3.12	7.61	9.48	9.08	9.58	9.04	6.83	6.31	6.95	10.82	11.67	11.18	11.53	9.50
LPD	16.37	16.27	16.22	1.67	35.52	35.67	35.49	2.78	49.59	49.62	49.13	2.20	38.52	39.02	38.29	2.29
LC	6.11	5.66	6.05	8.73	11.74	11.47	11.79	4.37	17.77	17.60	17.39	4.47	13.89	14.00	13.97	3.63
DO	1.87	1.71	1.84	8.59	2.60	2.51	2.63	5.98	2.72	2.43	2.60	9.05	2.91	2.93	2.92	3.91
N	23	19	22	64	16	16	16	48	17	17	16	50	16	16	16	48
LP prom	9.51	10.63	10.06	10.03	24.53	25.23	24.34	24.70	27.54	29.24	27.03	27.97	27.60	27.69	27.18	27.49
LP min	8.20	7.77	8.23	7.77	22.08	21.51	21.89	21.51	24.74	25.60	24.57	24.57	25.29	25.53	25.34	25.29
LP max	10.64	14.38	13.92	14.38	27.28	29.25	26.01	29.25	30.93	32.85	29.06	32.85	29.48	30.00	29.10	30.00

N = número de especímenes examinados, LP= Longitud patrón no transformada.

**ANEXO II. VALORES DE LAMBDA DE WILKS, SIGNIFICANCIA (P) Y TOLERANCIA PARA LAS VARIABLES MORFOMÉTRICAS DE LOS GRUPOS EXPUESTOS (30DPF, 90DPF, 150DPF HEMBRAS (H) Y MACHOS (M)).**

Carácter Lineal	Grupos expuestos a As <sub>i</sub>																			
	30 dpf				90 dpf				150 dpf H				150 dpf M							
	Lambda Wilks	Lambda parcial	F (2,55)	p	Toler	Lambda Wilks	Lambda parcial	F (2,43)	p	Toler	Lambda Wilks	Lambda parcial	F	p	Toler	Lambda Wilks	Lambda parcial	F	p	Toler
LT	0.353	0.938	1.805	0.174	0.631	0.575	0.989	0.237	0.790	0.794	0.492	0.825	4.652	0.015	0.888	0.771	0.975	0.527	0.594	0.918
Amax	0.634	0.522	25.224	0.000	0.490	0.809	0.719	8.416	0.001	0.571	0.400	0.986	0.305	0.739	0.631	0.773	0.978	0.452	0.639	0.482
AC	0.322	0.974	0.735	0.484	0.192	0.722	0.806	5.184	0.010	0.574	0.530	0.765	6.745	0.003	0.710	0.887	0.892	2.555	0.090	1.000
Amin	0.358	0.925	2.216	0.119	0.427	0.570	0.979	0.448	0.642	0.821	0.507	0.800	5.496	0.007	0.740	0.770	0.974	0.539	0.587	0.625
LPD	0.344	0.963	1.052	0.356	0.908	0.578	0.993	0.152	0.860	0.787	0.404	0.995	0.105	0.900	0.854	0.891	0.887	2.676	0.081	1.000
LC	0.392	0.844	5.095	0.009	0.122	0.578	0.993	0.141	0.869	0.755	0.395	0.972	0.613	0.546	0.920	0.772	0.976	0.501	0.610	0.833
DO	0.418	0.791	7.260	0.002	0.129	0.679	0.857	3.576	0.037	0.958	0.600	0.676	10.533	0.000	0.898	0.775	0.981	0.396	0.675	0.916
Total grupal	0.334	F (12,110)	6.767	<0.0000	-	0.582	F (6,86)	4.459	<0.0006	-	0.406	F (8,88)	6.265	<0.0000	-	0.790	F (4,84)	2.620	<0.0000	-

**ANEXO III. COEFICIENTES ESTANDARIZADOS DE LOS PRIMERAS DOS VARIABLES DE FUNCIÓN CANÓNICA RESULTADO DEL AFD PARA LOS DATOS MORFOMÉTRICOS ESTANDARIZADOS DE LOS GRUPOS DE PÉCES CEBRA EXPUESTOS A AS<sub>i</sub>.**

Código	Grupos expuestos a AS <sub>i</sub>							
	30 dpf		90 dpf		150 dpf H		150 dpf M	
	Función 1	Función 2	Función 1	Función 2	Función 1	Función 2	Función 1	Función 2
LT	-0.3090	0.4444	-	-	0.6409	0.1478	-	-
Amax	1.2669	0.4690	1.1662	-0.1593	-	-	0.5391	-0.5843
AC	-	-	-0.8596	-0.8919	-0.4104	1.0250	-0.4983	-0.6425
Amin	-0.2365	-0.8151	-	-	-0.3251	-0.9591	-	-
LPD	0.2190	0.2449	-	-	-	-	0.6197	0.1554
LC	-1.4745	0.3205	-	-	-	-	-	-
DO	1.5307	-1.1183	-0.6420	-0.0541	-0.8714	0.1696	-	-
Eigenvalue	1.3742	0.2727	0.5638	0.0992	0.8725	0.3157	0.1966	0.0797
Cum Prop	0.8344	1.0000	0.8503	1.0000	0.7343	1.0000	0.7115	1.0000

## LITERATURA CITADA

---

- 1 National Research Council. Arsenic: Medical and Biologic Effects of Environmental Pollutants (1977).
- 2 Cullen, W. y Reimer, K. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* **89**, 713-764, doi:10.1021/cr00094a002 (1989).
- 3 Andrae, M. O., Byrd, J. T. y Froehlich, P. N. Arsenic, antimony, germanium, and tin in the Tejo estuary, Portugal: modeling a polluted estuary. *Environmental science & technology* **17**, 731-737, doi:10.1021/es00118a008 (1983).
- 4 IARC. Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, including Arsenic. Arsenic in drinking-water. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Supplement* **84**, 39-267 (2004).
- 5 Aitio, A. y Becking, G. Arsenic and Arsenic Compounds. *World Health Organization* (2001).
- 6 Nordstrom, D. K. Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* **296**, 2143-2145, doi:10.1126/science.1072375 (2002).
- 7 Smedley, P. L. y Kinniburgh., D. G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochem* **17**, 517-568, doi:10.1016/S0883-2927(02)00018-5 (2002).
- 8 Chakraborti, D., Rahman, M., Ahamed, S., Dutta, R., Pati, S. y Mukherjee, S. Arsenic groundwater contamination and its health effects in Patna district (capital of Bihar) in the middle Ganga plain, India. *Chemosphere* **152**, 520-529, doi:10.1016/j.chemosphere.2016.02.119 (2016).
- 9 Tandukar, N., Bhattacharya, P., Neku, A. y Mukherjee, A. Extent and severity of arsenic poisoning in Nepal. *CSIRO Publishing*, 595–604 (2006).
- 10 Guo, H. Arsenic level in drinking water and mortality of lung cancer (Taiwan). *Cancer causes & control : CCC* **15**, 171-177, doi:10.1023/B:CACO.0000019503.02851.b0 (2004).
- 11 Uddin, R. y Huda, N. Arsenic poisoning in bangladesh. *Oman medical journal* **26**, 207, doi:10.5001/omj.2011.51 (2011).
- 12 Matschullat, J. Arsenic in the geosphere--a review. *The Science of the total environment* **249**, 297-312 (2000).
- 13 Razo, I. Carrizales, L., Castro, J., Diaz-Barriga, F. y Monroy, M. Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, Air, & Soil Pollution* **152**, 129-152 (2004).
- 14 Del Razo, L., Corona, J., García-Vargas, G., Albores, A. y Cebrián, M. Fluoride levels in wellwater from a chronic arsenicism area of northern Mexico. *Environmental pollution* **80**, 91-94. (1993).
- 15 Rosas, I., Belmont, R., Armienta, A. y Baez, A. Arsenic concentrations in water, soil, milk and forage in Comarca Lagunera, Mexico. *Water Air Soil Pollut.* **112**, 133-149, doi:10.1023/A:1005095900193 (1999).
- 16 CONAGUA. Estudio de la contaminación difusa del acuífero de la Comarca Lagunera, Coahuila. *Subdirección General Técnica, Gerencia de Aguas Subterráneas* (2000).
- 17 Monroy, M. Díaz-Barriga, F., Razo, I. y Carrizales, L. Evaluación de la contaminación por arsénico y metales pesados (Pb, Cu, Zn) y análisis de riesgo en salud en villa de la paz-matehuala, S.L.P. *Instituto de Metalurgia, UASLP*, <http://ambiental.uaslp.mx/docs/fdbymmf-020701-notacontvpmat.pdf> (2002).

- 18 JMAS-JUAREZ, CONAGUA. Prospección hidrogeológica e hidrogeoquímica en el bolsón de la Mesilla, Chihuahua, Zona de Conejos-Médanos *Junta Municipal de Agua y Saneamiento de Juárez* (2000).
- 19 Wyatt, C., Fimbres, C., Romo, L., Mendez, R. y Grijalva, M. Incidence of heavy metal contamination in water supplies in northern Mexico. *Environmental research* **76**, 114-119 (1998).
- 20 Armienta, M., Villaseñor, G., Rodríguez, R., Ongley, L. y Mango, H. The role of arsenic-bearing rocks in groundwater pollution at Zimapán Valley, México. *Environmental Geology* **40**, 571-581, doi:10.1007/s002540000220 (2001).
- 21 Carrillo, A. y Drever, J. Environmental assessment of the potential for arsenic leaching into groundwater from mine wastes in Baja California Sur, Mexico. *Geofísica Internacional* **37**, 35-39 (1998).
- 22 Wang, J., y Wai, C. Arsenic in Drinking Water—A Global Environmental Problem. *Journal of Chemical Education* **81**, 207-213, doi:10.1021/ed081p207 (2004).
- 23 Bhattacharya, P., Welch, A., Stollenwerk, K., McLaughlin, M., Bundschuh, J. y Panullah, G. Arsenic in the environment: Biology and Chemistry. *The Science of the total environment* **379**, 109-120, doi:10.1016/j.scitotenv.2007.02.037 (2007).
- 24 Bhattacharya, P., Frisbie, S., Smith, E., Naidu, R., Jacks, G. y Sarkar, B. Arsenic in the environment: a global perspective. *Handbook of heavy metals in the environment*, 145-215 (2002).
- 25 Naidu, R., Smith, E., Owens, G., Bhattacharya, P. y Nadebaum, P. Managing arsenic in the environment: from soil to human health. *CSIRO Publishing* (2006).
- 26 Cebrian, M. E., Albores, A., Aguilar, M. y Blakely, E. Chronic arsenic poisoning in the north of Mexico. *Human toxicology* **2**, 121-133 (1983).
- 27 Cebrián, M., Albores, M., García-Vargas, G., Del Razo, L. y Ostrosky-Wegman, P. Chronic arsenic poisoning in humans: The case of Mexico. *John Wiley and Sons. New York, NY, USA.*, 93-107 (1994).
- 28 Cantellano, A., Viniestra, G., Eslava, G. y Alvarez, A. El arsenicismo en la Comarca Languenera. *alud Publ. Mex.* **6**, 375-385 (1964).
- 29 Del Razo, L., Hernández, J., García-Vargas, G., Ostrosky-Wegman, P., Cortinas de Nava, C. y Cebrián, M. Urinary excretion of arsenic species in a human population chronically exposed to arsenic via drinking water: A pilot study. *Science and Technology Letters*, 91-100 (1994).
- 30 Watanabe, T. y Hirano, S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Archives of toxicology* **87**, 969-979, doi:10.1007/s00204-012-0904-5 (2013).
- 31 Saha, J., Dikshit, A., Bandyopadhyay, M. y Saha, K. A Review of Arsenic Poisoning and its Effects on Human Health. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **29**, 281-313, doi:10.1080/10643389991259227 (1999).
- 32 Lin, S., Shi, Q., Nix, F., Styblo, M., Beck, M., Herbin-Davis, K., ... Thomas, D. A novel S-adenosyl-L-methionine:arsenic(III) methyltransferase from rat liver cytosol. *The Journal of biological chemistry* **277**, 10795-10803, doi:10.1074/jbc.M110246200 (2002).
- 33 Rosen, B. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* **133**, 689-693 (2002).
- 34 Yang, H., Fu, H., Lin, Y. y Rosen, B. Pathways of arsenic uptake and efflux. *Current topics in membranes* **69**, 325-358, doi:10.1016/B978-0-12-394390-3.00012-4 (2012).
- 35 Dopp, E., Hartmann, L., von Recklinghausen, U., Florea, A., Rabieh, S., Zimmermann, U., ... Rettenmeier, A. Forced uptake of trivalent and pentavalent methylated and

- inorganic arsenic and its cyto-/genotoxicity in fibroblasts and hepatoma cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **87**, 46-56, doi:10.1093/toxsci/kfi218 (2005).
- 36 Thomas, D., Styblo, M. y Lin, S. The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and applied pharmacology* **176**, 127-144, doi:10.1006/taap.2001.9258 (2001).
- 37 Challenger, F. Biological methylation. *Science progress* **35**, 396-416 (1947).
- 38 Aposhian, H., Zakharyan, R., Avram, M., Sampayo-Reyes, A. y Wollenberg, M. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicology and applied pharmacology* **198**, 327-335, doi:10.1016/j.taap.2003.10.027 (2004).
- 39 Nemeti, B. y Gregus, Z. Glutathione-dependent reduction of arsenate in human erythrocytes--a process independent of purine nucleoside phosphorylase. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **82**, 419-428, doi:10.1093/toxsci/kfh301 (2004).
- 40 Aposhian, H. Enzymatic methylation of arsenic species and other new approaches to arsenic toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* **37**, 397-419, doi:10.1146/annurev.pharmtox.37.1.397 (1997).
- 41 Hayakawa, T., Kobayashi, Y., Cui, X. y Hirano, S. A new metabolic pathway of arsenite: arsenic-glutathione complexes are substrates for human arsenic methyltransferase Cyt19. *Archives of toxicology* **79**, 183-191, doi:10.1007/s00204-004-0620-x (2005).
- 42 Kala, S., Kala, G., Prater, C., Sartorelli, A. y Lieberman, M. Formation and urinary excretion of arsenic triglutathione and methylarsenic diglutathione. *Chemical research in toxicology* **17**, 243-249, doi:10.1021/tx0342060 (2004).
- 43 Naranmandura, H., Suzuki, N. y Suzuki, K. Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation. *Chemical research in toxicology* **19**, 1010-1018, doi:10.1021/tx060053f (2006).
- 44 Shraim, A., Cui, X., Li, S., Ng, J., Wang, J., Jin, Y., ... Hirano, S. Arsenic speciation in the urine and hair of individuals exposed to airborne arsenic through coal-burning in Guizhou, PR China. *Toxicology letters* **137**, 35-48 (2003).
- 45 Hirano, S., Cui, X., Li, S., Kanno, S., Kobayashi, Y., ... Shraim, A. Difference in uptake and toxicity of trivalent and pentavalent inorganic arsenic in rat heart microvessel endothelial cells. *Archives of toxicology* **77**, 305-312, doi:10.1007/s00204-003-0447-x (2003).
- 46 Hirano, S., Kobayashi, Y., Cui, X., Kanno, S., Hayakawa, T. y Shraim, A. The accumulation and toxicity of methylated arsenicals in endothelial cells: important roles of thiol compounds. *Toxicology and applied pharmacology* **198**, 458-467, doi:10.1016/j.taap.2003.10.023 (2004).
- 47 Petrick, J., Ayala-Fierro, F., Cullen, W., Carter, D. y Aposhian, H. Monomethylarsonous acid (MMA(III)) is more toxic than arsenite in Chang human hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology* **163**, 203-207, doi:10.1006/taap.1999.8872 (2000).
- 48 Styblo, M., Del Razo, L., Vega, L., Germolec, D., LeCluyse, E., Hamilton, G., ... Thomas, D. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of toxicology* **74**, 289-299 (2000).
- 49 Bing, L., Jingbo, P., y Guifan, S. Monomethylarsinic acid: a more toxic immediate metabolites of inorganic As metabolism. *Chin J Endemiol* **20**, 219-221 (2001).
- 50 Obinaju, B. Mechanisms of arsenic toxicity and carcinogenesis. *African Journal of Biochemistry Research* **3**, 232-237 (2009).

- 51 Hughes, M. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology letters* **133**, 1-16 (2002).
- 52 Tseng, C., Chong, C., Chen, C. y Tai, T. Lipid profile and peripheral vascular disease in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Angiology* **48**, 321-335, doi:10.1177/000331979704800405 (1997).
- 53 Moon, K., Guallar, E. y Navas-Acien, A. Arsenic exposure and cardiovascular disease: an updated systematic review. *Current atherosclerosis reports* **14**, 542-555, doi:10.1007/s11883-012-0280-x (2012).
- 54 Chen, C., Hsueh, Y., Lai, M., Shyu, M., Chen, S., Wu, M., ... Tai, T. Increased prevalence of hypertension and long-term arsenic exposure. *Hypertension* **25**, 53-60 (1995).
- 55 Tseng, C., Tai, T., Chong, C., Tseng, C., Lai, M., Lin, B., ... Chen, C. Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Environmental health perspectives* **108**, 847-851, doi:10.1289/ehp.00108847 (2000).
- 56 Santra, A., Das Gupta, J., De, B., Roy, B. y Guha, D. Hepatic manifestations in chronic arsenic toxicity. *Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology* **18**, 152-155 (1999).
- 57 Mazumder, D., Haque, R., Ghosh, N., De, B., Santra, A., Chakraborti, D. y Smith, A. Arsenic in drinking water and the prevalence of respiratory effects in West Bengal, India. *International journal of epidemiology* **29**, 1047-1052 (2000).
- 58 Chisolm, J. y Thomas, D. Developmental toxicity of metals—Implications for public health. *Reproductive and Developmental Toxicity of Metals*, 541–566 (1983).
- 59 Bailey, K. y Fry, R. Arsenic-Associated Changes to the Epigenome: What Are the Functional Consequences? *Current environmental health reports* **1**, 22-34, doi:10.1007/s40572-013-0002-8 (2014).
- 60 Wasserman, G., Liu, X., Parvez, F., Ahsan, H., Factor-Litvak, P., van Geen, A., ... Graziano, J. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihsar, Bangladesh. *Environmental health perspectives* **112**, 1329-1333, doi:10.1289/ehp.6964 (2004).
- 61 States, J., Barchowsky, A., Cartwright, I., Reichard, J., Futscher, B. y Lantz, R. Arsenic toxicology: translating between experimental models and human pathology. *Environmental health perspectives* **119**, 1356-1363, doi:10.1289/ehp.1103441 (2011).
- 62 Hallauer, J., Geng, X., Yang, H., Shen, J., Tsai, K. y Liu, Z.. The Effect of Chronic Arsenic Exposure in Zebrafish. *Zebrafish* **13**, 405-412, doi:10.1089/zeb.2016.1252 (2016).
- 63 Nayak, A., Lage, C. y Kim, C. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **98**, 118-124, doi:10.1093/toxsci/kfm072 (2007).
- 64 Raldua, D. y Pina, B. In vivo zebrafish assays for analyzing drug toxicity. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **10**, 685-697, doi:10.1517/17425255.2014.896339 (2014).
- 65 Howe, K., Clark, M., Torroja, C., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Stemple, D. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **496**, 498-503, doi:10.1038/nature12111 (2013).
- 66 Santoriello, C. y Zon, L. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2337-2343, doi:10.1172/JCI60434 (2012).
- 67 Woods, I., Wilson, C., Friedlander, B., Chang, P., Reyes, D., Nix, R., Kelly, P., Chu, F. Postlethwait, J. y Talbot, W. The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes. *Genome research* **15**, 1307-1314, doi:10.1101/gr.4134305 (2005).

- 68 Hamdi, M., Sanchez, M., Beene, L., Liu, Q., Landfear, S., Rosen, B. y Liu, Z. Arsenic transport by zebrafish aquaglyceroporins. *BMC molecular biology* **10**, 104, doi:10.1186/1471-2199-10-104 (2009).
- 69 Beene, L., Halluer, J., Yoshinaga, M., Hamdi, M. y Liu, Z. Pentavalent arsenate transport by zebrafish phosphate transporter NaPi-IIb1. *Zebrafish* **8**, 125-131, doi:10.1089/zeb.2011.0701 (2011).
- 70 Hamdi, M., Yoshinaga, M., Packianathan, C., Qin, J., Hallauer, J., McDermott, J., ... Liu, Z. Identification of an S-adenosylmethionine (SAM) dependent arsenic methyltransferase in *Danio rerio*. *Toxicology and applied pharmacology* **262**, 185-193, doi:10.1016/j.taap.2012.04.035 (2012).
- 71 Kimmel, C., Ballard, W., Kimmel, S., Ullmann, B. y Schilling, T. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **203**, 253-310, doi:10.1002/aja.1002030302 (1995).
- 72 JoVE Science Education Database. Biology II: Mouse, Zebrafish, and Chick. Zebrafish Reproduction and Development. <https://www.jove.com/science-education/5151/zebrafish-reproduction-and-development> (2018).
- 73 Westerfield, M. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). *The zebrafish book 5th Edition* (2007).
- 74 Hisaoka, H. y Battle, H. The normal developmental stages of the zebrafish *Brachydanio rerio*. *Morphol* **102**, 311-326 (1958).
- 75 Laale, H. W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research: A literature review. *Fish Biol* **10**, 121-173 (1977).
- 76 OECD. Test guideline 203: Fish, acute toxicity test. *Organisation for Economic Co-operation and Development, guideline for the testing of chemicals* (1992).
- 77 Braunbeck, T. y Lammer, E. . Fish embryo toxicity assays. *Organization for Economic Co-operation and Development*, <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/36817242.pdf> (2006).
- 78 Nagel, R. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*--a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* **19 Suppl 1**, 38-48 (2002).
- 79 Oxendine, S., Cowden, J., Hinton, D. y Padilla, S. Adapting the medaka embryo assay to a high-throughput approach for developmental toxicity testing. *Neurotoxicology* **27**, 840-845, doi:10.1016/j.neuro.2006.02.009 (2006).
- 80 Beker van Woudenberg, A., Wolterbeek, A., Te Brake, L., Snel, C., Menke, A., Rubingh, C., ... Kroese, D. A category approach to predicting the developmental (neuro) toxicity of organotin compounds: the value of the zebrafish (*Danio rerio*) embryotoxicity test (ZET). *Reproductive toxicology* **41**, 35-44, doi:10.1016/j.reprotox.2013.06.067 (2013).
- 81 Law, J. Issues related to the use of fish models in toxicologic pathology: session introduction. *Toxicologic pathology* **31 Suppl**, 49-52, doi:10.1080/01926230390174922 (2003).
- 82 Hill, A., Teraoka, H., Heideman, W. y Peterson, R. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **86**, 6-19, doi:10.1093/toxsci/kfi110 (2005).
- 83 Ramsay, J., Watral, V., Schreck, C. y Kent, M. Pseudoloma neurophilia infections in zebrafish *Danio rerio*: effects of stress on survival, growth, and reproduction. *Diseases of aquatic organisms* **88**, 69-84, doi:10.3354/dao02145 (2009).
- 84 Leonard, A. y Lauwerys, R. Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutation research* **75**, 49-62 (1980).

- 85 Golub, M., Macintosh, M. y Baumrind, N. Developmental and reproductive toxicity of inorganic arsenic: animal studies and human concerns. *Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews* **1**, 199-241, doi:10.1080/10937409809524552 (1998).
- 86 Wang, A., Holladay, S., Wolf, D., Ahmed, S. y Robertson, J. Reproductive and developmental toxicity of arsenic in rodents: a review. *International journal of toxicology* **25**, 319-331, doi:10.1080/10915810600840776 (2006).
- 87 Ahmad, S., Sayed, M., Barua, S., Khan, M., Faruquee, M., Jalil, A., ... Talukder, H. Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. *Environmental health perspectives* **109**, 629-631, doi:10.1289/ehp.01109629 (2001).
- 88 Milton, A., Smith, W., Rahman, B., Hasan, Z., Kulsum, U., Dear, K., ... Ali, A. Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in bangladesh. *Epidemiology* **16**, 82-86 (2005).
- 89 Calderon, J., Navarro, M., Jimenez-Capdeville, M., Santos-Diaz, M., Golden, A., Rodriguez-Leyva, I., ... Diaz-Barriga, F. Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environmental research* **85**, 69-76, doi:10.1006/enrs.2000.4106 (2001).
- 90 Smith, A., Marshall, G., Yuan, Y., Ferreccio, C., Liaw, J., von Ehrenstein, O., ... Selvin, S. Increased mortality from lung cancer and bronchiectasis in young adults after exposure to arsenic in utero and in early childhood. *Environmental health perspectives* **114**, 1293-1296, doi:10.1289/ehp.8832 (2006).
- 91 Hill, D., Wlodarczyk, B. y Finnell, R. Reproductive consequences of oral arsenate exposure during pregnancy in a mouse model. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* **83**, 40-47, doi:10.1002/bdrb.20142 (2008).
- 92 Nemeč, M., Holson, J., Farr, C. y Hood, R. Developmental toxicity assessment of arsenic acid in mice and rabbits. *Reproductive toxicology* **12**, 647-658 (1998).
- 93 Rodriguez, V., Carrizales, L., Mendoza, M., Fajardo, O. & Giordano, M. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicology and teratology* **24**, 743-750 (2002).
- 94 Tabocova, S., Hunter, E. y Gladen, B. Developmental toxicity of inorganic arsenic in whole embryo: culture oxidation state, dose, time, and gestational age dependence. *Toxicology and applied pharmacology* **138**, 298-307 (1996).
- 95 Adeyemi, J., da Cunha Martins-Junior, A. y Barbosa, F. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (Danio rerio) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* **172-173**, 7-12, doi:10.1016/j.cbpc.2015.04.001 (2015).
- 96 Li, D., Lu, C., Wang, J., Hu, W., Cao, Z., Sun, D., ... Ma, X. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (Danio rerio) embryos. *Aquatic toxicology* **91**, 229-237, doi:10.1016/j.aquatox.2008.11.007 (2009).
- 97 Lee, J. y Freeman, J. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity assessment: The application of the zebrafish in defining the effects of arsenic, methylmercury, or lead on early neurodevelopment. *Toxics* **2**, 464-495, doi:10.3390/toxics2030464 (2014).
- 98 Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705, doi:10.1016/j.cell.2007.02.005 (2007).
- 99 Guil, S. y Esteller, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**, 87-95, doi:10.1016/j.biocel.2008.09.005 (2009).

- 100 Hermann, A., Gowher, H. y Jeltsch, A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **61**, 2571-2587, doi:10.1007/s00018-004-4201-1 (2004).
- 101 Esteller, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**, 5427-5440, doi:10.1038/sj.onc.1205600 (2002).
- 102 Bustaffa, E., Stoccoro, A., Bianchi, F. y Migliore, L. Genotoxic and epigenetic mechanisms in arsenic carcinogenicity. *Archives of toxicology* **88**, 1043-1067, doi:10.1007/s00204-014-1233-7 (2014).
- 103 Reichard, J. y Puga, A. Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation. *Epigenomics* **2**, 87-104, doi:10.2217/epi.09.45 (2010).
- 104 Ren, X., McHale, C., Skibola, C., Smith, A., Smith, M. y Zhang, L. An emerging role for epigenetic dysregulation in arsenic toxicity and carcinogenesis. *Environmental health perspectives* **119**, 11-19, doi:10.1289/ehp.1002114 (2011).
- 105 Waalkes, M., Liu, J., Ward, J. y Diwan, B. Mechanisms underlying arsenic carcinogenesis: hypersensitivity of mice exposed to inorganic arsenic during gestation. *Toxicology* **198**, 31-38, doi:10.1016/j.tox.2004.01.017 (2004).
- 106 Xie, Y., Trouba, K., Liu, J., Waalkes, M. y Germolec, D. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environmental health perspectives* **112**, 1255-1263, doi:10.1289/txg.7152 (2004).
- 107 Han, Z., Song, G., Cui, Y., Xia, H. y Ma, X. Oxidative stress is implicated in arsenic-induced neural tube defects in chick embryos. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **29**, 673-680, doi:10.1016/j.ijdevneu.2011.06.006 (2011).
- 108 Majumdar, S., Chanda, S., Ganguli, B., Mazumder, D., Lahiri, S. y Dasgupta, U. Arsenic exposure induces genomic hypermethylation. *Environmental toxicology* **25**, 315-318, doi:10.1002/tox.20497 (2010).
- 109 Pilsner, J., Liu, X., Ahsan, H., Ilievski, V., Slavkovich, V., Levy, D., ... Gamble, M. Genomic methylation of peripheral blood leukocyte DNA: influences of arsenic and folate in Bangladeshi adults. *The American journal of clinical nutrition* **86**, 1179-1186, doi:10.1093/ajcn/86.4.1179 (2007).
- 110 Bagnyukova, T., Luzhna, L., Pogribny, I. y Lushchak, V. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. *Environmental and molecular mutagenesis* **48**, 658-665, doi:10.1002/em.20328 (2007).
- 111 Mhanni, A. y McGowan, R. Global changes in genomic methylation levels during early development of the zebrafish embryo. *Development genes and evolution* **214**, 412-417, doi:10.1007/s00427-004-0418-0 (2004).
- 112 Tudela, S. Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fish Res* **42**, 229-243, doi:10.1016/S0165-7836(99)00052-1 (1999).
- 113 Salini, J., Milton, D., Rahman, M. y Hussain, M. Allozyme and morphological variation throughout the geographic range of the tropical shad, hilsa *Tenualosa ilisha*. *Fish Res* **66**, 53-69, doi:10.1016/S0165-7836(03)00124-3 (2004).
- 114 Turan, C., Oral, M., Öztürk, B. y Düzgüneş, E. Morphometric and meristic variation between stocks of Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) in the Black, Marmara, Aegean and northeastern Mediterranean Seas. *Fish Res* **79**, 139-147, doi:10.1016/j.fishres.2006.01.015 (2006).

- 115 Ruiz-Campos, G., Camarena-Rosales, F., Varela-Romero, A., Sanchez-González, S. y De La Rosa-Velez, J. Morphometric variation of wild trout populations from northwestern Mexico (Pisces: Salmonidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **13**, 91–110, doi:10.1023/A:1026367113735 (2003).
- 116 Mojekwu, T. y Anumudu, C. Advanced Techniques for Morphometric Analysis in Fish. *J Aquac Res Development* **6**, doi:10.4172/2155-9546.1000354 (2015).
- 117 Sfakianakis, D., Leris, I., Laggis, A. y Kentouri, M. The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Environ Biol Fish* **92**, 197–205, doi:10.1007/s10641-011-9833-z (2011).
- 118 Singh, N., Kumar, D. y Sahu, A. Arsenic in the environment : Effects on human health and possible prevention. *Journal of environmental biology* **28** (2007).
- 119 Wang, S., Wang, Z., Cheng, X., Li, J., Sang, Z., Zhang, X., ... Wang, Z. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China. *Environmental health perspectives* **115**, 643-647, doi:10.1289/ehp.9270 (2007).
- 120 Minamoto, K., Mascie-Taylor, C., Moji, K., Karim, E. y Rahman, M. Arsenic-contaminated water and extent of acute childhood malnutrition (wasting) in rural Bangladesh. *Environmental sciences : an international journal of environmental physiology and toxicology* **12**, 283-292 (2005).
- 121 Islam, L., Nabi, A., Rahman, M., Khan, M. y Kazi A. Association of Clinical Complications with Nutritional Status and the Prevalence of Leukopenia among Arsenic Patients in Bangladesh. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **1**, 74-82, doi:10.3390/ijerph2004020074 (2004).
- 122 D'Amico, A., Gibson, A. y Bain, L. Embryonic arsenic exposure reduces the number of muscle fibers in killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquatic toxicology* **146**, 196-204, doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.010 (2014).
- 123 Lima, A., Curtis, C., Hammermeister, D., Markee, T., Northcott, C. y Brooke, L. Acute and chronic toxicities of arsenic(III) to fathead minnows, flagfish, daphnids, and an amphipod. *Archives of environmental contamination and toxicology* **13**, 595-601 (1984).
- 124 Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., ... Martins, R. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e4196, doi:10.3791/4196 (2012).
- 125 Lawrence, C., Best, J., James, A. y Maloney, K. The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*, 368-369, doi:10.1016/j.aquaculture.2012.09.022 (2012).
- 126 Lawrence, C., Best, J., Cockington, J., Henry, E., Hurley, S., James, A., ... Sanders, E. The Complete and Updated "Rotifer Polyculture Method" for Rearing First Feeding Zebrafish. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e53629, doi:10.3791/53629 (2016).
- 127 Lee, M., Jung, B., Chung, S., Bae, O., Lee, J., Park, J., ... Chung, J. Arsenic-induced dysfunction in relaxation of blood vessels. *Environmental health perspectives* **111**, 513-517, doi:10.1289/ehp.5916 (2003).
- 128 Zaldivar, R. A morbid condition involving cardio-vascular, broncho-pulmonary, digestive and neural lesions in children and young adults after dietary arsenic exposure. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale B, Hygiene, Krankenhaushygiene, Betriebshygiene, präventive Medizin* **170**, 44-56 (1980).
- 129 Ross, M. Cell division and the nervous system: regulating the cycle from neural differentiation to death. *Trends in neurosciences* **19**, 62-68 (1996).

- 130 Wullimann, M. y Knipp, S. Proliferation pattern changes in the zebrafish brain from embryonic through early postembryonic stages. *Anatomy and embryology* **202**, 385-400 (2000).
- 131 Hannun, Y. y Luberto, C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends in cell biology* **10**, 73-80 (2000).
- 132 Liu, L., Trimarchi, J., Navarro, P., Blasco, M. y Keefe, D. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability, and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **278**, 31998-32004, doi:10.1074/jbc.M303553200 (2003).
- 133 Chen, Y., Lin-Shiau, S. y Lin, J. Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *Journal of cellular physiology* **177**, 324-333, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199811)177:2<324::AID-JCP14>3.0.CO;2-9 (1998).
- 134 Larochette, N., Decaudin, D., Jacotot, E., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., ... Kroemer, G. Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Experimental cell research* **249**, 413-421, doi:10.1006/excr.1999.4519 (1999).
- 135 Wang, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development* **15**, 2922-2933 (2001).
- 136 Seok, S., Baek, M., Lee, H., Kim, D., Na, Y., Noh, K., ... Park, J. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **21**, 870-877, doi:10.1016/j.tiv.2007.02.011 (2007).
- 137 Wang, S., Zhao, Y., Wu, L., Tang, M., Su, C., Hei, T. y Yu, Z. Induction of germline cell cycle arrest and apoptosis by sodium arsenite in *Caenorhabditis elegans*. *Chemical research in toxicology* **20**, 181-186, doi:10.1021/tx0601962 (2007).
- 138 Reik, W., Dean, W. y Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**, 1089-1093, doi:10.1126/science.1063443 (2001).
- 139 Chen, H., Li, S., Liu, J., Diwan, B., Barrett, J. y Waalkes, M. Chronic inorganic arsenic exposure induces hepatic global and individual gene hypomethylation: implications for arsenic hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* **25**, 1779-1786, doi:10.1093/carcin/bgh161 (2004).
- 140 Uthus, E. y Davis, C. Dietary arsenic affects dimethylhydrazine-induced aberrant crypt formation and hepatic global DNA methylation and DNA methyltransferase activity in rats. *Biological trace element research* **103**, 133-145, doi:10.1385/BTER:103:2:133 (2005).
- 141 Okoji, R., Yu, R., Maronpot, R. y Froines, J. Sodium arsenite administration via drinking water increases genome-wide and Ha-ras DNA hypomethylation in methyl-deficient C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* **23**, 777-785 (2002).
- 142 Wilson, A., Power, B. y Molloy, P. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1775**, 138-162, doi:10.1016/j.bbcan.2006.08.007 (2007).
- 143 Corrales, J., Fang, X., Thornton, C., Mei, W., Barbazuk, W., Duke, M., ... Willett, K. Effects on specific promoter DNA methylation in zebrafish embryos and larvae following benzo[a]pyrene exposure. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* **163**, 37-46, doi:10.1016/j.cbpc.2014.02.005 (2014).
- 144 Fang, X., Corrales, J., Thornton, C., Scheffler, B. y Willett, K. Global and gene specific DNA methylation changes during zebrafish development. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **166**, 99-108, doi:10.1016/j.cbpb.2013.07.007 (2013).

- 145 Pickens, M. Effects of Global DNA Methylation Changes on Neurobehavior in Zebrafish. *University of Wisconsin Milwaukee, Theses and Dissertatio Paper 1073*, <https://dc.uwm.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.com.mx/&httpsredir=1&article=2078&context=etd> (2015).
- 146 Kurdyukov, S. y Bullock, M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* **5**, doi:10.3390/biology5010003 (2016).
- 147 Winterbottom, E., Koestler, D., Fei, D., Wika, E., Capobianco, A., Marsit, C., ...Robbins, D. The aquaglyceroporin AQP9 contributes to the sex-specific effects of in utero arsenic exposure on placental gene expression. *Environmental health : a global access science source* **16**, 59, doi:10.1186/s12940-017-0267-8 (2017).
- 148 Plaut, I. y Gordon, M. Swimming Metabolism of Wild-Type and Cloned Zebrafish *Brachydanio Rerio*. *The Journal of experimental biology* **194**, 209-223 (1994).
- 149 Dubinska-Magiera, M., Daczewska, M., Lewicka, A., Migocka-Patrzałek, M., Niedbalska-Tarnowska, J. y Jagła, K. Zebrafish: A Model for the Study of Toxicants Affecting Muscle Development and Function. *International journal of molecular sciences* **17**, doi:10.3390/ijms17111941 (2016).
- 150 Ambrosio, F., Brown, E., Stolz, D., Ferrari, R., Goodpaster, B., Deasy, B., ... Barchowsky, A. Arsenic induces sustained impairment of skeletal muscle and muscle progenitor cell ultrastructure and bioenergetics. *Free radical biology & medicine* **74**, 64-73, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.012 (2014).
- 151 Gaworecki, K., Chapman, R., Neely, M., D'Amico, A. y Bain, L. Arsenic exposure to killifish during embryogenesis alters muscle development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **125**, 522-531, doi:10.1093/toxsci/kfr302 (2012).
- 152 Szymkowicz, D., Sims, K., Castro, N., Bridges, W. y Bain, L. Embryonic-only arsenic exposure in killifish (*Fundulus heteroclitus*) reduces growth and alters muscle IGF levels one year later. *Aquatic toxicology* **186**, 1-10, doi:10.1016/j.aquatox.2017.02.020 (2017).
- 153 Abdel-Hameid, N. A Protective Effect of Calcium Carbonate Against Arsenic Toxicity of the Nile Catfish, *Clarias gariepinus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **9**, 191-200, doi:10.4194/trjfas.2009.0211 (2009).
- 154 Takatsu, A., Kuroiwa, T. y Uchiumi, A. Arsenic accumulation in organs of the fresh water fish *Tribolodon hakonensis*. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements* **13**, 176-179, doi:10.1016/S0946-672X(99)80008-X (1999).