

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS



**EFFECTO MULTIGENERACIONAL DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL
ARSÉNICO DURANTE EL DESARROLLO SOBRE LA CONDUCTA DEL PEZ
CEBRA (*Danio rerio*)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

VÍCTOR RENÉ DIPP ÁLVAREZ

Director de Tesis:

Ulises Gregorio III Pacheco Bardullas

Ensenada, B.C.

Abril de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, esta tesis no habría sido posible sin su apoyo constante y su forma de impulsarme para concluir con mis objetivos, La comprensión que demostraron desde principio a fin, cuando no había oportunidad de comer juntos en familia o cuando no pude llegar a dormir por tener que pasar la noche entera en el laboratorio trabajando. A mis hermanos por su manera tan peculiar de apoyarme durante el trabajo, ya sea con historias, anécdotas o simplemente distracciones cuando lo necesitaba.

Quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron durante toda mi carrera, familiares y amigos, aquellos que llegaron y se quedaron, así como también aquellos que partieron para continuar su camino, no sin antes dejar huella en mi formación profesional. Profesores, compañeros y administrativos que ayudaron a que este trabajo de tesis fuera posible.

Gracias al Dr. Héctor Ortiz Kerbertt por su colaboración en el desarrollo de los aparatos utilizados para el análisis de la memoria a corto y largo plazo. Agradezco a CONACYT por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis con la beca de código: BECA-254500-26552-2438. Mil gracias al Dr. Ulises Pacheco Bardullas por creer en mí y apoyarme de inicio a fin de este proyecto, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y de disfrutar del fruto de la labor realizada por la colaboración de los integrantes; por su gran paciencia y palabras de ánimo cuando mi motivación menguaba. A todos, gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.....	5
1.2 DISTRIBUCIÓN DEL ARSÉNICO.....	5
1.3 TOXICOCINÉTICA Y METABOLISMO GENERAL DEL ARSÉNICO.....	6
1.4 EFECTOS TÓXICOS DE LA EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO.....	8
1.5 EFECTOS NEUROTÓXICOS DE LA EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO.....	9
1.6 EL ROL EPIGENÉTICO DEL ARSÉNICO Y SU IMPORTANCIA MULTIGENERACIONAL..	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
4. METODOLOGÍA	
4.1 MODELO DE ESTUDIO.....	14
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	14
4.3 PRUEBAS MOTORAS.....	19
4.2.1 Actividad espontánea de la cola en embriones de 19-26 hpf.....	19
4.2.2 Actividad motora larval a los 7 dpf.....	21
4.4 CONDUCTA SOCIAL.....	24
4.3.1 Evaluación de la conducta de seguimiento a los 60 dpf.....	24
4.3.2 Evaluación de la conducta de afiliación a los 61 dpf.....	25
4.5 PRUEBA DEL TANQUE NOVEDOSO PARA CONDUCTAS ASOCIADAS A LA ANSIEDAD.....	26
4.6 EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE Y MEMORIA.....	28
4.5.1 Evitación inhibitoria pasiva para evaluar el aprendizaje asociativo.....	28
4.5.2 Habitación sensorimotora a un estímulo para evaluar el aprendizaje no asociativo.....	30
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
5. RESULTADOS	35
5.1 EFECTO MULTIGENERACIONAL POR EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO SOBRE LA FUNCIÓN MOTORA DURANTE EL DESARROLLO DE LOS PECES.....	35
5.1.1 Movimiento espontáneo de la cola en embriones.....	35
5.1.2 Evaluación de la actividad motora en larvas.....	37
5.1.3 Actividad motora en juveniles y adultos durante la prueba del tanque novedoso.....	37
5.2 EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD SOCIAL DEL PEZ CEBRA EN ETAPA JUVENIL.....	40
5.3 CONDUCTAS ASOCIADAS A LA ANSIEDAD, PRUEBA DEL TANQUE NOVEDOSO.....	42
5.4 EFECTOS SOBRE EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA EN PECES CEBRA ADULTOS.....	44
5.4.1 Evaluación del aprendizaje no asociativo a través de la habituación a un estímulo externo.....	44
5.4.2 Evaluación del aprendizaje asociativo con el uso de la prueba de evitación inhibitoria..	46
6. DISCUSIÓN	49
7. PERSPECTIVA	58
8. LITERATURA CITADA	59

APENDICE 4

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

Ensenada, B.C. a 5 de junio de 2019.

P. BIOL. Víctor René Dipp Álvarez
Presente.-

Por este medio comunicamos a usted que después de haber leído detenidamente el trabajo que presenta como Tesis Profesional bajo el Título:

Efecto multigeneracional de la exposición crónica al arsénico durante el desarrollo sobre la conducta del pez cebra (Danio rerio)

Consideramos que reúne los requisitos para aprobar la parte escrita de su Examen Profesional.

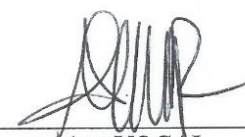
ATENTAMENTE



PRESIDENTE



SECRETARIO



1er. VOCAL

1. INTRODUCCIÓN

El arsénico (As) es un elemento tóxico, ubicuo en la naturaleza con múltiples efectos nocivos a la salud de poblaciones humanas. En su forma inorgánica, se trata de un problema mundial grave cuando contamina alimentos y agua potable (Kapaj et al., 2006), ya que está ligado a patologías como cáncer (Tchounwou et al., 2003), diabetes (Abernathy et al., 1999), problemas cardiovasculares (Yoshida et al., 2004), neuropatologías periféricas y centrales (Abernathy et al., 1999), así como conductuales en animales (Rodríguez et al., 2001) y humanos (Saha et al., 1999).

1.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

El arsénico (As) es un sólido perteneciente a los semimetales, sin embargo, puro es su forma más infrecuente, ya que se encuentra comúnmente en compuestos orgánicos o en aleaciones que le confieren mayor solubilidad (Kumari et al., 2017).

Los estados oxidativos más comunes del arsénico inorgánico son el pentavalente (As^{V}) y el trivalente (As^{III}). En el agua, el As^{V} (también conocido como arsenato) es dominante en condiciones oxidantes, mientras que en ambientes reductores el arsenato es transformado por una reacción de óxido reducción a As^{III} (arsenito); en este medio es la forma dominante (Kumari et al., 2017). El As^{III} es considerado más tóxico que el pentavalente (Bhattacharya,

2002), dado que provoca efectos biológicos únicos, como mayor citotoxicidad, genotoxicidad y potente inhibidor enzimático (Thomas et al., 2001).

1.2 DISTRIBUCIÓN DEL ARSÉNICO

A nivel global, los sitios notables de contaminación por As en aguas continentales son Argentina, Bangladesh, Chile, China, Hungría, India (Bengala Occidental), México, Rumania, Taiwán, Vietnam y el suroeste de Estados Unidos (Bhattacharya, 2002; Ng et al., 2003; Smedley & Kinniburgh, 2002). En México, las fuentes de agua potable y de irrigación muestran altos niveles de contaminación de As de forma natural (Herrera et al., 2015; MANCILLA-VILLA et al., 2012; Prieto-García et al., 2005), y actividades como la minería pueden exacerbar la contaminación de los suelos (Bundschuh et al., 2012; Tolins et al., 2014).

La Organización Mundial de la Salud recomienda 10 µg/L (10 ppb) como concentración máxima en el nivel de arsénico en el agua, sin embargo, la Norma Oficial Mexicana marca 25 ppb desde el año 2005. En muchas regiones del país, en las zonas rurales del norte y la Comarca Lagunera (Smedley & Kinniburgh, 2002), principalmente, las concentraciones documentadas son más elevadas que el límite permitido, poniendo en riesgo de exposición a cientos de miles de niños y adultos a concentraciones de hasta 500 ppb (Limón-Pacheco et al., 2018).

La exposición de la población mexicana al As, sus efectos neurotóxicos e importancia epidemiológica (Tolins et al., 2014) son de interés para este trabajo,

pues se ha documentado un efecto en las habilidades de aprendizaje ante el peligro, memoria a largo plazo (de Castro et al., 2009) y déficit intelectual verbal (Calderón et al., 2001; Rocha-Amador et al., 2007; von Ehrenstein et al., 2007).

1.3 TOXICOCINÉTICA Y METABOLISMO GENERAL DEL ARSÉNICO

El As^{III} y As^{V} ingresan por el sistema digestivo en agua contaminada, absorbidos por el intestino delgado principalmente, y excretados en la orina. Es en el hígado donde estos compuestos son metabolizados por la enzima arsenicometiltransferasa (AS3MT). El ácido dimetilarsénico (DMA) liberado por el hígado forma un complejo tiol dimetilarsénico trivalente con las cisteínas de la hemoglobina, además, se conoce que el arsénico inorgánico trivalente forma conjugados con el glutatión. El arsénico inorgánico lleva a la disminución de la actividad de enzimas relacionadas al glutatión en procesos antioxidantes, ya que el arsénico interactúa con el grupo tiol del glutatión formando complejos $\text{As}(\text{SG})_3$ (Scott et al., 1993).

El arsénico se biometila en el hígado para formar ácido MMA y DMA, los cuales son considerados producto del metabolismo del arsénico inorgánico (Kumari et al., 2017). Además, se sabe que S-adenosilmetionina (SAM) es la molécula donadora de los grupos metilo para que la metilación del arsénico inorgánico sea posible (Vahter, 2002), Ratnaik (2003) considera que de esta forma es como disminuye la toxicidad del arsénico para ser eliminado del cuerpo fácilmente, hasta 60% de la dosis ingerida por la orina (Buchet et al., 1981). Sin

embargo, el grupo de investigación de Aposhian (1999) considera que no se trata de una disminución de la toxicidad del arsénico, sino bioactivación, dado que el MMA es la forma más tóxica de arsénico en el ambiente intracelular. Se conocen dos formas de metilación del arsénico inorgánico: la vía oxidativa y la vía reductora (**figura 1**).

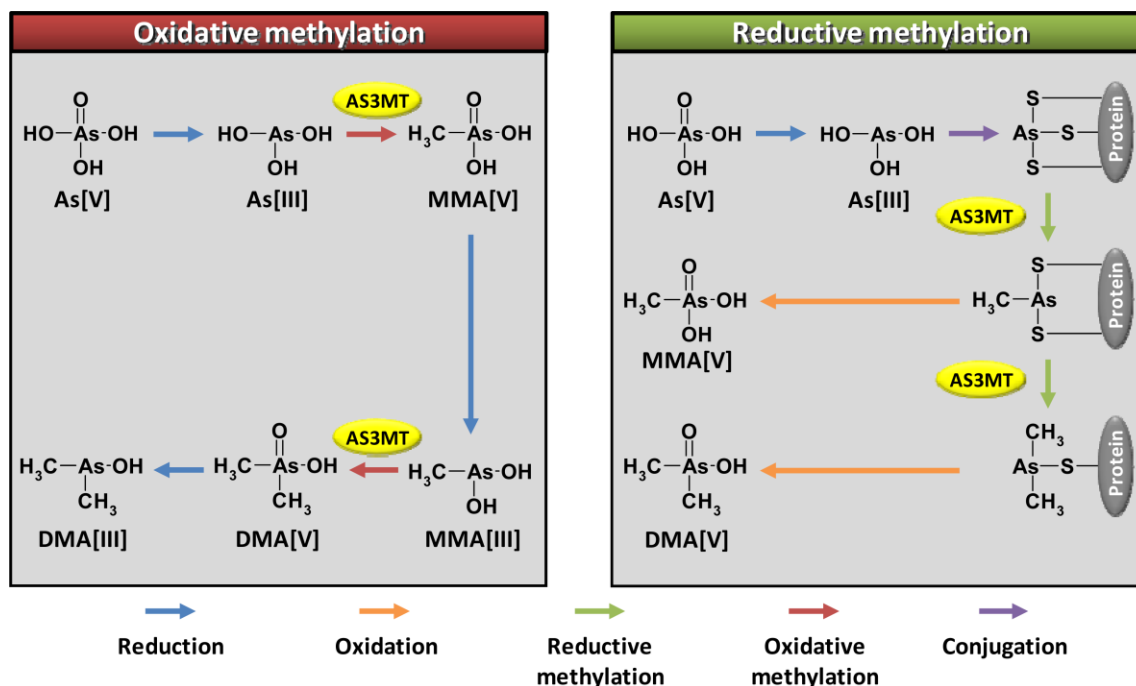


Figura 1. Metilación oxidativa del arsénico inorgánico pentavalente: se reduce a arsénico trivalente, sobre la cual actúa la enzima dependiente de S-adenosilmetionina (SAM) metiltransferasa (AS3MT), la cual metila para generar MMA (V), se reduce a MMA (III) y la AS3MT vuelve a actuar para metilar nuevamente, formando así DMA (V); en una reacción posterior se reduce a DMA (III). Metilación reductiva del arsénico inorgánico pentavalente: el arsénico inorgánico pentavalente se reduce a trivalente, el cual es capaz de conjugarse con el glutatión, en las cuales se requieren compuestos tioles como cisteína, mercaptoetanol y ditiotreitól; sobre estas conjugaciones actúa la AS3MT para metilar y generar MMA (V) al oxidarse. Una metilación posterior del compuesto previo a la oxidación producirá DMA (V) (Agusa, Fujihara, Takeshita, & Iwata, 2011).

1.4 EFECTOS TÓXICOS DE LA EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO

La toxicidad del arsénico es generada por el estrés oxidativo como especies reactivas de oxígeno que culmina en muerte celular (Watanabe & Hirano, 2013). La evidencia de los efectos que provoca la exposición crónica al arsénico en humanos es numerosa: lesiones dérmicas como melanosis, leucomelanosis, queratosis, enfermedad de Bowen y cáncer de piel son efecto de una exposición crónica al arsénico inorgánico a través de la ingesta de agua contaminada con arsénico (Rahman et al., 2009). Este arsénico inorgánico ingerido es absorbido generando daño a las células epiteliales (Saha et al., 1999). Un estudio publicado en el año 2000 en el *International Journal of Epidemiology*, elaborado en Bengala Occidental, India, con una población expuesta a concentraciones altas del contaminante de mayor a 500 microgramos por litro, demostró que aquellos individuos con queratosis y lesiones de piel provocadas por la ingesta de arsénico en el agua que consumen tienen mayor probabilidad de sufrir de tos crónica, falta de aire y un aumento de sonidos respiratorios crepitantes y sibilantes (Mazumder et al., 2000).

Además, la exposición al arsénico puede ser un factor de riesgo que permite el desarrollo de diabetes mellitus en humanos expuestos de forma crónica a su forma inorgánica (Lai et al., 1994). Se ha asociado la exposición crónica de individuos al arsénico con el desarrollo de diversos tipos de carcinomas, entre los que se incluyen, cáncer de piel, pulmón, hígado, vejiga,

riñón y colon (Kumari et al., 2017); aún no es claro el mecanismo con el cual actúa el arsénico en carcinogénesis (Tchounwou et al., 2003).

1.5 EFECTOS NEUROTÓXICOS DE LA EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO

Seguido de la ingesta y absorción por el intestino, el arsénico ingresa al sistema nervioso a través de un grupo de proteínas denominadas aquaporinas (AQPs), canales transmembranales en las células de la mayoría de los seres vivos (Liu et al., 2002). En peces cebra se conocen cinco AQPs capaces de transportar el As al interior de la célula, y estas AQPs son homólogos cercanos a las de humano (Hamdi et al., 2009).

Casos clínicos reportan efectos sobre el sistema nervioso central y periférico. Encefalopatía hepática, y delirio son consecuencias de una exposición aguda y crónica al As a nivel del sistema nervioso central, además de discapacidad cognitiva como dificultad en el aprendizaje, memoria a corto plazo y largo plazo, y falta de concentración, con una recuperación parcial después de la interrupción a la exposición (Lagerkvist & Zetterlund, 1994). Además, se conoce que es capaz de provocar depresión y ansiedad como evidencia de un efecto sobre el sistema nervioso a nivel psicológico (Tyler & Allan, 2014). Un estudio realizado en niños de Bengala Occidental, reporta la correlación de la presencia de As en orina y un déficit en múltiples tareas cognitivas, como efecto de una exposición crónica (von Ehrenstein et al., 2007).

La neuropatía periférica es reportada en conjunto a concentraciones elevadas de arsénico en la orina de pacientes, los síntomas incluyen entumecimiento, dolor y debilidad en manos y pies, además de una velocidad de conducción nerviosa más lenta (Hall, 2002; Heaven et al., 1994; Lagerkvist & Zetterlund, 1994; D. Mazumder et al., 1992; Vahidnia et al., 2007), posiblemente por una degeneración axonal y por cambios en la composición del citoesqueleto (Le Quesne & McLeod, 1977); múltiples estudios *in vitro* e *in vivo* reportan que el As interfiere de forma post-traducciona l en las proteínas que conforman a los neurofilamentos, e hiperfosforilación de proteínas involucradas en los microtúbulos, indicando un posible efecto neurodegenerativo, tratable pero irreversible (Bolla-Wilson & Bleecker, 1987; Hall, 2002; Lagerkvist & Zetterlund, 1994; Wax et al., 2000).

1.6 EL ROL EPIGENÉTICO DEL ARSÉNICO Y SU IMPORTANCIA MULTIGENERACIONAL

La epigenética es la regulación de la expresión del DNA sin modificaciones a sus bases nitrogenadas de forma directa como efecto de un estrés externo o ambiental y su mantenimiento (Berger et al., 2009), en otras palabras, son los cambios persistentes en el DNA, heredables, y que afectan la expresión de proteínas. Se considera epigenética cuando el generador de la regulación se da de forma externa a la célula, es capaz de afectar la cromatina indirectamente por

medio de un iniciador, y la regulación se mantiene gracias a una molécula que sostiene el cambio.

La metilación del DNA es un proceso epigenético donde un grupo metilo se adhiere a las citosinas, inhibiendo la transcripción. Existe evidencia *in vitro* e *in vivo* de que la exposición al As provoca hipometilación global (Coppin et al., 2008; Watanabe & Hirano, 2013; Zhou et al., 2008) principalmente, del DNA, pero también se ha reportado evidencia de hipermetilación en promotores de genes (Mass & Wang, 1997). El papel del As como efector de un cambio epigenético es el de carcinogénico (Barrett et al., 1989; Simeonova & Luster, 2000); como se mencionó anteriormente, SAM es la molécula donadora de grupos metilo para la metabolización del As, se cree que este secuestro de grupos metilo es promotor de la hipometilación del DNA, afectando la regulación de la expresión y así desencadenando los efectos carcinogénicos de la exposición al As y posiblemente los neurotóxicos (Watanabe & Hirano, 2013).

Se cree que los cambios epigenéticos son heredables (Holliday & Ho, 2002), por lo tanto será posible observar los efectos que causa a nivel neurotóxico en la primera generación (F0), en la siguiente generación (F1); un efecto multigeneracional de la exposición crónica al As. No se han realizado trabajos que analicen el efecto conductual en humanos por la logística que esto implicaría, por lo que estudios multigeneracionales y transgeneracionales son necesarios en otros modelos animales como el pez cebra, y así evaluar el riesgo en la conducta

de las poblaciones humanas expuestas, de forma barata y en un tiempo generacional reducido.

Dado que no existen trabajos anteriores que estudien al As como efector epigenético de forma multigeneracional en la conducta, la propuesta innovadora de este proyecto es evaluar el efecto multigeneracional del As en el sistema nervioso de forma conductual, evaluando la función motora, conducta social y el aprendizaje y memoria en 4 etapas del desarrollo en dos generaciones del pez cebra.

Además, aunque se han documentado los riesgos ecológicos asociados a las concentraciones bajas de As y su amplia distribución en ecosistemas acuáticos, no han sido estudiados a fondo sus efectos en el comportamiento de especies acuáticas.

2. HIPÓTESIS

La exposición crónica al arsénico a dosis relevantes al ambiente en el pez cebra producirá alteraciones sobre la actividad motora, conducta social, conductas asociadas a la ansiedad y el aprendizaje y memoria, las cuales se transmitirán a la siguiente generación.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto multigeneracional sobre la conducta del pez cebra por exposición crónica al arsénico en dosis relevantes al ambiente.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Establecer un sistema de exposición de flujo continuo con el objetivo de exponer los organismos por un periodo prolongado y con un mínimo de manipulación para reducir las condiciones de estrés por el manejo.
2. Estandarizar las condiciones de reproducción y alimentación en peces cebra adultos para obtener la F0 y la F1.
3. Estandarizar las pruebas conductuales de pez cebra para evaluar la actividad motora, conducta social, conductas asociadas a la ansiedad y el aprendizaje y memoria.
4. Evaluar la actividad motora del pez cebra durante su desarrollo desde las 19 horas post fertilización (hpf) hasta 140 dpf, en la generación F0 y F1.
5. Evaluar la conducta social del pez cebra juvenil con la conducta de seguimiento y la afiliación en la generación F0 y F1.
6. Evaluar las conductas asociadas a la ansiedad en pez cebra, por medio de la prueba del tanque novedoso en la generación F0 y F1.
7. Evaluar el aprendizaje y memoria del pez cebra con el uso de pruebas conductuales de aprendizaje asociativo y no asociativo; con la prueba de

evitación inhibitoria y la prueba de habituación sensorimotora a un estímulo, respectivamente en la generación F0 y F1.

4. METODOLOGÍA

4.1 MODELO DE ESTUDIO

Se seleccionó al pez cebra (Zebrafish; *Danio rerio*) como modelo de estudio debido a su tamaño, lo que permite más individuos en un espacio reducido (comparado a ratones y ratas), otorgando mayor poder estadístico a las pruebas conductuales. Es un modelo excelente para estudios multi y transgeneracionales de neurotoxicología por exposición a compuestos por el hecho de que se utilizan menos generaciones, en contraste con mamíferos que es necesario exponer in utero a los embriones, por lo que la F1 de ratón por ejemplo, sería la F0 en pez cebra, una generación menos debido a que el pez cebra se desarrolla dentro de un corión (Baker, King-Heiden, Peterson, & Heideman, 2014). Ha sido un creciente modelo para estudio del efecto neurotóxico de sustancias gracias a que se conoce su genoma casi en su totalidad (Teraoka, Dong, & Hiraga, 2003).

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

El efecto multigeneracional de la exposición crónica al arsénico fue evaluado en dos generaciones de pez cebra denominadas F0 (generación expuesta directamente al arsénico) y generación F1 (expuesta al arsénico sólo como gameto), cada generación se desarrolló durante 150 dpf. Se llevó a cabo

una batería de pruebas con el objetivo de evaluar funciones motoras y cognitivas. Se dividió a los peces en tres grupos distintos, grupo control, 50 partes por billón (ppb) y 500 ppb, con cuatro replicas (**figura 2**).

La primera generación (F0) se obtuvo colocando 90 peces cebrá adultos hembra y macho en una relación 3:2 dentro de peceras de dos litros con un fondo de canicas (éstas permiten la extracción de los huevos fertilizados), 10 peces por pecera; la reproducción se llevó a cabo al inicio del siguiente ciclo de luz. Los embriones obtenidos (F0) fueron sometidos a un paradigma de intoxicación a partir de las 4 hpf, divididos en los dos grupos de exposición al As, dosis baja 50 ppb, y dosis alta 500 ppb, y un control sin arsénico en medio E2 0.5X (los tres grupos fueron preparados con medio E2 (tres soluciones de sales en agua destilada. **E2A**: 1.5M NaCl, 50 mM KCl, 100 mM MgSO₄, 15 mM KH₂PO₄ y 5 mM Na₂HPO₄. **E2B**: 500 mM CaCl₂. **E2C**: 350 mM NaHCO₃. **Solución de trabajo**: 7.5 mM NaCl, 0.25 mM KCl, 0.5 mM MgSO₄, 75 µM KH₂PO₄ y 25 µM Na₂HPO₄, 0.5 mM CaCl₂, 0.35 mM NaHCO₃), solución fisiológica que permite el desarrollo óptimo de los embriones. Posteriormente se almacenaron en 12 cajas Petri, 75 embriones por caja, mantenidos a 28.5° C en una incubadora en el laboratorio A4 de la Facultad de Ciencias con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad.

A los 5 dpf, al inicio de su fase larval, se comenzó a alimentar con rotíferos a los organismos. Los rotíferos fueron mantenidos en cultivo abierto, aireación continua, y filtrados cada dos días, con un cambio del 30% del agua y 15% de

sal marina Instant Ocean®. Las larvas fueron transferidas al bioterio de la Facultad de Ciencias, dentro un sistema de flujo continuo de agua, 4 peceras por tratamiento con 50 larvas cada una, conectadas a bombas dosificadoras de agua a pH 7 28.5° C para agua filtrada por ósmosis inversa como agua control, en el caso de los grupos bajo exposición al arsénico se preparó cada concentración con el agua control. Cada día se prepararon 7 litros de agua nueva para los tres grupos y el agua residual de las peceras fue dispuesta en el almacén de la Facultad de Ciencias bajo las normas de control de desechos tóxicos dictaminadas por la institución.

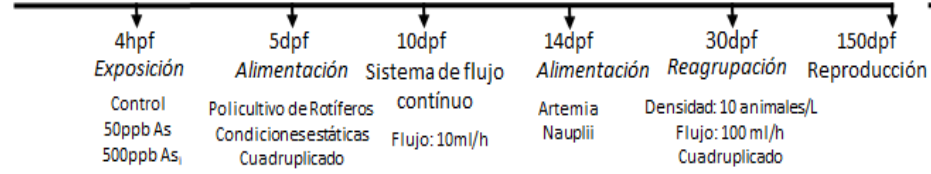
A los 10 dpf comenzó la alimentación con artemia, mantenida en cultivos de un litro con agua salina preparada con sal marina Instant Ocean®, bajo las instrucciones indicadas en el producto. Los cultivos se mantuvieron por veinticuatro horas con aireación y luz continua antes de ser filtrados y resuspendidos en agua control para alimentar a los peces cebras de los tres grupos. En los casos en que no hubo cultivo de artemia disponible se alimentó a los peces con comida para pez en hojuelas comercial, de la marca Wardley® y TetraFin®.

Después de 140 días de exposición, se reprodujeron los organismos de la primera generación (F0) para obtener la segunda generación (F1) y se mantuvieron con las mismas condiciones y especificaciones que la generación anterior, sin embargo, en peceras nuevas de vidrio y sin contenido de arsénico.

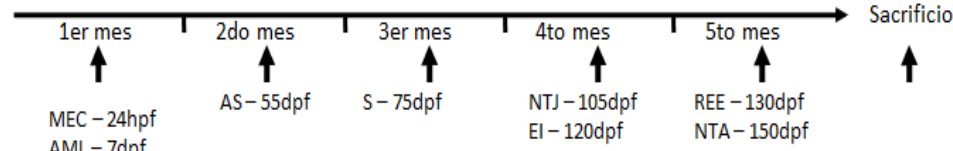
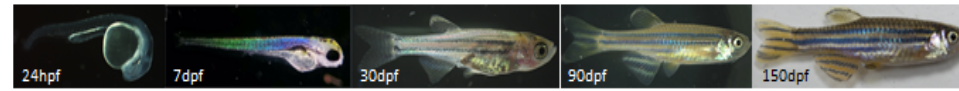
Los peces de la segunda generación se dividieron de acuerdo al tratamiento de sus progenitores, de modo que fue posible saber en todo momento a qué tratamiento fueron expuestos desde la generación anterior. La F1 se reprodujo para obtener la F2 y posteriormente sacrificada a los 150 dpf; los organismos fueron congelados para el posterior uso en experimentos moleculares del proyecto, los cuales están fuera del alcance de este trabajo de tesis.

F0

Especificaciones de crianza 26.5 ±1.5 °C 14h/10h ciclo luz/oscuridad pH 7.0



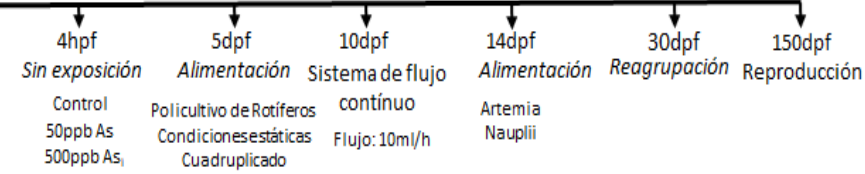
Desarrollo y Experimentos



Abreviaciones:

MEC: Movimiento espontáneo de la cola	AS: Afiliación social	NTJ: Novel tank juvenil
AML: Actividad motora larval	S: Seguimiento	NTA: Novel tank adultos
	EI: Evitación inhibitoria pasiva	REE: Respuesta a un estímulo externo

F1



Desarrollo y Experimentos

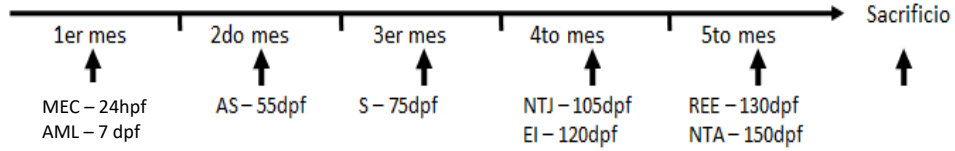
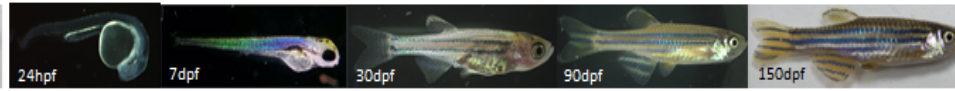


Figura 2. Diseño experimental y especificaciones de crianza. La F0 se obtuvo a partir de la reproducción de 90 peces cebra adultos. A los 150 dpf se reprodujeron para obtener la F1. Se compara con estadio de desarrollo en cada punto del tiempo asociado a las abreviaciones de las pruebas que se realizaron.

C

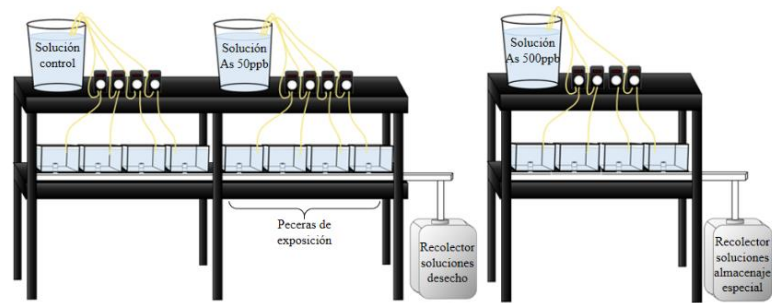


Figura 3. A) Peceras para la reproducción de los peces adultos para obtener la F0, para la F1 se acomodaron de la misma forma. La relación hembra macho en cada pecera fue de 3:1 **B)** Embriones de los dos tratamientos fueron colocados dentro de la incubadora, sometidos a un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 horas oscuridad. **C)** A partir de los 7 dpf se trasladaron los peces a un cuarto dentro del bioterio en el que se acomodaron 50 individuos por pecera de 4 litros en el sistema de flujo continuo.

4.3 PRUEBAS MOTORAS

4.3.1 *Actividad espontánea de la cola en embriones de 19-26 hpf*

La primera evidencia del desarrollo neuronal en embriones de pez cebra es observable como una actividad espontánea de la cola, la cual es visible a partir de las 17 hpf, con un pico de actividad a las 19 hpf y posterior descenso después de las 26 hpf (Saint - Amant & Drapeau, 1998).

En una caja de Petri cubierta con 20 ml agar bacteriológico al 1.4%, se perforaron 15 agujeros de 5 mm, la caja se replicó 2 veces para cada tratamiento. Dentro de cada agujero se colocaron 5 embriones de un mismo tratamiento con medio E2 a 28° y en el caso de los tratamientos E2 con solución de 50ppb o 500ppb, para 50 embriones por caja (n=150). Dentro de una habitación a una temperatura entre 26.5°C y 28.5°C con un estereoscopio Carl Zeiss STEMI 2000-C acoplados a una cámara POINT GREY y en el software FlyCapture 2 se grabó una serie de videos, cada uno de 1 minuto por cada dos agujeros para un total de 5 videos por caja, estas grabaciones permitieron registrar el movimiento de cada embrión (**figura 4**). El registro se realizó a las 24 hpf. Para los embriones de la F1 se realizó el mismo procedimiento, excepto que el registro se inició a las 19 hpf y se repitió con los mismos embriones a las 20, 21, 22, 24 y 26 hpf. Se cuantificó el número de movimientos espontáneos realizados por individuo en un minuto de grabación.

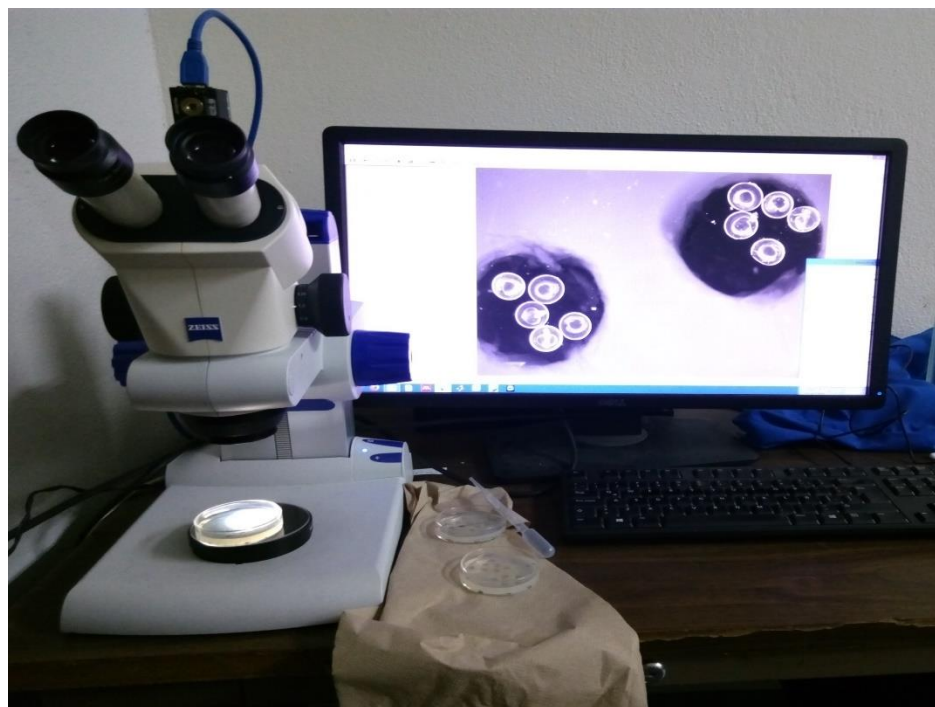
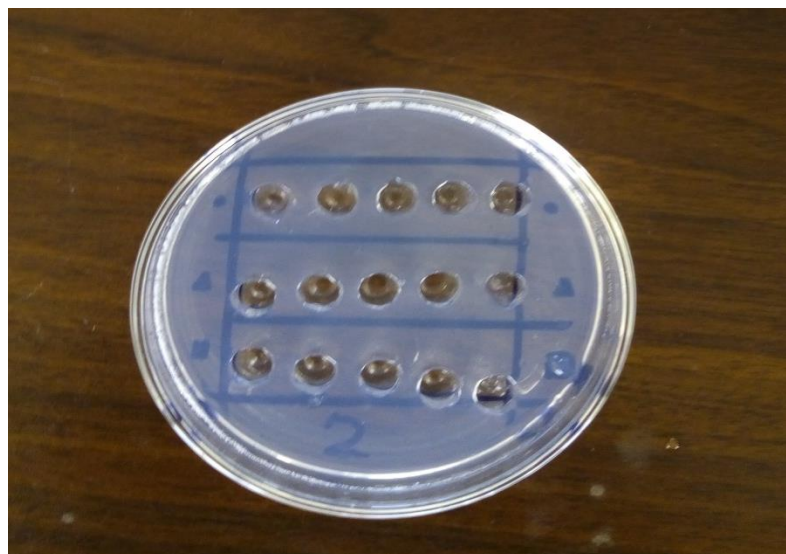
A**B**

Figura 4. A) Se muestra el equipo utilizado para la grabación de la actividad espontánea de la cola en embriones, se observa el estereoscopio Carl Zeiss STEMI 2000-C, una cámara POINT GREY y el software FlyCapture 2. B) Caja de Petri dentro de las cuales se colocaron los embriones para ser grabados al mismo tiempo.

4.3.2 Actividad motora larval a los 7 dpf

Las larvas de pez cebra responden al cambio de iluminación, disminuyendo su actividad motora durante la iluminación y aumentando durante los periodos de oscuridad en una conducta denominada escototaxis (tropismo positivo hacia la oscuridad) (Harold A. Burgess & Michael Granato, 2007). Con el objetivo de analizar si la exposición al arsénico durante el desarrollo altera la actividad motora durante los periodos de luz-oscuridad se estandarizó un experimento de actividad motor larval (Irons et al., 2010). Se cortaron tres cajas de veinticuatro pozos para obtener tres cajas de dieciocho pozos (tres filas de seis pozos por triplicado), a cada fila se le asignó un tratamiento y el control para evitar contaminación cruzada. Cada pozo se llenó con 1 ml de agar bacteriológico al 1.4% con el fin de evitar el reflejo de las larvas en las paredes de cada pozo, para esto se perforaron agujeros de 1 cm de diámetro en cada pozo con agar bacteriológico. En una habitación a temperatura entre 26.5° C y 28.5°C, con un sistema de grabación de una cámara POINT GREY y una placa que emite luz infrarroja, se grabaron videos con ciclos conformados por 5 períodos de 10 minutos, alternando luz y oscuridad para medir su respuesta (**figura 5 y 6**). El primer período del experimento se realiza una línea base en oscuridad para medir el movimiento durante su mayor actividad, seguido de la alternancia de condiciones de iluminación. Se repitió el procedimiento 5 veces con diferentes embriones para obtener resultados por quintuplicado. Los videos fueron capturados con el software FlyCapture 2 y posteriormente analizados por el

software LOLITRACK de Loligo® Systems, se cuantificó la distancia recorrida en centímetros en cada período de tiempo. Se repitió el experimento para la F1 bajo las mismas condiciones y en la misma etapa de desarrollo. Al finalizar las larvas fueron descartadas para futuros experimentos.

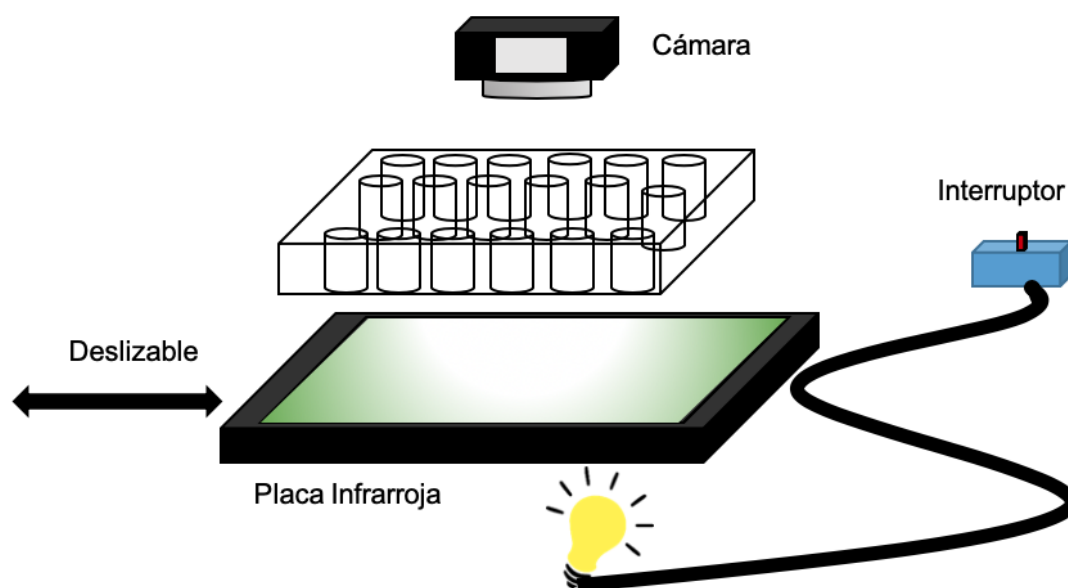


Figura 5. Sistema de grabación montado para la prueba de actividad motora larval a los 7dpf. El sistema consiste en una cámara POINT GREY sobre dos placas, la placa de 18 pozos sobre la placa de luz infrarroja, montadas sobre una lámpara, la lámpara se prende y se apaga de forma externa sin necesidad de manipulación de la placa transparente de pozos, y la placa infrarroja es deslizable para la grabación del ciclo de luz.

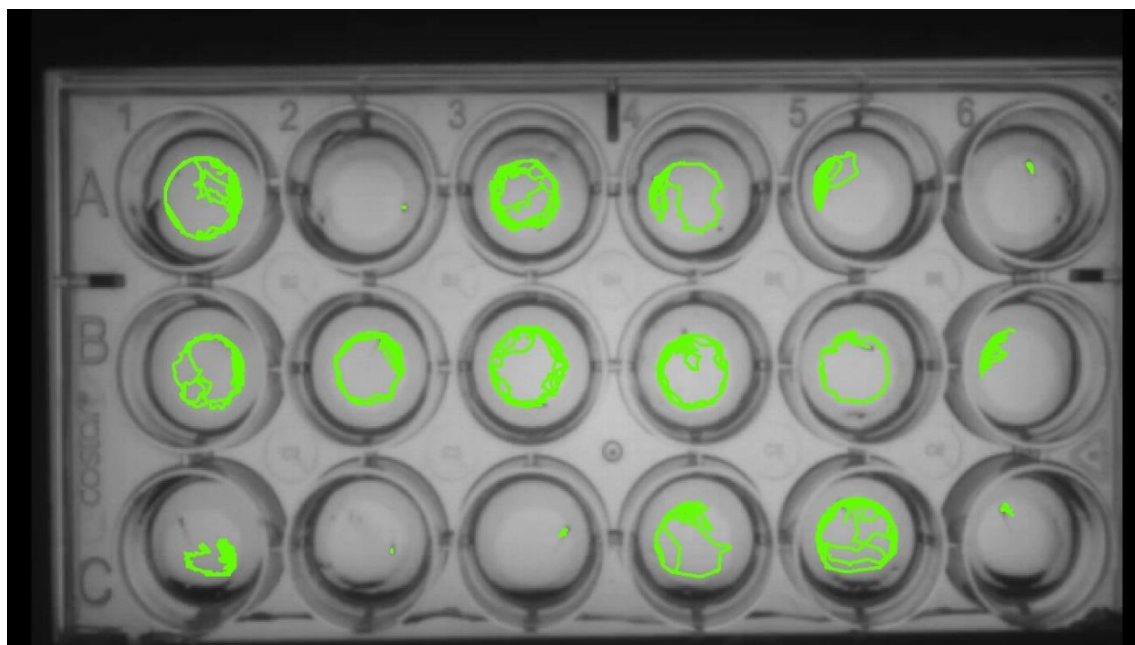
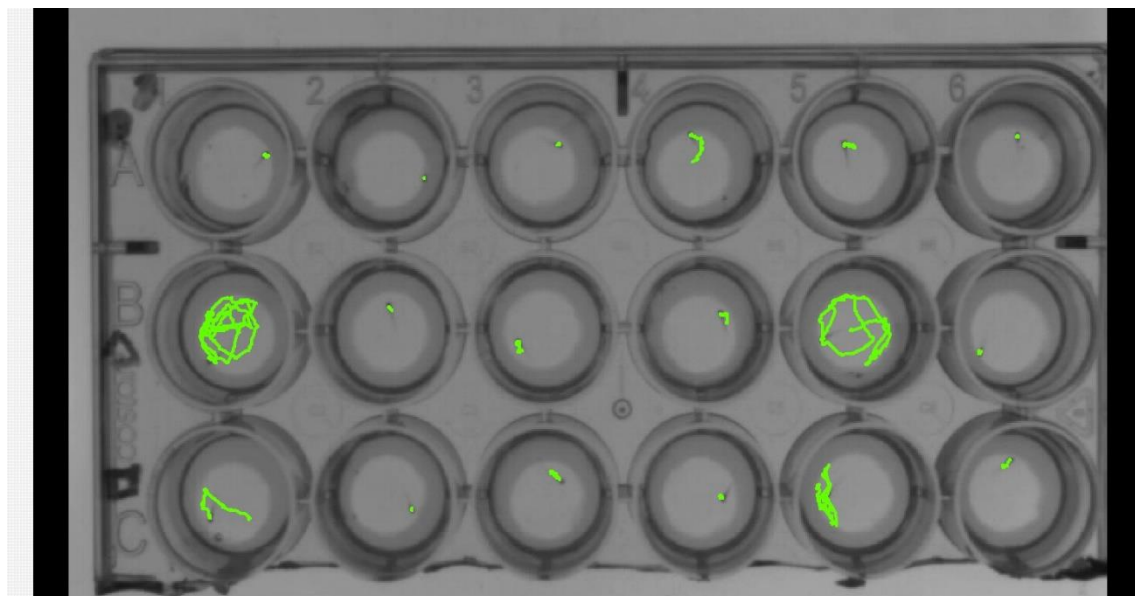


Figura 6. Rastreo de individuos a través del software LOLITRACK de Loligo® Systems en luz (superior) y oscuridad (inferior).

4.4 CONDUCTA SOCIAL

4.4.1 Evaluación de la conducta de seguimiento a los 60 dpf

Los peces cebras son animales sociales, por lo que la interacción entre dos individuos durante un periodo de tiempo definido permite analizar efectos de la exposición crónica al As sobre la conducta social. Se planteó que esta interacción se verá afectada de forma positiva o negativa. Después de un periodo de habituación de 1 minuto, se evaluó el tiempo que permanecen juntos dos peces del mismo tratamiento por un periodo de 5 minutos en una pecera de 14 cm de largo, 7 cm de ancho y 7 cm de alto, con agua control limpia a pH 7.0 y a 28.5°C en una habitación iluminada y temperatura entre los 26.5°C y 28.5°. Se utilizó una cámara POINT GREY con el software de grabación FlyCapture 2, para un posterior análisis de videos con el software LOLITRACK de Loligo® Systems y así obtener un promedio de distancia entre los dos peces durante el tiempo de grabación. Se compararon los resultados de los peces expuestos de forma crónica al As contra control. Además, se midió la actividad motora durante la misma prueba cuantificando la distancia recorrida en centímetros; Se comparó la distancia recorrida por peces en exposición al As contra un control en las generaciones F0 y F1.

4.4.2 Evaluación de la conducta de afiliación a 61 dpf

Los peces cebras poseen la tendencia de formar bancos y seguir a sus congéneres dentro de una pecera, actividad que les provee de protección. En esta prueba fueron expuestos a un tanque estímulo de un lado y otro vacío del opuesto, los tres tanques de 28 cm de largo, 15 cm de ancho y 15 cm de alto. El tanque estímulo consistió en un grupo de 15 peces cebras de la misma etapa de desarrollo que los peces medidos en el tanque de prueba. El tanque de prueba se dividió en 3 zonas las cuales se designaron como “A” la más cercana a la pecera estímulo, “B” la zona intermedia y “C” la más alejada de la pecera estímulo. Las 3 peceras fueron llenadas con 2 litros de agua control limpia a pH 7.0 y a 28.5°C en una habitación iluminada, temperatura entre 26.5°C y 28.5°. Se utilizó una cámara POINT GREY con el software de grabación FlyCapture 2, para un posterior análisis de videos con el software LOLITRACK de Loligo® Systems. Después de media hora de habituación a la habitación, se ingresó a cada pez de cada tratamiento individualmente a la zona intermedia y se registró su tiempo en cada zona del tanque y entre zonas por un periodo de 5 minutos. Este protocolo sólo se aplicó a la F0, los motivos se explicarán en la discusión.

4.5 PRUEBA DEL TANQUE NOVEDOSO PARA EVALUAR CONDUCTA ASOCIADAS A LA ANSIEDAD

Esta prueba evalúa la conducta inducida en los peces ante un ambiente nuevo, los cuales responden nadando hacia el fondo de la pecera (Levin, Bencan, & Cerutti, 2007). Para evidenciar si la exposición crónica tiene efectos en la ansiedad de los peces cebra adultos se utilizó peceras trapezoidales con las medidas propuestas por Egan y colaboradores (2009) y dividida por la mitad (27.9 cm base mayor, 22.5 cm base menor, 15.2 cm altura y 7.1 cm ancho). Se capturaron videos para observar la habituación en un ambiente novedoso, midiendo el tiempo en segundos hasta el primer cruce a la zona superior y el tiempo en segundos que permanecieron los peces en cada una de las dos zonas.

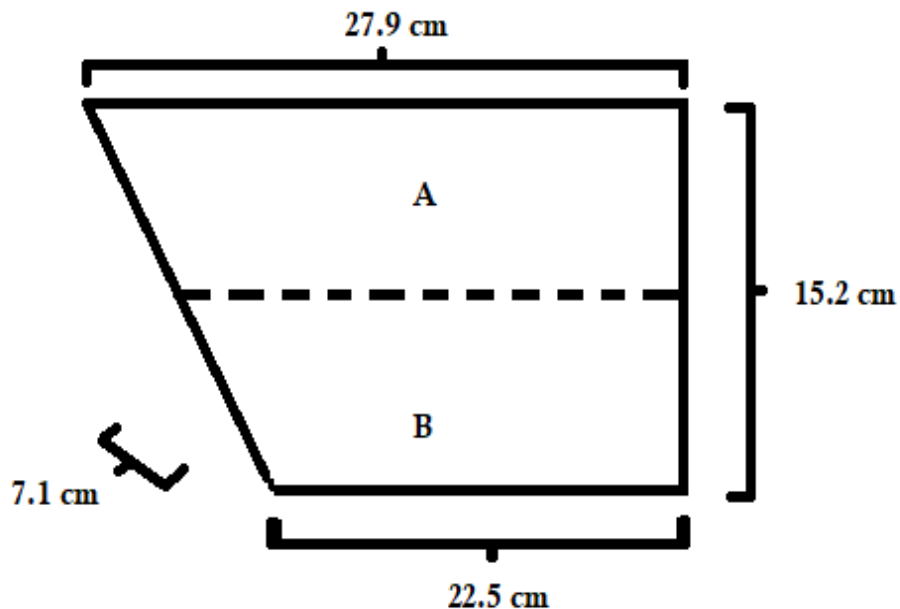


Figura 7. Medidas del tanque novedoso.

Se utilizaron 2 litros de agua control limpia pH 7.0 y a 28°C, sin exposición al As. Un total de 8 peces de cada tratamiento por cada día de grabación se transfirieron en agua control limpia pH 7.0 y se colocaron en peceras separadas por tratamiento, se repitió el procedimiento por tres días para peces diferentes para un total de 72 peces (n=72). Se utilizó una webcam Logitech y software asociado, en una habitación a 28°C con un set de grabación e iluminación montado a 60 cm del tanque; se grabaron 5 minutos de cada pez individualmente desde el momento en que se ingresa al pez en la pecera de prueba. La prueba se realizó a los 30 dpf y a los 90 dpf en la F0, para la F1 sólo se analizó la etapa juvenil debido a un florecimiento bacteriano en las peceras a los 70 dpf.

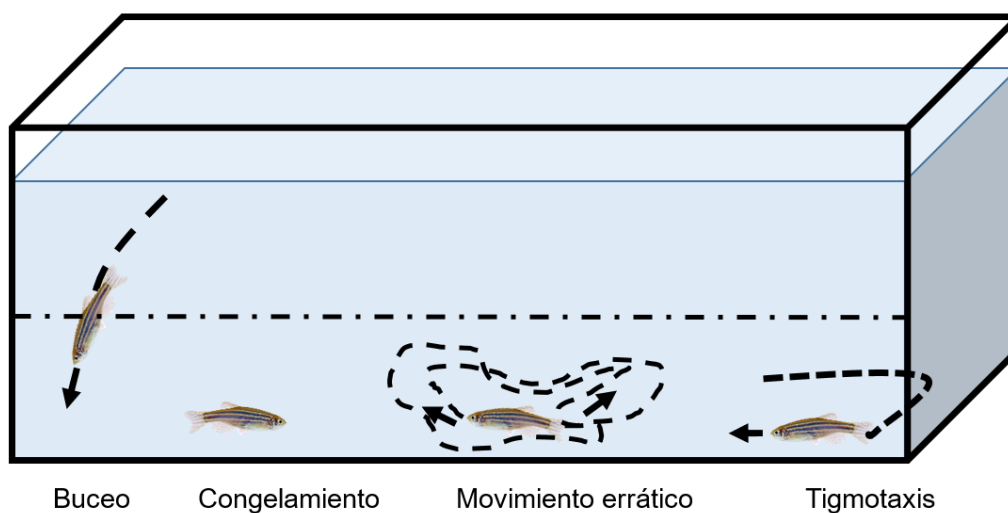


Figura 8. Comportamiento típico de un pez en el tanque nuevo. (Stewart et al. 2014).

4.6 EVALUACIÓN DEL APRENDIZAJE Y MEMORIA

4.6.1 Evitación inhibitoria pasiva para evaluar el aprendizaje asociativo

Para conocer los efectos del As en la consolidación de la memoria a largo plazo se aplicó la prueba diseñada por Blank y colaboradores (2009). Este protocolo requiere dos días consecutivos, el primer día de entrenamiento y el segundo de evaluación. Se construyó una pecera (18 cm largo, 9 cm ancho, 7 cm altura) dividida por la mitad por una compuerta, una mitad de la pecera forrada con papel contact blanco y la otra papel contact negro; en el lado negro (oscuridad), pegadas a las paredes se colocaron placas paralelas de metal conectadas a una fuente de poder que emite corriente con una diferencia de potencial de 3V, contenido en la zona entre las dos placas, con el apoyo del Dr. Héctor Ortiz Kerbertt de la Facultad de Ciencias (**figura 9**). En el primer día de prueba se llevó a cabo la sesión de entrenamiento, se separaron los peces en peceras con agua control limpia a pH 7.0 y a 28°C, 20 por tratamiento (n=60), dos horas antes de iniciar. Se llenó la pecera con agua control limpia a pH 7.0 y a 28°C hasta 3 cm de profundidad y se colocó cada pez individualmente en la zona blanca por un minuto (con el choque eléctrico apagado en la zona negra) para su habituación al nuevo ambiente. Al terminar ese tiempo, se levantó la compuerta que divide ambas zonas y se registró el tiempo que el pez tardó en cruzar; si el pez no ingresó en la zona oscura dentro de un período de 3 minutos, se eliminó de esta prueba, para posteriormente ser regresado a su tanque de

alojamiento, en su respectivo tratamiento, reemplazándolo por otro. Una vez que el pez entró a la zona negra, se cerró la compuerta inmediatamente, se administró el choque eléctrico por 5 segundos y se retiró el pez a una pecera nueva con agua control limpia a pH 7.0 y a 28°C para cada tratamiento. En el segundo día se sometieron al mismo procedimiento pero esta vez sin choque eléctrico, registrando el tiempo que tardaron en cruzar a la zona negra. Se espera que no exista diferencia en el tiempo que tardan en cruzar aquellos peces que se encuentran expuestos al arsénico, lo que indicaría problemas de aprendizaje como efecto de la exposición crónica, mientras que en controles se espera ver un retardo en el tiempo que tardan en cruzar a la zona negra.

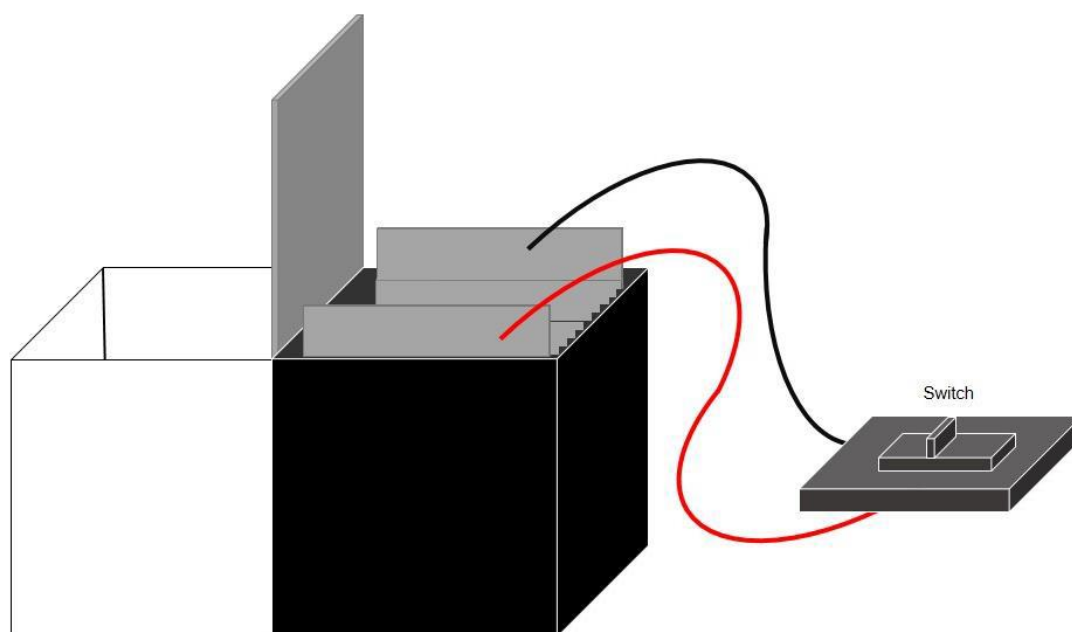


Figura 9. Pecera de prueba basada en el diseño de Blank (2009); en ella se midió el tiempo de cruce del lado blanco al lado negro en dos días de prueba, así como es descrito en la metodología. Se muestran los cables que administran la corriente entre dos placas de metal en la zona negra.

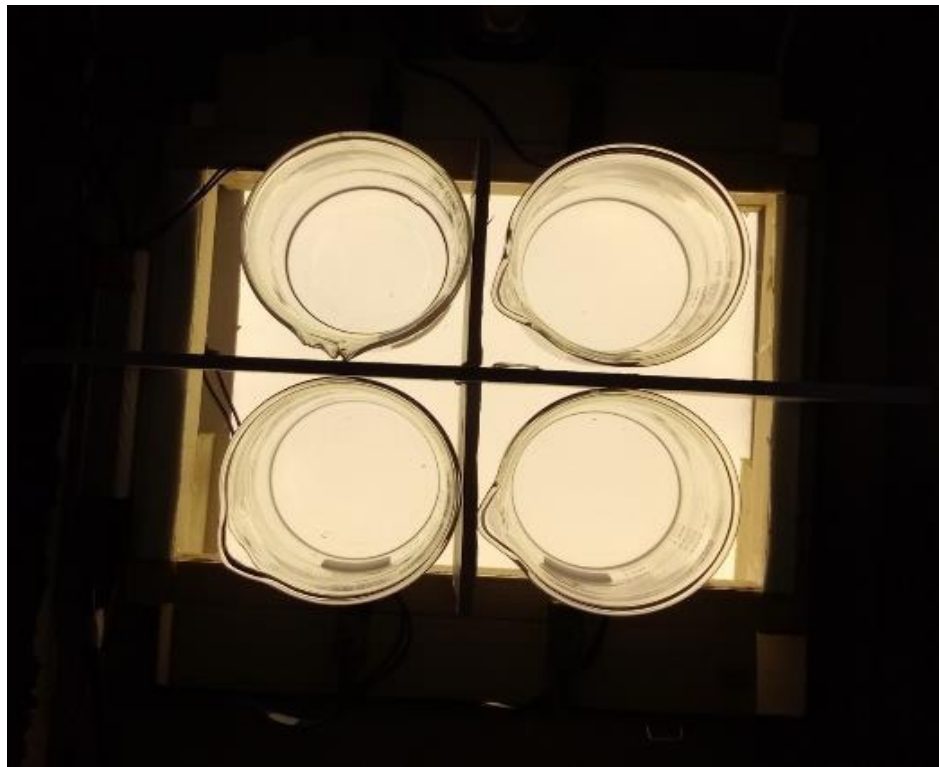
4.6.2 Habitación sensorimotora a un estímulo para evaluar el aprendizaje no asociativo

Se diseñó un set de grabación basado en el estudio de Crosby y colaboradores (2015), desarrollado por el grupo de Eddins (2010), que consiste en una base de madera sobre la que se pegan 4 solenoides programados a través de modulación por ancho de pulsos con una placa Arduino NANO para liberar un golpe cuya secuencia, intervalos y fuerza fueron programados en LabVIEW, desarrollados por el Dr. Héctor Ortiz Kerbertt como colaboración (ver anexo). Los solenoides reciben 12 V, 1 A, y tienen una longitud de 10 mm con una fuerza máxima de 600 g. En 4 vasos de precipitado de vidrio de 300 mL posicionados sobre la base, alineados a los solenoides, se colocó un pez de cada tratamiento y se les permitió 5 minutos de habitación al nuevo ambiente (**figura 10**). Para iniciar la prueba, se programó un golpe cada minuto por 10 minutos, posteriormente otro golpe al pasar 8 minutos y un último golpe 32 minutos después del anterior. Se tomó video 5 segundos antes de cada golpe hasta 5 segundos después del mismo, para cada golpe, con una cámara POINT GREY y el software FlyCapture 2 en un cuarto a temperatura en un rango entre 26.5°C y 28°C. El experimento se realizó durante tres días consecutivos con 16 animales por grupo. Se espera observar que no exista una habitación a los golpes en los peces con exposición crónica al arsénico, mientras que en peces control sí exista dicha habitación.

A



B



C

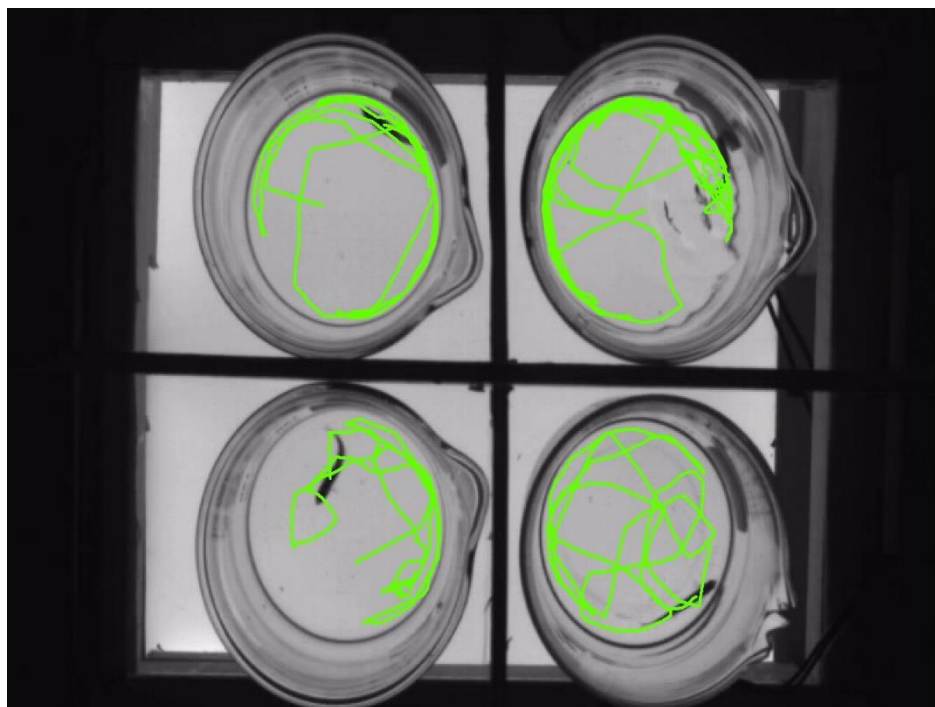


Figura 10. A) Aparato de grabación de la prueba de habituación a un estímulo y **B)** arreglo para la grabación. **C)** Rastreo del movimiento de los peces 5 segundos después del golpe de los solenoides en los vasos.

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos fueron analizados con StatView versión 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) y SigmaPlot 12 (Systat Software, San Jose, CA, USA). La actividad motora larval fue procesada con ANOVA de dos vías seguida de una prueba *post hoc* de Dunnett para comparar los tratamientos con el grupo control. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para verificar diferencias entre los tratamientos en las pruebas de movimiento espontáneo de la cola, actividad motora y social juvenil (seguimiento y afiliación), conductas asociadas a la ansiedad en juveniles y adultos, evitación inhibitoria y la habituación sensorimotora a un estímulo, seguida de una Mann-Whitney para los datos que no superaron la prueba de normalidad, para verificar cuál tratamiento es diferente comparado con el control. Se estableció como estadísticamente significativo el $p < 0.05$. La decisión de utilizar pruebas no paramétricas está fundamentada con la recomendación de la literatura, dado que se ha reportado que los datos de estudios conductuales demuestran buenos resultados al ser analizados de estos modelos estadísticos (Siegel & Castellan, 1988; Garamszegi, 2015).

Tabla II. Resumen de las pruebas estadísticas aplicadas para cada marcador evaluado, con referencia asociada.

<i>Marcador</i>	<i>Prueba aplicada</i>	<i>Post-hoc</i>	<i>Referencia</i>
Actividad motora			
Movimiento espontáneo de la cola	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney	Saint-Amant & Drapeau, 1998. Modificado
Actividad motora larval	ANOVA dos vías	Dunnett	Irons et al. 2010. Modificado
Actividad motora juvenil	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney	-
Actividad motora adultos	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney	-
Conducta Social			
Afiliación en juveniles	ANOVA	Dunnett	-
Seguimiento en adultos	ANOVA	Dunnett	-
Aprendizaje y memoria			
Aprendizaje no asociativo	ANOVA	Dunnett	Eddins et al., 2010; Crosby et al., 2015
Aprendizaje asociativo	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney	Blank et al., 2009
Conductas asociadas a la ansiedad			
Tanque Novedoso	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney	Egan et al., 2009

5. RESULTADOS

5.1 EFECTO MULTIGENERACIONAL POR EXPOSICIÓN AL ARSÉNICO SOBRE LA FUNCIÓN MOTORA DURANTE EL DESARROLLO DE LOS PECES CEBRA

En este estudio se evaluó el efecto multigeneracional sobre la conducta del pez cebra por exposición crónica al arsénico en dosis relevantes al medio ambiente. Los resultados muestran que el arsénico induce diversas alteraciones conductuales sobre la generación F0, sin embargo, la F1 no presenta dichas alteraciones.

5.1.1 Movimiento espontáneo de la cola en embriones

La generación F0, exhibió un incremento de su actividad transcurridas las 24 hpf [$H(2)=19.089$ $p<0.001$], comparados con el control [500 ppb, $q=6.518$ $p<0.05$, 50 ppb $q=3.057$ $p<0.05$] (**figura 11-A**).

La segunda generación (F1) muestra una diferencia de inicio del movimiento espontáneo a las 19 hpf [$H(2)=14.091$ $p<0.001$], donde los de 500 ppb comenzaron con mayor actividad a las 19 hpf, que el grupo control [$q=3.183$ $p<0.05$]; Las diferencias a comparación del control desaparecen en las horas siguientes, hasta el final de las mediciones, a las 26 hpf [$H(2)=58.331$ $p<0.001$], los de 50 ppb aún exhibían mayor movimiento espontáneo comparado con el control [$q=6.639$ $p<0.05$] (**figura 11-B**).

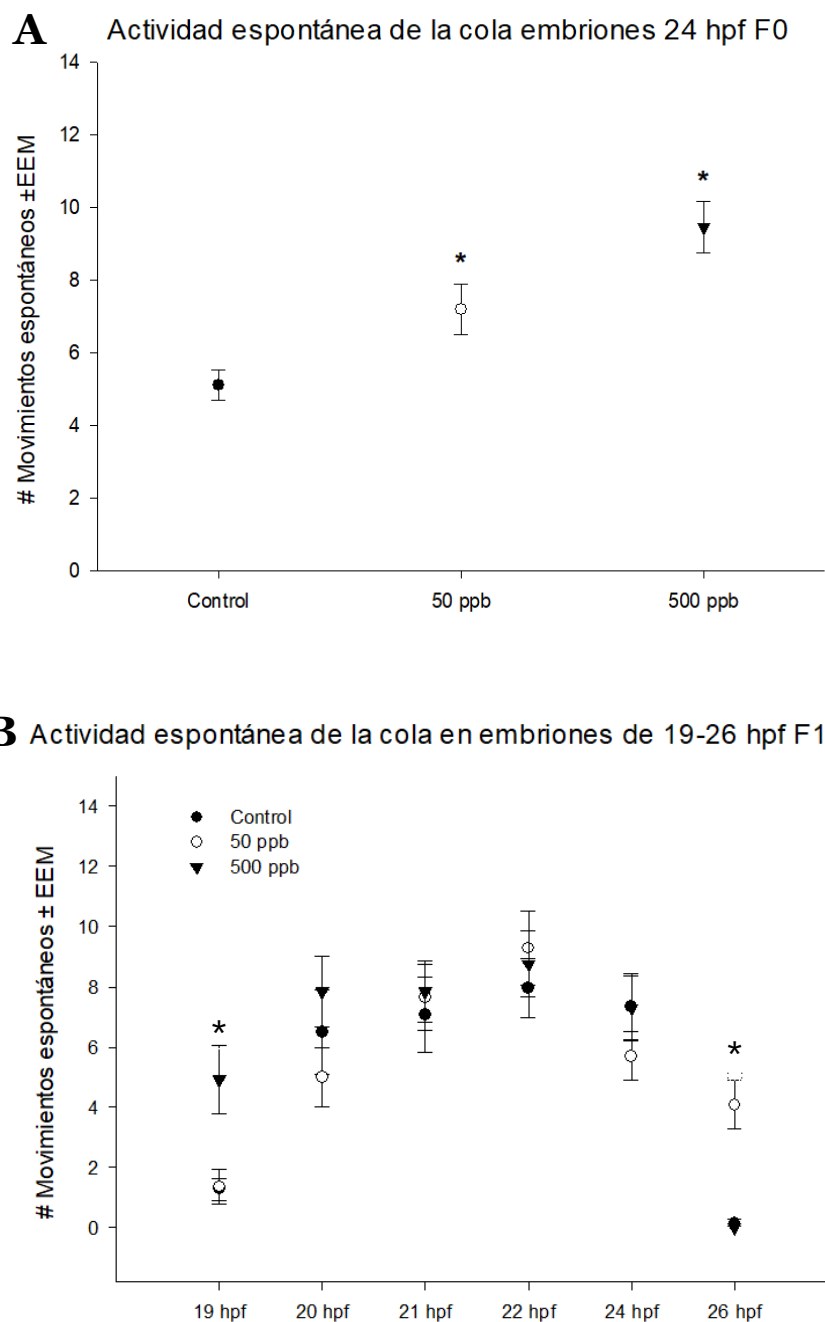


Figura 11. Efecto sobre la actividad espontánea de la cola, **A)** número de movimientos espontáneos de la cola durante la exposición al arsénico a las 24 hpf en la generación F0. **B)** Número de movimientos espontáneos de la cola sin exposición directa al arsénico (exposición como gameto), 19-26 hpf. Los datos se presentan como media $\pm$ SEM, $n=48-50$ por tratamiento. *Indica diferencia significativa al compararse con el grupo control ($p<0.001$). EEM, error estándar de la media.

5.1.2 Evaluación de la actividad motora en larvas

La actividad larval a los 7 días post fertilización de la F0 demostró un resultado significativo en la distancia recorrida durante el período de oscuridad [$F(2,72)=5.69$ $p<0.005$]. El grupo expuesto a 500 ppb demostró una hiperactividad comparado con el grupo control ($p<0.0001$) en la oscuridad [$F(2,72)=4.19$ $p<0.01$], sin embargo, esta diferencia no es visible bajo luz [$F(2,72)=1.59$ $p>0.05$] (**figura 12-A**). La F1 no presentó diferencia significativa en esta prueba [$F(2, 87)=0.3905$ $p>0.05$] (**figura 12-B**).

5.1.3 Actividad motora en juveniles y adultos durante la prueba del tanque novedoso

Durante la etapa juvenil y después adulta, la hiperactividad no se logró identificar en los juveniles durante el experimento del tanque novedoso [$F(2,63)=1.17$ $p>0.05$], sin embargo, se identificó la misma hiperactividad en el grupo de 500 ppb durante el experimento del tanque novedoso en adultos [$F(2,51)=3.87$ $p<0.05$] (**figura 13-A**). La F1 muestra una significativa disminuida actividad en los peces pertenecientes al grupo de 50 ppb [$F(2,59)=3.231$ $p<0.05$] (**figura 13-B**).

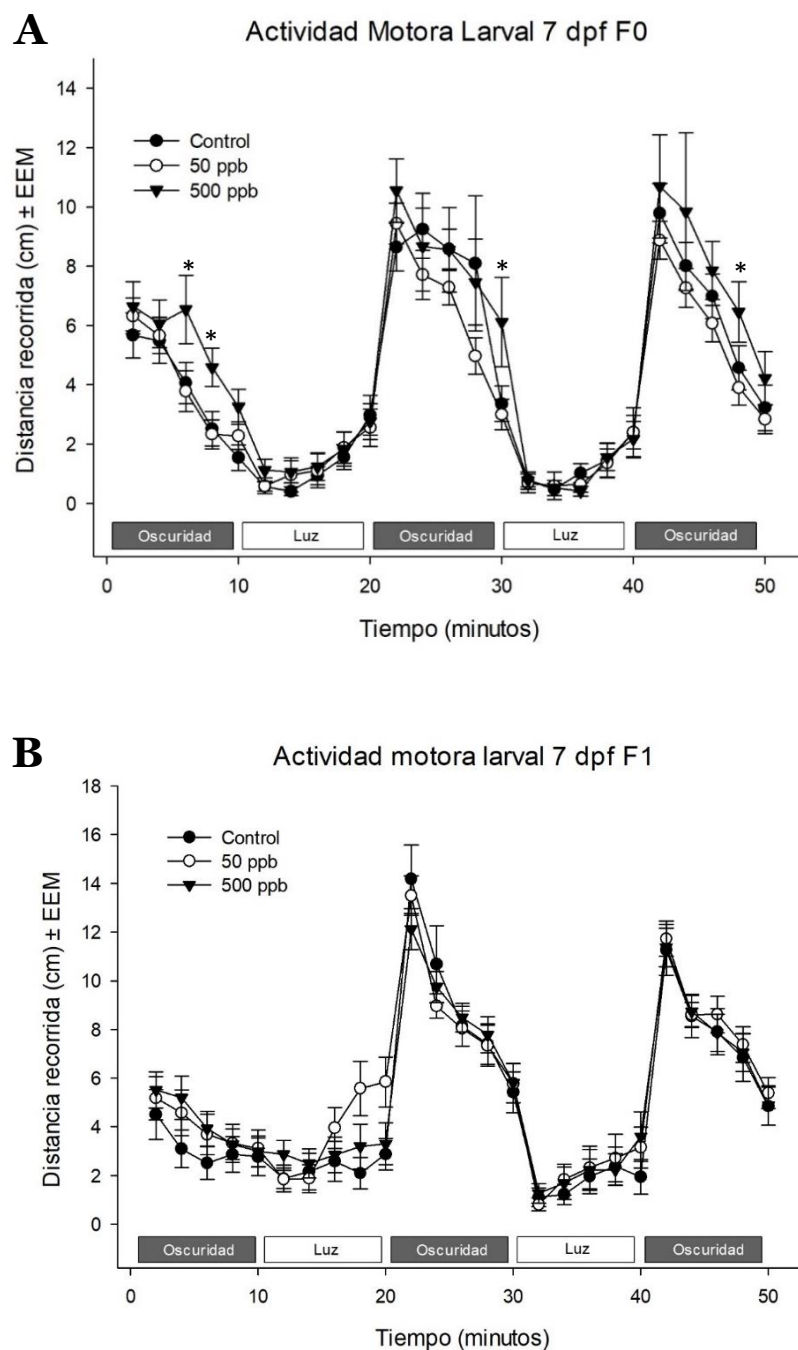


Figura 12. Efecto sobre la actividad motora larval a los 7 dpf. **A)** F0, exposición crónica al arsénico, la actividad larval fue cuantificada como la suma de la distancia recorrida en bloques de dos minutos por cada tratamiento (0, 50 y 500 ppb), con una alternancia en las condiciones de iluminación. **B)** F1, descendientes sin exposición al arsénico. Las barras representan EEM $n=25$ individuos por grupo. *Indica diferencia significativa al ser comparadas con el grupo control ($p<0.05$). EEM, error estándar de la media.

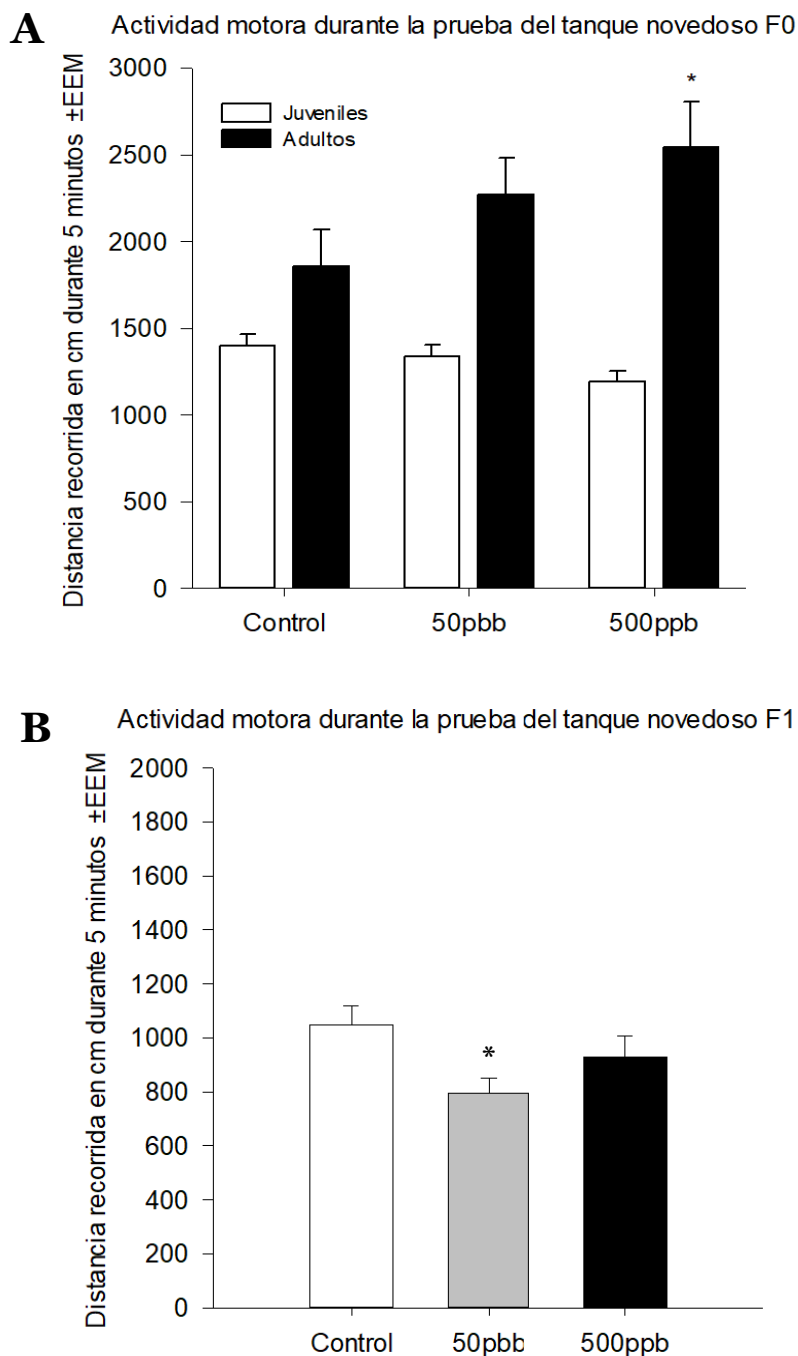


Figura 13. Efecto sobre la actividad motora de juveniles y adultos durante la prueba del tanque novedoso **A)** F0, existe mayor actividad en los peces del grupo de 500 ppb de concentración al compararse con su etapa juvenil. **B)** F1, descendientes sin exposición al arsénico, los individuos del grupo de 50 ppb demuestran una actividad significativamente menor al compararse con el control. Las barras representan EEM n=20. *Indica diferencia significativa al ser comparadas con el grupo control ($p < 0.05$). EEM, error estándar de la media.

5.2 EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD SOCIAL DEL PEZ CEBRA EN ETAPA JUVENIL

La conducta social del pez cebra no se ve afectada por la exposición al arsénico [$F(2,90)=0.00264$ $p>0.05$]; sin embargo, aquellos peces que fueron expuestos a las concentraciones altas tienden a permanecer más cerca entre ellos, dado por el promedio de distancia entre ambos peces durante el experimento [$F(2,14)=9.888$ $p<0.005$] (**figura 14-A**).

Los peces del grupo de 500 ppb de la segunda generación no muestran resultados significativos que evidencien la preferencia a permanecer más unidos que aquellos del grupo control [$F(2,23)=1.274$ $p>0.05$], sin embargo, se observa una ligera tendencia de que efectivamente podrían estar más influenciados a permanecer juntos (**figura 14-B**).

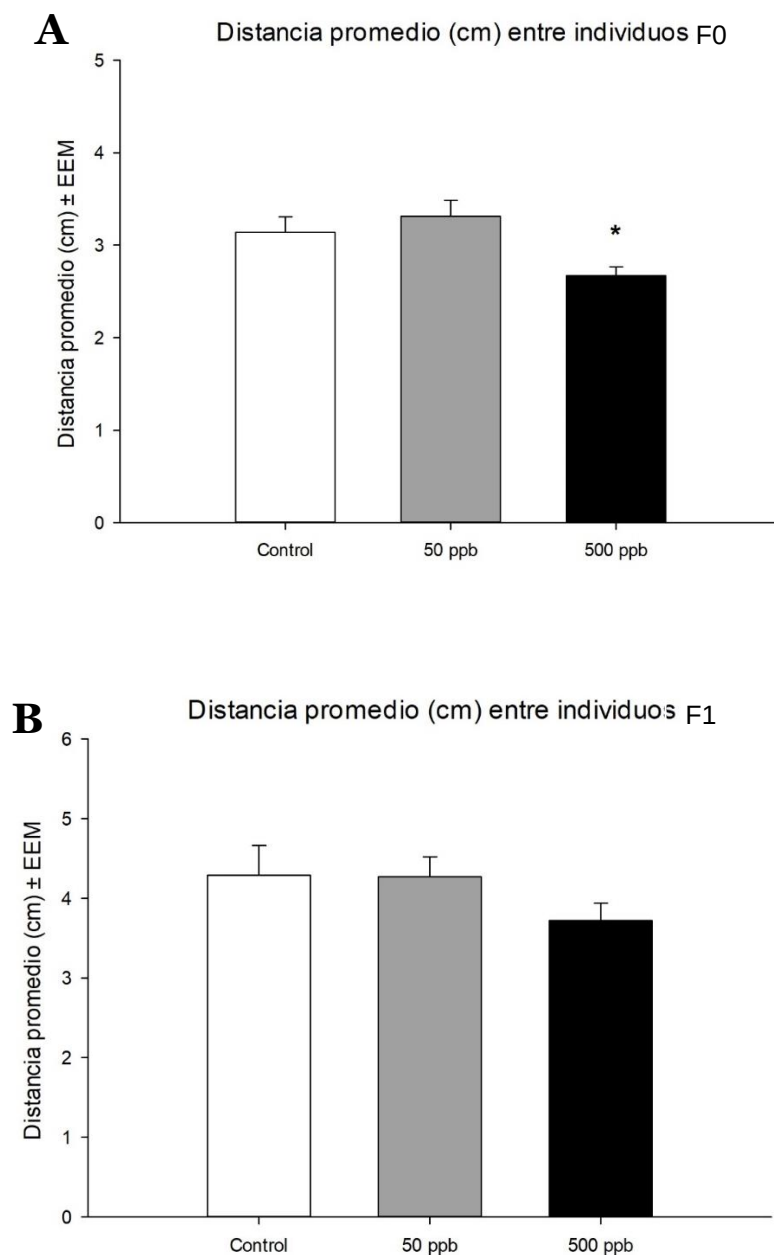


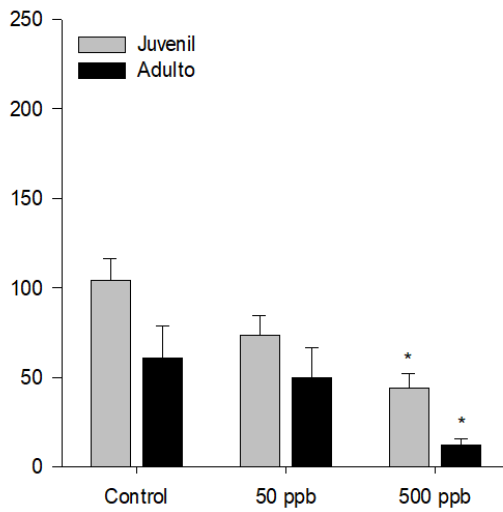
Figura 14. Efectos sobre la conducta social durante la exposición crónica al arsénico en peces cebrá juveniles **A)** F0, la interacción social fue cuantificada como la distancia promedio entre los individuos $\pm$ EEM, el grupo de 500 ppb muestra un incremento en la interacción social con menor distancia promedio entre individuos **B)** En la F1, no se observa una diferencia significativa entre los grupos, sin embargo, se observa una tendencia en el grupo de 500 ppb a permanecer unidos. *Indica diferencia significativa al ser comparadas con el grupo control ($p < 0.05$), $n = 6$ pares de peces. EEM, error estándar de la media.

5.3 CONDUCTAS ASOCIADAS A LA ANSIEDAD, PRUEBA DEL TANQUE NOVEDOSO

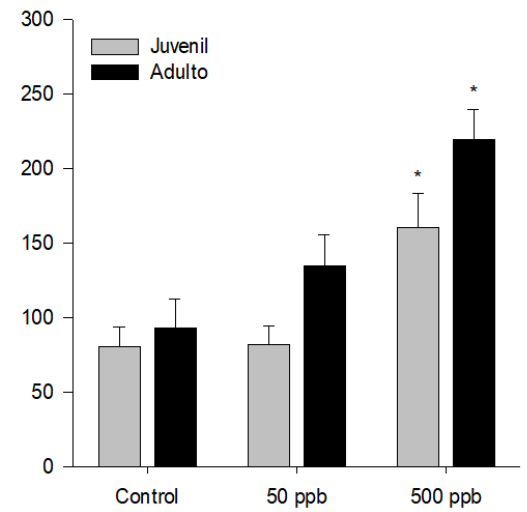
El experimento del tanque novedoso permite medir la ansiedad ante el estrés de un ambiente nuevo. En la primera generación, se encontró que los animales con el tratamiento de 500 ppb en exposición crónica muestran un comportamiento asociado a la ansiedad, medido con la distancia recorrida en la zona superior del tanque, la cual fue significativamente mayor a la recorrida por el grupo control. El comportamiento es observable durante la etapa juvenil [$H(2)=12.669$ $p<0.005$] y la etapa adulta [$H(2)=10.630$ $p=0.005$]. Se midió la latencia a cruzar al lado superior del tanque por primera vez durante el experimento, y se encontró que el tiempo es significativamente mayor en el grupo de 500 ppb comparado con el control durante la etapa juvenil [$F(2,65)=7.499$ $p=0.001$] y adulta [$F(2,54)=10.182$ $p<0.001$] (**figura 15-A**).

Para la F1, aunque se observan tendencias, no se observó diferencias significativa entre los tratamientos para ninguna de las variables medidas, primer cruce [$H(2)=2.745$ $p>0.05$], tiempo en la zona superior [$H(2)=0.704$ $p>0.05$], distancia recorrida [$F(2,60)=3.12$ $p>0.05$], así como tampoco en el número de cruces durante la prueba [$H(2)= 3.952$ $p>0.05$] (**figura 15-B**).

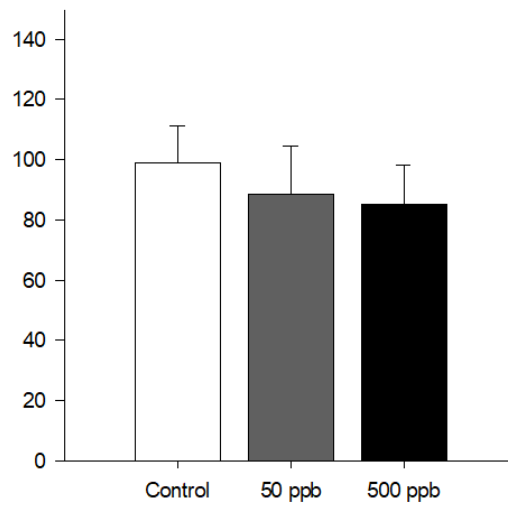
A Tiempo (s) en zona superior $\pm$ EEM



Tiempo primer cruce (s) $\pm$ EEM



B Tiempo (s) en zona superior $\pm$ EEM



Tiempo (s) primer cruce $\pm$ EEM

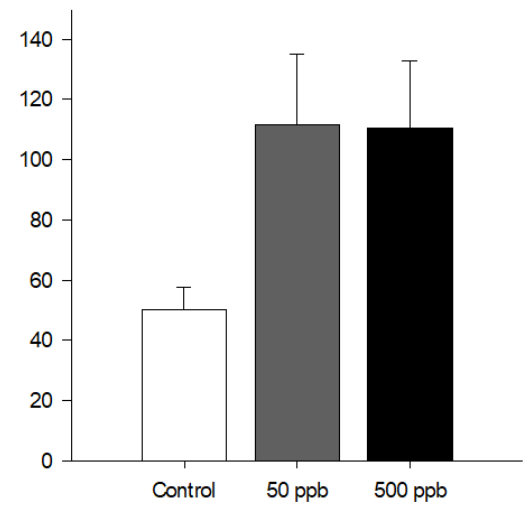


Figura 15. A) Generación F0, efecto de la exposición crónica al arsénico sobre las conductas asociadas a la ansiedad. Se analizó el tiempo en la zona superior y el tiempo hasta el primer cruce en dos etapas del desarrollo, juveniles y adultos. **B)** F1, efecto multigeneracional de la exposición crónica al arsénico durante la etapa juvenil. *Indica diferencia significativa al compararse con el grupo control en cada etapa del desarrollo ($p < 0.001$) $n=17$. EEM, error estándar de la media.

5.4 EFECTOS SOBRE EL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA EN PEZ CEBRA ADULTOS

5.4.1 Evaluación del aprendizaje no asociativo a través de la habituación a un estímulo externo

Las dos pruebas conductuales empleadas para la evaluación del aprendizaje y la memoria durante la primera generación reflejaron efectos significativos. Durante la prueba de habituación a un estímulo externo se observó que todos los grupos se habitúan al golpe externo durante los primeros 10 minutos de estimulación continua cada minuto [$F(2,9)=24.5$ $p<0.001$]. Posterior al periodo de habituación se generó un estímulo 8 minutos después para revelar alteraciones en la reactividad; el grupo de 50 ppb demostró hiporeactividad comparado con el grupo control [$F(2,42)=7.32$ $p<0.002$] (**figura 16-A**).

La segunda generación, al igual que la primera, también demuestra una habituación al estímulo cada minuto [$F(1,82)=23.197$ $p<0.001$], sin embargo, no mostraron diferencias significativas en reactividad al estímulo entre los tratamientos [$F(2,39)=1.509$ $p>0.05$] (**figura 16-B**).

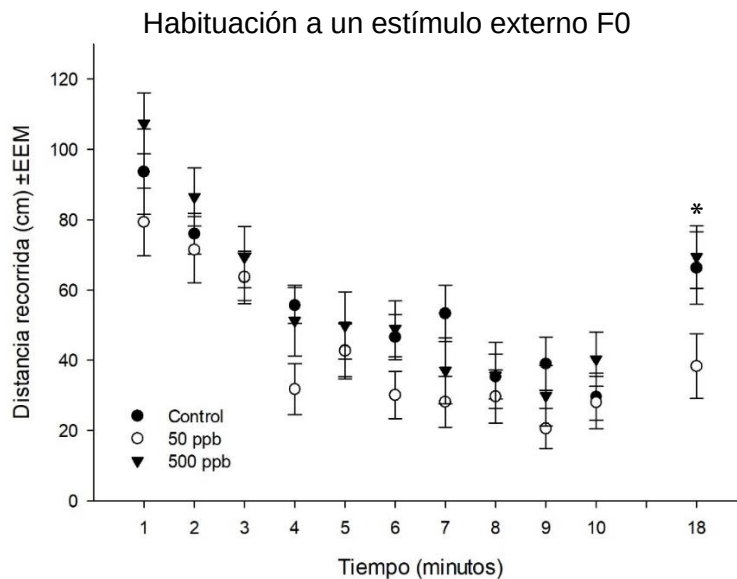
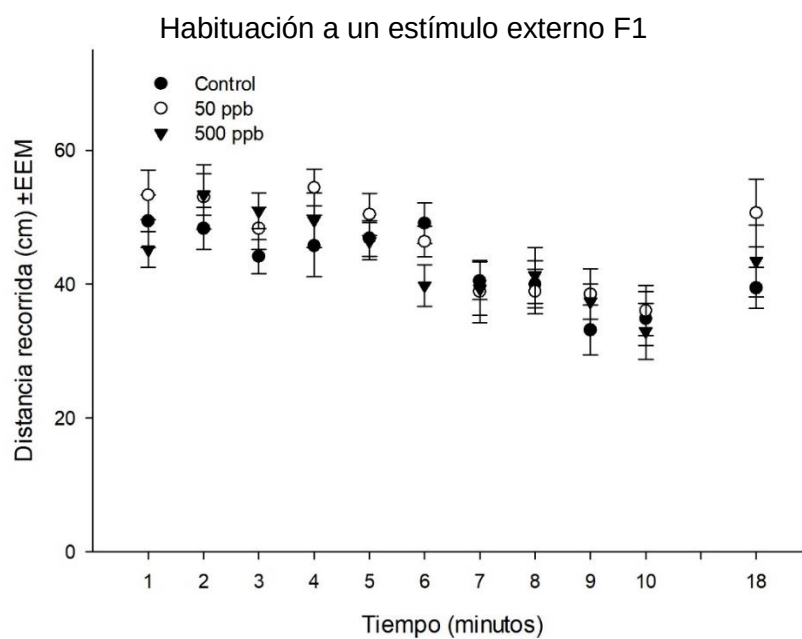
A**B**

Figura 16. Resultados de la habituación a un estímulo externo como indicador del aprendizaje no asociativo. Se midió la distancia recorrida en 5 s después de un golpe en el cristal como estímulo externo, uno cada minuto por 10 minutos, seguido por un último estímulo después de 8 minutos. **A)** F0, se observa una habituación al estímulo cada minuto; se observa una diferencia significativa 8 minutos después en el grupo de 50 ppb. **B)** Se observa la habituación durante el periodo de 10 minutos, sin embargo, no existe una diferencia significativa entre los tres grupos 8 minutos después *Indica una diferencia significativa comparado con el grupo control ($p < 0.05$) $n = 15$.

5.4.2 Evaluación del aprendizaje asociativo con el uso de la prueba de evitación inhibitoria

Ninguno de los individuos mostró diferencias durante el día de entrenamiento [$H(2)=0.261$ $p=0.87$], todos entraron a la zona oscura dentro de 60 segundos, sin embargo, después de veinticuatro horas, el grupo bajo exposición crónica a 500 ppb de concentración de arsénico les tomó menos tiempo para ingresar a la zona oscura que el grupo control [$H(2)=6.838$ $p=0.033$] (**figura 17-A**).

En la evitación inhibitoria de la segunda generación no fue posible observar diferencias entre los tratamientos durante el entrenamiento [$H(2)=1.889$ $p=0.389$]. Así mismo, no existió entre los tratamientos diferencia significativa veinticuatro horas después del entrenamiento [$H(2)=2.613$ $p=0.271$]. Además, no existió una diferencia significativa entre el día del entrenamiento y 24 horas después para el control ($p=0.5750$), 50 ppb ($p=0.1902$) y 500 ppb ($p=0.1259$) (**figura 17-B**).

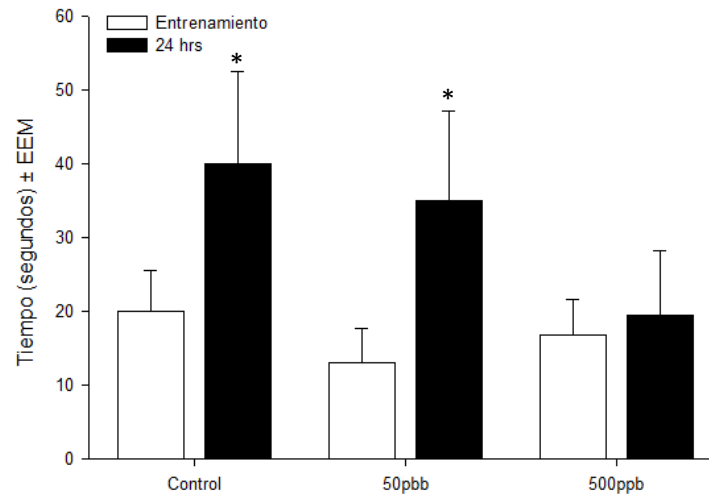
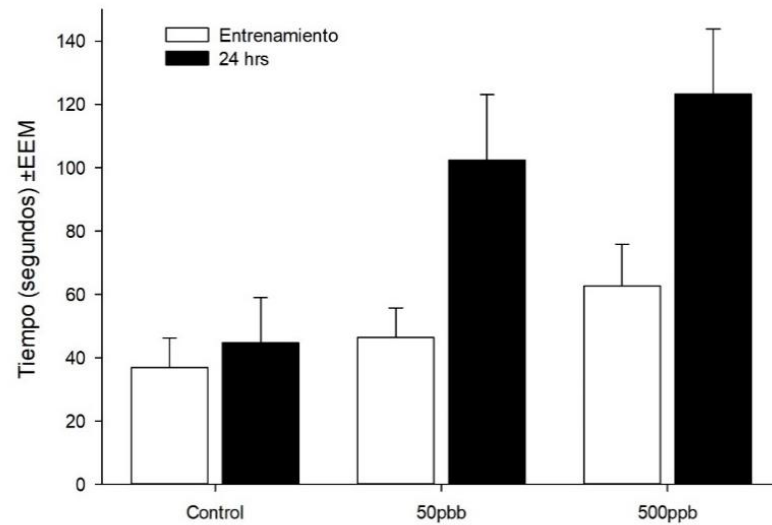
A**Evitación inhibitoria adultos F0****B****Evitación inhibitoria adultos F1**

Figura 17. Resultados del experimento de evitación inhibitoria como indicador del aprendizaje asociativo. Se midió el tiempo que tarda cada pez en entrar a la zona oscura del tanque de prueba. Después de un choque eléctrico y un periodo de veinticuatro horas, se repitió la medición de tiempo antes de entrar a la zona oscura. **A)** F0, se observa un cambio significativo en el aprendizaje de los grupos control y 50 ppb, lo que indica evidencia de un aprendizaje asociativo. El grupo de 500 ppb no es capaz del aprendizaje asociativo como indica la ausencia de una evidencia significativa. **B)** No existe diferencia significativa en el tiempo para entrar a la zona

oscura entre el día de entrenamiento y veinticuatro horas después en ninguno de los tratamientos, incluso el control.*Indica una diferencia significativa comparado con el grupo control ($p < 0.05$), $n=17$. EEM, error estándar de la media.

Tabla II. Resumen de los efectos de la exposición crónica al As durante el desarrollo con respecto al grupo control, en dos generaciones.

<i>Marcador</i>	<i>F0 50 ppb</i>	<i>500 ppb</i>	<i>F1 50 ppb</i>	<i>500 ppb</i>
Actividad motora				
Movimiento espontáneo de la cola	—	↓	↑	↑
Actividad motora larval	—	↑	—	—
Actividad motora juvenil	—	—	↓	—
Actividad motora adultos	—	↑	—	—
Conducta Social				
Afiliación en juveniles	—	↑	—	—
Seguimiento en adultos	—	—	—	—
Aprendizaje y memoria				
Aprendizaje no asociativo	↓	—	—	—
Aprendizaje asociativo	↓	↓	—	—
Conductas asociadas a la ansiedad				
Tanque Novedoso	—	↑	—	—
↑ Aumento significativo comparado con el control ↓ Disminución significativa comparado con el control — Sin efecto significativo comparado con el control				

6. DISCUSIÓN

Se evaluaron los efectos sobre la conducta de una exposición crónica al As y así lograr corroborar si estos efectos son heredables. Se utilizó una batería de pruebas conductuales durante el desarrollo de los peces cebras de la F0, para analizar la actividad motora, conducta social, conductas asociadas a la ansiedad y el aprendizaje y memoria. Es de importancia para el estudio el efecto que pueda tener una exposición crónica al As sobre la siguiente generación, por lo que se repitieron las pruebas en la F1.

Los resultados revelaron que el grupo expuesto a 500 ppb de la F0 presenta efectos en la actividad motora, conducta social, aprendizaje asociativo y conductas asociadas a la ansiedad, mientras que el grupo de 50 ppb muestra efectos sobre el aprendizaje asociativo y no-asociativo. La F1 únicamente tuvo efectos en la actividad motora embrionaria y juvenil.

Los modelos roedores han demostrado que el As es un potente agente disruptivo del sistema nervioso capaz de alterar la conducta de los organismos expuestos (Rodríguez et al., 2001). Bardullas y colaboradores (2009) concluyeron que la exposición crónica a concentraciones relevantes al ambiente (0.05, 0.5, 5 y 50 mg/L) altera el sistema motor dependiendo de la concentración, ya sea causando hiperactividad en concentraciones bajas o hipoactividad en concentraciones altas. En acuerdo con la literatura (Drapeau et al., 2002), en este trabajo se encontró que los peces expuestos al As en una concentración de 500

ppb muestran un mayor movimiento espontáneo de la cola a las 24 hpf, comparado con el control. Se observó que los embriones de este grupo presentaron un retraso en su desarrollo al ser comparados con los estadios de desarrollo embrionario del grupo control (datos no presentados). Para corroborar si este retraso es causado por la exposición al As, se optó por comenzar las mediciones de movimientos espontáneos de la cola desde las 19 hpf hasta las 26 hpf en la F1; si los efectos son transmitidos de forma multigeneracional, debería mantenerse esta tendencia. Para la F1 fue evidente un efecto en la actividad motora embrionaria (**figura 11**), ya que al inicio del experimento, a las 19 hpf, la actividad de aquellos peces del grupo de 500 ppb presentaron mayor actividad, y los del grupo de 50 ppb mayor actividad a las 26 hpf, comparado con el control. En contraste con la F0, los resultados de la F1 muestran un aumento en la actividad de los peces del grupo de 500 ppb. Esto indica un efecto multigeneracional en la actividad motora embrionaria del pez cebra.

Cuando los embriones son capaces del nado libre, son considerados larvas que ya son capaces de detectar luz y responder a su presencia y ausencia (Fleisch & Neuhauss, 2006), a los 7 dpf es posible medir la distancia recorrida durante un período de tiempo para verificar efectos sobre la actividad motora en los peces durante esta etapa de su desarrollo. Existe una hiperactividad en el grupo expuesto a 500 ppb durante la prueba de actividad motora larval después de siete días de exposición al arsénico (**figura 12-A**). La hiperactividad como

efecto de una exposición crónica a una sustancia tóxica en concentraciones de importancia ambiental, se ha reportado para cobre (9 µg/L) (Acosta et al., 2016) y metilmercurio (0.01-0.03 µM) (Mora-Zamorano, Svoboda, & Carvan, 2016) en pez cebra, sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado con As. Estudios en ratones presentan una respuesta dosis inversa, aquellos ratones expuestos a dosis bajas de As presentan mayor actividad, y los expuestos a dosis altas de As presentan menor actividad (Tadanobu et al., 1990). Se sabe que el efecto motor radica en cambios en los ganglios basales del cerebro de ratones (Rodríguez, JiméneZ-Capdeville, & Giordano, 2003), sin embargo, en peces podría tratarse del sistema reticuloespinal del tronco cerebral, región asociada al movimiento conservada entre vertebrados (Drapeau et al., 2002; Fetcho, Higashijima, & McLean, 2008; Hans, 2000).

La interacción social entre peces surge por la necesidad de protección a depredadores, la reproducción y alimentación (Magurran, 1990), y en peces cebra es una conducta adaptativa basada en señales visuales principalmente (Engeszer, Ryan, & Parichy, 2004). La exposición crónica al arsénico disminuyó la distancia entre los individuos durante las pruebas sociales en pares del grupo de 500 ppb de concentración de As en el agua (**figura 14-A**). Además, ninguno de los tratamientos permaneció más tiempo lejos de la zona alejada del banco de peces prueba, esto significa que el As no altera la preferencia por el agrupamiento entre peces. En mi conocimiento, este es el primer trabajo que

analiza la interacción social del pez cebra después de una exposición crónica al As.

Un estudio con nicotina y alcohol concluye que es posible afectar la interacción social entre los peces y disminuir la cohesión del grupo (Noam Miller, Greene, Dydinski, & Gerlai, 2013) después de una exposición aguda a las sustancias (nicotina 4 mg/L y 8 mg/L; alcohol 0.25%, 0.50%, 0.75% y 1.00%), sin embargo, ninguna de las dos sustancias logró dispersar los bancos de peces. Podría sugerirse un daño en las neuronas del sistema óptico, sin embargo, serían necesarios experimentos específicos para evaluar la capacidad visual de los peces cebra (Fleisch & Neuhauss, 2006) y existe muy poca evidencia de daños en el sistema óptico en humanos, dado que se ha asociado a neuropatías sin exploración al sistema visual (Rodríguez et al., 2003). Es posible que la disminución de la distancia entre individuos se explique como respuesta al comportamiento similar a la ansiedad, pues el grupo de Miller (2007) reporta mayor cercanía entre los individuos sujetos a situaciones de estrés (N. Miller & Gerlai, 2007).

En conjunto, esto sugiere que la exposición al arsénico no afecta directamente la interacción social entre individuos, en cambio los peces sí demuestran conductas asociadas al estrés dado que el grupo de 500 ppb tiende a permanecer más unido.

La exposición crónica al arsénico en dosis relevantes al ambiente durante el desarrollo del pez cebra es capaz de inducir conductas asociadas a la ansiedad

como muestran los resultados (**figura 15-A**). Se utilizaron dos parámetros definidos como marcadores de conducta asociada a la ansiedad, tiempo en la zona superior y tiempo antes del primer cruce a la zona superior (Egan et al., 2009) y se observaron alteraciones significativas en el grupo de 500 ppb para ambos parámetros analizados. Además es evidente que la exposición al As incrementa estas conductas asociadas al estrés con el avance del desarrollo del pez cebra, siendo en la etapa adulta más evidente el comportamiento alterado (**figura 15-A**). En acuerdo con lo observado en la conducta motora (Bardullas et al., 2009) y social (N. Miller & Gerlai, 2007) para el grupo de 500 ppb y con la evidencia presentada por Baldisarelli y colaboradores (2012) después de una exposición aguda al arsénico, la cual demuestra conductas asociadas a la ansiedad en peces expuestos al arsénico (arsenato 5 mg/L), los resultados de este trabajo muestran efectos en conductas asociadas a la ansiedad por una exposición crónica al As desde etapas tempranas del desarrollo.

Los resultados muestran que no existe un efecto del arsénico sobre la capacidad de habituación a estímulo externo continuo, sin embargo, el grupo de 50 ppb demostró una actividad menor posterior a cada estímulo al compararse con los otros dos grupos (**figura 16**). Además, la respuesta medida como actividad posterior al estímulo (reto de 8 minutos) fue menor significativamente. Esto sugiere un posible efecto sobre la capacidad de respuesta de los organismos después de una exposición crónica al As desde etapas tempranas. Los peces cebra utilizan la reacción para protegerse de posibles depredadores,

actúan con un comportamiento reflejo de respuesta ante un estímulo externo, el cual puede ser visual o sensorimotor (Fleisch & Neuhauss, 2006). En los peces, los neuromastos son las células de la línea lateral encargadas de la detección de movimientos en y del agua, y se ha demostrado que son sensibles a la toxicidad por presencia de metales (Froehlicher et al., 2009; Linbo et al., 2006); en plomo se ha detectado el mismo efecto en la respuesta reflejo (Rice et al., 2011). Esto sugiere que el efecto del As sobre la respuesta reflejo, sensorimotora, después de una exposición crónica, es similar a aquella producida por otros metales pesados.

La habituación sensorimotora a un estímulo permiten observar de forma rápida y conductual información sobre la neuroplasticidad (Eddins et al., 2010), y muchos grupos comienzan a utilizar al pez cebra como modelo toxicológico y farmacológico con el fin de medir los mecanismos del sistema nervioso de una habituación sensorimotora (Harold A Burgess & Michael Granato, 2007; Crosby et al., 2015; Eddins et al., 2010; Wolman, Jain, Liss, & Granato, 2011). En modelos murinos es un procedimiento utilizado con regularidad (Karl, Pabst, & von Hörsten, 2003). En este trabajo fue posible observar un efecto en la respuesta sensorimotora después de una exposición crónica al As en concentraciones de 50 ppb, la actividad motora fue significativamente menor (**figura 16-A**). Esta actividad menor no puede ser explicada por alteraciones en la actividad motora o como parte de una conducta asociada a la ansiedad, dado que este grupo no muestra efectos en estas pruebas realizadas. La actividad de

escape reflejo está modulada por las células Mauthner, neuronas localizadas en el tallo cerebral en peces, información de neuronas sensoriales y las uniones neuromusculares. Se conoce que los neuromastos son particularmente sensibles a toxicidad provocada por metales (Froehlicher et al., 2009), resultado confirmado por la literatura dado que se ha reportado una menor actividad como respuesta sensorimotora después de una exposición a plomo (Rice et al., 2011).

La memoria no puede ser observada de forma directa, por lo tanto debe ser inferida por medio de cambios en el patrón de comportamiento de los individuos al ser expuestos a un mismo estímulo (Cahill, McGaugh, & Weinberger, 2001). Los resultados muestran que la exposición crónica al As en ambas concentraciones afecta la habilidad de aprendizaje asociativo en los peces cebra. Son necesarios más estudios en el aprendizaje asociativo activo, ya que no se conoce completamente cómo el As induce las alteraciones cognitivas en los peces. El condicionamiento al miedo es ampliamente utilizado en modelos animales ya que es la forma de aprendizaje asociativo más persistente (Kim, DeCola, Landeira-Fernandez, & Fanselow, 1991). El grupo de de Castro (2009), desarrolló la prueba para el pez cebra, y utilizaron exposición a As para su validación, en concentraciones de relevancia ambiental. Encontraron efectos en todas las concentraciones utilizadas, siendo afectada la habilidad de la consolidación de la memoria y el aprendizaje en los peces expuestos al As, lo que concuerda con el presente trabajo. Existen múltiples estudios en ratones para evaluar el efecto del As sobre el aprendizaje y la

memoria, y se ha reportado que existen daños patológicos en neuronas, principalmente por efecto de estrés oxidativo (Cronican et al., 2013; Kim et al., 1991; Wu, Gu, Ge, Zhang, & Wang, 2006). Es posible que en el pez cebra actúe sobre las mismas regiones cerebrales, sin embargo, son necesarios más estudios al respecto.

La F1 presentó mayor actividad a las 19 hpf en el grupo descendiente de progenitores expuestos a 500 ppb, comparado con el control, sin embargo, a las 20 hpf los tres grupos homogeneizaron su movimiento, alcanzando el pico máximo de movimiento a las 22 hpf hasta su desaparición a las 26 hpf; cabe destacar que el movimiento espontáneo de la cola en el grupo de 50 ppb aún continuó durante las 26 hpf, en contraste con los otros dos grupos. El cese de los movimientos espontáneos de la cola se presenta a las 26 hpf (Saint-Amant & Drapeau, 1998), lo que indicaría que podría existir una transmisión multigeneracional sobre las funciones motoras. En mi conocimiento este es el primer estudio que demuestra que el As es capaz de inducir alteraciones en el movimiento espontáneo de la cola. Otros estudios han demostrado que numerosos contaminantes ambientales son capaces de alterar las funciones motoras de embriones de pez cebra (Raftery, Isales, Yozzo, & Volz, 2014; Selderslaghs, Blust, & Witters, 2012), como Polibromodifenil éteres (Chen et al., 2012), plata (Powers, Yen, Linney, Seidler, & Slotkin, 2010), plomo (Dou & Zhang, 2011) y metilmercurio (Abu Bakar et al., 2017).

Contrario a la hipótesis la generación F1 expuesta al arsénico como gameto, no presenta alteraciones en ninguno de los experimentos posteriores al movimiento espontáneo de la cola y la actividad motora juvenil, como se muestra en los resultados y en la tabla resumen (**tabla I**). Estos resultados ofrecen escasa evidencia de que existe un efecto multigeneracional por la exposición al arsénico inorgánico, por lo que estudios posteriores sobre el efecto transgeneracional del arsénico podrían ser de utilidad para resolver si el arsénico es capaz de afectar generaciones futuras en peces cebras expuestos de forma crónica desde la F0.

Otros estudios multigeneracionales con otras sustancias como ácido clofíbrico (Coimbra et al., 2015), han reportado efectos transmitidos a la siguiente generación. Sin embargo, estudios endocrinológicos han sido inconsistentes sobre la transmisión de efectos multigeneracionales (Segner, 2009), por lo tanto no es posible llegar a una conclusión hasta conocer el mecanismo de acción del arsénico y su rol epigenético sobre el DNA del pez cebra.

Los resultados de la prueba de aprendizaje asociativo en la F1 son incongruentes, aunque se observa una ligera tendencia no significativa, los grupos de 50 ppb y 500 ppb parecen tardar más en entrar a la zona oscura pasadas las veinticuatro horas del choque eléctrico, mientras que los controles no muestran ni indicios de un aprendizaje, lo que demuestra la variabilidad de los experimentos conductuales y que cada individuo reacciona diferente, lamentablemente en esta prueba los individuos reaccionaron de forma similar y no parecen haber aprendido de manera asociativa.

7. PERSPECTIVA

Es necesario realizar experimentos para la confirmación de que efectivamente el arsénico está afectando las regiones cerebrales implicadas en la conducta, por lo que procedimientos moleculares deben ser aplicados con los cerebros obtenidos de los peces sacrificados al finalizar los experimentos, además de un cribado para la detección de metilaciones en el DNA y confirmar efectos sobre los genes asociados al sistema nervioso central.

Además, debe realizarse el análisis de los resultados de la siguiente generación para confirmar que los efectos sean heredados, ya que la segunda generación no presentó efectos claros en la conducta social, de aprendizaje, memoria ni en la actividad motora durante las diferentes etapas del desarrollo.

En roedores, el efecto multigeneracional del As se ha documentado para la formación de tumores hepáticos (Nohara, Suzuki, Okamura, Matsushita, & Takumi, 2017), sin embargo, a mi conocimiento, no se han realizado estudios multigeneracionales que analicen el comportamiento de ratones después de una exposición crónica al As.

8. LITERATURA CITADA

- Abernathy, C. O., Liu, Y. P., Longfellow, D., Aposhian, H. V., Beck, B., Fowler, B., . . . Waalkes, M. (1999). Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environmental Health Perspectives*, 107(7), 593-597.
- Abu Bakar, N., Mohd Sata, N. S. A., Ramlan, N. F., Wan Ibrahim, W. N., Zulkifli, S. Z., Che Abdullah, C. A., . . . Amal, M. N. A. (2017). Evaluation of the neurotoxic effects of chronic embryonic exposure with inorganic mercury on motor and anxiety-like responses in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Neurotoxicol Teratol*, 59, 53-61. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.11.008>
- Acosta, D. D. S., Danielle, N. M., Altenhofen, S., Luzardo, M. D., Costa, P. G., Bianchini, A., . . . Dafre, A. L. (2016). Copper at low levels impairs memory of adult zebrafish (*Danio rerio*) and affects swimming performance of larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 185-186, 122-130. doi: 10.1016/j.cbpc.2016.03.008
- Agusa, T., Fujihara, J., Takeshita, H., & Iwata, H. (2011). Individual Variations in Inorganic Arsenic Metabolism Associated with AS3MT Genetic Polymorphisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(4), 2351.
- Aposhian, H., Zakharya, R., & Wildfang, E. (1999). How is inorganic arsenic detoxified? In C. O. Abernathy, R. L. Calderon & W. R. Chappell (Eds.), *Arsenic: exposure and health effects*: Springer Science & Business Media.
- Baker, T. R., King-Heiden, T. C., Peterson, R. E., & Heideman, W. (2014). Dioxin induction of transgenerational inheritance of disease in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 398(1-2), 36-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.08.011>
- Baldissarelli, L. A., Capiotti, K. M., Bogo, M. R., Ghisleni, G., & Bonan, C. D. (2012). Arsenic alters behavioral parameters and brain ectonucleotidases activities in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(4), 566-572. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.01.006>
- Bardullas, U., Limon-Pacheco, J. H., Giordano, M., Carrizales, L., Mendoza-Trejo, M. S., & Rodriguez, V. M. (2009). Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 239(2), 169-177. doi: 10.1016/j.taap.2008.12.004
- Barrett, J. C., Lamb, P. W., Wang, T. C., & Te Lee, C. (1989). Mechanisms of arsenic-induced cell transformation. *Biological Trace Element Research*, 21(1), 421-429. doi: 10.1007/BF02917284
- Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes & development*, 23(7), 781-783.
- Bhattacharya, P., Jacks, G., Frisbie, S. H., Smith, E., Naidu, R. Sarkar, B. (2002). Arsenic in the Environment: A Global Perspective. In B. Sarkar (Ed.), *Heavy Metals In The Environment*: CRC Press.
- Blank, M., Guerim, L. D., Cordeiro, R. F., & Vianna, M. R. M. (2009). A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(4), 529-534. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2009.07.001>
- Bolla-Wilson, K., & Bleecker, M. L. (1987). Neuropsychological impairment following inorganic arsenic exposure. *Journal of occupational medicine. : official publication of the Industrial Medical Association*, 29(6), 500-503.
- Buchet, J. P., Lauwerys, R., & Roels, H. (1981). Urinary excretion of inorganic arsenic and its metabolites after repeated ingestion of sodium metaarsenite by volunteers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 48(2), 111-118. doi: 10.1007/BF00378431

- Bundschuh, J., Litter, M. I., Parvez, F., Román-Ross, G., Nicolli, H. B., Jean, J.-S., . . . Toujaguez, R. (2012). One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of The Total Environment*, 429, 2-35. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.024>
- Burgess, H. A., & Granato, M. (2007). Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *Journal of Experimental Biology*, 210(14), 2526-2539. doi: 10.1242/jeb.003939
- Burgess, H. A., & Granato, M. (2007). Sensorimotor gating in larval zebrafish. *Journal of Neuroscience*, 27(18), 4984-4994.
- Cahill, L., McGaugh, J. L., & Weinberger, N. M. (2001). The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci*, 24(10), 578-581.
- Calderón, J., Navarro, M. E., Jimenez-Capdeville, M. E., Santos-Diaz, M. A., Golden, A., Rodriguez-Leyva, I., . . . Díaz-Barriga, F. (2001). Exposure to Arsenic and Lead and Neuropsychological Development in Mexican Children. *Environmental Research*, 85(2), 69-76. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/enrs.2000.4106>
- Chen, L., Huang, C., Hu, C., Yu, K., Yang, L., & Zhou, B. (2012). Acute exposure to DE-71: Effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(10), 2338-2344. doi: doi:10.1002/etc.1958
- Coimbra, A. M., Peixoto, M. J., Coelho, I., Lacerda, R., Carvalho, A. P., Gestó, M., . . . Santos, M. M. (2015). Chronic effects of clofibric acid in zebrafish (*Danio rerio*): A multigenerational study. *Aquatic Toxicology*, 160, 76-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.01.013>
- Coppin, J.-F., Qu, W., & Waalkes, M. P. (2008). Interplay between cellular methyl metabolism and adaptive efflux during oncogenic transformation from chronic arsenic exposure in human cells. *Journal of Biological Chemistry*.
- Cronican, A. A., Fitz, N. F., Carter, A., Saleem, M., Shiva, S., Barchowsky, A., . . . Lefterov, I. (2013). Genome-Wide Alteration of Histone H3K9 Acetylation Pattern in Mouse Offspring Prenatally Exposed to Arsenic. *PLoS One*, 8(2), e53478. doi: 10.1371/journal.pone.0053478
- Crosby, E. B., Bailey, J. M., Oliveri, A. N., & Levin, E. D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*, 49, 81-90. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2015.04.006>
- de Castro, M. R., Lima, J. V., Salomão de Freitas, D. P., de Souza Valente, R., Dummer, N. S., de Aguiar, R. B., . . . Barros, D. M. (2009). Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(3), 337-342. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.05.017>
- Dou, C., & Zhang, J. (2011). Effects of lead on neurogenesis during zebrafish embryonic brain development. *Journal of Hazardous Materials*, 194, 277-282. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.106>
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDeamid, J. R., & Brustein, E. (2002). Development of the locomotor network in zebrafish. *Progress in Neurobiology*, 68(2), 85-111. doi: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(02\)00075-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(02)00075-8)
- Eddins, D., Cerutti, D., Williams, P., Linney, E., & Levin, E. D. (2010). Zebrafish provide a sensitive model of persisting neurobehavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure: Comparison with nicotine and pilocarpine effects and relationship to dopamine deficits. *Neurotoxicol Teratol*, 32(1), 99-108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.02.005>
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavella, P. R., Elegante, M. F., . . . Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 38-44. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Engeszer, R. E., Ryan, M. J., & Parichy, D. M. (2004). Learned Social Preference in Zebrafish. *Current Biology*, 14(10), 881-884. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.04.042>

- Fetcho, J. R., Higashijima, S.-i., & McLean, D. L. (2008). Zebrafish and motor control over the last decade. *Brain research reviews*, 57(1), 86-93. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.06.018
- Fleisch, V. C., & Neuhauss, S. C. (2006). Visual behavior in zebrafish. *Zebrafish*, 3(2), 191-201.
- Froehlicher, M., Liedtke, A., Groh, K. J., Neuhauss, S. C., Segner, H., & Eggen, R. I. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol*, 95(4), 307-319. doi: 10.1016/j.aquatox.2009.04.007
- Guo, X., Chen, X., Wang, J., Liu, Z., Gaile, D., Wu, H., . . . Ren, X. (2018). Multi-generational impacts of arsenic exposure on genome-wide DNA methylation and the implications for arsenic-induced skin lesions. *Environment International*, 119, 250-263. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.024>
- Hall, A. H. (2002). Chronic arsenic poisoning. *Toxicology Letters*, 128(1), 69-72. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00534-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00534-3)
- Hamdi, M., Sanchez, M. A., Beene, L. C., Liu, Q., Landfear, S. M., Rosen, B. P., & Liu, Z. (2009). Arsenic transport by zebrafish aquaglyceroporins. *BMC Molecular Biology*, 10(1), 104. doi: 10.1186/1471-2199-10-104
- Hans, J. (2000). Major events in the development of the forebrain. *European journal of morphology*, 38(5).
- Heaven, R., Duncan, M., & Vukelja, S. J. (1994). Arsenic Intoxication Presenting with Macrocytosis and Peripheral Neuropathy, without Anemia. *Acta Haematologica*, 92(3), 142-143. doi: 10.1159/000204205
- Herrera, M. T. A., Montenegro, I. F., Navar, P. R., Domínguez, I. R. M., & Vázquez, R. T. (2015). Contenido de arsénico en el agua potable del valle del Guadiana, México. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 16(4), 63-70.
- Holliday, R., & Ho, T. (2002). DNA methylation and epigenetic inheritance. *Methods*, 27(2), 179-183. doi: [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00072-5](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00072-5)
- Irons, T. D., MacPhail, R. C., Hunter, D. L., & Padilla, S. (2010). Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*, 32(1), 84-90. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2009.04.066>
- Kapaj, S., Peterson, H., Liber, K., & Bhattacharya, P. (2006). Human Health Effects From Chronic Arsenic Poisoning—A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41(10), 2399-2428. doi: 10.1080/10934520600873571
- Karl, T., Pabst, R., & von Hörsten, S. (2003). Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(1), 69-83. doi: <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00301>
- Kim, J. J., DeCola, J. P., Landeira-Fernandez, J., & Fanselow, M. S. (1991). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist APV blocks acquisition but not expression of fear conditioning. *Behavioral neuroscience*, 105(1), 126.
- Kumari, B., Kumar, V., Sinha, A. K., Ahsan, J., Ghosh, A. K., Wang, H., & DeBoeck, G. (2017). Toxicology of arsenic in fish and aquatic systems. *Environmental Chemistry Letters*, 15(1), 43-64. doi: 10.1007/s10311-016-0588-9
- Lagerkvist, B. J., & Zetterlund, B. (1994). Assessment of exposure to arsenic among smelter workers: A five-year follow-up. *American Journal of Industrial Medicine*, 25(4), 477-488. doi: [doi:10.1002/ajim.4700250403](https://doi.org/10.1002/ajim.4700250403)
- Lai, M.-S., Hsueh, Y.-M., Chen, C.-J., Shyu, M.-P., Chen, S.-Y., Kuo, T.-L., . . . Tai, T.-Y. (1994). Ingested Inorganic Arsenic and Prevalence of Diabetes Mellitus. *American Journal of Epidemiology*, 139(5), 484-492. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a117031
- Le Quesne, P. M., & McLeod, J. G. (1977). Peripheral neuropathy following a single exposure to arsenic. Clinical course in four patients with electrophysiological and histological studies. *Journal of the neurological sciences*, 32(3), 437-451. doi: 10.1016/0022-510x(77)90025-9

- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & Behavior*, 90(1), 54-58. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.026>
- Limón-Pacheco, J. H., Jiménez-Córdova, M. I., Cárdenas-González, M., Sánchez Retana, I. M., Gonsebatt, M. E., & Del Razo, L. M. (2018). Potential Co-exposure to Arsenic and Fluoride and Biomonitoring Equivalents for Mexican Children. *Annals of Global Health*, 84(2), 257-273.
- Linbo, T. L., Stehr, C. M., Incardona, J. P., & Scholz, N. L. (2006). Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish. *Environ Toxicol Chem*, 25(2), 597-603.
- Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., & Rosen, B. P. (2002). Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6053-6058.
- Magurran, A. E. (1990). *The adaptive significance of schooling as an anti-predator defence in fish*. Paper presented at the Annales Zoologici Fennici.
- MANCILLA-VILLA, Ó. R., ORTEGA-ESCOBAR, H. M., RAMÍREZ-AYALA, C., USCANGA-MORTERA, E., RAMOS-BELLO, R., & REYES-ORTIGOZA, A. L. (2012). Metales pesados totales y arsénico en el agua para riego de Puebla y Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(1), 39-48.
- Mass, M. J., & Wang, L. (1997). Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: a model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 386(3), 263-277. doi: [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(97\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(97)00008-2)
- Mazumder, D., Gupta, J. D., Chakraborty, A., Chatterjee, A., Das, D., & Chakraborti, D. (1992). Environmental pollution and chronic arsenicosis in south Calcutta. *Bulletin of the World Health Organization*, 70(4), 481.
- Mazumder, D. N., Haque, R., Ghosh, N., De, B. K., Santra, A., Chakraborti, D., & Smith, A. H. (2000). Arsenic in drinking water and the prevalence of respiratory effects in West Bengal, India. *Int J Epidemiol*, 29(6), 1047-1052.
- Miller, N., & Gerlai, R. (2007). Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*, 184(2), 157-166. doi: 10.1016/j.bbr.2007.07.007
- Miller, N., Greene, K., Dydzinski, A., & Gerlai, R. (2013). Effects of nicotine and alcohol on zebrafish (*Danio rerio*) shoaling. *Behavioural Brain Research*, 240, 192-196. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.11.033>
- Mora-Zamorano, F. X., Svoboda, K. R., & Carvan, M. J., 3rd. (2016). The Nicotine-Evoked Locomotor Response: A Behavioral Paradigm for Toxicity Screening in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos and Eleutheroembryos Exposed to Methylmercury. *PLoS One*, 11(4), e0154570. doi: 10.1371/journal.pone.0154570
- Ng, J. C., Wang, J., & Shraim, A. (2003). A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*, 52(9), 1353-1359. doi: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00470-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00470-3)
- Nohara, K., Suzuki, T., Okamura, K., Matsushita, J., & Takumi, S. (2017). Tumor-augmenting effects of gestational arsenic exposure on F1 and F2 in mice. *Genes and Environment*, 39(1), 3. doi: 10.1186/s41021-016-0069-1
- Powers, C. M., Yen, J., Linney, E. A., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2010). Silver Exposure in Developing Zebrafish (*Danio rerio*): Persistent Effects on Larval Behavior and Survival. *Neurotoxicol Teratol*, 32(3), 391-397. doi: 10.1016/j.ntt.2010.01.009
- Prieto-García¹, F., Callejas, H., Lechuga, M. d. I. Á., Gaytán, J. C., & Barrado, E. (2005). Acumulación en tejidos vegetales de arsénico proveniente de aguas y suelos de Zimapán, Estado de Hidalgo, México. *Bioagro*, 17(3), 129-136.

- Raftery, T. D., Isales, G. M., Yozzo, K. L., & Volz, D. C. (2014). High-Content Screening Assay for Identification of Chemicals Impacting Spontaneous Activity in Zebrafish Embryos. *Environmental Science & Technology*, 48(1), 804-810. doi: 10.1021/es404322p
- Rahman, M. M., Ng, J. C., & Naidu, R. (2009). Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts on humans. *Environ Geochem Health*, 31 Suppl 1, 189-200. doi: 10.1007/s10653-008-9235-0
- Ratnaik, R. (2003). Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgraduate Medical Journal*, 79(933), 391-396. doi: 10.1136/pmj.79.933.391
- Rice, C., Ghorai, J. K., Zalewski, K., & Weber, D. N. (2011). Developmental lead exposure causes startle response deficits in zebrafish. *Aquat Toxicol*, 105(3-4), 600-608. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.08.014
- Rocha-Amador, D., Navarro, M. E., Carrizales, L., Morales, R., & Calderón, J. (2007). Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cadernos de Saúde Pública*, 23, S579-S587.
- Rodri, x, guez, V. M., Jiménez-Capdeville, M. E., & Giordano, M. (2003). The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letters*, 145(1), 1-18. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00262-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00262-5)
- Rodríguez, V. M., Carrizales, L., Jiménez-Capdeville, M. E., Dufour, L., & Giordano, M. (2001). The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain Research Bulletin*, 55(2), 301-308. doi: [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00477-4](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00477-4)
- Saha, J. C., Dikshit, A. K., Bandyopadhyay, M., & Saha, K. C. (1999). A Review of Arsenic Poisoning and its Effects on Human Health. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 29(3), 281-313. doi: 10.1080/10643389991259227
- Saint - Amant, L., & Drapeau, P. (1998). Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *J Neurobiol*, 37(4), 622-632.
- Scott, N., Hatlelid, K. M., MacKenzie, N. E., & Carter, D. E. (1993). Reactions of arsenic(III) and arsenic(V) species with glutathione. *Chem Res Toxicol*, 6(1), 102-106.
- Segner, H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(2), 187-195. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.10.099>
- Selderslaghs, I. W. T., Blust, R., & Witters, H. E. (2012). Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds. *Reproductive Toxicology*, 33(2), 142-154. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.08.003>
- Siegel, S., & Castellan, N. J. (1988). Nonparametric statistics for the behavioural sciences. New York, NY: McGraw-Hill.
- Simeonova, P. P., & Luster, M. I. (2000). Mechanisms of arsenic carcinogenicity: genetic or epigenetic mechanisms? *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 19(3), 281-286.
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry*, 17(5), 517-568. doi: [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)
- Tadanobu, I., Zhang, Y. F., Shigeo, M., Hiroko, S., Hiromichi, N., Hiroki, M., . . . Eiichi, A. (1990). The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicology Letters*, 54(2-3), 345-353.
- Tchounwou, P. B., Patlolla, A. K., & Centeno, J. A. (2003). Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure--a critical review. *Toxicol Pathol*, 31(6), 575-588. doi: 10.1080/01926230390242007
- Teraoka, H., Dong, W., & Hiraga, T. (2003). Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenital Anomalies*, 43(2), 123-132. doi: 10.1111/j.1741-4520.2003.tb01036.x

- Thomas, D. J., Styblo, M., & Lin, S. (2001). The Cellular Metabolism and Systemic Toxicity of Arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol*, 176(2), 127-144. doi: <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9258>
- Tolins, M., Ruchirawat, M., & Landrigan, P. (2014). The Developmental Neurotoxicity of Arsenic: Cognitive and Behavioral Consequences of Early Life Exposure. *Annals of Global Health*, 80(4), 303-314. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.005>
- Udagawa, O. O., K. Suzuki, T. Nohara, K. . (2019). Arsenic Exposure and Reproductive Toxicity. In: Yamauchi H., Sun G. (eds) Arsenic Contamination in Asia. *Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine*.
- Vahidnia, A., Van der Voet, G., & De Wolff, F. (2007). Arsenic neurotoxicity—a review. *Human & experimental toxicology*, 26(10), 823-832.
- Vahter, M. (2002). Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 181-182, 211-217. doi: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00285-8)
- von Ehrenstein, O. S., Poddar, S., Yuan, Y., Mazumder, D. G., Eskenazi, B., Basu, A., . . . Haque, R. (2007). Children's intellectual function in relation to arsenic exposure. *Epidemiology*, 18(1), 44-51.
- Watanabe, T., & Hirano, S. (2013). Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol*, 87(6), 969-979. doi: 10.1007/s00204-012-0904-5
- Wax, P. M., Wax, P., & Thornton, C. A. (2000). Recovery from Severe Arsenic-Induced Peripheral Neuropathy with 2,3-Dimercapto-l-propanesulphonic Acid. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 38(7), 777-780. doi: 10.1081/CLT-100102391
- Wolman, M. A., Jain, R. A., Liss, L., & Granato, M. (2011). Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15468-15473.
- Wu, C., Gu, X., Ge, Y., Zhang, J., & Wang, J. (2006). Effects of high fluoride and arsenic on brain biochemical indexes and learning-memory in rats. *Fluoride*, 39(4), 274-279.
- Yoshida, T., Yamauchi, H., & Fan Sun, G. (2004). Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: dose-response relationships in review. *Toxicol Appl Pharmacol*, 198(3), 243-252. doi: 10.1016/j.taap.2003.10.022
- Zhou, X., Sun, H., Ellen, T. P., Chen, H., & Costa, M. (2008). Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis*, 29(9), 1831-1836. doi: 10.1093/carcin/bgn063

ANEXO

Escrito por el Dr. Héctor Ortíz Kerbertt

Circuito de control de solenoides.

Hicimos un circuito simple y económico para golpear las arenas de manera automatizada por medio de cuatro solenoides activados con las salidas de Modulación de Ancho de Pulso (PWM) de la muy popular placa Arduino Nano. La programación de la secuencia de los golpes se hizo en LabVIEW en lugar del lenguaje propio de Arduino para tener una interfaz gráfica amigable e intuitiva desde donde se puede controlar la fuerza del golpe y el intervalo de tiempo entre uno y otro.

En la figura 1 se muestra el diagrama del circuito de control usado. Usamos cuatro de las salidas digitales que proveen PWM conectadas por medio de resistores limitadores a la base de igual número de transistores operando como switches que activan y desactivan a los solenoides. Las salidas PWM entregan pulsos rectangulares con una amplitud de 5 V cuando están en la porción de “encendido” y 0 V en la porción del pulso “apagado”. Los anchos de las porciones de encendido y apagado se controlan enviando valores enteros entre 0 y 255 a los pines digitales, donde 0 significa que el pulso está siempre apagado y 255 significa que está siempre encendido. Así, escribiendo valores enteros dentro de este intervalo podemos controlar el ancho del pulso y de esta manera simular un voltaje analógico inyectado a la base del transistor que de esta forma controla la intensidad con la que el solenoide es excitado.

Los solenoides son de 12 V, consumen hasta 1 A y pueden desarrollar una fuerza de hasta 600 g, con una carrera máxima de 10 mm.

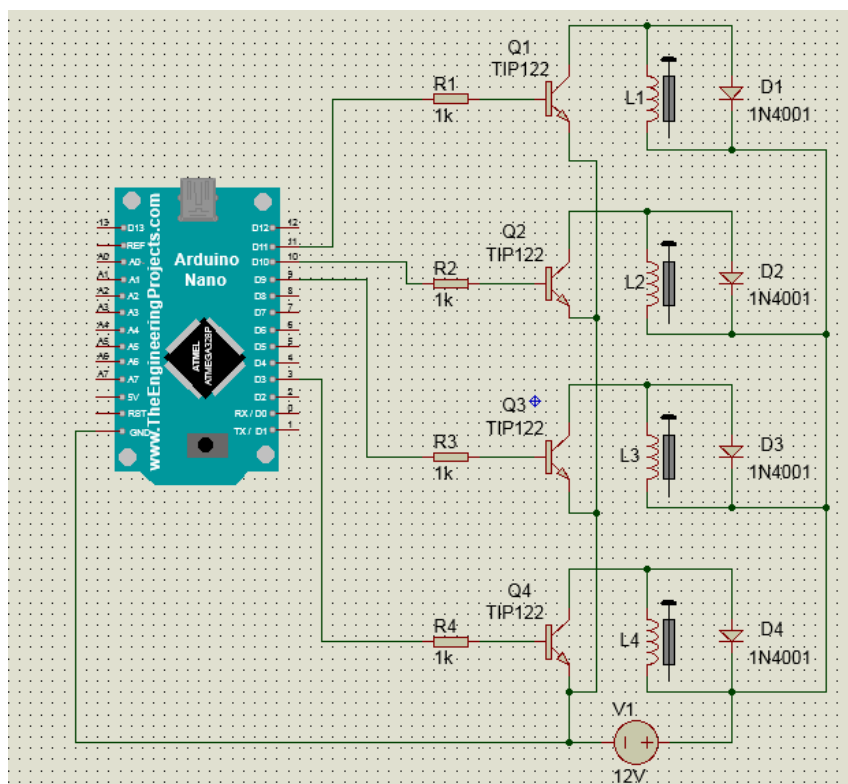


Figura 1. Usamos las salidas PWM 3, 9, 10 y 11. Los diodos conectados en paralelo con los solenoides suprimen los picos de voltaje que producen las propias bobinas en las transiciones de encendido a apagado.

Nos aseguramos de que la fuerza del golpe provisto por los cuatro solenoides no fuera significativamente mayor para alguno de los individuos. Para esto medimos la intensidad del golpe con un sensor de fuerza Pasco CI-6537 con los solenoides dispuestos en forma horizontal, como fueron colocados en el arreglo experimental con las arenas. Los golpes fueron programados en forma de impulsos de 100 ms de duración. En la figura 2 mostramos un resultado de la distribución de intensidades de los impulsos registrados por el sensor de fuerza cuando todos los solenoides se comportan esencialmente de la misma manera, lo cual ocurre partir de un valor mínimo del número entero en $\{0, \dots, 255\}$ que escribimos en la salida PWM y para una carrera del vástago de no menos de 5 mm.

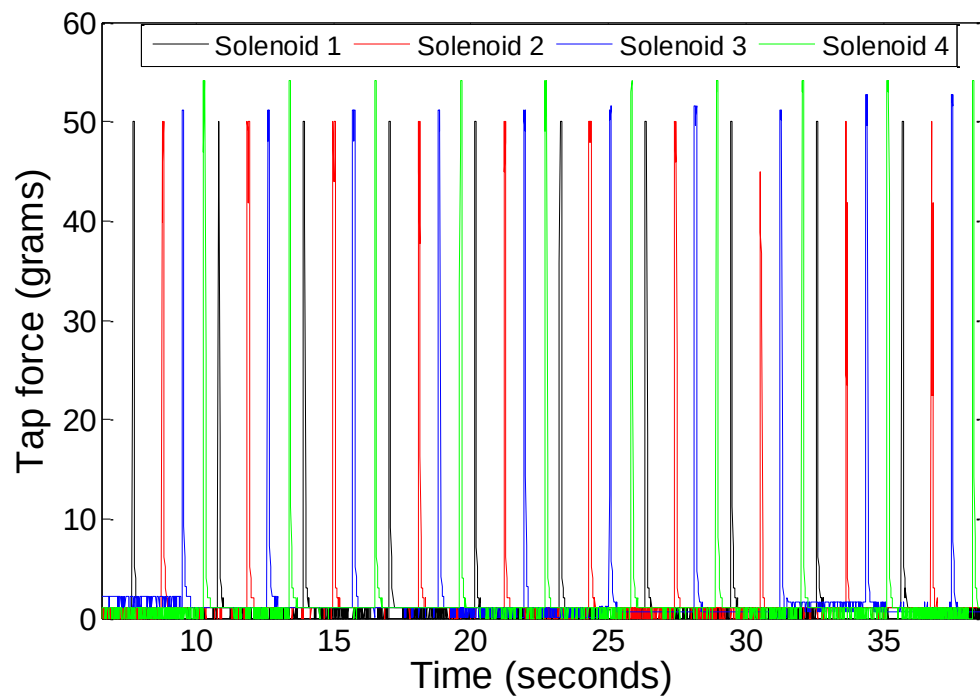


Figura 2. Distribución de intensidades de los golpes en forma de impulsos de 100 ms de duración provistos por los cuatro solenoides. Se muestran 10 golpes de cada uno.