

## Implementación de un sistema para evaluar la neurotoxicidad de los contaminantes ambientales en larvas de pez cebra (*Danio rerio*)

### Implementation of a system to evaluate neurotoxicity of environmental pollutants in zebrafish larvae (*Danio rerio*)

Selma Valles\*, Everardo Gutiérrez López\*, Ulises Bardullas\*✉

Valles, S., Gutiérrez López, E., & Bardullas, U. (2018). Implementación de un sistema para evaluar la neurotoxicidad de los contaminantes ambientales en larvas de pez cebra (*Danio rerio*). *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 26(74), 25-31.

#### RESUMEN

En la actualidad, una amplia gama de contaminantes son detectados en el ambiente con implicaciones en la salud y en la biodiversidad, su elevado número ha dificultado su estudio con métodos de experimentación in vitro e in vivo. Se implementó en el modelo del pez cebra un sistema de bajo costo para evaluar el efecto de los contaminantes ambientales, utilizando la actividad motora como marcador de neurotoxicidad. Embriones fueron expuestos a concentraciones de 0.05, 0.5, 5, 50 mg/l de arsénico inorgánico (Asi), 0.03, 0.3, 3, 10 mg/l de atrazina (ATR) y 14.5, 29.1, 43.6 mg/l de tiametoxam (TMX). La actividad motora aumentó en larvas expuestas a ATR y Asi y disminuyó con dosis altas de TMX. Estos datos sugieren que el sistema implementado es sensible para detectar cambios en la conducta motora en larvas del pez cebra, lo que puede contribuir positivamente al estudio de los contaminantes ambientales con potencial neurotóxico.

**Palabras clave:** pez cebra; neurotoxicidad; tiametoxam; atrazina; arsénico; plaguicidas.

**Keywords:** zebrafish; neurotoxicity; arsenic; atrazine; thiametoxam; pesticides.

Recibido: 12 de julio de 2017, aceptado: 15 de enero de 2018

\* Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California. Carretera Transpeninsular Ensenada-Tijuana No. 3917, Colonia Playitas, C. P. 22860, Ensenada, Baja California, México. Correo electrónico: selma.torres41@uabc.edu.mx; everardo.gutierrez@uabc.edu.mx; bardullas@uabc.edu.mx

✉ Autor para correspondencia

#### ABSTRACT

Currently, a wide variety of pollutants are detected in the environment with implications for both health and biodiversity, its high number has made it difficult to study with in vitro and in vivo methods of experimentation. A low cost system was implemented to evaluate the toxic effects of environmental pollutants, using the motor activity as neurotoxicity marker in zebrafish model. Embryos were exposed to inorganic arsenic (Asi) 0.05, 0.5, 5, 50 mg/l, atrazine (ATR) 0.03, 0.3, 3, 10 mg/l and thiametoxam (TMX) 14.5, 29.1, 43.6 mg/l. Motor activity increased in larvae exposed to ATR and Asi and decreased with the high dose of TMX. These data suggest that system is sensitive for to detect changes in motor behavior in zebrafish larvae, which may contribute to increase the study of environmental pollutants with neurotoxic potential.

#### INTRODUCCIÓN

Se estima que anualmente 2,000 nuevos químicos se suman al mercado global, de los cuales, la extensa mayoría no son sometidos a pruebas toxicológicas intensivas (Eaton & Gallagher, 2010). Las implicaciones éticas, los altos costos e intensiva labor de operación son algunas de las causas que han limitado la capacidad de evaluación de los efectos tóxicos de los contaminantes sobre los diferentes modelos in vitro e in vivo. Aunque el uso de líneas celulares tiene claras ventajas operacionales, representa un sistema biológico aislado y homogéneo que no permite predecir la interacción entre las múltiples variables en un organismo completo. Aunado a lo anterior, desde hace décadas es de gran preocupación el

efecto de los contaminantes ambientales sobre el desarrollo de los organismos. Numerosos estudios demuestran a los infantes como una de las poblaciones más vulnerables a los efectos deletéreos de los contaminantes ambientales, los cuales incluyen alteraciones en el sistema inmune, respiratorio (Cao et al., 2016) y nervioso (Tolins, Ruchirawat, & Landri-gan, 2014).

Por tal motivo, la incorporación de herramientas de alto rendimiento y bajo costo podrían contribuir a la identificación preliminar de sustancias con potencial tóxico. En los últimos años el pez cebrá ha emergido como un organismo en la investigación biomédica por la facilidad y economía en su manejo y mantenimiento y por sus cualidades biológicas con ciclos de vida reducidos que en 72 h completa su desarrollo embrionario y puede alcanzar la madurez sexual a los 90 días (Peterson & MacRae, 2012). Este organismo ha demostrado tener mecanismos celulares y estructuras del sistema nervioso conservados entre vertebrados (Lieschke & Currie, 2007), lo que ha permitido extrapolar el uso de pruebas neuroconductuales típicas de modelos murinos con una alta comparabilidad de los resultados (Steenbergen, Richardson, & Champagne, 2011). El pez cebrá es un modelo con notables ventajas para el estudio del efecto de los contaminantes sobre el desarrollo. Su desarrollo externo es translúcido, sus embriones son numerosos en cada puesta, lo que permite la implementación de pruebas de alto rendimiento con múltiples réplicas.

La actividad motora es un parámetro documentado por décadas en el campo de la psicofarmacología y de la toxicología, el cual es extensivamente utilizado en modelos murinos como un indicador de daño en el sistema nervioso por exposición a tóxicos (Bardullas et al., 2009; Wolansky, Gennings, DeVito, & Crofton, 2009), además de ser un método validado en estudios de neurotoxicidad aguda y crónica realizados por organismos gubernamentales como la Environmental Protection Agency (EPA) (Crofton et al., 1991). Sin embargo, los costos de implementación del modelo del pez cebrá con sistemas de crianza comerciales, así como los instrumentos de medición de la función motora en larvas, pueden alcanzar algunas decenas de miles de dólares, lo que limita la adopción de estos sistemas de medición por nuevos laboratorios.

De forma reciente, un grupo desarrolló un programa de código abierto denominado LSRtrack

(Zhou, Cattley, Cario, Bai, & Burton, 2014), el cual registra la actividad motora en múltiples individuos, lo que permite trasladar este método de análisis de la conducta al campo de la neurotoxicología y contribuir a la identificación de sustancias con potencial neurotóxico. Por tal motivo, este estudio tiene como objetivo el diseño y construcción de un sistema de bajo costo para la reproducción y crianza de pez cebrá y posteriormente la optimización de las herramientas para el análisis de la actividad motora con la intención de emplearse en la evaluación sistemática de contaminantes ambientales. La hipótesis del presente trabajo fue que la adopción de estas herramientas permitirá demostrar que la exposición al arsénico, a la atrazina y al tiametoxam es capaz de producir alteraciones sobre la actividad motora y conducta de tigmotaxis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcción de un sistema para la reproducción y crianza del pez cebrá

El sistema se construyó con materiales locales de bajo costo y consiste en dos niveles con acuarios de vidrio de 15, 10, y 1.5 l (figura 1). Los acuarios descargan sobre una canaleta de PVC a través de un tubo recubierto por un extremo con malla de nylon, el cual desemboca en un depósito de acrílico (sumidero). Los primeros compartimentos permiten separar por decantación los sólidos del agua, el líquido pasa a un tercer depósito en donde una bomba de impulsión de 150 l/h bombea el flujo hacia la lámpara UV, el flujo es bombeado por una segunda bomba de impulsión de 350 l/h hacia un filtro biológico —consistente en un tubo hermético de PVC de 50 cm de diámetro que en su interior contiene 1/2 k de esferas de poliestireno, estas esferas sirven como superficie para adhesión de bacterias benéficas que promueven la nitrificación y desnitrificación del agua—, finalmente, el agua regresa a través de un sistema de tuberías de PVC hacia ambos niveles, en donde válvulas de PVC grado alimenticio controlan el flujo que alimenta los acuarios. En el interior del depósito sumidero se colocó un calentador de alto rendimiento de 300 W, el cual mantiene la temperatura del sistema a 28.5 °C.

### Protocolo de exposición

Peces cebrá adultos de aproximadamente 6 meses de edad fueron mantenidos a una temperatura de 28 ± 1 °C con un ciclo de 14h/10h luz-obscuridad. Una noche antes del desove se colocaron trampas

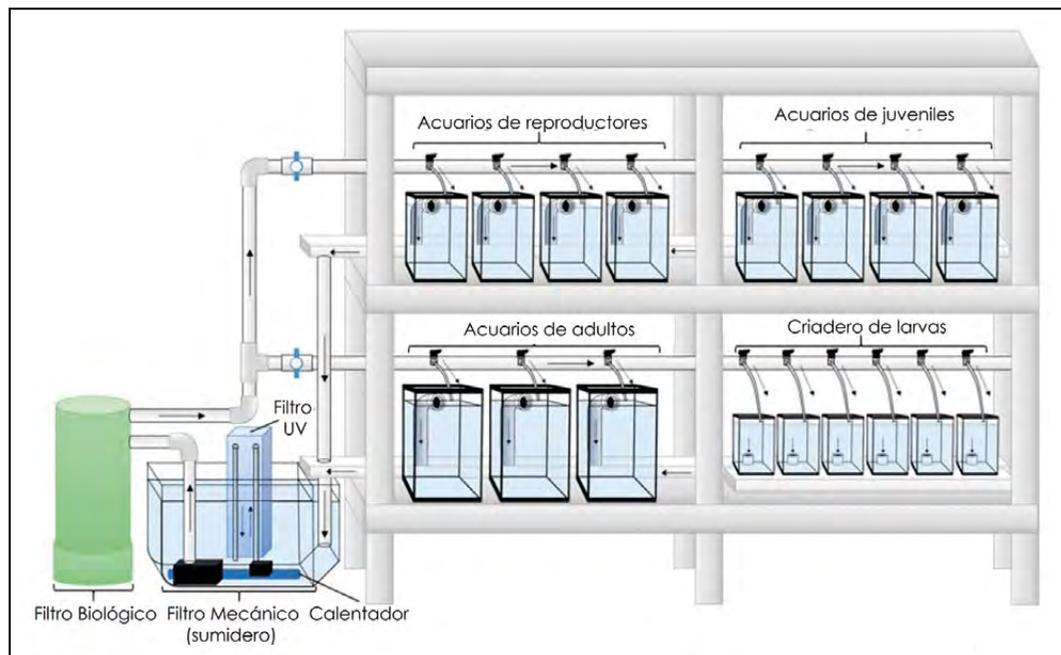


Figura 1. Diagrama esquemático del sistema de crianza de peces cebras. Elaboración propia.

para capturar los huevos y al siguiente día, una hora después de iniciar el ciclo de luz (8:00 am), los huevos fueron recolectados, limpiados con medio E2 (7.5mM NaCl, 0.25mM KCl, 0.5mM MgSO<sub>4</sub>, 75μM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25μM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.35mM NaHCO<sub>3</sub>) y colocados en cajas Petri a una densidad de 25 embriones por caja. Los huevos no fecundados fueron descartados (Nagel, 2002). Las soluciones de trabajo (ATR) 0.03, 0.3, 3 mg/l (ChemService West Chester, PA, US); (Asi) 0.05, 0.5, 5 mg/l (J. T. Baker Phillipsburg, NJ, US) y (TMX) 14.5, 29.1, 43.6 mg/l (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, US) fueron elaboradas a partir de soluciones madre disueltas en medio E2 sin el uso de ningún disolvente orgánico. Los grupos control de cada tratamiento se mantuvieron en medio E2.

Para cada tratamiento, incluso el grupo control, se realizaron tres réplicas. La exposición de los huevos fecundados a los diferentes tratamientos inició en la fase embrionaria a partir de las 2 h postfertilización (hpf) y continuó hasta la fase larval en el séptimo día posfertilización (dpf), con recambios diarios de las soluciones. La incubación se mantuvo a una temperatura estable de  $28 \pm 1$  °C en un ciclo de 14 h luz/10 h oscuridad.

#### Montaje de la actividad motora en larvas

Finalizada la exposición se corroboró la ausencia de malformaciones y las larvas de 7 dpf fueron transferidas al cuarto de grabación previamente clima-

tizado a  $28 \pm 1.5$  °C. Un total de 24 larvas fueron colocadas sobre placas de 24 pocillos (Costar, # 3526, Corning, NY, US) adaptadas para grabación previamente llenadas con medio E2 sin tóxicos. Para la grabación se utilizó una videocámara Flea3 (Point Grey Research) acoplada a un lente computar M6Z1212-3S sobre un soporte para cámara. Como fuente de iluminación se utilizó un luminario tipo led de 6500 K (General Lighting 04745-1) (figura 2a). La adaptación de las placas se realizó rebajando su altura hasta 5 mm, con ayuda de una herramienta rotativa de velocidad variable y su accesorio de corte #426 (Dremel 3000, D. F., México); posteriormente fueron pintadas en la parte exterior de los pocillos con pintura acrílica negra para producir un efecto de máscara durante la grabación. Se agregó un molde interno de agar bacteriológico a 1% llenando los pocillos con aproximadamente 1.5 ml de agar (figura 2b). El montaje de videograbación se colocó dentro de una estructura de madera para evitar estímulos externos.

#### Análisis de la actividad motora en larvas de pez cebras

Los registros de la actividad motora se realizaron entre las 11:00 a.m. y las 14:00 p.m. con una duración de 20 min para cada videograbación, siguiendo el procedimiento descrito ampliamente en Zhou et al. (2014), con el uso de la herramienta de software de código abierto LSRtrack en MATLAB. Los datos proporcionados fueron procesados con la finalidad de

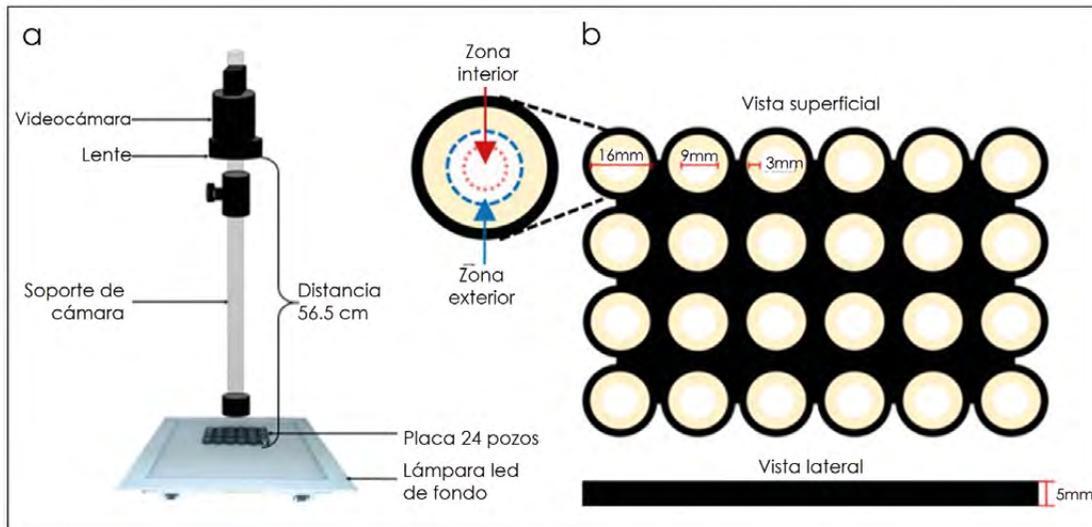


Figura 2. Diseño de equipo y material para el análisis locomotor en larvas de pez cebra. (a) Montaje para videograbación de placas, (b) placas de 24 pocillos con delimitación de agar en la periferia de los pocillos. Elaboración propia.

obtener medidas relevantes en términos de la actividad motora como marcador de neurotoxicidad. Para ello se generó un nuevo módulo de análisis a partir de los datos generados por LSRtrack (s. f.), el cual permite calcular y analizar las distancias totales recorridas por cada una de las larvas. El software también permite realizar análisis considerando intervalos de tiempo, lo que puede utilizarse para medir la progresión temporal de la distancia total recorrida de la larva expuesta al contaminante. La fórmula general para el cálculo de la distancia recorrida por cada larva se estableció de la siguiente forma:

$$distMMs_k = \frac{\sum_{i=1}^F fishDistances[k][i]}{unscaledRadius / radius}$$

El nuevo módulo desarrollado también permite la medición del comportamiento de las larvas en términos de su preferencia por mantenerse en los bordes. Se definió un círculo interior de 4 mm de radio ( $rCInterior$ ) para el análisis de los datos. En este caso se utilizaron los datos reportados por LSRtrack en la matriz *fishAreas*, de dimensiones  $N \times 4$ , que contiene las coordenadas posicionales de cada larva en cada fotograma, para calcular el centroide de cada pocillo:

$$wellC_k = \left( \frac{fishAreas[k][1] + (fishAreas[k][2] - fishAreas[k][1])}{2}, \frac{fishAreas[k][3] + (fishAreas[k][4] - fishAreas[k][3])}{2} \right)$$

Esto permite calcular la región que contempla el círculo interior y verificar si para cada fotograma la larva se encuentra dentro de ella o en los bordes considerando su distancia euclidiana al centroide del pocillo:

$$distToCenter_{f,k} = \sum_{i=1}^F DistanciaEuclidiana(wellC_k, fishCoord[k][i])$$

El resultado permite calcular el total de fotogramas para los cuales la larva se mantuvo fuera del círculo interior, utilizando para ello el valor  $rCInterior$ , lo cual se traduce en el porcentaje de fotogramas y tiempo que la larva estuvo en la zona de bordes.

**Estadística**

El análisis de la actividad motora y conducta de tigmotaxis se realizó con un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, seguido de una prueba *post hoc* LSD de Fisher para la comparación entre múltiples tratamientos, utilizando el software StatView versión 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, US). Los datos se presentan como un promedio  $\pm$  error estándar (EEM). Significancia establecida como  $p \leq 0.05$ .

**RESULTADOS**

Los resultados muestran un desarrollo normal de los organismos sin malformaciones visibles (figura 3). Adicionalmente, no se observó una mortalidad con los tratamientos al finalizar la exposición mayor a 10% (datos no mostrados). En experimentos inde-

pendientes la exposición durante 7 días a ATR, Asi y TMX generó alteraciones significativas en la actividad locomotora en larvas de pez cebra. Las concentraciones de 0.3 y 3 mg ATR/L fueron suficientes para producir hiperactividad [F (3, 37)= 4.75,  $p=0.0065$ ] (figura 4a). De la misma forma, las larvas expuestas al Asi desarrollaron un aumento significativo en la actividad motora después de 7 días de exposición a las dosis de 0.5 y 5 mg Asi/L [F (3, 79)= 6.69,  $p=0.0004$ ] (figura 4b). Un efecto de hipoactividad se observó en los individuos expuestos al insecticida TMX en donde una dosis de 29.1 mg TMX/L redujo la distancia total recorrida [F (3, 116)= 3.51,  $p=0.0044$ ] (figura 4c).

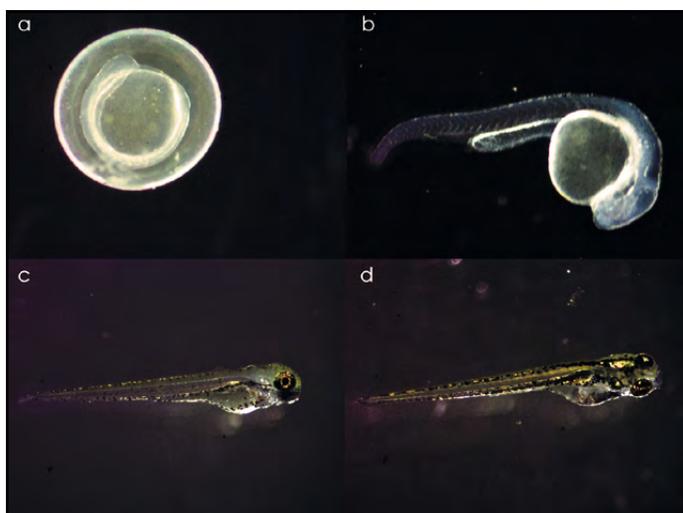


Figura 3. Desarrollo larval de pez cebra. (a) Embrión de pez cebra, 8 horas posfertilización (hpf); (b) embrión de 24 hpf; (c) larva de 72 hpf; (d) larva de 120 hpf. Elaboración propia.

Por otro lado, la exposición a ATR no produjo alteraciones en el parámetro de tigmotaxis [F (3, 52)= 01.37,  $p>0.05$ ] (figura 4d), mientras que las dosis de Asi de 5 mg Asi/L aumentaron el tiempo en los márgenes [F (3, 92)= 2.58,  $p=0.024$ ] (figura 4e). Finalmente, una dosis alta del insecticida TMX 43.6 mg disminuyó el tiempo en los márgenes [F (3, 116)= 4.51,  $p=0.0007$ ] (figura 4f).

## DISCUSIÓN

Acorde con la hipótesis inicial del presente trabajo, los resultados demuestran que la exposición durante etapas tempranas del desarrollo a tres tipos de contaminantes ambientales altera la actividad motora y la conducta de tigmotaxis en larvas de 7 días posfertilización. La ATR es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo con más de 50 años en el mercado. La exposición a este plaguicida se ha relacionado con alteraciones en el sistema nervioso en modelos murinos, particularmente sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal, lo que parcialmente explica los efectos deletéreos sobre la conducta motora (Bardullas, Giordano, & Rodríguez, 2011). Recientemente, un estudio demostró un aumento sobre la actividad motora en larvas de pez cebra de 5 dpf expuestas a 30, 100, 300  $\mu\text{g}$  ATR/L (Liu et al., 2016), pero evaluadas con el uso de un software comercial de videoseguimiento, lo que sugiere la reproducibilidad de los resultados con relación al uso de una herramienta de acceso libre.

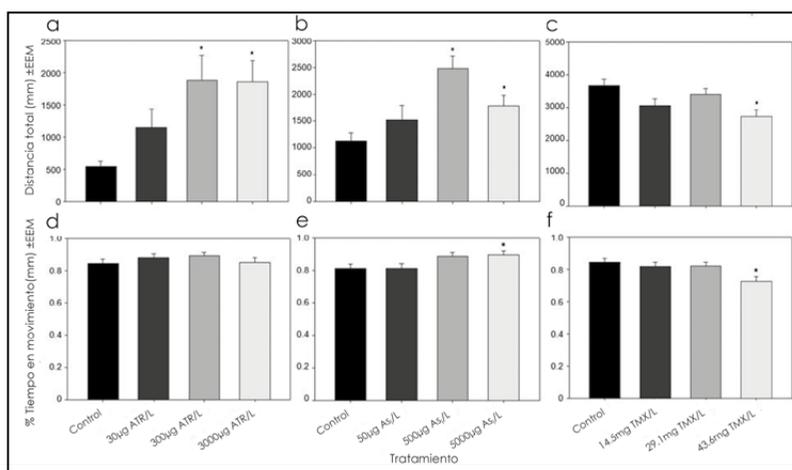


Figura 4. Efectos sobre actividad locomotora y tigmotaxis en larvas de pez cebra por exposición a atrazina (n= 12-18), arsénico (n= 24) y tiametoxam (n= 30). Efecto de la atrazina (a), arsénico (b) y tiametoxam (c) sobre la actividad motora. Efecto de la atrazina (d), arsénico (e) y tiametoxam (f) sobre la conducta de tigmotaxis.

\* Diferente de grupo control  $p < 0,05$ .

Elaboración propia.

Por otro lado, el Asi es considerado una de las sustancias más ubicuas y tóxicas del planeta, con amplia presencia en el territorio nacional, en donde se han documentado concentraciones que superan la norma nacional de 0.025 mg Asi/l (Camacho, Gutiérrez, Alarcón-Herrera, Villalba, & Deng, 2011; Del Razo et al., 2002). Asimismo, el impacto negativo del Asi sobre el sistema nervioso ha sido ampliamente descrito, tanto en humanos (Calderón et al., 2001), como en modelos animales. El Asi es un potente disruptor de la función motora en roedores adultos; estudios anteriores demostraron que la exposición durante 4 meses a dosis relevantes al medio ambiente de 0.5 y 5 mg Asi/l similares a las utilizadas en estudio generan hiperactividad en ratones C57Bl/6J (Bardullas et al., 2009), lo que sugiere similitudes entre el pez cebra y el ratón C57Bl/6J en la sensibilidad ante un marcador de neurotoxicidad.

En contraste con los contaminantes, el insecticida TMX es un plaguicida de reciente creación y escasa información toxicológica, es el segundo del grupo de los neonicotinoides más comercializado en el mundo; hay que mencionar que el uso de estos plaguicidas se ha asociado con el colapso en las colonias de abejas (Tomizawa & Casida, 2003). Recientemente un estudio reportó que en el pez cebra la exposición temprana a 45  $\mu\text{M}$  o 60  $\mu\text{M}$  de imidacloprid, un insecticida de la familia de neonicotinoides, es capaz de producir alteraciones en la actividad motora en estadio larval y tener efectos persistentes durante la etapa adulta (Crosby, Bailey, Oliveri, & Levin, 2015), por lo que es plausible sugerir que el TMX puede producir afectaciones similares.

En el presente estudio se tomó ventaja de la robusta conducta de tigmotaxis, o preferencia a permanecer cerca de los márgenes que el pez cebra exhibe, comportamiento evolutivamente bien conservado que exhibe una gran variedad de animales (Stewart, Gaikwad, Kyzar, & Kalueff, 2012), por lo que en el presente estudio se incluyó el diseño de un algoritmo que permite analizar esta conducta en larvas como un parámetro de exploración y ansiedad (Hoy et al., 1999). De forma reciente, este marcador ha sido trasladado al modelo del pez cebra y validado en larvas (Schnörr, Steenbergen, Richardson, & Champagne, 2012). Desde el conocimiento de los autores del presente, este es el primer reporte que sugiere posibles efectos relacionados con la ansiedad por exposición a dosis relevantes al medio ambiente de Asi, y una modesta disminución en los niveles de permanencia en el borde con una dosis alta de TMX. Sin embargo, una limitación de dicho

algoritmo para la detección de tigmotaxis y futuros alcances de este estudio consiste en la necesidad de ser validado a través de una serie de retos farmacológicos con ansiolíticos y ansiogénicos.

De manera importante, los resultados del presente estudio demuestran que la actividad motora en larvas de pez cebra puede ser implementada como un parámetro de neurotoxicidad de manera eficaz y con alto costo-beneficio con la adopción de herramientas de videoseguimiento de libre acceso en comparación con los sistemas comerciales, cuyos costos pueden superar los 25,000 dólares. De la misma forma, la construcción de un sistema para la reproducción y crianza de pez cebra con materiales de bajo costo genera un gasto de solo 800 dólares, en comparación con los sistemas comerciales, entre \$6,000 y 15,000 dólares. Este costo accesible se traduce en la posibilidad de que el modelo sea incorporado en nuevos laboratorios interesados en un modelo de bajo costo y alto rendimiento con múltiples aplicaciones en el campo de la toxicología, como el estudio y evaluación de contaminantes ambientales, así como de vigilancia de aguas residuales y mantos acuíferos.

## CONCLUSIONES

Con la implementación de un sistema de reproducción y crianza, así como la adaptación de herramientas de videoseguimiento de reciente creación, el presente estudio corroboró que la larva de pez cebra es un organismo valioso para la evaluación de marcadores de neurotoxicidad por exposición a contaminantes ambientales con una buena relación costo-efectividad. Los dos algoritmos de análisis desarrollados permitieron evaluar con una adecuada sensibilidad los efectos de tres contaminantes de relevancia actual. Asimismo, en el caso del ATR y Asi, los datos fueron consistentes con la literatura reportada para modelos murinos, lo que sugiere el potencial del uso del pez cebra en sus distintos estadios, como un modelo que complementa la información toxicológica obtenida de roedores, amortizando las desventajas de estos modelos en cuanto a costo, espacio e implicaciones bioéticas.

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado gracias a la incorporación de Nuevos PTC (UABC-PTC514) del Programa para el Desarrollo Profesional Docente de la Secretaría de Educación Pública. Un agradecimiento especial a Mayra López Cervantes por su apoyo en la crianza y reproducción de los organismos.

**REFERENCIAS**

- Bardullas, U., Giordano, M., & Rodríguez, V. M. (2011). Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(2), 263-272.
- Bardullas, U., Limón-Pacheco, J. H., Giordano, M., Carrizales, L., Mendoza-Trejo, M. S., & Rodríguez, V. M. (2009). Chronic low-level arsenic exposure causes gender-specific alterations in locomotor activity, dopaminergic systems, and thioredoxin expression in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 239(2), 169-177.
- Calderón, J., Navarro, M. E., Jimenez-Capdeville, M. E., Santos-Diaz, M. A., Golden, A., Rodríguez-Leyva, I.,... Diaz-Barriga, F. (2001). Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environmental Research*, 85(2), 69-76.
- Camacho, L. M., Gutiérrez, M., Alarcón-Herrera, M. T., Villalba, M. L., & Deng, S. (2011). Occurrence and treatment of arsenic in groundwater and soil in northern Mexico and southwestern USA. *Chemosphere*, 83(3), 211-225.
- Cao, J., Xu, X., Hylkema, M. N., Zeng, E. Y., Sly, P. D., Suk, W. A., ... Huo, X. (2016). Early-life exposure to widespread environmental toxicants and health risk: A focus on the immune and respiratory systems. *Annals of Global Health*, 82(1), 119-131.
- Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tillson, H. A., & MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicology and Teratology*, 13(6), 599-609.
- Crosby, E. B., Bailey, J. M., Oliveri, A. N., & Levin, E. D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, 49, 81-90.
- Del Razo, L. M., Garcia-Vargas, G. G., Garcia-Salcedo, J., Sanmiguel, M. F., Rivera, M., Hernandez, M. C., & Cebrian, M. E. (2002). Arsenic levels in cooked food and assessment of adult dietary intake of arsenic in the Region Lagunera, Mexico. *Food and Chemical Toxicology*, 40(10), 1423-1431.
- Eaton, D. L., & Gallagher, E. P. (2010). 1.01 –General overview of Toxicology. En *Comprehensive Toxicology* (vol. 1, pp. 1-46). US: Elsevier.
- Hoy, J. B., Cody, B. A., Karlix, J. L., Schmidt, C. J., Tebbett, I. R., Toffollo, S., ... Wielbo, D. (1999). Pyridostigmine bromide alters locomotion and thigmotaxis of rats: Gender effects. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 63(3), 401-406.
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews. Genetics*, 8(5), 353-367.
- Liu, Z., Wang, Y., Zhu, Z., Yang, E., Feng, X., Fu, Z., & Jin, Y. (2016). Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 148, 163-170.
- LSRtrack (s. f.). PRICA\_Analyze.zip [Carpetas con información]. Recuperado de <https://drive.google.com/file/d/0B3eZrXlrQP5eOFRpaGpzaUNabkk/view?usp=sharing>
- Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*, 19(Suppl. 1), 38-48.
- Peterson, R. T., & MacRae, C. A. (2012). Systematic approaches to toxicology in the zebrafish. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 433-453.
- Schnörr, S. J., Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., & Champagne, D. L. (2012). Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 228(2), 367-374.
- Steenbergen, P. J., Richardson, M. K., & Champagne, D. L. (2011). The use of the zebrafish model in stress research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(6), 1432-1451.
- Stewart, A. M., Gaikwad, S., Kyzar, E., & Kalueff, A. V. (2012). Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test. *Brain Research*, 1451, 44-52.
- 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.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48, 339-364.
- Wolansky, M. J., Gennings, C., DeVito, M. J., & Crofton, K. M. (2009). Evidence for dose-additive effects of pyrethroids on motor activity in rats. *Environmental Health Perspectives*, 117(10), 1563-1570.
- Zhou, Y., Cattley, R. T., Cario, C. L., Bai, Q., & Burton, E. A. (2014). Quantification of larval zebrafish motor function in multiwell plates using open-source MATLAB applications. *Nature Protocols*, 9(7), 1533-1548.