

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE PSICOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado en Psicología

Convocatoria Junio 2022

Modulación de los efectos conductuales y fisiológicos de la exposición prenatal a Clorpirifós mediante el tratamiento gestacional con un suplemento probiótico

Modulation of behavioral and physiological effects of prenatal chlorpyrifos exposure by gestational treatment with a probiotic supplementation

Autor: Mario Ruiz Coca

Tutor: Fernando Sánchez Santed

Cotutor: Cristian Pérez Fernández

Índice

Resumen/abstract.....	
Introducción.....	
Método.....	
Resultados.....	
Discusión.....	
Conclusión.....	
Referencias.....	
Anexo.....	

Resumen

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un trastorno del neurodesarrollo heterogéneo con una etiología muy compleja caracterizado por déficits de comunicación social de aparición temprana, deterioro social y comportamientos, actividades o intereses sensoriomotores repetitivos. Aunque es innegable el importante papel que la genética tiene en el autismo, también está modulado por variables ambientales externas. La exposición prenatal a Clorpirifós (CPF) ha demostrado tener efectos conductuales y moleculares a medio y largo plazo que recuerdan a los observados en pacientes con autismo. Además, una desregulación inmunológica, problemas gastrointestinales y disbiosis son comorbilidades comunes en este trastorno. En los últimos años se han establecido relaciones entre la microbiota intestinal y el TEA. De hecho, se ha demostrado que la exposición al CPF induce disbiosis en modelos animales. Basándonos en esto, consideramos que los comportamientos similares a los del TEA tras la exposición gestacional al CPF podrían revertirse exponiendo a los animales a un suplemento probiótico durante la gestación. También nos propusimos estudiar los niveles de expresión génica de genes importantes para los principales sistemas de neurotransmisión y la expresión de algunas citoquinas como marcador de neuroinflamación de muestras de cerebro en crías de 7 días mediante RTqPCR. Se observó el rendimiento de las ratas Wistar en el *3-chambered test*, *open field test* y la emisión de vocalizaciones ultrasónicas por parte de las crías (PND7) en una condición de aislamiento. Hemos encontrado que la suplementación con probióticos afectaba al desarrollo y a diferentes comportamientos (motricidad y vocalizaciones) durante los períodos neonatal y adolescente y a la expresión de genes de los principales sistemas de neurotransmisión, principalmente dentro del sistema GABAérgico, Glutamatérgico y genes tan esenciales para la regulación del comportamiento social como son aquellos que codifican para los receptores de Oxitocina y Vasopresina. En futuros estudios se deberán analizar los niveles de proteínas relevantes en el cerebro y la composición de la microbiota intestinal. Future studies should analyse the levels of relevant proteins in the brain and the composition of the gut microbiota.

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a heterogeneous neurodevelopmental disorder with a complex etiology characterized by early-appearing social communication deficits, social impairment and repetitive sensory-motor behaviours, activities or interests. Although the important role of genetics in autism is undeniable, it is also modulated by external environmental variables. The prenatal exposure to Chlorpyrifos (CPF) has proved to have medium and long-term behavioural and molecular effects that are reminiscent of those observed in autism patients. Furthermore, immune dysregulation, gastrointestinal issues and dysbiosis are common comorbidities in this disorder. In recent years, links between the gut microbiota and ASD have been established. In fact, CPF exposure has been proved to induce dysbiosis in animal models. Based on this, we consider that ASD-like behaviours following gestational CPF exposure could be reverted by exposing animals to a probiotic supplement during gestation. We also aimed to study the gene expression levels of important genes for the principal neurotransmitter systems and the expression of some cytokines as a marker of neuroinflammation. Wistar Rats' performance in the 3-Chambered Test, the Open Field Test and the emission of ultrasonic vocalizations by pups (PND7) in an isolated condition were observed. RTqPCR was conducted in microplates, composed of SYBR green master mix, nuclease-free water, primers, and the cDNA (total reaction 10uL). We found that probiotic supplementation affected development and different behaviours (motricity, and vocalizations) during neonatal and adolescent ages and the expression of genes of the main neurotransmitter systems, mainly within the GABAergic system, lutamatergic system and genes as essential for the regulation of social behaviour as those coding for Oxytocin and Vasopressin receptors.

Introducción

El trastorno del espectro autista (TEA) es un término referido a un complejo trastorno del desarrollo de naturaleza biológica con múltiples causas y factores etiológicos. Está caracterizado por diferentes grados de afectación de la sociabilidad, las habilidades de comunicación e interacción social y la presencia de patrones repetitivos y estereotipados de conducta, actividades e intereses (5th ed.; DSM-V; American Psychiatric Association, 2013). Los déficits en sociabilidad y comunicación están caracterizados por alteraciones en el procesamiento de los estímulos sociales afectando a la comprensión y percepción de los pensamientos y emociones de otras personas (Barthélémy y cols., 2019), aproximaciones sociales anormales y una disminución significativa del intercambio de intereses, emociones y afectos con otras personas, alteraciones de la conducta no verbal y verbal, escaso desarrollo y comprensión de la relaciones socioafectivas, y falta de ajuste conductual a las demandas del contexto social. En cuanto a la presencia de patrones repetitivos y estereotipados de conducta, actividades e intereses; se observan movimientos, uso de objetos o habla de manera estereotipada y repetitiva, rígida adherencia a las rutinas e intereses altamente restrictivos (Lord y cols., 2018). También se encuentran alteraciones en las funciones ejecutivas (Barthélémy y cols., 2019), hiperactividad o hipoactividad ante la estimulación sensorial o una total insensibilidad hacia determinados estímulos (Lord y cols, 2018; Robertson y Baron-Cohen, 2017) y alteraciones en otras esferas como la motricidad, la atención, la memoria o el control inhibitorio (Biosca -Brull y cols, 2021).

Los signos y síntomas han de estar presentes en las primeras fases del desarrollo, aunque podrían no llegar a manifestarse totalmente hasta que la demanda social supera las capacidades de la persona, o pueden estar enmascarados por estrategias compensatorias aprendidas a lo largo del ciclo vital. Para el diagnóstico, el DSM-V especifica que los síntomas deben causar deterioro clínicamente significativo en las principales áreas del funcionamiento habitual de la persona y no ser explicados por discapacidad intelectual, trastornos del lenguaje o un retraso global en el desarrollo (5th ed.; DSM-V; American Psychiatric Association, 2013). Debido a que no existen evidencias sobre la existencia de marcadores biológicos precisos, el diagnóstico debe llevarse a cabo en base a la conducta. Estas manifestaciones del trastorno varían de acuerdo con la edad, el sexo y el nivel de desarrollo del sujeto; siendo los varones los que tienen una mayor predisposición a presentar TEA (García-Franco y cols, 2019). El ratio de hombre-mujer en los registros clínicos en el autismo es de 4:1 y se desconocen los mecanismos

a la base de este dimorfismo sexual, pudiendo tener el sexo femenino un efecto protector sobre la predisposición a padecer autismo (Havdahl y cols, 2021).

Aunque hoy en día las causas del TEA son bastante desconocidas, a la base de su etiología encontramos una fuerte carga genética que puede oscilar del 40 al 80 % y del 74 al 93 % dependiendo del estudio (Chaste y Leboyer, 2022; Lord y cols., 2018). Los modelos animales también evidencian esta fuerte carga genética como es el caso de los modelos knockout del gen FMR1 (síndrome de X frágil), los modelos de roedores BTBR, entre otros (Biosca-Brull, 2021). Aunque la genética por lo tanto tiene un innegable papel etiológico en el TEA, cada vez hay más evidencia acerca de que el riesgo a padecer TEA es modulado por variables ambientales externas que tienen influencia en el curso y la severidad de los fenotipos observados. Los principales factores ambientales encontrados relacionados con el autismo son la presencia de estresores perinatales, infecciones, la exposición a agentes tóxicos (como metales pesados, contaminantes orgánicos persistentes, ácido valproico, plaguicidas organofosforados, etc.), las condiciones metabólicas de la madre y la dieta, el estatus socioeconómico y las relaciones familiares disfuncionales (Biosca-Brull, 2021; Lord y cols., 2018). En las últimas décadas la prevalencia de este tipo de patologías ha aumentado considerablemente, lo cual no puede explicarse en base a la carga genética. Parte de este aumento es fruto de los cambios en los criterios diagnósticos pero dichos cambios no explican todo este fenómeno, haciéndose imprescindible hablar de factores ambientales externos en la explicación de esta patología. Se han visto fuertes influencias de la exposición a neurotóxicos, siendo las exposiciones ambientales en períodos críticos del desarrollo como la etapa gestacional y la infancia temprana más propensos a producir efectos neurológicos y conductuales a largo plazo (Guardia-Escote y cols., 2021).

Los compuestos organofosforados (OP) han sido ampliamente utilizados a lo largo de todo el mundo por su efectividad como plaguicida. El principal mecanismo de acción de los OP es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) dando como resultado la acumulación del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en las sinapsis y la sobreestimulación tanto del sistema nervioso central (SNC), como del periférico (Sánchez-Santed y cols., 2016). En el caso de los OP, al ser sustancias químicas liposolubles, son capaces de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (BHE) (Guardia-Escote y cols., 2021). Los OP como el clorpirifos (CPF), el paratión y el diazinón han sido relacionados con alteraciones en el desarrollo del cerebro en una gran cantidad de estudios, con efectos a largo plazo tanto con la

exposición postnatal como prenatal (He y cols., 2022; Guardia-Escote y cols., 2021). La exposición a dosis muy bajas de CPF también ha demostrado producir efectos neurotóxicos; encontrando déficits en memoria y aprendizaje en la adultez, en la conducta social innata y aprendida y en la locomoción (Lee y cols., 2015). Estos déficits funcionales no son causa de la clásica inhibición de la AChE, sugiriendo un posible mecanismo de acción no colinesterásico del CPF a bajas dosis (Lee y cols., 2015; Perez-Fernandez, 2020). En humanos, aunque los estudios acumulados son muy heterogéneos y algunos autores no han encontrado efectos a largo plazo en relación con la exposición a CPF, las evidencias apuntan hacia una relación entre la exposición a CPF con efectos cognitivos adversos y características del neurodesarrollo típicos del TEA. Cuando se evalúan diferentes aspectos en relación a la conducta, las capacidades cognitivas y el neurodesarrollo, hay estudios que muestran ciertos efectos con la exposición postnatal y otros que evidencian efectos con la exposición prenatal (Biosca-Brull, 2021; Guardia-Escote, 2021). Otro factor relevante es el sexo, observándose que los hombres son más sensibles a las alteraciones neurológicas tras la exposición a los plaguicidas OP, con la excepción de ciertos déficits motores que presentan una mayor incidencia en mujeres (Guardia-Escote, 2021).

En modelos preclínicos de exposición postnatal a CPF en el predestete, estadio del desarrollo equivalente a la fase perinatal en humanos (Perez-Fernandez, 2020), algunos estudios encuentran un incremento en la actividad locomotora (Perez-Fernandez y cols., 2020), mientras que otros estudios no evidencian este efecto, incluso encuentran una disminución en dicha actividad (Venerosi y cols., 2008; Dam y cols., 2000). En este tipo de exposición, no se han observado alteraciones en la sociabilidad ni en la preferencia por la novedad social (Venerosi y cols., 2008; Perez-Fernandez y cols., 2020). Tampoco se han visto alteraciones en los procesos atencionales, memoria, aprendizaje espacial, ansiedad (Perez-Fernandez, 2020) o en las tasas de emisión de ultrasonidos en una condición de aislamiento social (Ricceri y cols., 2003). Todos estos resultados en modelos preclínicos hacen difícil la asociación entre la administración postnatal de CPF con el TEA. Sin embargo, cuando la exposición se produce durante el período gestacional, sí que se pueden observar un amplio rango de efectos como malformaciones, retrasos en el desarrollo o alteraciones funcionales (Guardia-Escote, 2021). Varios estudios muestran cómo la exposición prenatal a CPF produce hiperactividad y alteraciones en la actividad locomotora (Levin y cols., 2002; Icenogle y cols., 2004; Silva y cols., 2017). Además, en la exposición prenatal a CPF sí que se han encontrado fuertes evidencias de déficits en la sociabilidad innata y aprendida y en la comunicación social (Lan y

cols., 2017; Lan y cols., 2019; Morales-Navas y cols., (2020). Por lo tanto, es la exposición prenatal a CPF la que parece ser un posible factor ambiental externo en la generación de un fenotipo que recuerda al observado en pacientes TEA.

En personas TEA, se han reportado alteraciones cerebrales como el aumento del número de neuronas en la corteza prefrontal y el incremento general del peso cerebral. Además, los estudios de neuroimagen funcional han revelado anomalías en la conectividad del lóbulo frontal, en la activación de la amígdala y de áreas del lenguaje, así como una morfología cortical general alterada (Vuong y Hsiao, 2017). En cuanto a los principales sistemas de neurotransmisión cerebrales, en el TEA se han observado alteraciones en el sistema GABAérgico posiblemente relacionados con alteraciones en los equilibrios excitatorios/inhíbitorios (Eissa y cols., 2018): reducción del número de células de Purkinje GABAérgicas en el cerebelo, un bajo nivel de las enzimas encargadas de su síntesis (GAD65 y GAD67) en el cerebelo y en la corteza parietal, una reducción de la subunidad α del receptor de GABA en la formación hipocámpal y corteza entorrinal, entre otros (Zhubi y cols., 2014; Blatt, 2005). También se han reportado alteraciones en el sistema colinérgico (Perry y cols., 2001; Eissa y cols., 2018), glutamatérgico, dopaminérgico y serotoninérgico (Eissa y cols., 2018; Morales-Navas., 2021). Por último, niños diagnosticados de autismo, disponen de bajos niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Zhubi y cols., 2014). En modelos preclínicos de exposición a CPF se han visto alteraciones muy relacionadas tanto en el sistema colinérgico y GABAérgico, una reducción de la expresión de BDNF (Perez-Fernandez y cols., 2020), o alteraciones funcionales en el sistema serotoninérgico (Aldridge y cols., 2005) entre otros.

Otro aspecto importante es que en el TEA se ha observado comorbilidad con otro tipo de afecciones como epilepsia, TDAH, obesidad, discapacidad intelectual, ansiedad, ciertas condiciones inmunológicas, trastornos del estado de ánimo y trastornos del sueño, problemas gastrointestinales (diarrea, permeabilidad intestinal, dolor abdominal, etc.), déficits metabólicos y disbiosis (Tuchman, 2013; Vuong y Hsiao, 2017; Havdahl y cols., 2021; Lord y cols., 2018). Con relación a esta última, recientemente se han establecido relaciones entre la microbiota intestinal, el eje intestino-cerebro y la manifestación de conductas características del TEA. En los modelos de roedores germ-free en los que se crían organismos libres de microbiota, se muestran déficits en sociabilidad e investigación social, reduciéndose la motivación a interactuar con un congénere frente a un objeto inanimado o la preferencia por la

novedad social. También se ha demostrado cómo la microbiota puede ser un importante modulador de las conductas repetitivas (Crumeyrolle-Arias y cols., 2014; Desbonnet y cols., 2014; Sampson y Mazmanian, 2015). Además, presentan alteraciones del SNC en los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico y en la expresión de BDNF (Liu y cols., 2016; Sampson y Mazmanian, 2015). Estos estudios proporcionan evidencias acerca de la posible función moduladora que la microbiota tiene sobre la conducta social en general y el fenotipo TEA en particular. Existen diversos mecanismos por los cuales la microbiota puede modificar el sistema nervioso y la conducta, entre los que encontramos la activación directa del nervio vago. Además, la microbiota produce ciertos metabolitos con la capacidad de atravesar la BHE como precursores de vitaminas, neurotransmisores, ácidos grasos de cadena corta, hormonas, etc. La microbiota es capaz de metabolizar la fibra en ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), capaces de atravesar la BHE. Se ha visto que un SCFA (acetato) puede alterar los niveles de glutamato, glutamina y GABA y que varios de estos SCFAs son capaces de inducir la producción directa de serotonina (5-HT) (Sampson y Mazmanian, 2015), todos ellos sistemas relacionados con el fenotipo TEA (Morales-Navas, 2021). Una última ruta de influencia es la regulación del sistema inmune mediante la facilitación de la liberación de citoquinas proinflamatorias o su producción directa. Estas tienen una fuerte influencia en la conducta del organismo, el estado de ánimo y la neurodegeneración. La microbiota es capaz de producir sustancias que activan varias células del sistema inmune produciendo citoquinas proinflamatorias: IL-1a, IL-1b, TNFa e IL-6. Estas citoquinas son capaces de atravesar la BHE y actuar sobre receptores que expresan en neuronas y glía alterando su fisiología y desencadenando una respuesta inflamatoria en el SNC (Sampson y Mazmanian, 2015).

La exposición a CPF también se ha relacionado con disbiosis intestinal en múltiples estudios con modelos animales tanto en la adolescencia como en la adultez. Guardia-Escote y cols. (2020) encuentran como la exposición a CPF reduce la abundancia relativa del género *Streptococcus*. También se ha visto que es capaz de disminuir en ratas la abundancia relativa de *Lactobacillus* y alterar la de *Bifidobacterium*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y muchos otros géneros de bacterias, la cantidad de SCFAs y aumentar la permeabilidad del intestino; todas ellas condiciones asociadas con la disbiosis intestinal y el TEA (Guardia-Escote y cols., 2020; Perez-Fernandez y cols., 2020; Fang y cols., 2018; Condet y cols., 2015).

Varios estudios muestran mejoras significativas en la gravedad del TEA y en variables fisiológicas de inflamación con el empleo de probióticos que contienen *Lactobacillus*

Plantarum y otras cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Martínez-González y Andreo-Martínez, 2020). Un estudio llevado a cabo por Shaaban y cols. (2018) encontró que en una muestra de 30 niños TEA hubo mejoras significativas en la gravedad del autismo con la administración de un probiótico formado por cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El tratamiento con probióticos también ha demostrado ser eficaz tanto en el restablecimiento de la conducta social en modelos animales *germ-free* o con alteraciones de la microbiota, como en la disminución en modelos animales de autismo de los déficits en sociabilidad y la restauración de las anormalidades conductuales observadas en actividad locomotora y en la frecuencia de USV (Fung y cols., 2017; Hsiao y cols., 2013; Vuong y Hsiao, 2017).

Otra condición ambiental, la deficiencia durante la gestación de vitamina D, también se ha visto relacionada con patologías neuropsiquiátricas como el autismo, la esquizofrenia y el Parkinson. Esta vitamina cumple una importante función tanto en el cerebro en desarrollo como en el SNC adulto (Harms y cols., 2011). La vitamina D es capaz de modular los canales de Ca y disminuir los niveles de excitotoxicidad, de incrementar los niveles de antioxidantes en el cerebro y de aumentar la recaptación de especies de oxígeno reactivo (Harms y cols., 2011), fenómenos relacionados con el estrés oxidativo. Los estudios sugieren un aumento del estrés oxidativo en el autismo que puede contribuir al desarrollo de esta enfermedad (Chauhan y Chauhan, 2006). Se ha visto que el tratamiento gestacional con vitamina D es capaz de bloquear los déficits en sociabilidad, conducta estereotipada y aprendizaje emocional en modelos de autismo (Vuillermot y cols., 2017).

Por lo tanto, partiendo de la relación que se ha establecido entre la exposición prenatal a CPF y ciertos comportamientos tipo-TEA, nuestro estudio pretende estudiar cómo afecta esta exposición a la descendencia. Además, nuestro principal objetivo es observar si estas alteraciones pudieran verse revertidas mediante un tratamiento probiótico combinado con un suplemento de vitamina D durante la gestación. Se espera que el probiótico sea capaz de influir en la descendencia, ya que se ha encontrado que el feto puede ser colonizado por bacterias a través de la placenta y el líquido amniótico. También puede influir en el desarrollo del feto mediante cambios en la salud de la propia madre (Swartwout y Luo, 2018). Nuestra hipótesis principal es que la exposición prenatal en ratas a CPF generará un fenotipo que recuerda al observado en el TEA, esperándose que el tratamiento gestacional con el probiótico bloquee o reduzca los efectos neurotóxicos del CPF en el desarrollo general y motor, en sociabilidad, en locomoción y en la expresión genética en el SNC.

Método

Animales experimentales

La muestra estuvo conformada por 158 ratas Wistar criadas por nosotros en nuestras instalaciones. Se utilizaron ratas ya que esta especie ha demostrado ser un modelo de roedor más apropiado que el ratón para el estudio de la sociabilidad y muchos otros efectos conductuales (Ellenbroek y Youn, 2016). En el día postnatal (PND) 1 (el nacimiento se fijó como PND0), todas las crías fueron separadas de sus madres originales y distribuidas aleatoriamente para asegurar una población representativa y evitar el sesgo en relación con el origen genético de cada madre. El destete fue realizado en el PND21 (4 animales del mismo sexo por jaula). La habitación fue aclimatada a una temperatura constante de 22 ± 2 °C y una humedad de $50 \pm 10\%$ en ciclos de 12 horas con luz a las 19:00h. Los animales jóvenes fueron alimentados con comida y agua *ad libitum*. El presente estudio fue incluido en el proyecto PID2020-113812RB-C32 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y FEDER. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de investigación animal de la Universidad de Almería, cumpliendo con las guías Arrive de experimentación animal.

Agente neurotóxico

El CPF [O, O-dietil O-3,5,6-tricloropiridina-2-il fosforotioato (Pestanal, Sigma Aldrich)] fue administrado mediante inyección subcutánea a las madres embarazadas del día gestacional (GD) 12.5 al 15.5, entre las 12 y las 13:30h. La mitad de los animales fueron asignados aleatoriamente a la exposición a CPF o al vehículo (DMSO). Este periodo gestacional fue elegido debido a la relación que se ha establecido entre la exposición a CPF en esta ventana del desarrollo y los resultados conductuales y moleculares encontrados (Morales-Navas y cols., 2021). La dosis de CPF administrada fue de 1 mg/kg/mL al día utilizando como vehículo el DMSO (1 mL/kg), ya que es un importante disolvente capaz de diluir una gran variedad de moléculas que de otro modo serían poco solubles (Galvao y cols., 2014). Para la condición de control, el DMSO fue administrado por la misma vía y el mismo volumen.

Suplemento probiótico

El tratamiento probiótico estaba compuesto por cepas activas de las bacterias *Lactobacillus Plantarum* (KABP 023, CECT 7485) y *Levilactobacillus Brevis* (KABP 052, CECT 7480) ya que se ha visto que muchas de las especies *Lactobacillus* son más sensibles a

CPF que otras (Condette y cols., 2015). Este suplemento de uso comercial fue proporcionado por la empresa AB BIOTICS y estaba formado por $2e+11$ cfu/g de cepas activas de las bacterias anteriormente mencionadas (asegurando que cada sujeto recibiera $2e+9$ cfu/g), 0,01 mg de vitamina D, 1623 mg de glucosa, 266,5 mg de maltodextrina, 10 mg de Dióxido de Silicio E-551 y 0,5 mg de fructosa. Se implementó su tratamiento a las madres embarazadas por vía oral durante todo el período gestacional en bebederos con una bola de seguridad para garantizar que se desperdicie la menor cantidad posible (las características de estos bebederos se encuentran ilustrada en el Anexo I). Se utilizó como vehículo 10 ml de PBS y a las madres del grupo control se les administró mediante la misma vía el mismo volumen de PBS.

Evolución del peso corporal y batería funcional (PND1-30)

Con el objetivo de entender los posibles efectos en el desarrollo que la exposición a CPF y el tratamiento probiótico pueden llegar a tener, se recogieron diferentes medidas mediante una batería funcional compuesta por la evolución del peso corporal, la apertura ocular y el desarrollo neuromotor. Todas las pruebas se realizaron en el animalario entre las 9 y las 12 de la mañana con luz tenue y las condiciones de temperatura y humedad anteriormente descritas. El pesaje se realizó en los PND1, 5, 10, 15, 21 y 30; la apertura ocular del PND12-15 y las variables de la batería neuromotora fueron recogidas en el PND16. La apertura ocular fue puntuada con 0 (ambos ojos cerrados), 1 (un sólo ojo abierto) y 2 (ambos ojos abiertos). Estas puntuaciones directas fueron transformadas después en porcentajes (0, 50 y 100%, respectivamente). Respecto a la batería neuromotora, en un primer lugar la capacidad de agarre fue evaluada arrastrando a la cría por una rejilla y valorando su capacidad de agarre en las puntuaciones directas 0 (baja capacidad de oponer resistencia), 1 (cuando se observa cierta resistencia al desplazamiento) y 2 (fuerte capacidad de oponer resistencia). Seguidamente, se situó a la cría en una pendiente inclinada (60°) y se valoró su capacidad de adherencia durante 15 segundos valorando con puntuaciones de 0 (incapacidad de mantenerse adherida), 1 (cuando presentó ciertas dificultades) y 2 (capacidad desarrollada completamente). Por último, se valoró su capacidad de escalada en la misma pendiente dividiendo esta en 3 secciones, situando en el final un refuerzo de comida y a la rata en el principio. Se valoró como 0 (incapacidad de escalar más allá de la primera sección), 1 (sección intermedia) y 2 (escalada hasta la última sección de la prueba).

Pruebas conductuales

Vocalizaciones ultrasónicas (USV)

Las ratas (PND 7) fueron separadas de sus madres 50 minutos antes a una habitación cercana a la experimental con sus respectivas camadas y fueron cubiertas por algodón para reducir cambios bruscos en la temperatura. Para la grabación de USV se aisló durante 5 minutos a cada infante en una cámara insonorizada (80×60×70 cm) que se muestra en el Anexo II, y la grabación se obtuvo con un micrófono (*Dodotronic ultramic 250k*) posicionado aproximadamente a unos 10 cm del animal. Los USVs fueron procesados usando el *software SeaWave v2.0* (CIBRA) con un formato de 16 bits y 250 kHz. El orden de registro se contrabalanceó con respecto a la condición de tratamiento, pasando la prueba en un primer lugar las crías del grupo control y luego las crías del grupo de exposición a CPF con el objetivo de evitar un sesgo de hora. Se controlaron la humedad y la temperatura de la sala en función de las condiciones previamente descritas en los animalarios, la iluminación de la fase preexperimental (luz tenue) y la iluminación en la fase de aislamiento (ausencia de luz). La evaluación de USV fue llevada a cabo entre las 9 y las 12 am. El programa utilizado para la observación y el análisis de las llamadas fue *DeepSqueak* con el cual, con la ayuda de una red neuronal convolucional regional (*Faster-RCNN*) entrenada por nosotros para la detección de llamadas, se seleccionaron manualmente las ultravocalizaciones comprendidas entre los 30 y los 65 kHz, ya que la literatura ha mostrado que esta es la frecuencia a la que son moduladas las llamadas en este tipo de situaciones de aislamiento por las crías de rata (Portfors, 2007). La condición de aislamiento y la grabación de USV se llevó a cabo en el PND 7, debido a que este ha demostrado presentar un pico óptimo de emisión de llamadas en la rata (Wöhr y Schwarting, 2008; Hofer y cols., 2001). En total se obtuvieron 67 grabaciones (Machos: 8 DMSO + PBS, 11 CPF + PBS, 7 DMSO + Probiótico, 6 CPF + Probiótico; Hembras: 10 DMSO + PBS, 10 CPF + PBS, 8 DMSO + Probiótico, 7 CPF + Probiótico). Los parámetros analizados mediante el *software DeepSqueak* como variables dependientes fueron el número total de llamadas, el número de llamadas por minuto, la latencia en emitir la primera llamada, la media de la frecuencia principal y el pico principal de frecuencia.

Open Field Test

La evaluación de la actividad locomotora fue realizada en 8 jaulas plexiglás de actividad (39x39x15 cm) que se muestran ilustradas en el Anexo III. Se utilizó como tecnología de registro células fotoeléctricas conectada a un ordenador. La prueba se realizó entre las 9-12am, con una iluminación tenue y las mismas condiciones de temperatura y humedad anteriormente

descritas. La conducta fue automáticamente grabada con VersaMax® y los datos fueron recogidos con el *software* VersaData® (PLC Control System SL). Las variables recogidas fueron la distancia total recorrida (cm), la actividad vertical (*rearing*), el tiempo en movimiento (s), el tiempo que se encuentra en el margen o periferia (s), el tiempo en el centro (s) y la velocidad (cm/s). Las ratas se llevaron a la habitación experimental donde estuvieron 1 hora en habituación antes de realizar la prueba (con una duración de 30 min). Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en las diferentes jaulas experimentales, que antes fueron limpiadas con etanol al 70%.

Análisis moleculares

Protocolo de sacrificio

24 animales (12 hembras y 12 machos) fueron sacrificados en un número idéntico de sujetos para cada uno de los 8 grupos experimentales ($n = 3$). Justo después de pasar la prueba de USV en el PND7, fueron decapitados. Los cerebros de las ratas fueron diseccionados rápidamente extrayendo muestras de ambos hemisferios completos. Las muestras se guardaron en recipientes libres de RNasas (1.5 ml) y fueron inmediatamente congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar la degradación del RNA. Todos los materiales utilizados durante la extracción del tejido fueron autoclavados o tratados con ZAP (Invitrogen).

Expresión genética: Reacción en cadena de la polimerasa (RTqPCR)

Las muestras fueron tratadas utilizando el reactivo Trizol (Ambion) con el objetivo de aislar el RNA de tal forma que se encuentre libre de contaminación de proteínas y DNA. La concentración total de RNA fue cuantificada por fluorimetría mediante Qubit (Invitrogen). Luego todas las muestras fueron normalizadas a una dilución de 100 ng/uL, usando esta concentración para la retrotranscripción a cDNA (20 uL). Estos 20 uL de cDNA se diluyeron en agua libre de RNasas (factor 1:10), dilución final que fue utilizada para la reacción qPCR. Las placas estaban formadas por 48 micropozos a los que se añadía a cada uno SYBR green master mix (5 uL), agua libre de RNasas (3 uL), primers de los genes de interés (1 uL) y el cDNA (1 uL) teniendo como resultado 10 uL por micropozo. Las muestras fueron añadidas en duplicados y la reacción y el análisis se efectuó en un termociclador (Step one v2.2.2, Applied Biosystems). Los valores en Ct y la melting curves fueron revisados para detectar patrones anormales en cada reacción. Se utilizó como gen housekeeping, primers diseñados en secciones de exón del gen *gapdh* y para ver la posible contaminación genómica de las muestras se

utilizaron primers diseñados en secciones de intrón de este mismo gen. Se aseguró que las muestras no expresaron contaminación genómica, ratios de expresión muy temprana de los genes analizados (< 30 Ct) o anomalías en sus melting curves. Por último, los valores Ct de cada gen se normalizaron con respecto a los observados en el Housekeeping (Δ Ct) y con respecto al control interno ($\Delta\Delta$ Ct), el cual es la diferencia de cada Δ Ct entre el valor Δ Ct más alto. Este $\Delta\Delta$ Ct fue luego transformado al fold change (2^{POT}) que se muestra en la sección de resultados. Se analizaron un total de 29 genes de los principales sistemas de neurotransmisión y citoquinas proinflamatorias.

Análisis estadístico

Las medidas de peso corporal de los animales que fueron evaluados hasta el PND30, el porcentaje de apertura ocular, la actividad locomotora y la progresión del total de USVs en cada minuto se analizaron mediante un medidas repetidas (ANOVA) con tres factores; *Sexo* con dos niveles (masculino y femenino), *Exposición* con dos niveles (DMSO y CPF) y *Probiótico* con dos niveles (probiótico y PBS). Para el peso corporal en los primeros días de vida de la muestra completa, las variables de la batería neuromotora (capacidad de agarre, adherencia y escalada), las de USVs y la velocidad en Open Field se utilizó un análisis de varianza two-way ANOVA con esos mismos factores. Para la RTqPCR, los datos se obtuvieron mediante el software StepOne (v2.2.2). Las medias de los valores Ct fueron transformadas a un fold change después de normalizarlos con los Ct del *housekeeping*. Se realizó entonces un two-way ANOVA para cada gen individualmente con dos de los factores anteriormente descritos; *Exposición* y *Probiótico*. No se utilizó para este último análisis el factor *Sexo* porque con anterioridad, la realización de un análisis multivariante de varianza (MANOVA), nos permitió descartar su uso en el posterior análisis ya que no se observaron efectos significativos de interacción del *Sexo* con el resto de factores.

Resultados

Evolución del Desarrollo y Batería Funcional

La evaluación de la evolución del peso corporal durante el periodo postnatal (PND1 a PND30) de las ratas que no fueron utilizadas para el análisis molecular y USV, mostró un aumento significativo del peso corporal en el grupo tratado con probiótico en base a la interacción *Probiótico x PND* [$F(1,3,101.9) = 9.258$, $p = 0.001$]. Se observaron dichas diferencias en el PND5, 10, 15, 21, 30 ($p = 0.004$, $p = 0.008$, $p < 0,001$, $p = 0,001$, $p = 0,001$, respectivamente); a excepción del PND1 donde no se observa este efecto ($p = 0.222$). Sin embargo, cuando se añade a la muestra todos los sujetos utilizados, observamos un efecto en la interacción *Probiótico x Exposición* [$F(1,150) = 5,791$, $p = 0,017$] en la primera semana de vida. Como podemos observar en la Figura 1, los grupos expuestos a CPF que han recibido probiótico tienen significativamente un mayor peso corporal que los que no han recibido este tratamiento ($p < 0,001$).

La observación de la apertura ocular muestra un efecto significativo en la interacción *PND x Probiótico* [$F(1,79) = 5.115$, $p = 0.026$]. En el PND13 se observa un mayor porcentaje de desarrollo del sistema visual en las ratas que han recibido el probiótico ($p = 0.003$), aunque estas diferencias se eliminan en el PND14 ($p = 0.519$). La batería neuromotora mostró diferencias significativas en los grupos expuestos al probiótico con respecto a los controles tanto en la capacidad de agarre [$F(1,79) = 8.107$, $p = 0.006$] como en la capacidad de escalada [$F(1,79) = 10.460$, $p = 0.002$], donde los grupos tratados con probiótico presentan un desarrollo más temprano en estas variables motoras que los controles ($p = 0,006$, $p = 0,002$) independientemente de la exposición gestacional a CPF. La capacidad de adherencia en un plano inclinado no presentó diferencias significativas entre los grupos expuestos o no a probiótico [$F(1,79) = 0,184$, $p = 0,669$]. Todos estos resultados se muestran en la Figura 1.

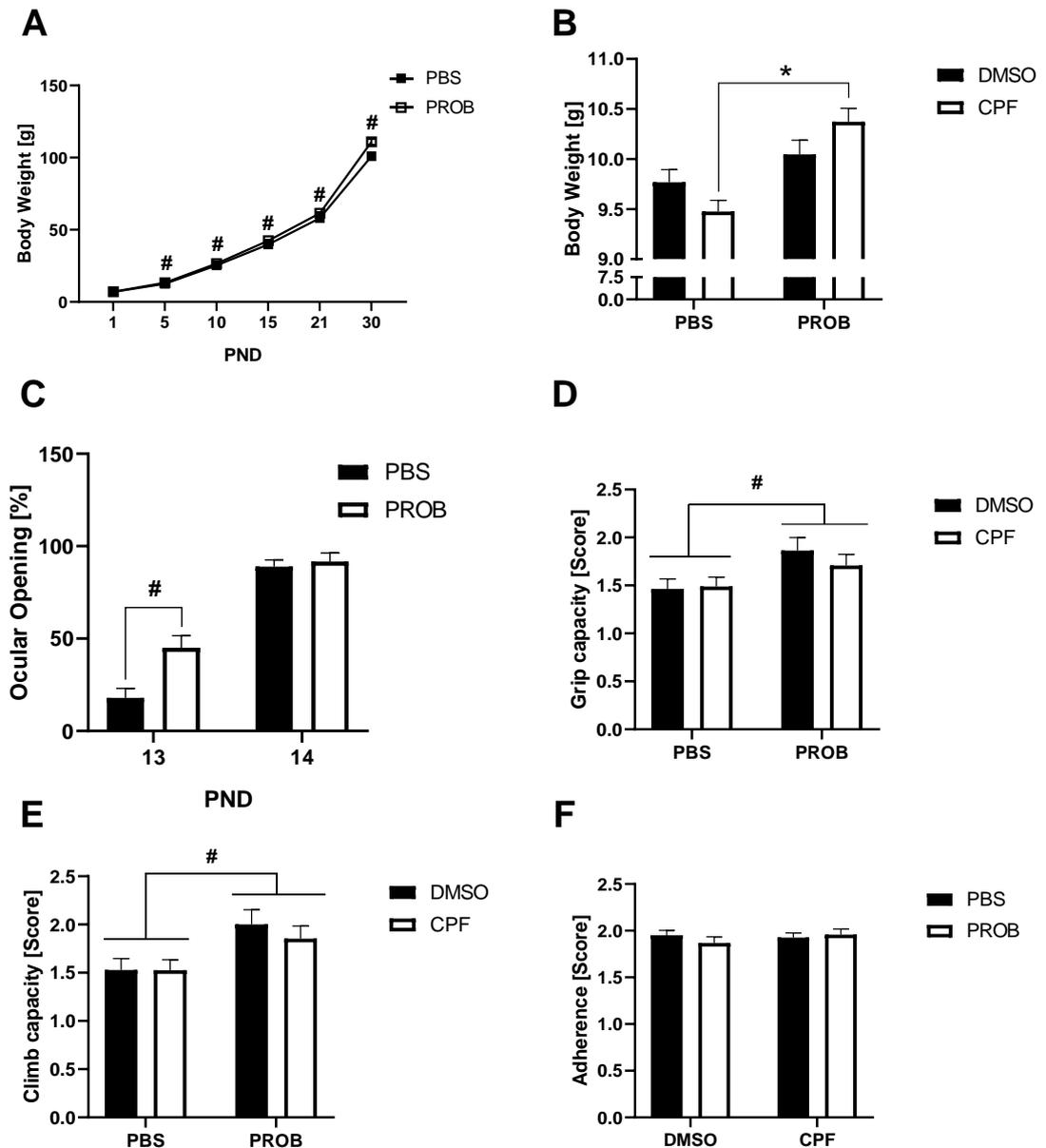


Figura 1. Desarrollo y Batería funcional. La evolución del peso corporal a lo largo de los PND1-30 representadas por la media (\pm SEM) (A), media (\pm SEM) del peso corporal en los primeros días de vida de toda la muestra (n=158) (B), porcentaje de apertura ocular en los PND13 y 14 (C) y las medias (\pm SEM) de las puntuaciones en capacidad de agarre (D), escalada (E) y adherencia (F) de la batería funcional. * $p < 0,05$ por efecto de la exposición a CPF; # $p < 0,05$ por efecto del tratamiento probiótico.

Emisión de Ultrasonidos (USV)

Con respecto al número total de llamadas, se han encontrado efectos significativos en la interacción *Probiótico x Exposición* [$F(1,59) = 6.171$, $p = 0.016$]. En el grupo de animales expuestos a DMSO, la administración gestacional del suplemento probiótico aumenta el

número total de llamadas de forma significativa ($p=0.012$), aunque este efecto es bloqueado por la exposición prenatal a CPF ($p=0.356$), donde los animales controles expuestos a probiótico generan una mayor tasa de USVs comparados con los CPF ($p=0.037$).

Cuando observamos la progresión del número total de llamadas en el tiempo, en los 4 primeros minutos observamos efectos significativos en la interacción *Probiótico x Exposición* [$F(1,59)=5.338$, $p=0.024$; $F(1,59)=6.755$, $p=0.012$; $F(1,59)=4.417$, $p=0.040$; $F(1,59)=5.276$, $p=0.025$]. Como se observa en la Figura X, los animales tratados con el probiótico muestran un aumento en el número total de llamadas en cada uno de los 4 primeros minutos ($p=0.030$, $p=0.007$, $p=0.025$, $p=0.033$, respectivamente), pero cuando son expuestos al CPF este efecto es bloqueado únicamente en los 2 primeros minutos ($p=0.025$, $p=0.028$). No hubo diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la duración media de las llamadas, la frecuencia media, ni la latencia de emisión de la primera llamada. Todos estos resultados se muestran en la Figura 2.

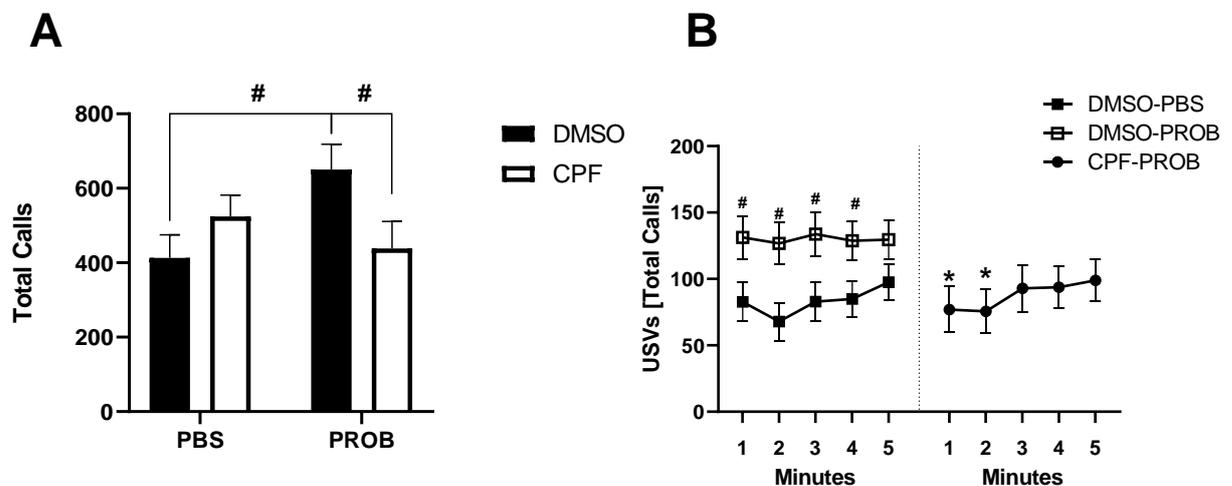


Figura 2. USVs. Total de llamadas emitidas por los diferentes grupos (A) y progresión del número de llamadas en cada minuto, donde se puede observar el efecto de aumento en el número de USV que produce el tratamiento probiótico en el grupo control y el bloqueo de estos efectos por parte del CPF (B). * $p < 0,05$ por efecto de la exposición a CPF; # $p < 0,05$ por efecto del tratamiento probiótico.

Open Field Test

Se han encontrado efectos significativos en la interacción *Probiótico x Distancia Total Recorrida* [$F(3,36,238,73)=5,878$, $p < 0.001$] y en la interacción *Probiótico x Tiempo en Movimiento* [$F(3,81,270,44)=4,922$, $p=0,001$]. Los grupos expuestos al probiótico presentan

una mayor distancia total recorrida que el grupo control en los 3 primeros bloques ($p= 0,007$, $p < 0,001$, $p= 0,041$), aunque estos efectos se pierden en los 3 últimos bloques de la prueba ($p= 0,271$, $p= 0,953$, $p= 0,315$). Lo mismo ocurre con respecto al tiempo que permanece el animal en movimiento donde los grupos que han recibido probiótico permanecen significativamente más tiempo en movimiento que los controles durante los 3 primeros bloques ($p= 0,009$, $p < 0,001$, $p= 0,041$), perdiéndose nuevamente estos efectos en los 3 últimos bloques ($p= 0,429$, $p= 0,804$, $p= 0,294$). Todos estos efectos son independientes de la exposición a CPF [$F(3,36,238,73)= 0,613$, $p= 0,626$; $F(3,81,270,44)= 0,604$, $p= 0,652$]. El análisis de la conducta de *rearing* muestra diferencias significativas en la interacción *Probiótico* x Actividad Vertical [$F(3,91,278)= 3,660$, $p= 0,007$], teniendo los animales expuestos al probiótico una mayor frecuencia de actividad vertical en los bloques 1 ($p= 0,008$) y 2 ($p= 0,024$). No se observan diferencias estadísticamente significativas en el tiempo que pasa el animal en los márgenes ni en el centro del paradigma. Por último, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p= 0,031$) en la velocidad en el grupo CPF frente a su grupo control. Todos estos resultados se presentan en la figura 3.

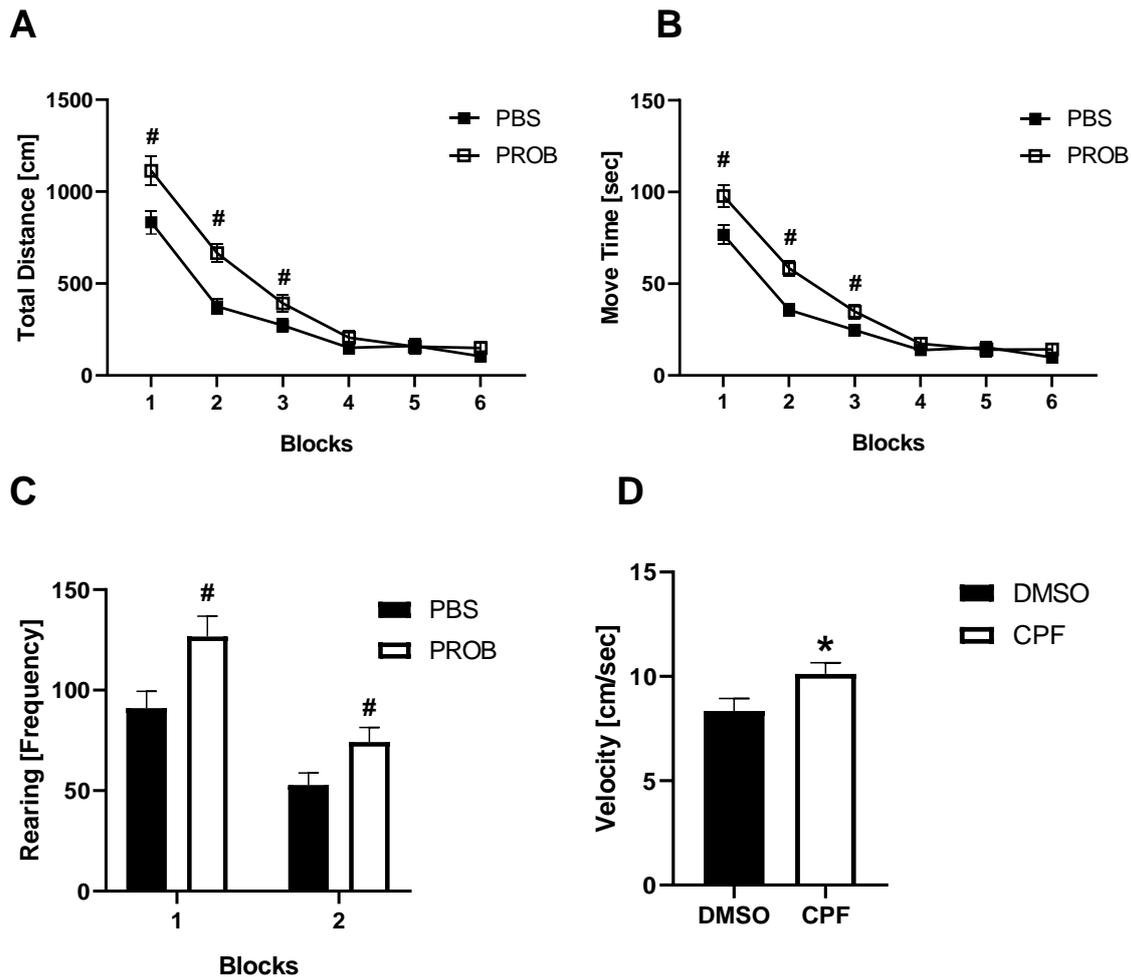


Figura 3. Actividad locomotora en Open Field Test. Media (\pm SEM) de la distancia total recorrida en cada bloque de 5 minutos (A), Media (\pm SEM) del tiempo en segundos que permanece el animal en movimiento en cada bloque de 5 minutos (B), frecuencia de actividad vertical (C) y velocidad en centímetros por segundo (D). * $p < 0,05$ por efecto de la exposición a CPF; # $p < 0,05$ por efecto del tratamiento probiótico.

Expresión genética: RTqPCR

No se observaron diferencias significativas para la mayor parte de los genes analizados (Material suplementario x). Sólo aquellos genes donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la máxima interacción se exponen a continuación. En la expresión del *receptor tipo I de vasopresina (VASSR)* encontramos efectos de la *Exposición* [$F(1,16) = 4,629$, $p = 0,047$], donde los CPF expresan una menor cantidad que los controles (0,047). Además hay un efecto en la interacción *Probiótico x Exposición* [$F(1,16) = 5,391$, $p = 0,034$]. Los controles tratados con el probiótico muestran una mayor expresión del *receptor tipo I de vasopresina (VASSR)* que los que no han recibido el tratamiento ($p = 0,047$), y este

efecto es bloqueado por la exposición gestacional al CPF ($p= 0,006$). En la expresión de *Tirosina Hidroxilasa (TH)* se observan efectos en la interacción *Probiótico x Exposición* [$F(1,20)= 4,417$, $p= 0,048$], donde el CPF disminuye significativamente su expresión en el SNC únicamente en los grupos tratados con probiótico ($p= 0,049$). También se han visto diferencias significativas en la interacción *Probiótico x Exposición* para la expresión genética del *transportador de Cl-K kcc2 (KCC2)* [$F(1,16)= 6.365$, $p= 0,030$], donde en el grupo control el probiótico aumenta su expresión ($p= 0,043$), aumento que es bloqueado por la exposición a CPF ($p= 0,044$). Este patrón de interacción *Probiótico x Exposición* en la expresión genética se repite para el resto de genes en los que se encuentran efectos significativos; *subunidad α del receptor GABA2 (GABA-A- α 2)*, *receptor metabotrópico tipo I del glutamato (GMR)*, *receptor tipo I de oxitocina (OXYR)* [$F(1,16)= 6,365$, $p= 0,020$; $F(1,16)= 5.036$, $p= 0,036$; $F(1,16)= 6,298$, $p= 0,021$; respectivamente], donde en todos ellos los efectos de incremento en la expresión relativa que el probiótico tiene en el grupo control ($p= 0,012$, $p= 0,019$, $p= 0,044$; respectivamente), son bloqueados en el grupo probiótico por la exposición a CPF ($p= 0,010$, $p= 0,033$, $p= 0,029$; respectivamente). Todos estos resultados se muestran en la Figura 4. No se han observado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *AChE* y en el resto de los sistemas de neurotransmisión analizados. Tampoco se han observado efectos del probiótico o el CPF en la expresión de citoquinas proinflamatorias; *factor de necrosis tumoral α (TNF α)* e *interleucina 1b (IL-1b)* en el SNC. Toda esta información se incluye en el Anexo IV.

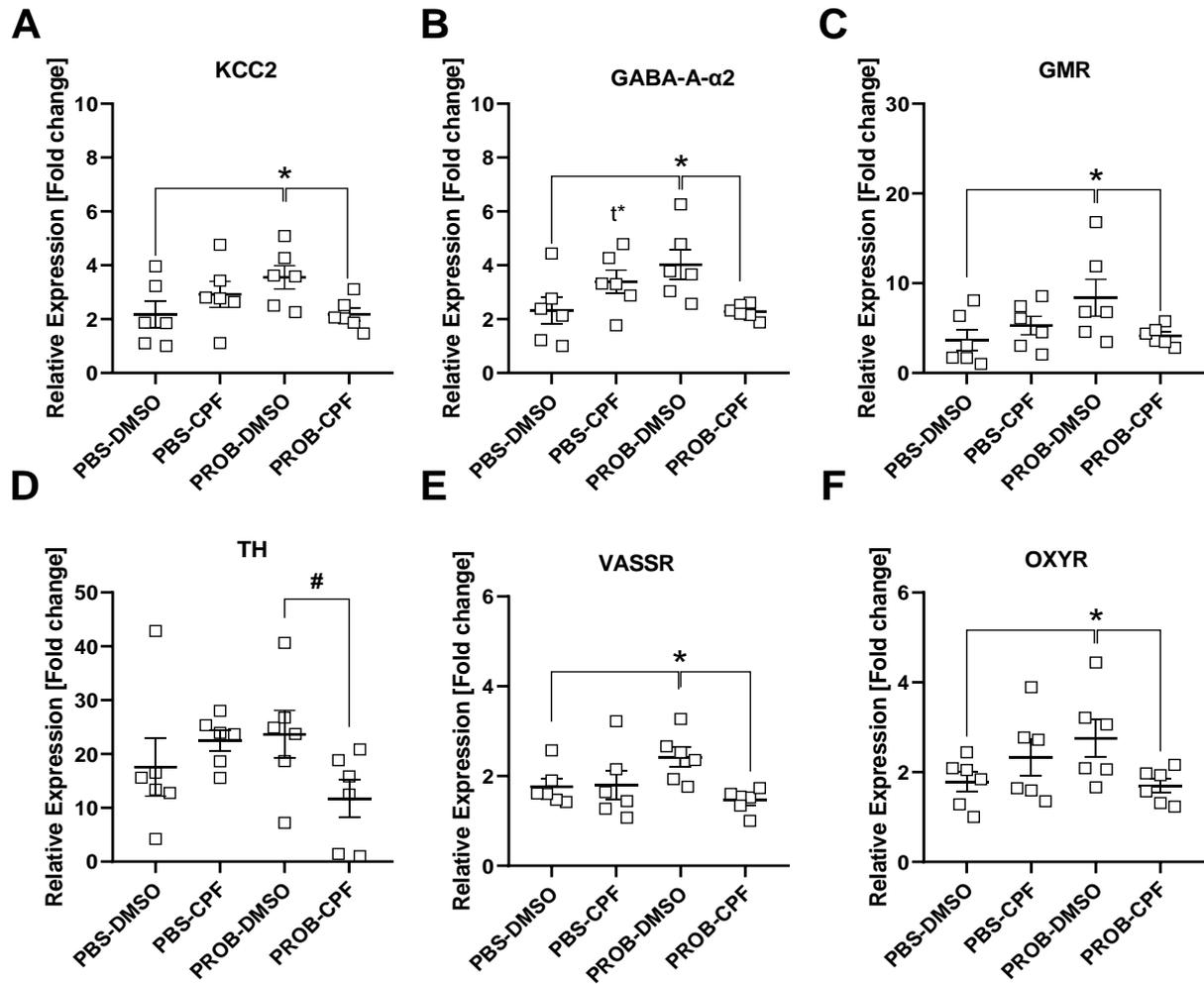


Figura 4. Media (\pm SEM) de la expresión relativa del *transportador de Cl-K kcc2* (A), de la subunidad α del receptor GABA2 (B), del receptor metabotrópico I del glutamato (C) de la tirosina hidroxilasa (D), receptor I de vasopresina (E) y receptor I de oxitocina (F). *p < 0,05

Discusión

Se han observado efectos muy interesantes en el desarrollo debidos al tratamiento durante toda la fase gestacional con el suplemento probiótico, conformado por cepas activas de *L. Plantarum* y *L. Brevis* y un suplemento de vitamina D. Se ha encontrado un aumento significativo del peso corporal, por lo que el tratamiento prenatal con este probiótico parece tener efectos obesogénicos en la descendencia. Este efecto se opone a las evidencias obtenidas por otros estudios como el llevado a cabo por Di Bonaventura y cols. (2021) en el que el tratamiento postnatal durante 83 días con una cepa de *L. Plantarum* produjo una regulación a la baja en el peso corporal, disminuyendo el sobrepeso y la obesidad en las ratas expuestas a una dieta obesogénica. Park y cols. (2013) encontraron un efecto parecido de reducción del peso corporal con *L. Plantarum* y también se observa pérdida de peso en estudios con humanos (Zhang y cols., 2016). La principal disbiosis que caracteriza un fenotipo obesogénico reportada por la literatura es el cambio en dos de los filos más prominentes del intestino de los mamíferos, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Wallace y cols., 2016) por lo que en un futuro se deberán observar los cambios que han ocurrido a causa del tratamiento probiótico en este conjunto de bacterias y el resto de la microbiota. Estos efectos en el incremento del peso corporal no parecen deberse a la glucosa que contiene el suplemento ya que los estudios de exposición gestacional a glucosa en ratas que presentan este efecto utilizan dosis muy superiores a las utilizadas en nuestro estudio (Ozkan y cols., 2019; Nivoit y cols., 2009). Además, los grupos tratados con probiótico muestran un adelanto general en el desarrollo tanto en la apertura ocular en el PND13 como en el desempeño en la capacidad de agarre y escalada de la batería funcional (PND16). Esto podría indicar que el aparente efecto obesogénico que parece tener el suplemento probiótico sobre la descendencia, discordante con la literatura actual, podría tratarse en realidad de un adelanto general en el desarrollo. Se hacen necesarios estudios que investiguen si este adelanto en el desarrollo en general, y en el desarrollo motor temprano en concreto, son realmente beneficiosos o perjudiciales para la salud del organismo.

Otros resultados que apoyan posibles efectos anómalos en el desarrollo a causa del tratamiento probiótico son los encontrados en el Open Field Test. Este paradigma es muy útil para evaluar la actividad exploratoria y el desempeño locomotor en roedores (Gould y cols., 2009). Se encontró que el tratamiento probiótico produce un aumento significativo del tiempo en movimiento y la distancia total recorrida en los 3 primeros bloques de 5 minutos. Estos sujetos presentan por lo tanto hiperactividad inducida al ser expuestos a un ambiente novedoso,

efectos que se pierden en los últimos bloques conforme se van habituando al campo abierto. Resultados similares en Open Field ya habían sido mostrados por Liu y cols. (2016), que utilizaron *L. Plantarum* postnatalmente en un modelo de roedores germ-free en la adolescencia. Todo apunta a que esta especie bacteriana es capaz de modular la actividad locomotora y exploratoria del huésped. La otra cepa que compone el probiótico utilizado, el *L. Brevis*, se ha visto que es capaz de descarboxilar la tirosina produciendo tiramina, la cual interviene en la modulación de las funciones motoras (Sampson y Mazmanian, 2015). Sin embargo, la tiramina periférica no parece tener efectos en el SNC debido a que es incapaz de atravesar la BHE (Finberg y Gillman, 2011) por lo que estos efectos se explican más por la propia acción del *L. Plantarum* o la modificación indirecta del resto de cepas que se encuentran endógenamente en el organismo. No podemos descartar que parte de estos efectos en la locomoción se expliquen por la acción de la vitamina D en el SNC, ya que se ha visto que esta es capaz de modular el sistema dopaminérgico y la actividad locomotora (Kesby y cols., 2010; Harms y cols., 2011).

La exposición de 1 mg/kg/ml de CPF durante la gestación (GD12.5 y 15.5) en este estudio no ha demostrado tener diferencias estadísticamente significativas en variables del desarrollo general y motor. Únicamente se evidencian efectos significativos por la exposición a este tóxico, independientemente de si se ha recibido probiótico o no, en la velocidad mostrada en el Open Field Test, mostrando que los CPF se mueven por el campo abierto a una mayor velocidad que los controles independientemente del tratamiento probiótico. Este efecto va en línea con los resultados encontrados en otros estudios de exposición a CPF, tanto prenatal como postnatal, acerca del aumento en la velocidad y en la actividad locomotora por este plaguicida (Silva y cols., 2017; Perez-Fernandez, 2020). Por lo tanto, la hipótesis sustentada por otros estudios (Guardia-Escote, 2021; Lan y cols., 2017; Lan y cols., 2019; Morales-Navas y cols., 2020) de que la exposición prenatal a CPF tendría como resultado efectos tóxicos generando un fenotipo tipo-TEA, es rechazada debido a la ausencia de un evidente impacto en el desarrollo general, motor y social por efecto de la exposición gestacional a CPF. Esta ausencia de efectos significativos podría deberse a la baja dosis administrada y a que la exposición ocurre durante un breve intervalo de tiempo (4 días). Sin embargo, Morales-Navas y cols. (2020) utilizando esta misma cantidad de exposición gestacional encontraron efectos de reducción de la sociabilidad y la comunicación, por lo que estas diferencias podrían deberse a pequeños cambios en el protocolo de USV (ya que es una variable especialmente sensible) o al cambio de la casa comercial (Envigo) de la cual proceden las ratas.

El estudio de los USVs en modelos de roedores ha demostrado ser una herramienta muy útil para el estudio de la sociabilidad, el estado afectivo y la comunicación social en modelos roedores de trastornos del neurodesarrollo (Scattoni y cols., 2009; Portfors, 2007). Las crías expuestas al probiótico presentan una mejora significativa en el número de veces que emiten una llamada a su madre ante la presencia de una situación de aislamiento, y estas mejoras son bloqueadas por completo por la exposición a CPF. Este efecto de bloqueo de las mejoras producidas por el probiótico en la comunicación social concuerda con otros estudios que muestran un marcado deterioro en la sociabilidad de las ratas expuestas a CPF durante la gestación. Morales-Navas y cols. (2020) encontraron una disminución significativa del número total de USV emitidas por las crías y un aumento en la latencia de aparición de la primera llamada. Por lo tanto, aunque en nuestros resultados no se observa un efecto significativo de la exposición a CPF por sí sola en la emisión de USVs, una exposición tan corta como la utilizada en nuestro estudio a este plaguicida es capaz de eliminar las mejoras producidas por el tratamiento probiótico.

En cuanto al estudio genético mediante RTqPCR, se analizó la expresión de un total 28 genes en las crías que se utilizaron para el análisis de los USVs en el PND7, encontrándose efectos significativos en 6 de ellos. Lo más interesante es que la mayoría de estos efectos en la expresión génica son muy similares a los observados en la comunicación social (en el total de llamadas emitidas ante una situación de aislamiento). Como ya se ha mencionado, el tratamiento prenatal probiótico mejoró la comunicación social en las crías y la exposición a CPF durante unos pocos días durante la gestación fue capaz de bloquear estos efectos. Algo parecido ocurre con la expresión de *vassr*, *oxyr*, *gaba-a- α 2*, *gmr* y *kcc2*. La expresión de estos genes es incrementada significativamente en la infancia temprana por el tratamiento gestacional probiótico y el CPF elimina esta regulación al alza.

La modificación de la expresión de *vassr* y *oxyr* podría explicar en parte tanto la mejora en comunicación social observada tras el suplemento probiótico, como el bloqueo de estos efectos por parte del CPF. Estos neuropéptidos están directamente relacionados con las conductas sociales y de apego en animales y humanos y con el TEA (Quezada, 2011). Hasta donde sabemos es la primera vez que se observa una regulación de la expresión de los genes que codifican para los receptores de oxitocina en el SNC por parte de estas cepas bacterianas, siendo la cepa *Lactobacillus Reuteri* el único microorganismo que ha reportado una regulación al alza de la oxitocina central tras su ingestión (Erdman y Poutahidis, 2016). Con respecto al

sistema GABAérgico, ya se han reportado modificaciones en su expresión por parte de modificaciones en la microbiota (Vuong y Hsiao, 2017) y casos de alteraciones en la expresión del receptor GABA-A- $\alpha 2$ tras la exposición a CPF (Perez-Fernandez y cols., 2020). También se ha observado que en el grupo probiótico la exposición a CPF produce una regulación a la baja de la *TH* que es la enzima que inicia el proceso de síntesis de las monoaminas, principalmente la dopamina, considerándose como la enzima limitante (Bajena-Trujillo y cols., 2000). Al estar la dopamina fuertemente implicada en la regulación de la actividad locomotora (Liu y cols., 2016), estas alteraciones observadas en la expresión de la TH en el SNC en la infancia temprana podría indicarnos la presencia de futuras alteraciones en el sistema dopaminérgico. A pesar de esto, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los receptores D₁ y D₂ de dopamina (Anexo IV). Otros estudios que utilizan la administración de *L. Plantarum* sí que han observado claras alteraciones dopaminérgicas a la base de la hiperactividad locomotora evaluada mediante el Open Field Test (Liu y col., 2016).

Por otra parte, el KCC2 es un cotransportador con grandes implicaciones en el neurodesarrollo. Está relacionado con el mantenimiento de las concentraciones intracelulares de Cl⁻ en las neuronas, en la eficacia y polaridad de la transmisión sináptica mediada por los receptores A del GABA y en la función del sistema glutamatérgico (Chamma y cols., 2012); ambos sistemas están alterados observándose una regulación al alza de la expresión del receptor GABA-A- $\alpha 2$ y *GMR* en el grupo expuesto únicamente a probiótico. Se ha demostrado que la regulación al alza de KCC2 puede ocurrir por la necesidad de reforzar la inhibición sináptica de forma homeostática y que ocurre de manera normal durante el desarrollo. En cambio, cuando el grupo probiótico es expuesto a CPF, se produce una caída en sus niveles de expresión. La desregulación del KCC2, aparte de estar este fuertemente implicado en el neurodesarrollo, se ha visto directamente involucrada en la aparición de convulsiones epilépticas (Chamma y cols., 2012), condición con la que el TEA presenta comorbilidad (Tuchman, 2013). Además, la activación de los receptores GMR del grupo I inducen una rápida regulación al alza de KCC2 en el período postnatal temprano (Chamma y cols., 2012), por lo que las alteraciones funcionales observadas en varios de estos genes por la interacción *Probiótico x Exposición* podrían estar interrelacionadas.

No se han encontrado, sin embargo, cambios en la expresión de BDNF ni de genes relevantes para el sistema serotoninérgico anteriormente reportados por la literatura con el

tratamiento mediante *L. Plantarum* (Ranuh y cols., 2019). Tampoco se han observado alteraciones en inflamación medidas por la expresión de las citoquinas proinflamatorias TNF α e IL-1b ni con el tratamiento probiótico, ni con la exposición a CPF.

Después de observar una concordancia tan sincrónica entre los resultados conductuales y la expresión de los genes anteriormente descritos en el SNC por el tratamiento mediante *L. Plantarum* y *L. Brevis*, podríamos pensar que nos encontramos ante pistas clave para llegar a comprender las bases neurobiológicas de cómo este tipo de cepas bacterianas en concreto, y el eje microbiota-intestino-cerebro en general, pueden llegar a modular las interacciones sociales y la comunicación en los mamíferos. Sin embargo, nuestro estudio presenta varias limitaciones en cuanto a que no hemos investigado los cambios en los ratios de bacterias intestinales, en la fisiología del intestino, ni en el metabolismo general del organismo. Tampoco hemos analizado los mecanismos epigenéticos (pre y postranscripcionales) que puedan estar dándose en el SNC ni los niveles de las proteínas que codifican los genes analizados, todos ellos objetivos que deberán abordarse en futuros estudios. Hace falta mucha investigación todavía desde todas las disciplinas científicas para poder afirmar que los cambios conductuales producidos por alteraciones en la microbiota en la comunicación social son consecuencia de los sistemas de neurotransmisión que se muestran alterados en este estudio. También se hace evidente la falta de más análisis conductuales que evalúen dominios tales como el control inhibitorio, la memoria y el aprendizaje espacial y emocional. Un estudio realizado por Zhao y cols. (2020) encontró que ratas tratadas con *L. Plantarum* presentan mejoras significativas en la memoria y el aprendizaje espacial, por lo que en futuros estudios podrían realizarse pruebas con el objetivo de evaluar estas capacidades, tales como el laberinto de agua de Morris.

Conclusiones

Ante la exposición gestacional mediante un suplemento probiótico hemos encontrado un adelanto general en el desarrollo, alteraciones conductuales en la actividad locomotora (hiperactividad ante la presencia de un ambiente novedoso), una mejora significativa en la comunicación social y alteraciones en la expresión de genes de sistemas de neurotransmisión importantes para el desarrollo del SNC y la sociabilidad. Los resultados en comunicación social y en la expresión génica que se muestran en la descendencia son bloqueados por la exposición prenatal a CPF, exposición relacionada con el fenotipo autista (Morales-Navas y cols., 2020; Biosca-Brull y cols., 2021). Aunque se han reportado grandes beneficios del tratamiento coadyuvante mediante probióticos tanto para el autismo en humanos (Shaaban y cols., 2018; Martínez-González y Andreo-Martínez, 2020), como en modelos preclínicos de autismo (Fung y cols., 2017; Hsiao y cols., 2013; Vuong y Hsiao, 2017) y otras patologías neuropsiquiátricas (Salvador y cols., 2021; Cepeda-Vidal y cols., 2019; Fuenmayor-González y cols., 2022), se debería seguir investigando los efectos que estos suplementos pueden tener en la salud general del organismo, que impactos producen en el desarrollo y qué cepas son las más adecuadas y seguras para su empleo clínico. Desde una perspectiva más básica, la producción científica en las próximas décadas debe seguir investigando el eje microbiota-intestino-cerebro y los mecanismos neurobiológicos que subyacen a sus efectos en el SNC y la conducta.

Referencias

- Aldridge, J. E., Meyer, A., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2005). Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure. *Environmental health perspectives*, 113(8), 1027-1031. <https://doi.org/10.1289/ehp.7968>
- American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed.). <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Bahena-Trujillo, R., Flores, G., & Arias-Montaña, J. A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*, 11(1), 39-60. <https://doi.org/10.32776/revbiomed.v11i1.218>
- Barthélémy, C., Fuentes, J., Howlin, P., & van der Gaag, R. (2019). Personas con trastorno del espectro del autismo. *Identificación, comprensión, intervención*.
- Biosca-Brull, J., Pérez-Fernández, C., Mora, S., Carrillo, B., Pinos, H., Conejo, N. M., ... & Colomina, M. T. (2021). Relationship between Autism Spectrum Disorder and Pesticides: A Systematic Review of Human and Preclinical Models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5190. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105190>
- Blatt, G. J. (2005). GABAergic cerebellar system in autism: a neuropathological and developmental perspective. *International review of neurobiology*, 71, 167-178. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(05\)71007-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)71007-2)
- Cepeda-Vidal, V., Mondragón-Portocarrero, A., Lamas, A., Miranda, J. M., & Cepeda, A. (2019). Empleo de prebióticos y probióticos en el manejo de la ansiedad. *Farmacéuticos comunitarios*, 11(2), 30-40. <https://raco.cat/index.php/FC/article/view/358992>
- Chamma, I., Chevy, Q., Poncer, J. C., & Lévi, S. (2012). Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Frontiers in cellular neuroscience*, 6, 5. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00005>

Chaste, P., & Leboyer, M. (2022). Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in clinical neuroscience*.

<https://doi.org/10.31887/DCNS.2012.14.3/pchaste>

Chauhan, A., & Chauhan, V. (2006). Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*, 13(3), 171-181. <https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2006.05.007>

Condette, C. J., Bach, V., Mayeur, C., Gay-Quéheillard, J., & Khorsi-Cauet, H. (2015). Chlorpyrifos exposure during perinatal period affects intestinal microbiota associated with delay of maturation of digestive tract in rats. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 61(1), 30-40.

<http://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000734>

Crumeyrolle-Arias, M., Jaglin, M., Bruneau, A., Vancassel, S., Cardona, A., Daugé, V., ... & Rabot, S. (2014). Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats.

Psychoneuroendocrinology, 42, 207-217.

<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.014>

Dam, K., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2000). Chlorpyrifos exposure during a critical neonatal period elicits gender-selective deficits in the development of coordination skills and locomotor activity. *Developmental Brain Research*, 121(2), 179-187.

[https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(00\)00044-4](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(00)00044-4)

Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular psychiatry*, 19(2), 146-148.

<http://www.nature.com/articles/mp201365>

Di Bonaventura, M., Coman, M., Tomassoni, D., Di Bonaventura, E., Botticelli, L., Gabrielli, M. G., & Cifani, C. (2021). Supplementation with *Lactiplantibacillus plantarum* IMC 510 Modifies Microbiota Composition and Prevents Body Weight Gain Induced by Cafeteria Diet in Rats. *International journal of molecular sciences*,

22(20), 11171. <https://doi.org/10.3390/ijms222011171>

Eissa, N., Al-Houqani, M., Sadeq, A., Ojha, S. K., Sasse, A., & Sadek, B. (2018).

Current enlightenment about etiology and pharmacological treatment of autism

spectrum disorder. *Frontiers in neuroscience*, 12, 304.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00304>

Ellenbroek, B., & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race?. *Disease models & mechanisms*, 9(10), 1079-1087.

<https://doi.org/10.1242/dmm.026120>

Erdman, S. E., & Poutahidis, T. (2016). Microbes and oxytocin: benefits for host physiology and behavior. *International review of neurobiology*, 131, 91-126.

<https://doi.org/10.1016/bs.irn.2016.07.004>

Fang, B., Li, J. W., Zhang, M., Ren, F. Z., & Pang, G. F. (2018). Chronic chlorpyrifos exposure elicits diet-specific effects on metabolism and the gut microbiome in rats. *Food and chemical toxicology*, 111, 144-152.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.001>

Finberg, J. P., & Gillman, K. (2011). Selective inhibitors of monoamine oxidase type B and the “cheese effect”. *International review of neurobiology*, 100, 169-190.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386467-3.00009-1>

Fuenmayor-González, L., Fajardo-Loaiza, T., Rivadeneira-Dueñas, J., & Arévalo-Manchero, J. (2022). Microbiota, probióticos y el comportamiento humano. *Revista Vive*, 5(13), 75-86. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v5i13.1132>

Fung, T. C., Olson, C. A., y Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature neuroscience*, 20(2), 145-155.

[Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease | Nature Neuroscience](#)

Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*, 28(3), 1317-1330.

<https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>

García-Franco, A., Alpizar-Lorenzo, O. A., & Guzmán-Díaz, G. (2019). Autismo: revisión conceptual. *Boletín Científico De La Escuela Superior Atotonilco De Tula*,

6(11), 26-31. <https://doi.org/10.29057/esat.v6i11.3693>

Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. *Mood and anxiety related phenotypes in mice*, 1-20. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1

Guardia-Escote, L., Basaure, P., Biosca-Brull, J., Cabré, M., Blanco, J., Pérez-Fernández, C., ... y Colomina, M. T. (2020). APOE genotype and postnatal chlorpyrifos exposure modulate gut microbiota and cerebral short-chain fatty acids in preweaning mice. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110872. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110872>

Guardia-Escote, L., Biosca-Brull, J., Morales, M., Perez-Fernandez, C., Sanchez-Santed, F., & Colomina, M. T. (2021). Behavioral endpoints in adult and developmental neurotoxicity: the case of organophosphate pesticides. In *Toxicological Risk Assessment and Multi-System Health Impacts from Exposure* (pp. 95-104). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85215-9.00001-5>

Harms, L. R., Burne, T. H., Eyles, D. W., & McGrath, J. J. (2011). Vitamin D and the brain. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 25(4), 657-669. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.009>

He, X., Tu, Y., Song, Y., Yang, G., y You, M. (2022). The relationship between pesticide exposure during critical neurodevelopment and autism spectrum disorder: A narrative review. *Environmental Research*, 203, 111902.

Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., ... & Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7), 1451-1463. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>

Havdahl, A., Niarchou, M., Starnawska, A., Uddin, M., van der Merwe, C., & Warrier, V. (2021). Genetic contributions to autism spectrum disorder. *Psychological medicine*, 51(13), 2260-2273. <https://doi.org/10.1017/S0033291721000192>

Hofer, M.A.; Shair, H.N.; Brunelli, S.A. Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. *Curr. Protoc. Neurosci.* 2001, 17. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0814s17>

Icenogle, L. M., Christopher, N. C., Blackwelder, W. P., Caldwell, D. P., Qiao, D., Seidler, F. J., ... & Levin, E. D. (2004). Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation.

Neurotoxicology and Teratology, 26(1), 95-101.

<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2003.09.001>

Kesby, J. P., Cui, X., O'Loan, J., McGrath, J. J., Burne, T. H., & Eyles, D. W. (2010). Developmental vitamin D deficiency alters dopamine-mediated behaviors and dopamine transporter function in adult female rats. *Psychopharmacology*, 208(1), 159-168.

<https://doi.org/10.1007/s00213-009-1717-y>

Lee, I., Eriksson, P., Fredriksson, A., Buratovic, S., & Viberg, H. (2015).

Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and biomolecular studies on chlorpyrifos and carbaryl. *Toxicology and applied pharmacology*, 288(3), 429-438.

<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.08.014>

Liu, W. H., Chuang, H. L., Huang, Y. T., Wu, C. C., Chou, G. T., Wang, S., & Tsai, Y. C. (2016). Alteration of behavior and monoamine levels attributable to

Lactobacillus plantarum PS128 in germ-free mice. *Behavioural brain research*, 298,

202-209. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.046>

Lan, A., Kalimian, M., Amram, B., & Kofman, O. (2017). Prenatal chlorpyrifos leads to autism-like deficits in C57Bl6/J mice. *Environmental health*, 16(1), 1-10.

[Prenatal chlorpyrifos leads to autism-like deficits in C57Bl6/J mice | SpringerLink](#)

Lan, A., Stein, D., Portillo, M., Toiber, D., & Kofman, O. (2019). Impaired innate and conditioned social behavior in adult C57Bl6/J mice prenatally exposed to

chlorpyrifos. *Behavioral and Brain Functions*, 15(1), 1-9.

[Impaired innate and conditioned social behavior in adult C57Bl6/J mice prenatally exposed to chlorpyrifos | Behavioral and Brain Functions | Full Text \(biomedcentral.com\)](#)

Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G., & Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism

spectrum disorder. *The Lancet*, 392(10146), 508-520. [https://doi.org/10.1016/S0140-](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)

[6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2)

Martínez-González, A. E., & Andreo-Martínez, P. (2020). Prebióticos, probióticos y trasplante de microbiota fecal en el autismo: una revisión sistemática. *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*, 13(3), 150-164.

<https://doi.org/10.1016/j.rpsm.2020.06.002>

Morales Navas, M. (2021). Exposición prenatal a contaminantes ambientales: exposición prenatal a clorpirifós y el desarrollo de autismo. [Tesis de doctorado]. Universidad de Almería.

Morales-Navas, M., Castaño-Castaño, S., Pérez-Fernández, C., Sánchez-Gil, A., Teresa Colomina, M., Leinekugel, X., & Sánchez-Santed, F. (2020). Similarities between the effects of prenatal chlorpyrifos and valproic acid on ultrasonic vocalization in infant wistar rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6376. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176376>

Nivoit, P., Morens, C., Van Assche, F.A. F. A., Jansen, E. H. J. M., Poston, L., Remacle, C., & Reusens, B. (2009). Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia* 52, 1133–1142. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1316-9>

Ozkan, H., Topsakal, S., & Ozmen, O. (2019). Investigation of the diabetic effects of maternal high-glucose diet on rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 609-617. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.011>

Park, D. Y., Ahn, Y. T., Park, S. H., Huh, C. S., Yoo, S. R., Yu, R., ... & Choi, M. S. (2013). Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PloS one*, 8(3), e59470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059470>

Pérez Fernández, C. (2020). Short, medium, and long-term behavioral and molecular effects of the preweaning exposure to Chlorpyrifos in Wistar rats. [Tesis de doctorado]. Universidad de Almería.

Perez-Fernandez, C., Morales-Navas, M., Guardia-Escote, L., Colomina, M. T., Giménez, E., & Santed, F. S. (2021). Pesticides and aging: Preweaning exposure to

Chlorpyrifos induces a general hypomotricity state in late-adult rats. *Neurotoxicology*, 86, 69-77. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.07.002>

Perez-Fernandez, C., Morales-Navas, M., Aguilera-Sáez, L. M., Abreu, A. C., Guardia-Escote, L., Fernández, I., ... & Sánchez-Santed, F. (2020). Medium and long-term effects of low doses of Chlorpyrifos during the postnatal, preweaning developmental stage on sociability, dominance, gut microbiota and plasma metabolites. *Environmental Research*, 184, 109341.

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109341>

Perez-Fernandez, C., Morales-Navas, M., Guardia-Escote, L., Garrido-Cárdenas, J. A., Colomina, M. T., Giménez, E., & Sánchez-Santed, F. (2020). Long-term effects of low doses of Chlorpyrifos exposure at the preweaning developmental stage: A locomotor, pharmacological, brain gene expression and gut microbiome analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110865.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110865>

Perez-Fernandez, C., Morales-Navas, M., Guardia-Escote, L., Colomina, M. T., Giménez, E., & Sánchez-Santed, F. (2020). Postnatal exposure to low doses of Chlorpyrifos induces long-term effects on 5C-SRTT learning and performance, cholinergic and GABAergic systems and BDNF expression. *Experimental Neurology*, 330, 113356. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113356>

Perry, E. K., Lee, M. L., Martin-Ruiz, C. M., Court, J. A., Volsen, S. G., Merrit, J., ... & Wenk, G. L. (2001). Cholinergic activity in autism: abnormalities in the cerebral cortex and basal forebrain. *American journal of psychiatry*, 158(7), 1058-1066.

<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.7.1058>

Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(1), 28-34. [Types and Functions of Ultrasonic Vocalizations in Laboratory Rat...: Ingenta Connect](#)

[Ingenta Connect](#)

Quezada, J. P. (2011). Oxitocina, Vasopresina y Conducta Social: hipótesis neuro-peptida para el Trastorno Autista. *Rev. Chil. Psiquiatr. Neurol. Infanc. Adolesc.*

Volumen, 22(3).

<https://www.researchgate.net/profile/JaimePereira/publication/274389615>

Ranuh, R., Athiyah, A. F., Darma, A., Risky, V. P., Riawan, W., Surono, I. S., & Sudarmo, S. M. (2019). Effect of the probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506 on BDNF and 5HT stimulation: Role of intestinal microbiota on the gut-brain axis. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(2), 145.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6635314/#>

Ricceri, L., Markina, N., Valanzano, A., Fortuna, S., Cometa, M. F., Meneguz, A., & Calamandrei, G. (2003). Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 191(3), 189-201. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00229-1)

Robertson, C. E., & Baron-Cohen, S. (2017). Sensory perception in autism. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(11), 671-684. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.111> <https://www.nature.com/articles/nrn2017111>

Salvador, A. G., Antolinez, S. Q., Furundarena, I. H., Aróstegui, S., & de Cerio, F. G. (2021). Enfermedades mentales y nutrición saludable. Nuevas alternativas para su tratamiento. *Rev Esp Nutr Comunitaria*, 27(1), 70-81.

Sampson, T. R., & Mazmanian, S. K. (2015). Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell host & microbe*, 17(5), 565-576.

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.011>

Sánchez-Santed, F., Colomina, M. T., & Hernández, E. H. (2016). Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*, 74, 417-426

<https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.003>

Scattoni, M. L., Crawley, J., & Ricceri, L. (2009). Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders.

Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 33(4), 508-515.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.08.003>

Silva, J. G., Boareto, A. C., Schreiber, A. K., Redivo, D. D., Gambeta, E., Vergara, F., ... & Dalsenter, P. R. (2017). Chlorpyrifos induces anxiety-like behavior in offspring

rats exposed during pregnancy. *Neuroscience Letters*, 641, 94-100.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.053>

Swartwout, B., & Luo, X. M. (2018). Implications of probiotics on the maternal-neonatal interface: gut microbiota, immunomodulation, and autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 9, 2840. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02840>

Tuchman, R. (2013). Deconstruyendo los trastornos del espectro autista: perspectiva clínica. *Rev Neurol*, 56(Supl 1), S3-S12. <https://doi.org/10.33588/rn.56s01.2012657>

Venerosi, A., Cutuli, D., Colonnello, V., Cardona, D., Ricceri, L., & Calamandrei, G. (2008). Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. *Neurotoxicology and teratology*, 30(6), 468-474. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2008.07.002>

Vuillermot, S., Luan, W., Meyer, U., & Eyles, D. (2017). Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune activation. *Molecular autism*, 8(1), 1-13. [Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune activation | SpringerLink](https://doi.org/10.1007/s12065-017-0001-1)

Vuong, H. E., & Hsiao, E. Y. (2017). Emerging roles for the gut microbiome in autism spectrum disorder. *Biological psychiatry*, 81(5), 411-423.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.08.024>

Wallace, J. G., Gohir, W., & Sloboda, D. M. (2016). The impact of early life gut colonization on metabolic and obesogenic outcomes: what have animal models shown us?. *Journal of developmental origins of health and disease*, 7(1), 15-24.

<https://doi.org/10.1017/S2040174415001518>

Wöhr, M.; Schwarting, R.K. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav. Neurosci.* **2008**, 122, 310–330. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.2.310>

Zhang, Q., Wu, Y., & Fei, X. (2016). Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials.

International Journal of Food Sciences and Nutrition.

<https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1181156>

Zhao, Y., Yang, G., Zhao, Z., Wang, C., Duan, C., Gao, L., & Li, S. (2020). Antidepressant-like effects of *Lactobacillus plantarum* DP189 in a corticosterone-induced rat model of chronic stress. *Behavioural Brain Research*, 395, 112853.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112853>

Zhubi, A., Cook, E. H., Guidotti, A., & Grayson, D. R. (2014). Epigenetic mechanisms in autism spectrum disorder. *International review of neurobiology*, 115, 203-244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801311-3.00006-8>

Anexo I

Vía de administración oral del suplemento probiótico



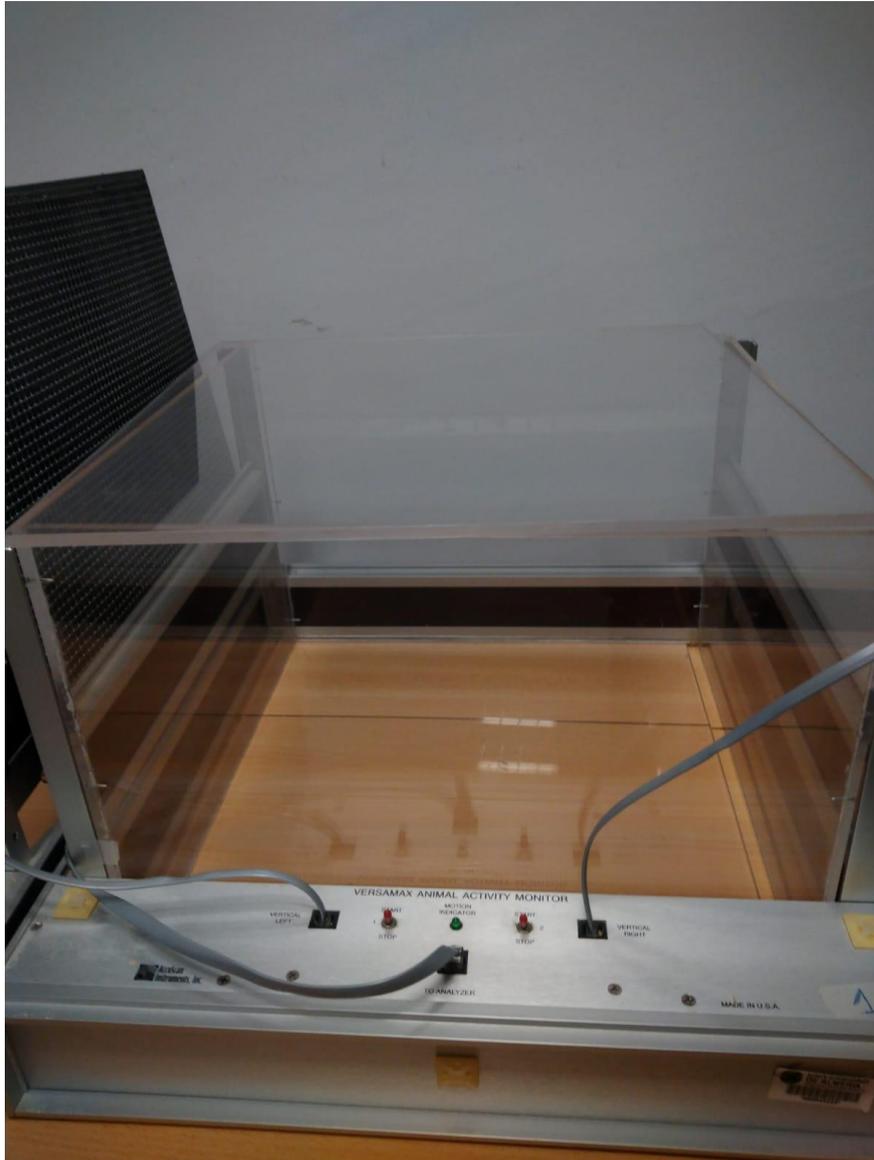
Anexo II

Cámara insonorizada para la grabación de USVs en una condición de aislamiento

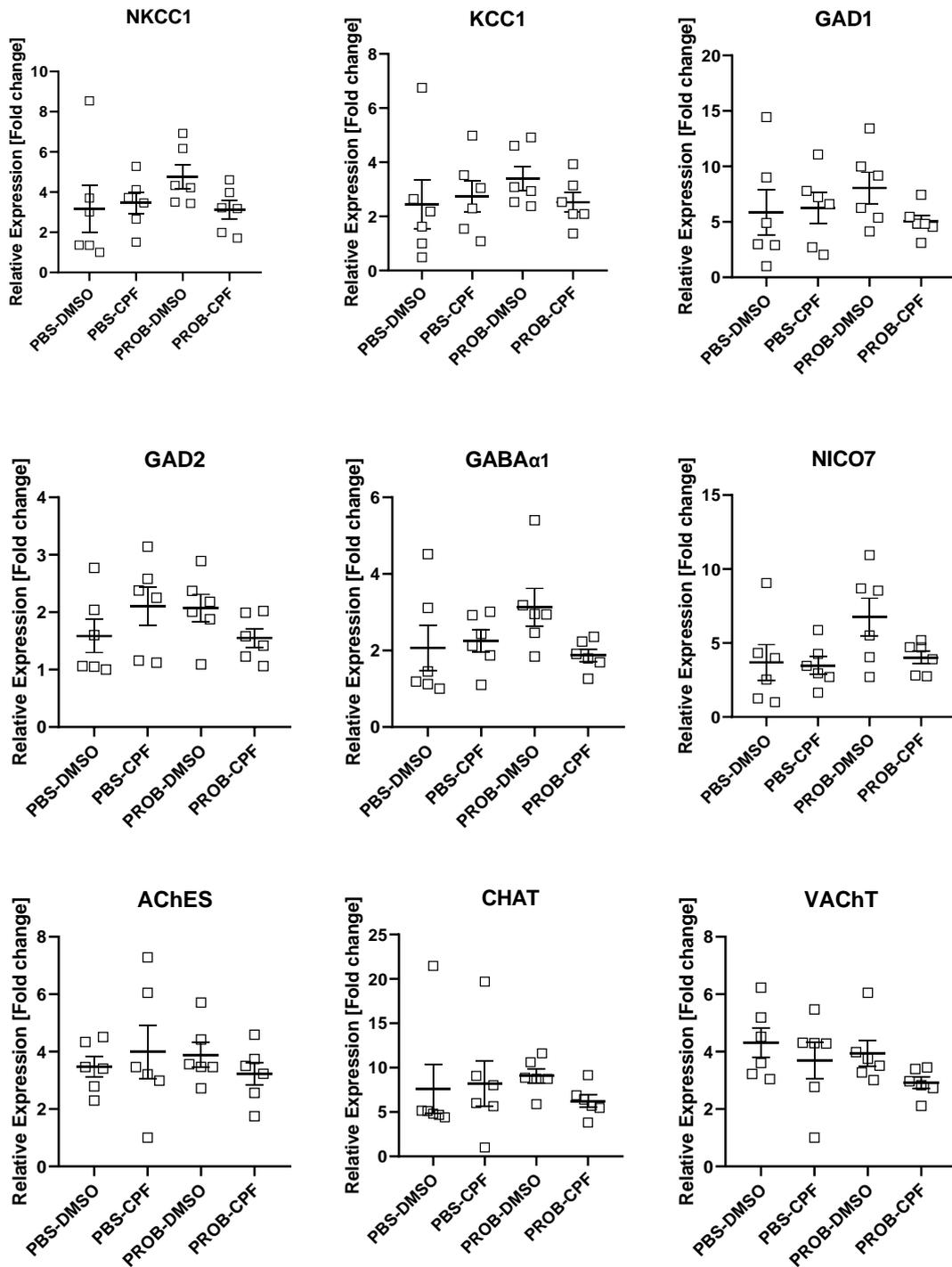


Anexo III

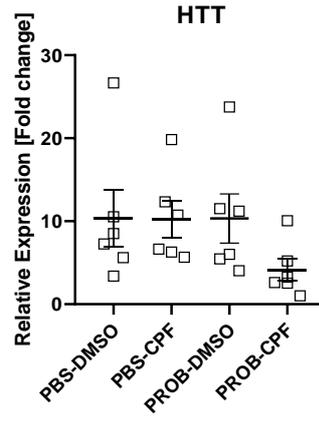
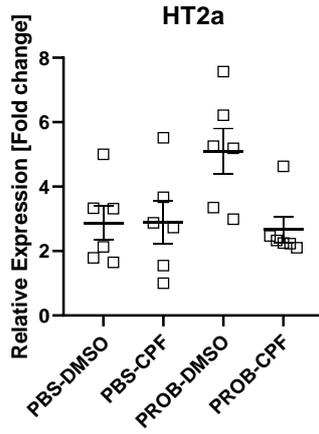
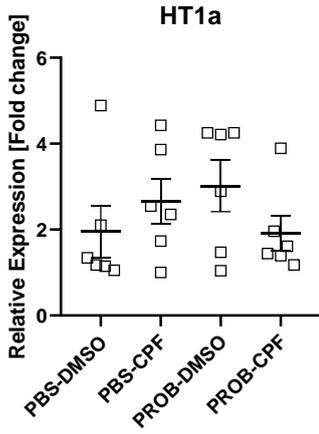
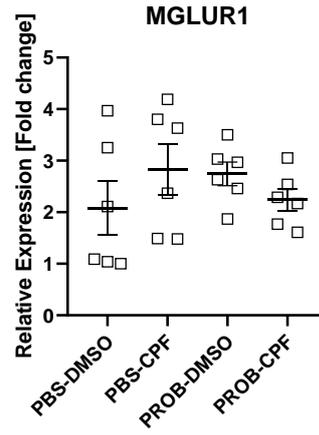
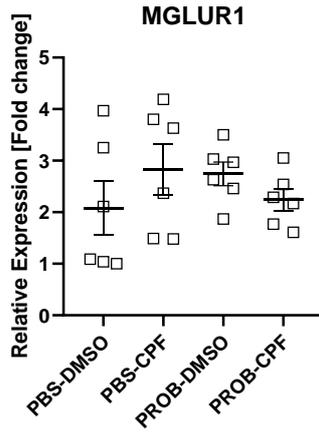
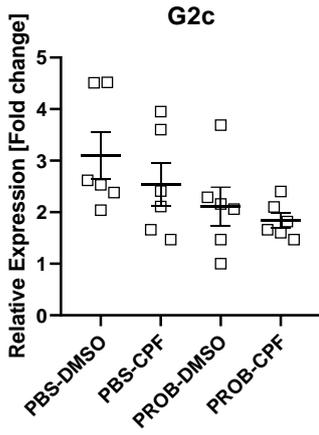
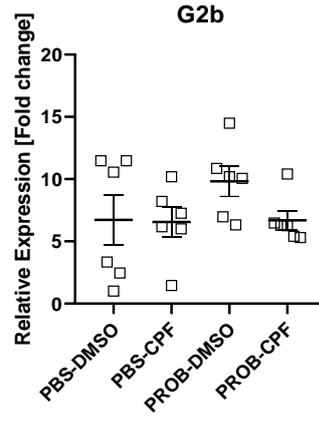
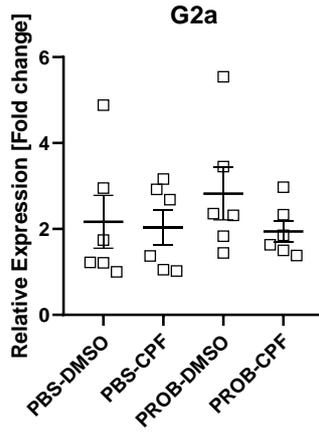
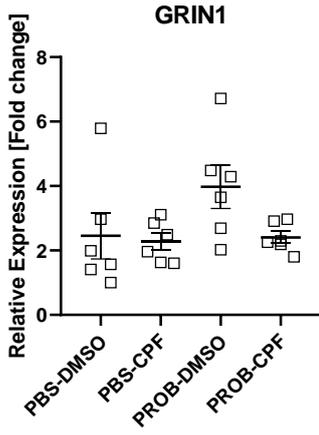
Open Field Test

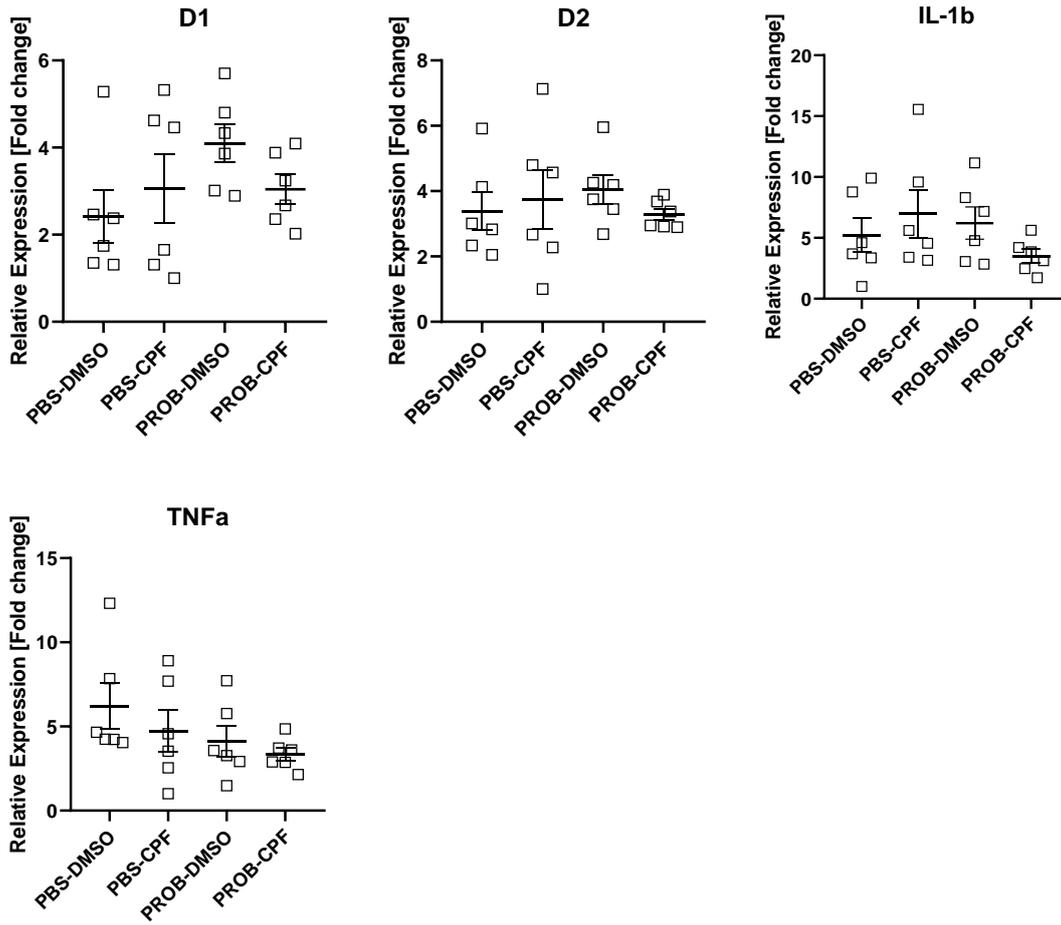


Anexo IV



Anexo IV. Media (\pm SEM) de la expresión relativa de todos los genes analizados en los que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos.





Anexo IV. Media (\pm SEM) de la expresión relativa de todos los genes analizados en los que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos.