

Tesis doctoral

Exposición prenatal a contaminantes ambientales: exposición prenatal a clorpirifós y el
desarrollo de autismo

Miguel Morales Navas

Julio 2021



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Directores:

Director - Luis Fernando Sánchez Santed

Co-director - Xavier Leinekugel

Título de la tesis (Español): Exposición prenatal a contaminantes ambientales: exposición prenatal a clorpirifós y el desarrollo de autismo

Thesis title (English): Prenatal Exposure to Environmental Pollutants: Prenatal Exposure to Chlorpyrifos and the Development of Autism

Autor: Miguel Morales Navas

Director de tesis: Luis Fernando Sánchez Santed

Co-director de tesis: Xavier Leinekugel

Programa doctoral: Salud, Psicología y Psiquiatría

Los experimentos llevados a cabo en esta tesis doctoral han sido realizados en los laboratorios de Psicobiología de la Universidad de Almería, siendo todos los protocolos supervisados por el Doctor Luis Fernando Sánchez Santed (Director de tesis) y Xavier Leinekugel (Co-Director de tesis), dentro del programa de doctorado de Salud, Psicología y Psiquiatría de la Universidad de Almería.

“No importa si crees en algún tipo de Arquitecto Universal o no, pues algo irrefutable es que la materia tiende a la consciencia, y más nos vale que en este basto universo, visto lo visto, no seamos los más listos de la clase”

Abstract

Organophosphate pesticides are a group of chemical compounds that have been used in very different areas, such as residential use, the care of public gardens, and, above all, in agricultural fields as a pesticide. Within this type of compound, chlorpyrifos has been one of the most used, and, like the rest of the substances belonging to this family, it is considered a dangerous neurotoxin. Its main mechanism of action is the irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE), although also, over the last few years, it has been possible to verify how even with subtoxic doses (those that do not produce the irreversible inhibition of AChE) there is an increase in oxidative stress, loss of neurons in certain brain structures, and neuroinflammation, among others. These kinds of alterations have been related to numerous psychiatric conditions, among which we can highlight the Autism Spectrum Disorder. In fact, the incidence of autism is higher in people who, for vital reasons, such as living near a farm field, have been exposed to this type of substance during their development.

On the other hand, it is known that exposure to valproic acid during fetal development causes autism. In fact, it is one of the most widely used animal models, as it covers a wide range of very similar aspects, both at a behavioral level (low social interaction, impulsive control disorders, or repetitive patterns of behavior); as well as at the physiological level (teratogenicity, alteration of the excitatory-inhibitory balances of the brain, etc).

In order to make a comparison between the effects of prenatal exposure of both compounds, we have administered subtoxic doses of chlorpyrifos of 1 mg/kg to Wistar rats, between gestational days (GD) 12.5-15.5, and a dose of valproic acid of 400 mg/kg, on 12.5 (GD).

The results obtained in the ultrasound tests, carried out between postnatal days (PND) 7 and 8, have highlighted an important similarity between both groups, chlorpyrifos (CPF) and valproic acid (VPA), compared to the control group (CNT). Both CPF and VPA took longer to make their first call, as well as fewer calls throughout the test. This indicates that they express less motivation to warn the mother of their adverse situation. In the locomotion tests, we have observed how the CPF is more active during adolescence compared to the CNT, something that does not occur in adulthood. Furthermore, no significant differences in CPF have been observed in the drug-challenge. In the 3-room test, in which

both sociability and reaction to social novelty are evaluated, both those exposed to CPF and VPA were similar to each other compared to the CNT. More specifically, the CPF, in their adolescence, showed a negative index in the reaction to social novelty, closely followed by those exposed to VPA. An effect that was recovered in adulthood, showing that CPF is more social even than the controls. The metabolomic analyzes, in line with what was seen in the behavioral tests, also showed that there are similarities between those exposed to CPF and those exposed to VPA in adolescence, being in adulthood where they showed a more pronounced difference in the amount of GABA, more specifically, in the cerebellum.

Thus, however, it seems that, indeed, although far from representing a model of autism, prenatal exposure to subtoxic doses of CPF can give rise to alterations very similar to those seen in an accepted autistic animal model, such as VPA. As well as that these alterations caused by CPF are more prone to recovery during the ontogeny of the animal than those caused by VPA.

Keywords: chlorpyrifos, valproic acid, pesticides, organophosphates, autism, sociability, ultrasound, locomotion

Resumen

Los plaguicidas organofosforados son un grupo de compuestos químicos que han sido utilizados en ámbitos muy diferentes, como son: el uso residencial, el cuidado de jardines públicos y, sobre todo, en los campos de cultivo como plaguicida. Dentro de este tipo de compuestos, el clorpirifós ha sido uno de los más utilizados y, al igual que el resto de sustancias pertenecientes a esta familia, es considerado como un peligroso neurotóxico. Su mecanismo principal de acción es la inhibición irreversible de la acetilcolinesterasa (AChE), aunque también, a lo largo de los últimos años de estudio, se ha podido comprobar cómo incluso con dosis subclínicas (aquellas que no producen la inhibición irreversible de la AChE) provoca aumentos en el estrés oxidativo, pérdidas de neuronas en ciertas estructuras cerebrales y neuroinflamación, entre otras. Este tipo de alteraciones se han relacionado con numerosos cuadros psiquiátricos, de entre los que podemos destacar el Trastorno de Espectro Autista. De hecho, la incidencia de autismo es superior en personas que, por cuestiones vitales, como pueden ser vivir cerca de un campo de cultivo, se han visto expuestas durante su desarrollo a este tipo de sustancias.

Por otro lado, es conocido que la exposición a ácido valproico durante el desarrollo fetal provoca autismo. De hecho, es uno de los modelos animales más utilizados, pues abarca un amplio rango de aspectos que son muy similares, tanto a nivel comportamental (baja interacción social, alteraciones del control impulsivo o patrones repetitivos de comportamiento); como a nivel fisiológico (teratogenia, alteración de los balances excitatorios-inhibitorios del cerebro, etc).

Con el ánimo de realizar una comparativa entre los efectos de la exposición prenatal de ambos compuestos, hemos administrado a ratas Wistar dosis subclínicas de clorpirifós de 1mg/kg, entre los días prenatales 12.5-15.5, y una dosis de ácido valproico de 400mg/kg, en el día prenatal 12.5.

Los resultados obtenidos en las pruebas de ultrasonidos, realizada entre los días 7 y 8 de vida, han remarcado una importante similitud entre ambos grupos, el clorpirifós (CPF) y el ácido valproico (VPA), en comparación con el grupo control (CNT). Tanto los CPF como los VPA tardaron más en realizar su primera llamada, así como también emitieron menos número de ellas a lo largo de la prueba. Lo que indica que expresan una menor motivación para advertir a la madre de su situación adversa. En las pruebas de locomoción, hemos observado como los CPF son más activas durante la adolescencia en

comparación con los CNT, algo que no se da en la adultez. Además, no se han observado diferencias significativas en los CPF en el desafío de drogas. En la prueba de las 3-habitaciones, en la que se evalúan tanto la sociabilidad como la reacción ante la novedad social, tanto las expuestas a CPF como a VPA se mostraron similares entre sí en comparación con los CNT. Más concretamente, los CPF, en su adolescencia, evidenciaron un índice negativo en la reacción ante la novedad social, seguidas muy de cerca por las expuestas a VPA. Efecto que se recuperó en la adultez, mostrándose los CPF más sociales incluso que las controles. Los análisis metabolómicos, en línea con lo visto en las pruebas comportamentales, también mostraron que existen similitudes entre las expuestas a CPF y las expuestas a VPA en la adolescencia, siendo en la adultez donde mostraron una diferencia más acentuada en la cantidad de GABA, más concretamente, en el cerebelo.

Así pues, con todo, parece ser que, efectivamente, aunque lejos de representar un modelo autista, la exposición prenatal a dosis subclínicas de CPF puede dar lugar a alteraciones muy parecidas a las vistas en un modelo animal autista aceptado, como es el de VPA. Así como también, que estas alteraciones provocadas por el CPF, son más propensas a la recuperación durante la ontogenia del animal que las que provoca el VPA.

Palabras clave: clorpirifós, ácido valproico, plaguicidas, organofosforados, autismo, sociabilidad, ultrasonidos, locomoción

ÍNDICE

Tabla de contenido

Abstract.....	9
Resumen.....	11
1. Introducción	19
1.1. ¿Qué son los organofosforados?	20
1.1.1. Principales usos.....	21
1.2. Clorpirifós	22
1.2.1. Mecanismos de acción	24
2. Autismo.....	35
2.1. ¿Qué es el autismo?	35
2.2. Etiopatología del autismo	36
2.3. La genética y el autismo	37
2.4. Los factores ambientales y el riesgo de padecer autismo	38
2.5. Comportamiento autista	39
2.6. El uso de ácido valproico y su relación con el autismo	40
2.7. Modelo animal de TEA: el modelo de ácido valproico	41
3. ¿Qué tienen en común el clorpirifós y el ácido valproico?.....	49
3.1. Cómo afectan	49
3.1.1. Estrés oxidativo	50
3.1.2. Estructura y comportamiento neuronal	51

3.1.3.	Neuropéptidos: oxitocina y vasopresina	53
3.1.4.	Comportamiento.....	54
4.	Justificación del estudio	57
4.1.	Estudio 1º	58
4.2.	Estudio 2º	59
4.3.	Estudio nº3	61
5.	Estudio nº1	65
	Abstract.....	65
5.1.	Introducción	65
5.2.	Materiales y método.....	69
5.2.1.	Animales experimentales	69
5.2.2.	Protocolo de administración.....	70
5.2.3.	Vocalizaciones ultrasónicas (USV)	71
5.2.4.	Actividad acetilcolinesterásica.....	72
5.2.5.	Análisis estadísticos	73
5.3.	Resultados	74
5.3.1.	Marcadores de desarrollo	74
5.3.2.	Grabaciones de vocalización ultrasónica	75
5.4.	Discusión.....	77
5.5.	Conclusión	80
6.	Estudio nº2.....	81

Abstract.....	81
6.1. Introducción.....	82
6.2. Materiales y método.....	85
6.2.1. Animales experimentales.....	86
6.2.2. Protocolo de administración.....	86
6.2.3. Actividad locomotora espontánea.....	87
6.2.4. Desafío de drogas (Drug challenge) en campo abierto.....	88
6.2.5. Coordinación y habilidad motora.....	88
6.2.6. Análisis estadísticos.....	90
6.3. Resultados.....	91
6.3.1. Actividad locomotora espontánea en ratas adolescentes.....	91
6.3.2. Actividad locomotora espontánea en ratas adultas.....	93
6.3.3. Desafío de drogas en el paradigma de campo abierto en ratas adultas.....	94
6.3.3. Test de paso de viga en ratas adultas.....	97
6.4. Discusión.....	97
6.5. Conclusiones.....	101
7. Estudio nº3.....	103
Abstract.....	103
7.1. Introducción.....	104
7.2. Materiales y método.....	108
7.2.1. Animales experimentales.....	108

7.2.2. Protocolo de administración.....	108
7.2.3. Test de Sociabilidad.....	109
7.2.4. Metabolómica.....	112
7.2.5. Análisis estadísticos	112
7.3. Resultados	113
7.3.1. Sociabilidad en adolescentes.....	113
7.3.2 Sociabilidad en adultas	122
7.3.3. Metabolómica.....	130
7.4. Discusión.....	132
7.5. Conclusiones	142
8. Discusión General.....	145
8.1. Objetivo de la presente tesis	145
8.2 Ultravocalizaciones y el perfil de un modelo autista en comparación con el CPF	146
8.3. La locomoción como aspecto evaluador de un modelo autista.....	148
8.4. Deficiencias sociales, y el enriquecimiento ambiental y social como tratamiento	151
9. Final conclusions	157
9. Conclusiones finales	161
Referencias.....	165

1. Introducción

Según la Arqueología, los primeros vestigios de cultivos humanos se sitúan en una época tan remota como los 11.000 años. Desde entonces, el ser humano, aplicando su imaginación e inteligencia en pos de su supervivencia, ha trabajado para idear métodos con los que proteger dichos cultivos de plagas y enfermedades. Tanto es así que, si observamos las estrategias de las que se valieron para tal propósito, no nos sorprenderemos en encontrar métodos que van desde los religiosos (como, por ejemplo: ofrecer oraciones por frutas y cultivos), hasta el tratamiento de las propias semillas (como era el remojarlas en un jugo de puerro doméstico antes de plantarlas o fumigar los cultivos con variedad de humos) (Smith & Secoy, 1975).

En la actualidad, gracias al desarrollo de la ciencia y de la tecnología, estos métodos han evolucionado, aunque el cometido principal sigue siendo el mismo: proteger las plantas.

Los agricultores, como bien sabemos, usan principalmente plaguicida para proteger los cultivos de plagas de insectos, enfermedades fúngicas u otros organismos indeseables (Saeedi Saravi & Shokrzadeh, 2011). Hoy en día se estima que, a nivel mundial, se utilizan aproximadamente 4,6 millones de toneladas de más de 500 clases de plaguicidas (W. Zhang et al., 2011) y, aunque, evidentemente, debemos tener presentes los beneficios que estas sustancias químicas ofrecen, tales como: mejorar la productividad, acrecentar la resistencia de los cultivos frente a todo tipo de agentes perjudiciales, ofrecer alimentos de mejor calidad, etc.; no podemos obviar algunos riesgos que, irremediablemente, van anexionados a su uso, como pueden ser: la muerte y contaminación de animales domésticos, la pérdida de enemigos naturales, la merma en el número de abejas y la polinización que llevan estas a cabo de forma natural, o el impacto negativo sobre la salud de las personas (Pimentel et al., 1993).

1.1. ¿Qué son los organofosforados?

Los organofosforados (OPs; por sus siglas en inglés) son un conjunto de insecticidas descubiertos en 1938 por un grupo de químicos alemanes (Jaga & Dharmani, 2003). Aunque, haciendo justicia histórica, los primeros compuestos organofosforados fueron preparados por alquimistas durante la Edad Media (Balali-Mood & Abdollahi, 2014).

En un principio, los OPs se diseñaron específicamente para controlar las plagas, evitar la proliferación de la maleza o combatir las enfermedades que las plantas sufrían. Pero luego, lamentablemente, se utilizaron como agentes químicos para la guerra (Kloske & Witkiewicz, 2019). Como plaguicidas, los OPs han estado entre los más utilizados en todo el mundo (Burke et al., 2017), algo que ha incluido su uso dentro de hogares, en jardines domésticos o en prácticas veterinarias (Bates & Campbell, 2008).

Así pues, los OPs son comúnmente entendidos como cualquier derivado orgánico en el que su componente principal sea el ácido fosfónico, el ácido fosfínico o el ácido fosfórico (Kulshreshtha & Shinde, 2012). Por lo tanto, al estar refiriéndonos a un grupo extremadamente grande, se hace harto complejo establecer una clasificación universal para los mismos. No obstante, hay que resaltar que, la mayoría de los OPs que más se utilizan, tienen como componente predominante al último de los mencionados (el ácido fosfórico) y que, dentro de este grupo, los que pertenecen al tipo pentavalente:

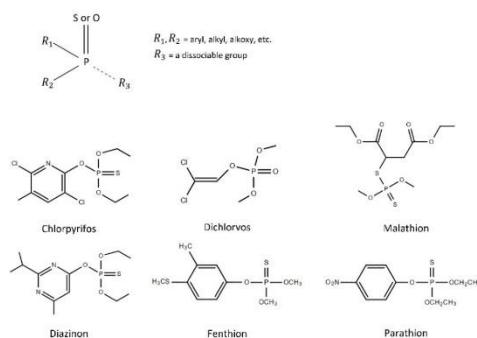


Figura 1.1. Estructuras básicas de los OPs comúnmente más usados como plaguicidas.

1.1.1. Principales usos

Como cualquier otro plaguicida, los OPs se han utilizado para prevenir, destruir, incapacitar, modificar o inhibir el crecimiento de las plagas. Para ello, se han usado estos compuestos como fungicidas, herbicidas, insecticidas, etc. (Kamel & Hoppin, 2004). Como ya se ha mencionado más arriba, los OPs han llegado a utilizarse como armas químicas, pero también, debido a su gran variedad y poderosos efectos, se han empleado para proteger a soldados y a civiles de algunas enfermedades transmitidas por insectos, tales como la malaria o el tifus (Fisher, 1999). Afortunadamente, lejos de todo esto, puede ser mencionado que han sido en los campos agrícola, industrial o doméstico, y no en los de batalla, donde más se han utilizado los OPs.

En cuanto a sus usos agrícolas, los OPs han sido y son los plaguicidas más populares (Hu et al., 2010). Tanto es así que, durante las décadas de los 50 y 60, este tipo de productos químicos se convirtió en el principal agente utilizado para controlar las plagas (Taylor et al., 2007). Sin embargo, su uso, desde la década de los 90, ha disminuido. Por ejemplo, en los Estados Unidos, la estimación sobre la utilización de estos compuestos ha pasado, de casi 40 millones de toneladas en los 90, hasta los nueve millones en 2012 (Atwood & Paisley-Jones, 2017).

Dentro de los plaguicidas más usados, algunos de los principales OPs son: el clorpirifós, el malatión, el paratión, el metilparatión, el fenitrotion, el diazinón y el diclorvos (Camarata et al., 2006; Meleiro Porto et al., 2010).

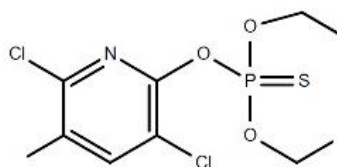
Los OPs son efectivos contra una amplia gama de insectos y pueden encontrarse en el mercado de muchas maneras, como, por ejemplo: insecticidas listos para usar, concentrados emulsionables, inmersiones, polvos y collares antipulgas (Walker & Stachecki, 2002). En cuanto a su modo de acción sobre los insectos, todos los OPs, a diferencia de otras sustancias con objetivos parecidos, son absorbidos fácilmente, atravesando barreras biológicas –como

pueden ser la piel y la mucosa—, perturbando así rápidamente su sistema nervioso central, provocándoles a estos: desorientación, parálisis, coma o la muerte, según el nivel de exposición (Gonzalez, 2015; Sass, 2007). Junto a su efectividad, los OPs también muestran una acelerada descomposición, habiendo sido por ello, durante muchos años, como hemos advertido ya, los elegidos para proteger los cultivos de las plagas.

Respecto a sus usos industriales y residenciales, los OPs son principalmente productos utilizados por aplicadores profesionales (Atwood & Paisley-Jones, 2017). De entre los más populares en estos ámbitos, encontramos los repelentes y raticidas, los cuales se han aplicado en una gran cantidad de lugares, tales como: hoteles, escuelas, jardines públicos, edificios de apartamentos, aceras, restaurantes, baños, centros comerciales, hospitales e incluso municipios (Balali-Mood & Abdollahi, 2014; Jaga & Dharmani, 2003); con el objetivo principal de controlar las plagas y los insectos, que pican y pueden ser vectores de algunas enfermedades. Quizás, de entre todos los comercializados, el OP más popular sea el clorpirifós.

1.2. Clorpirifós

El clorpirifós (0, O-diethyl 0- [3,5,6-trichloro-2-pyridyl] phosphorothioate) (CPF) es un OP que fue introducido en el mercado en el año 1965, para controlar las plagas en los campos de cultivo, así como reducir las domésticas (como pueden ser las de termitas), disminuir el efecto de los insectos en la hierba de los campos de golf o, inclusive, el control de catervas de mosquitos (Eaton et al., 2008).



Nombre Químico	0, O-diethyl 0- [3,5,6-trichloro-2-pyridyl] phosphorothioate
Peso Molecular	350.6 g mol ⁻¹
Estructura y fórmula empírica	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Estado	Sólido cristalino
Punto de fusión	41.5 – 42.5 °C
Presión de vapor (25 °C)	1.75x10 ⁻⁵ torr
Solubilidad en agua (20 °C)	0.73 mg/L ⁻¹
Densidad (21 °C)	1.51 g/ml

Tabla 1.1. Propiedades fisicoquímicas del clorpirifós.

Ampliamente extendido en multitud de formas de empleo, el CPF puede aplicarse mediante pulverización aérea, *quimigación*, esparcidores arrastrados por maquinaria agrícola o equipos de mano (Reserved, 2014). Como puede suponerse, durante algún tiempo, el CPF fue uno de los plaguicidas más populares de países como Estados Unidos (Gurunathan et al., 1998), no siendo hasta el 2001 cuando la EPA prohibió su uso residencial (Saunders et al., 2012). Sin embargo, a pesar de todo esto, el CPF continúa, hoy por hoy, siendo uno de los plaguicidas más utilizados en el mundo (Koshlukova & Reed, 2014). Por ejemplo, en los ya mencionados Estados Unidos, se estima que se usan aproximadamente 22 mil toneladas cada

año (Californians for Pesticide Reform, 2017), focalizándose su uso principalmente en tres tipos de cultivos: maíz (39%), frutos secos (15%) y soja (9%) (Eaton et al., 2008).

1.2.1. Mecanismos de acción

En cuanto al principal efecto de intoxicación por CPF, es el que se produce por la inhibición irreversible de la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa (AChE), causada por la acción del metabolito resultante de la oxidación del CPF (CPF-O), el cual es aún más potente como inhibidor de la AChE (Testai et al., 2010). La AChE es la encima que se encarga de descomponer la acetilcolina dentro de las hendiduras sinápticas, tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC), como en el Sistema Nervioso Periférico (SNP) (Chambers et al., 1994). Al inhibir su acción, lo que se provoca es una acumulación de acetilcolina en los receptores muscarínicos y nicotínicos, produciendo así una sobreestimulación colinérgica (Lotti, 2010; Pope et al., 2005). Esta sobreestimulación conlleva la presentación de síntomas fisiológicos dependientes de la gravedad de la intoxicación, como: náuseas, sudoración, salivación, espasmos y debilidad muscular, temblores, falta de coordinación, parálisis (Middlemore-Risher et al., 2010; Sánchez-Santed et al., 2004; Sherman, 1995); pudiendo llegar estos hasta a provocar la muerte (Carey et al., 2013; Costa, 2006).

Aun así, y partiendo de la información contrastada por la acción del oxon cuando la intoxicación es alta, también encontramos que, el CPF, puede provocar efectos incluso en dosis subclínicas (aquellas que se encuentran por debajo del umbral para hacer posible la inhibición de la AChE). Por ejemplo, en exposiciones continuadas, el CPF, puede provocar el desorden conocido como COPDIN (por sus siglas en inglés: *chronic organophosphate-induced neuropsychiatric disorder*) (Ray & Richards, 2001), con síntomas tales como: déficits en la memoria, ansiedad, depresión, fatiga o inclusive disfunción autonómica (Tan et al., 2009). El mecanismo de este desorden es aún desconocido, pero se sabe que no depende de la inhibición

de la AChE (Prendergast et al., 1998). Además de este desorden podemos encontrar otros mecanismos de acción alternativos a la inhibición de la AChE, que tienen también efectos notables en la fisiología y el comportamiento de los sujetos; especialmente cuando estos últimos se encuentran en su etapa de desarrollo fetal.

Uno de estos mecanismos substancialmente dañino, cuando la progenitora ha sido expuesta a CPF, es el estrés oxidativo. En numerosas investigaciones, el CPF ha sido capaz de incrementar la generación de las especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés: *reactive oxygen species*) (Crumpton et al., 2000a; Dominah et al., 2017; Geter et al., 2008), conllevando un incremento del estrés oxidativo, el cual es especialmente tóxico en el cerebro, pues posee un frágil equilibrio homeostático de reducción-oxidación, además de ser el órgano del cuerpo metabólicamente más activo, a la par de poseer un alto contenido lipídico, así como una baja concentración de antioxidantes endógenos (Arteaga et al., 2017). Sugiriéndose, por tanto, que la exposición del CPF durante el estadio gestacional da lugar a un incremento en la muerte celular, pudiendo ser los ROS un conducto general para muchos neurotóxicos (Sarafian & Bredesen, 1994).

Otro de los mecanismos propuestos ha sido el relacionado con el Sistema GABAérgico. Según algunos estudios con animales, la exposición subclínica a CPF durante el periodo perinatal, ha llegado a provocar problemas en la coordinación motora, así como en la propia actividad locomotora (Dam et al., 2000; Aldina Venerosi et al., 2009); algo que también ha podido apreciarse en niños expuestos a CPF, expresando estos puntuaciones más bajas en el *Bayley Psychomotor Development Index* (Rauh et al., 2006). Por ejemplo, en el cerebelo, la exposición en útero al CPF ha causado pérdida de células de Purkinje (neuronas GABAérgicas) que inclusive han perdurado hasta la adultez (Abou-Donia et al., 2006a), algo que perjudica la coordinación motora, pues esta está modulada por el GABA extracelular. Además, se ha visto también cómo, el CPF, provoca neuroinflamación incrementando los niveles de IL-1b en el

hipocampo, efecto que está relacionado con el daño en el aprendizaje espacial (Belén Gómez-Giménez et al., 2017a). Con relación a esto, también se ha comprobado cómo la exposición prenatal a CPF provoca disminución en la densidad de las capas piramidales de CA1 en el hipocampo (Speed et al., 2012), algo que puede provocar desequilibrios en los mecanismos de excitación e inhibición durante el desarrollo. Este factor, a su vez, puede entrañar daños en el propio desarrollo del feto, pues las neuronas GABAérgicas, durante este estadio, son las que se encargan de regular el flujo de calcio, algo de vital importancia para la proliferación, la migración, la muerte celular, etc. (De Cock et al., 2012). Un dato que apoyaría también esta relación, serían las alteraciones producidas por dosis subclínicas de otros OPs, similares al CPF, en la producción de corrientes espontáneas mediadas por el sistema GABAérgico, que ya han sido vistas con anterioridad en cultivos in vitro (Rocha et al., 1999).

Además de la tesis de afectación del sistema GABAérgico, tenemos también aquellas que apuntan de manera importante al sistema serotoninérgico durante el periodo perinatal, siendo este uno de los más vulnerables al CPF. Por ejemplo, se ha comprobado cómo la exposición neonatal al CPF ha provocado daño específico en las neuronas serotoninérgicas del tronco encefálico (Raines et al., 2001). Así como también, exposiciones por debajo del umbral de toxicidad, han modificado el comportamiento propio de las neuronas serotoninérgicas, promoviendo una regulación al alza de los receptores y haciendo que las neuronas postsinápticas se hiperactiven en un intento de compensar la falta de 5-HT (Aldridge, Meyer, et al., 2005a), algo que conlleva a efectos negativos en el comportamiento, como, por ejemplo: depresión mayor, hiperactividad locomotora o daños cognitivos (Aldridge, Levin, et al., 2005; Fernandez et al., 2017). De hecho, a tenor de los diversos hallazgos en esta línea, se ha sugerido que las funciones del sistema colinérgico, al verse este gravemente afectado por la exposición al CPF durante el desarrollo fetal, las adquiere el sistema serotoninérgico, incluso y a pesar de verse este también negativamente afectado por la sustancia (Aldridge, Levin, et al., 2005),

llegando esta a provocar alteraciones en la forma en que las conexiones sinápticas serotoninérgicas se desarrollan (Aldridge, Meyer, et al., 2005a). Pero esto aún va más allá, pues, como algunas investigaciones han reportado, la exposición a dosis subclínicas de CPF provoca una activación diferente en este sistema dependiendo del sexo de los sujetos, afectando así de maneras diversas tanto a la actividad sináptica como a los comportamientos relacionados con ella (Aldridge et al., 2004; Aldridge, Levin, et al., 2005; Theodore A. Slotkin & Seidler, 2007). Como vemos, los efectos de la exposición prenatal al CPF son de diversa índole, lo que entraña una complejidad y una gravedad esta, que se ve aumentada al saber que, algunos de estos efectos, son permanentes (Theodore A. Slotkin & Seidler, 2005).

Otro de los efectos prenatales que se han registrado después de dosis por debajo del umbral de inhibición de la AChE, ha sido la activación del sistema inmune del sistema nervioso central, también llamada neuroinflamación. Estudios como el de Tian et al. (2015) han mostrado un incremento en la expresión de citoquinas proinflamatorias en la amígdala, después de tan solo 24 horas tras la administración de una dosis subtóxica de CPF. Incremento que se ha prolongado hasta las 72 horas, algo con lo que además concuerda el estudio de Zhang et al. (2015), donde las células microgliales (células del sistema inmune que se activan cuando el SNC sufre daños) se activaron tras pasar solamente 12 horas tras la exposición a la sustancia. Datos, así pues, que nos dejan entrever la rápida activación de los mecanismos neuroinflamatorios cuando los sujetos son expuestos al CPF. Esto, junto con los estudios que han apuntado que, en los efectos de la neuroinflamación en el comportamiento, ven desde déficits en el aprendizaje espacial (B. Gómez-Giménez et al., 2018b), hasta la aparición de alteraciones en los niveles de ansiedad y condicionamiento del miedo (Liu et al., 2016) o, incluso, de temores (Rauh et al., 2015). Además, y algo más importante aún para este estudio, es que la desregulación de los procesos neuroinflamatorios también ha sido señalada como uno

de los agentes intervinientes en los sujetos con Trastorno del Espectro Autista (TEA) (Bjørklund et al., 2016; Matta et al., 2019; Pardo et al., 2005).

Por otro lado, también se ha visto cómo la exposición subtóxica a CPF afecta a la migración celular, llegando a niveles que afectan morfológicamente al sujeto, provocando, así pues, cierto grado de teratogenia en él (Deacon et al., 1980; Tara Sankar Roy et al., 2005).

Más aún, pero de manera más general a lo comentado, la exposición a CPF ha sido relacionada con el agravamiento o incluso como co-factor en el desarrollo de los siguientes problemas psiquiátricos: Enfermedad de Huntington (Dominah et al., 2017), Enfermedad de Alzheimer (G. Salazar et al., 2011; Sánchez-Santed et al., 2016; Vorhees, 1987), Parkinson (J. Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2019), y TEA (Lan et al., 2017; Aldina Venerosi et al., 2010).

Proceso	Compuesto	Esperable en el TEA	Expresado en los estudios	Especie	Momento de exposición	Dosis	Referencia
<i>Estrés oxidativo</i>	VPA	Aumento	Aumento	Ratón	GD9 (embriones)	0.60nM	(Tung & Winn, 2011)
	VPA		Aumento	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Hamzawy et al., 2018)
	VPA		Aumento	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Matsuo et al., 2020)
	VPA		Aumento	Ratón	GD12.5	600mg/kg	(Al-Amin et al., 2015)
	VPA		Aumento	Rata	GD12.5	500mg/kg	(Mirza & Sharma, 2019)
	CPF		Aumento	Ratón	GD14	6mg/kg	(De Felice et al., 2016)
	CPF		Sin efecto	Rata	GD17-20	1,2,5,10,20 y 40mg/kg/día	(Theodore A. Slotkin et al., 2005)
	CPF		Aumento	PC6 (células de rata)	No comentado	50µg/ml	(Garcia et al., 2001)
	CPF		Aumento en la expresión de los genes Hsp89α y β relacionados con la modulación del estrés oxidativo	Ratas y células cultivadas (PC-12)	No comentado	50, 100 y 200nM	(Bagchi et al., 1996)
CPF		Aumento	Ratón	GD7-12	0, 1, 3 y 5mg/kg/día	(Gu et al., 2020)	
<i>Funciones sinápticas</i>	VPA	Colinérgicas alteradas	Colinérgicas alteradas	Rata	GD12	400mg/kg	(Kim et al., 2014)
	VPA		Colinérgicas alteradas	Ratón	GD10.5	500mg/kg	(Luongo et al., 2016)
	CPF		Colinérgicas alteradas	Rata	PND1-4 (a); PND11-14(b)	1mg/kg/día(a); 5mg/kg/día(b)	(T. A. Slotkin et al., 2001)
	CPF		Colinérgicas alteradas	Rata	GD17-20	0, 1, y 5mg/kg/día	(Qiao et al., 2003)
	VPA	Serotoninérgicas alteradas	Serotoninérgicas alteradas	Rata	GD9	800mg/kg	(Miyazaki et al., 2005)
	VPA		Serotoninérgicas alteradas	Rata	GD9.5	800mg/kg	(Oyabu et al., 2013)
	CPF		Serotoninérgicas alteradas	Rata	GD17-20(a); PND1-4(b)	1mg/kg/día (a, b); 5 mg/kg/día (b)	(Aldridge, Meyer, et al., 2005b)
	CPF		Serotoninérgicas alteradas	Rata	GD9-12; GD17-20	1 y 5mg/kg/día	(Theodore A. Slotkin & Seidler, 2007)
<i>Equilibrio E/I</i>	VPA	Más excitatorio	Más excitatorio	Ratón	GD10.5	500mg/kg	(Gogolla et al., 2009)
	VPA		Más excitatorio	Rata	GD12.5	500mg/kg	(Lin et al., 2013)

Proceso	Compuesto	Esperable en el TEA	Expresado en los estudios	Especie	Momento de exposición	Dosis	Referencia
	VPA		Más excitatorio	Rata	GD15	300mg/kg	(Fueta et al., 2018a)
	CPF		Más excitatorio (de forma temprana, luego desaparece pudiendo tener efecto más un severo durante el desarrollo)	Ratón	10-12 semanas	5mg/kg (x5 días)	(Speed et al., 2012)
	CPF		Más excitatorio	Rata	Adultas (no específica)	0.1, 1 y 10mg/kg	(M. Muller et al., 2014a)
	CPF		Más excitatorio	Rata	Adultas (90 días)	10 y 40mg/kg	(Timofeeva & Gordon, 2002)
<i>Niveles de oxitocina</i>	VPA	Disminución	Disminución	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Dai et al., 2018)
	VPA		Disminución	Ratón	GD12.5	400mg/kg	(Tsuji et al., 2020)
	CPF		Disminución (solo en machos y en la amígdala)	Ratón	GD15-PND14	6 mg/kg/bw/día	(Aldina Venerosi et al., 2015)
	CPF		Incremento	Ratón	GD15-18(a); PND11-14(b)	3 y 6mg/kg/día (a); 1mg/kg/día y (splitlitter design)(b)	(Tait et al., 2009)
	CPF		Disminución (en hembras)	Ratón	GD12-15	2.5 y 5mg/kg/día	(Lan et al., 2019a)
<i>Receptores de vasopresina</i>	VPA	Desarrollo alterado	Desarrollo alterado (las hembras se parecen a los machos. Importante para la teoría de la “sobremasculinización”)	Ratón	PND1-2	50mg/kg/día	(Murray et al., 2011)
	VPA		Desarrollo alterado (regulación a la baja de los receptores V1aR)	Topillos de la pradera	GD12.5	600mg/kg	(Sailer et al., 2019)
	VPA		Ningún efecto	Ratas	GD12.5	600mg/kg	(Štefánik et al., 2015)
	CPF		Desarrollo alterado (regulación al alta de los receptores V1aR; contrario a los VPA)	Ratón	GD15-PND14	6 mg/kg/bw/día	(Aldina Venerosi et al., 2015)

Proceso	Compuesto	Esperable en el TEA	Expresado en los estudios	Especie	Momento de exposición	Dosis	Referencia
	CPF		Desarrollo a la baja (reducción de los niveles en el hipotálamo solamente en machos)	Ratón	GD15-18(a); PND11-14(b)	3 y 6mg/kg/día (a); 1mg/kg/día y (<i>splitlitter design</i>)(b)	(Tait et al., 2009)
			Desarrollo a la baja (reducción de los niveles en el hipotálamo solamente en machos)	Ratón	GD15-18; PND11-14	3 y 6 mg/kg/día	(A. Venerosi et al., 2012)
<i>Teratogenia</i>	VPA	Efectos teratogénicos	Efectos teratogénicos	Ratón	GD8	500mg/kg	(Hrubec et al., 2006)
	VPA		Efectos teratogénicos	Ratón	GD9; GD12.5 y GD14.5	500mg/kg	(Kataoka et al., 2013)
	VPA		Efectos teratogénicos	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Ingram et al., 2000)
	CPF		Efectos teratogénicos (efectos débiles)	Rata (embriones)	GD9.5	0.5, 5, y 50µg/ml	(T S Roy et al., 1998)
	CPF		Efectos teratogénicos	Rata	PND11-14	5mg/kg/día	(Tara Sankar Roy et al., 2004)
	CPF		Efectos teratogénicos	Ratón	GD6-7; GD1-15	100µg/gbw	(Raafea, 2014)
<i>Sociabilidad</i>	VPA	Disminuida	Disminuida	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Bambini-Junior et al., 2014)
	VPA		Disminuida	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Mohammadi et al., 2020)
	VPA		Disminuida	Rata	GD12.5	400mg/kg	(Kim et al., 2014)
	CPF		Disminuida	Ratón	GD12-15	2.5 y 5mg/kg/día	(Lan et al., 2017)
	CPF		Disminuida	Ratón	GD12-15	2.5 y 5mg/kg/día	(Lan et al., 2019a)
<i>Vocalizaciones ultrasónicas</i>	VPA	Reducción	Reducción	Ratón	GD13	600mg/kg	(Cheaha & Kumarsit, 2015)
	VPA		Reducción	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Dai et al., 2018)
	VPA		Reducción	Rata	GD12.5	500mg/kg	(M. Servadio et al., 2016)
	CPF		Sin efectos significativos	Ratón	GD14-17	6mg/kg/bw/día	(De Felice et al., 2015a)
	CPF		Sin efectos significativos (pero más latencia)	Ratón	GD15-18	6mg/kg/día	(Aldina Venerosi et al., 2009)
	CPF		Sin efectos	Ratón	PND1-4; PND11-14	1 y 3mg/kg/día	(Ricceri et al., 2003)

Proceso	Compuesto	Esperable en el TEA	Expresado en los estudios	Especie	Momento de exposición	Dosis	Referencia
	CPF		Reducción	Ratón	GD13.5-20	6mg/kg/día	(Mullen et al., 2013)
<i>Actividad locomotora</i>	VPA	Aumento	Aumento	Rata	GD9	600mg/kg	(Dufour-Rainfray et al., 2010)
	VPA		Aumento	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Felix-Ortiz & Febo, 2012b)
	VPA		Aumento	Rata	GD12.5	500mg/kg	(H. F. Wu et al., 2018)
	CPF		Aumento	Rata	GD9-12	1 y 5mg/kg/día	(Icenogle et al., 2004)
	CPF		Aumento	Ratón	PND1-4; PND11-14	1 y 3mg/kg/día	(Ricceri et al., 2003)
	CPF		Reducción	Ratón	GD15-18	6mg/kg/día	(Aldina Venerosi et al., 2009)
<i>Ansiedad</i>	VPA	Aumento	Aumento	Rata	GD12	400mg/kg	(Ellenbroek et al., 2016)
	VPA		Aumento	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Hou et al., 2018)
	VPA		Aumento	Ratón	GD12.5	500mg/kg	(Kataoka et al., 2013)
	VPA		Aumento	Rata	GD12.5	500 y 600mg/kg	(Banerjee et al., 2014)
	CPF		Aumento (solamente en hembras)	Ratón	GD14-17	6mg/kg/día	(Aldina Venerosi et al., 2010)
	CPF		Aumento (todos los sujetos eran hembras)	Ratón	GD15-PND14	0.2, 1 y 5mg/kg/día	(Braquenier et al., 2010)
	CPF		Aumento	Rata	GD14-20	0.01, 0.1, 1 y 10mg/kg/día	(Silva et al., 2017a)
<i>Aprendizaje</i>	VPA	Déficit	Déficit	Rata	GD12.5	500 y 600mg/kg	(Banerjee et al., 2014)
	VPA		Déficit	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Hou et al., 2018)
	VPA		Déficit	Rata	GD12.5	600mg/kg	(H. Wu et al., 2017)
	CPF		Déficit (solamente en las hembras)	Rata	GD17-20	1 y 5 mg/kg/día	(Levin et al., 2002)
	CPF		Déficit	Rata	GD9-12	1 y 5mg/kg/día	(Icenogle et al., 2004)
	CPF		Déficit	Ratón	GD12-15	2.5 y 5 mg/kg/día	(Lan et al., 2019a)

Proceso	Compuesto	Esperable en el TEA	Expresado en los estudios	Especie	Momento de exposición	Dosis	Referencia
<i>Memoria</i>	VPA	Déficit	Déficit	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Hou et al., 2018)
	VPA		Mejora	Rata	GD12.5	500mg/kg	(Edalatmanesh et al., 2013)
	VPA		Déficit	Ratón	GD12.5	500mg/kg	(Kataoka et al., 2013)
	VPA		Déficit	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Matsuo et al., 2020)
	CPF		Déficit	Ratón	GD13-17	0, 1 y 5 mg/kg/día	(Chen et al., 2012)
	CPF		Sin efecto	Ratón	GD12-15	2.5 y 5mg/kg/día	(Lan et al., 2017)
	CPF		Déficit	Rata	GD7-21	0.1, 0.3 y 1 mg/kg/día	(Belén Gómez-Giménez et al., 2017b)
	CPF		Sin efecto	Rata	GD6-PND10	0, 0.3, 1 y 5 mg/kg/día	(Maurissen et al., 2000)
<i>Comportamientos repetitivos</i>	VPA	Aumento de los comportamientos repetitivos	Aumento de los comportamientos repetitivos	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Schneider & Przewłocki, 2005a)
	VPA		Aumento de los comportamientos repetitivos	Rata	GD12.5	600mg/kg	(Mohammadi et al., 2020)
	VPA		Aumento de los comportamientos repetitivos	Ratón	GD12.5	600mg/kg	(Campolongo et al., 2018)
	CPF		Aumento de los comportamientos repetitivos	Ratón	GD12-15	2.5 y 5mg/kg/día	(Lan et al., 2017)
	CPF		Sin efecto	Ratón	GD14-17	6mg/kg/bw/día	(De Felice et al., 2015a)
	CPF		Disminución de los comportamientos repetitivos	Ratón	PND1-4; PND11-14	1 y 3mg/kg/día	(Ricceri et al., 2003)

Tabla 1.2. Resumen de los estudios más relevantes en cuanto a aspectos autistas y el uso de CPF y de VPA en roedores.

2. Autismo

2.1. ¿Qué es el autismo?

El trastorno del espectro autista (TEA), más conocido coloquialmente como autismo, es un trastorno del neurodesarrollo con alto índice de heredabilidad y heterogénea, que tiene características cognitivas subyacentes y que, además, suele suceder acompañada de otros tipos de déficits (Lord et al., 2020). Aunque entraremos en más detalle en una de las siguientes secciones, las características preponderantes, según su definición formal, son que se manifiesta durante la infancia y que se identifica por deficiencias de orden cualitativo en la interacción social, así como déficits en la comunicación (sea esta verbal o no verbal), además de patrones restrictivos de conductas repetitivas y estereotipadas (American Psychiatric Association, 2013).

El autismo, como término aplicado al diagnóstico psiquiátrico, tuvo su origen en Eugen Bleuler en 1908, para denominar el fenómeno que mostraba un paciente esquizofrénico, el cual se había “encerrado” en su propio mundo interno (Parnas et al., 2002). Aunque si bien es cierto que, al principio, al parecer, el término autista estaba referido a la introversión, la interpretación de esa introversión era bien distinta de lo que consideramos hoy día, pues se pensaba que era más un desapego de la realidad, y que el sujeto estaba más bien dentro de un mundo de ensoñación y fantasía (Rapaport, 1951). Empero, y obviando este curioso apunte sobre los orígenes del autismo como cuadro diagnóstico, muchas de las conductas descritas por Bleuler, en efecto, siguen siendo válidas para la determinación de la enfermedad.

2.2. Etiopatología del autismo

El TEA, como una de las enfermedades que más inciden en la población de nuestros días, se sitúa en un orden de incidencia del 1% en el mundo entero y creciendo (Lai et al., 2014), conllevando por ello que numerosos estudios hayan intentado, a lo largo de estos años, desentrañar cuáles son las bases etiológicas por las cuales se produce el autismo. Lamentablemente, debido a la extrema complejidad de dicho trastorno, esta base sigue permaneciendo desconocida (Goines & Ashwood, 2013). No obstante, a pesar de este desconocimiento, lo normal es que se entienda el autismo como un trastorno multifactorial en el que pueden intervenir: variaciones cromosómicas y genéticas (Bernier et al., 2014; Iossifov et al., 2014), desórdenes en la conectividad neuronal entre regiones funcionales del cerebro (Tyszka et al., 2014), problemas en la conectividad de la materia blanca y materia gris con distribución difusa (Cauda et al., 2011; Herbert et al., 2004), y factores ambientales (De Felice et al., 2015b; Kalkbrenner et al., 2014; Posar & Visconti, 2017).

En realidad, lo que podemos llegar a pensar después de ver esta diversidad de posibles factores y mecanismos, es que, precisamente, sea debido esta eventualidad por la que estamos ante un espectro y no algo realmente acotado y definido. Muy probablemente algunas de estas causas sean comórbidas y se den sincrónicamente, ya sea para provocar el desarrollo de las patologías que definen al autismo, o maximizando alguna de ellas a lo largo del desarrollo del individuo.

Quizás, lo más llamativo de la propia etiología del TEA sea que su incidencia es superior en hombres que en mujeres, siendo, según el DSM-V, cuatro veces más diagnosticado en los primeros que en las segundas (American Psychiatric Association, 2013). Esto ha provocado que surjan distintas teorías con respecto a la posible etiología del mismo, como pueden ser: la sobremasculinización del cerebro (Knickmeyer et al., 2008) o que las

mujeres posean un fenotipo protector contra el desarrollo de este trastorno (Jacquemont et al., 2014).

2.3. La genética y el autismo

La genética que interviene en el autismo es muy compleja y apunta a varios factores diferentes, como por ejemplo: alteración del número de variaciones de ciertos cromosomas, variaciones aberrantes en la expresión genética y/o funciones proteicas, modificaciones multigenéticas que incluyen variaciones raras o comunes, desórdenes genéticos neuropsiquiátricos y de discapacidad intelectual, entre otros (Ivanov et al., 2015).

En cuanto a los genes que intervienen en estas alteraciones, se detectan cada vez un mayor número de ellos, además de que muchos de estos parecen tener una vinculación hereditaria nada desdeñable (Lord et al., 2020). Quizás, entre los más sobresalientes en este aspecto, podríamos destacar el FMR1, vinculado al síndrome X frágil y del cual se estiman que entre un 20 y un 40% de los que sufren de este trastorno padecen a su vez del TEA (Antonio M. Persico & Bourgeron, 2006), o los genes NLGN3 y NLGN4, los cuales son parte de la etiología del Síndrome de Asperger, uno de los síndromes más característicos dentro del espectro de este trastorno (Jamain et al., 2003). Además, también podemos encontrar estudios sobre alteraciones en genes que parecen estar relacionados directamente con funciones comportamentales, tales como el AVPR1A, que codifica el receptor de vasopresina 1A (V1aR), situado en el cromosoma 12q, y que es uno de los mayores receptores de esta hormona, la cual se relaciona con la regulación del comportamiento social (severamente afectado en el autismo) (Meyer-Lindenberg et al., 2009), así como genes relacionados con alteraciones de la migración celular durante el desarrollo, como el RELN (A M Persico et al., 2001).

2.4. Los factores ambientales y el riesgo de padecer autismo

Las exposiciones a ciertos agentes durante el periodo gestacional pueden dar lugar a efectos adversos en el desarrollo del cerebro y otros órganos. De entre estos modificadores ambientales podemos destacar: una edad parental avanzada, estrés oxidativo, neuroinflamación y disfunción mitocondrial, alteraciones bioquímicas de diversa índole, contaminantes ambientales (tales como los OPs, metales pesados y la polución) y la exposición a drogas o tóxicos (Ivanov et al., 2015).

Por ejemplo, la exposición prenatal a altos niveles de polución ha sido relacionada con un bajo peso del neonato, así como peor resultado o déficits cognitivos a posteriori. Algo que además se ha visto fortalecido por el hecho de que el riesgo de padecer autismo bajo estas condiciones es dos veces superior al normal, sin contar además que podría ser incluso más alto cuando existe una predisposición genética, lo que se traduce en mayor susceptibilidad a sufrir dichos daños (Antonio M. Persico & Merelli, 2014).

La exposición a plaguicidas también ha sido señalada como un factor de riesgo a tener muy en cuenta (Philippat et al., 2018; Roberts et al., 2007b). En concreto, los ya mencionados plaguicidas OPs han sido uno de los más estudiados, pues son capaces de provocar alteraciones de diversa naturaleza, como por ejemplo, inhibir la degradación de la reelina, la cual es de vital importancia para la migración celular, la maduración y las funciones sinápticas de las células (Betancourt et al., 2006), o el aumento del estrés oxidativo en el cerebro (De Felice et al., 2016; Theodore A. Slotkin & Seidler, 2009); ambos, efectos relacionados con la etiología del autismo. De hecho, vivir cerca de campos de cultivo donde se utilizan estos plaguicidas se relaciona con un incremento del riesgo de padecer TEA de un 60% (Posar & Visconti, 2017).

No obstante, quizás algo más representativo y directo cuando hablamos de los factores ambientales sea el uso de drogas durante la gestación, como pueden ser la utilización de ciertos

fármacos, y en especial los antiepilépticos, de entre los que podemos destacar la talidomida o el ácido valproico (VPA) (M. Narita et al., 2010; Ornoy et al., 2016). En concreto, el VPA, tanto en investigaciones en animales como en estudios epidemiológicos humanos, es un factor de alto riesgo para padecer de este trastorno (Nicolini & Fahnstock, 2018; Rasalam et al., 2005). De hecho, se considera que su aplicación en madres gestantes da lugar a crías que despliegan un fenotipo muy parecido a lo observado en pacientes que sufren de TEA, de tal modo que es contemplado como un modelo animal de autismo aceptado (Mabunga et al., 2015).

2.5. Comportamiento autista

Si bien es cierto, como hemos mencionado en el apartado anterior, que el autismo presenta en su espectro un amplio grado de variedad en las posibles causas fisiológicas, por otro lado, tenemos, como columna vertebral de todas ellas, los comportamientos que idiosincrásicamente despliegan. Entre ellos, vamos a destacar los más comunes, los cuales, en su gran mayoría están recogidos en el DSM-V (American Psychiatric Association, 2013):

- Deficiencias en la comunicación y la interacción social:
 - incapacidad para comprender un lenguaje emocional tanto verbal como no verbal (falta de contacto ocular),
 - utilización repetida de palabras,
 - falta de interés en tener conductas de juego compartidas o hacer amigos.
- Restrictivos y repetidos patrones de comportamiento:
 - realizar siempre el mismo juego una y otra vez,
 - desarrollar rituales antes de realizar cualquier otra acción,
 - ecolalia, inflexibilidad a la hora de realizar cambios en alguna acción,
 - fijación y concentración extrema llegando a no prestar atención a su alrededor,

- hiper o hiperreactividad ante impulsos sensitivos.
- Deficiencias intelectuales:
 - reducidas funciones cognitivas,
 - deficiencias en los niveles de atención y problemas para aprender de manera adaptativa a distintos entornos.

Muchas de estas conductas están subordinadas al grado en el que el sujeto sufre del TEA. Lo que, en algún caso, por haber sido demasiado débiles, han pasado inadvertidas llegando incluso a producirse, en muchos casos, un diagnóstico tardío o incluso no haber sido diagnosticado nunca (Barnard et al., 2001).

2.6. El uso de ácido valproico y su relación con el autismo

El ácido valproico (ácido 2 propilpentanoico; VPA) es un ácido graso de cadena corta que deriva del ácido valérico natural (Ghodke-Puranik et al., 2013) y que fue sintetizado por primera vez en 1882. Generalmente, el VPA ha sido prescrito para el tratamiento de la epilepsia por sus efectos anticonvulsivos, aunque esto no ha sido óbice para que también haya sido utilizado en otro tipo de desórdenes psiquiátricos, tales como: la bipolaridad, la esquizofrenia, las manías agudas (Haddad et al., 2009).

Aunque existen datos sobre la farmacocinética y la farmacodinámica del VPA, realmente su mecanismo de acción no está aún completamente trazado; aunque sí son bien conocidos sus efectos bloqueando los canales de sodio y de calcio, así como el aumento en las funciones inhibitorias del GABA, acrecentando su síntesis e impidiendo su degradación (Phiel et al., 2001). Además, se sabe, que estas modificaciones a nivel del SNC son muy sensibles durante la gestación, teniendo efectos teratogénicos (Ornoy, 2009).

En cuanto a su relación con el autismo, tenemos que, la exposición al VPA durante el embarazo, ha sido relacionada, no solo con los aspectos teratogénicos ya mencionados (los cuales también se sabe que forman cuadro con el espectro autista), sino también con la merma del nivel de inteligencia de los sujetos, lo que engloba las capacidades verbales y no verbales de los mismos (Meador et al., 2013). De hecho, de forma más general, se ha podido ver cómo, niños expuestos uterinamente al VPA, han mostrado después problemas en cuanto a niveles de atención, sociabilidad e incluso un índice más alto de comorbilidad con el TDAH (Huber-Mollema et al., 2019).

Así pues, conjuntamente a todo esto, se ha visto de manera clara cómo el índice de incidencia del TEA aumentaba cuando el VPA había sido administrado a madres durante su etapa de gestación, llegando los números a ser, aproximadamente, siete veces superiores a lo que cabría esperar en una incidencia normal (Bromley et al., 2008; Moore et al., 2000).

2.7. Modelo animal de TEA: el modelo de ácido valproico

Partiendo de la idea de que en realidad la reproducción de cualquier cuadro psiquiátrico en animales es poco menos que una falacia, no menos cierto es que, los mecanismos que compartimos, hasta cierto nivel de análisis, son comunes. En el TEA, existen ciertos de estos modelos que en algún grado expresan fisiológicamente cambios y desempeñan tareas que, en cierto modo, podríamos decir que son análogas a los mostrados por los sujetos humanos que lo padecen. De entre los modelos animales, podemos destacar aquellos de aspecto genético, como por ejemplo: el FMR1, el BTBR o el MeCP2, o aquellos de contaminación ambiental como el modelo de activación inmune maternal (MIA, por sus siglas en inglés: *maternal immune activation*) o quizás, el más destacado y el que se utiliza en este estudio: el modelo de ácido valproico (VPA) (Patterson, 2011).

El modelo de VPA, concretamente en roedores, a través de los años, se ha situado como uno de los modelos animales de autismo inducido por ambiente más fiable (Nicolini & Fahnestock, 2018). Así pues, tenemos que los efectos del VPA provocan muchos cambios que pueden después encontrarse en los individuos que sufren del TEA. De entre ellos vamos a destacar los siguientes:

- **Fenotípicos:**

- ***Comportamiento social:*** en modelos animales de VPA se ha podido comprobar cómo estos han desplegado menos interés ante la novedad social que los del grupo control, los cuales sí que acudían al encuentro del nuevo congénere (Bambini-Junior et al., 2014; Cho et al., 2017). Además, los animales expuestos prenatalmente al VPA, presentan también un aumento en la latencia antes de entablar alguna relación social con otro igual (Schneider et al., 2006a, 2008). De hecho y a colación de lo mencionado, en el *3-chambered test* (descrito en el *Capítulo 7: estudio 3*), incluso cuando los animales de por sí se toman más tiempo antes de efectuar ningún acercamiento, cuando lo hacen, no parecen mostrar tampoco ningún tipo de preferencia por estar en la habitación del congénere o en aquella en la que no hay nada (Sakade et al., 2019). Siguiendo con los déficits de interacción social, estos animales, tienen también problemas en el momento de entablar conductas de juego (Edalatmanesh et al., 2013; M. Servadio et al., 2016).
- ***Llamadas de las crías a sus madres (vocalizaciones ultrasónicas):*** en cuanto a las llamadas que realizan estos animales cuando son crías indefensas, y factores como el aislamiento y el frío son aversivos para ellas, tenemos que, en principio, tardan más en emitir cualquier llamada de “ayuda” (Gandal et al., 2010); pero

es que, además, el número de las mismas parece verse reducido (Cezar et al., 2018; Kuo & Liu, 2017; Moldrich et al., 2013; Roman Tyzio et al., 2014). También se ha visto cómo, el tiempo de llamada, es más reducido que en animales controles (Cezar et al., 2018; Roman Tyzio et al., 2014) e, inclusive, cómo los patrones que estas describen están alterados en comparación con sujetos controles (Felix-Ortiz & Febo, 2012b; Moldrich et al., 2013).

- ***Sensibilidad ante estímulos:*** al igual que los pacientes con TEA, este modelo animal exhibe una reducida respuesta al dolor (Schneider et al., 2001), además de mostrar una hipersensibilidad para estímulos no dolorosos (Schneider & Przewłocki, 2005a). En cuanto al sistema perceptivo de estos animales y la posible relación de ciertos deterioros dependientes de los efectos del VPA en humanos, que pueden dar lugar a las mencionadas alteraciones en sus respuestas ante estímulos, tenemos, por ejemplo, que no parecen existir diferencias en la actividad electrofisiológica del córtex auditivo primario, aunque sí encontramos déficits en el secundario (Engineer et al., 2014); dato interesante, pues el córtex secundario está relacionado con el córtex somatosensorial encargado de estímulos relacionados como el tacto (Khalil, 2018), algo que tiene totalmente sentido si vemos los resultados en animales expuestos a VPA, los cuales tienen una reducida respuesta a los shocks cuando estos están relacionados con sonidos (Banerjee et al., 2014). Así pues, vemos que es una alteración sistémica en este aspecto, que se encuentra integralmente relacionada, y que puede provocar que el nivel de ansiedad general sea superior en estos animales en comparación con los controles (Schneider et al., 2007).
- ***Comportamientos repetitivos:*** en cuanto a los comportamientos repetitivos, el modelo de ácido valproico también despliega un fenotipo muy parecido a lo

esperable en una persona afectada por el TEA. Por ejemplo, tenemos que, en movimiento, dentro de un *open-field*, los animales hacían más veces exactamente el mismo pequeño recorrido, de manera consecutiva, que los sujetos controles (Schneider & Przewłocki, 2005). En la misma línea, en el laberinto en T, los animales tratados prenatalmente con VPA mostraron menos alternancia entre los brazos que el resto de los grupos (Cezar et al., 2018). Así además, en la prueba de enterrar canicas, también estos sujetos mostraron significativamente una fijación superior, respecto al comportamiento de cavar para esconderlas, que los animales controles (Kim et al., 2014).

- **Hiperactividad:** los sujetos autistas presentan una alta comorbilidad con trastornos hiperactivos, si los comparamos con la población en general (May et al., 2016). Así pues, en estos animales, también ha podido comprobarse la existencia de esa comorbilidad. Como ejemplo tenemos que, de nuevo, en la prueba del open-field, los animales mostraron más actividad locomotora que los controles (C. S. Choi et al., 2016; Raza et al., 2015). Pero es que, además de esto, el comportamiento de escape que a veces presentan estos animales en sus interacciones sociales, también ha sido relacionado con la propia hiperactividad que al parecer tienden a sufrir (Degroote et al., 2014).

- **Fisiológicos:**

- **Teratogenia:** como hemos comentado ya, la administración prenatal de VPA provoca serios cambios morfológicos, tales como: malformaciones en el corazón, anomalías craneofaciales, defectos en el propio esqueleto y extremidades, así como en los tubos neurales (Tung & Winn, 2011). Dichas malformaciones están en la línea de investigaciones y estudios que han visto

que el cerebro de autistas también presentan las anormalidades morfológicas mencionadas (Green et al., 2018; Ozgen et al., 2011; Tillman et al., 2018; Tripi et al., 2019). El modo en el que el VPA provoca la teratogenia, todavía no es del todo comprendido, aunque algunos estudios apuntan al estrés oxidativo.

- ***Estrés oxidativo:*** el estrés oxidativo ha sido señalado como una de las posibles causas de la teratogenia en el TEA. Un número excesivo de especies reactivas al oxígeno pueden provocar daños directos en el ADN, en diversas proteínas y lípidos, pudiendo alterar las vías de señalización a través de la activación de factores de transcripción sensibles a redox (Wells et al., 2009). Además, se ha comprobado cómo el uso de la oxitocina, una hormona que, entre otros, posee un efecto antioxidante, mejora el comportamiento de los animales tratados prenatalmente con VPA, reduciendo el estrés oxidativo de los mismos (P. Wang et al., 2014).
- ***Sistema GABAérgico y los balances excitatorios/inhíbitorios:*** una de las propuestas en los desequilibrios excitatorios/inhíbitorios que se han apuntado, es la de la desregularización de la descarboxilasa del ácido glutámico 67 (GAD67) en estructuras como el córtex, el hipocampo y el cerebelo (Hou et al., 2018). Por otro lado, también se ha observado cómo, en animales tratados prenatalmente con VPA, se encuentra una reducción poblacional en las neuronas positivas inhibidoras de parvalbúmina (PV), las cuales pueden estar tras la producción de dichos desequilibrios, pues son una de las encargadas de refinar la naturaleza de las conexiones de la circuitería neuronal dependientes de la experiencia del individuo (Gogolla et al., 2009). Además, también se ha conjeturado con la probabilidad de que

las neuronas GABAérgicas, que al comienzo del desarrollo y a edades tempranas son excitatorias, no sufran después el cambio necesario para convertirse en neuronas inhibitorias por la acción creciente de los transportadores KCC2 (encargados de la regulación de los ciclos de inhibición/excitación de las neuronas, a través del mantenimiento de los niveles de iones de cloruro en las neuronas). Lo cual provocaría que el GABA siguiera teniendo efectos despolarizantes y no hiperpolarizantes, algo que ayudaría a la comentada desregularización electrofisiológica del cerebro (Cellot & Cherubini, 2014). Con todo, cabría traer aquí, lo ya mencionado anteriormente en cuanto a la reducida respuesta a los electroshocks en animales tratados prenatalmente con VPA, lo cual apuntaría a esa disminución de las funciones GABAérgicas (Kim et al., 2014). Como último a señalar en este apartado, no podemos olvidar la comorbilidad que existe entre la epilepsia y el TEA, que también nos da una pequeña pista de que, efectivamente, estos desequilibrios excitatorios/inhibitorios (E/I) forman parte de la etiología del TEA (Puig-Lagunes et al., 2016).

- ***Niveles de serotonina:*** teniendo en cuenta el rol tan importante de la 5-HT durante la embriogénesis y los elevados niveles de esta sustancia en personas con autismo (Anderson et al., 1990), donde el 25% de los sujetos muestran hiperserotonemia en la sangre (C. L. Muller et al., 2016), los aspectos relacionados con dicha sustancia también han sido examinados en los modelos de VPA. Y, como era de esperar, efectivamente, tanto los niveles de serotonina como el propio desarrollo de las neuronas serotoninérgicas se encuentran alterados en estos animales (N. Narita et al., 2002; Oyabu et al.,

2013). De hecho, apoyando esto, se ha encontrado que existe un aumento de un género bacteriano (Clostridia) y una vía metabólica que están implicados en la estimulación de la producción de serotonina propia del individuo (Lim et al., 2017). Aunque existe algo de controversia, pues, al parecer, la distribución de la serotonina es distinta dependiendo de las estructuras cerebrales. Por ejemplo, tenemos que se han encontrado niveles elevados de receptores en la amígdala (C. C. Wang et al., 2013) y niveles de serotonina drásticamente descendidos en estructuras como el hipocampo (Dufour-Rainfray et al., 2010), estructura conexas con la relación social.

- **Neuroinflamación:** en los últimos años ha sido establecido que, tanto la neuroinflamación como, de manera más general, las anormalidades en el sistema neuroinmune, tienen un importante rol tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de ciertos aspectos del TEA (Siniscalco et al., 2018). Por ejemplo, se ha comprobado cómo, la sobreexpresión de IL-6 (una citoquina con funciones pro-inflamatorias), produce desequilibrios y anormalidades en la plasticidad sináptica, provocando déficits de aprendizaje, cognitivos y de comportamientos de interacción social (J. Choi et al., 2018). En cuanto a los modelos de VPA, se ha visto cómo los niveles de IL-6 se encuentran muy elevados en el hipocampo (H. Wu et al., 2017), alteración esta que también se encuentra relacionada con los desequilibrios excitatorios/inhibitorios neuronales que se han visto, como ya hemos mencionado más arriba, en los cerebros autistas (H. Wei et al., 2012). Además, en estos animales, las células gliales se encuentran afectadas por el VPA, siendo los cambios sufridos más fuertes en el córtex prefrontal y el

hipocampo, donde sufren también de una neuroinflamación crónica (Bronzuoli et al., 2018).

Así vemos cómo, el modelo animal del TEA que hemos escogido en este trabajo es sólido, consistente en el tiempo y puede ofrecernos una comparativa real, en orden de saber cuán lejos o cerca están los resultados obtenidos en nuestro trabajo, de lo que cabe esperar de la gradación que presentan los autistas, dentro de su amplio y complejo vademécum de comportamientos, así como también del sustrato fisiológico que sostiene su trastorno.

3. ¿Qué tienen en común el clorpirifós y el ácido valproico?

En primer lugar, me gustaría apuntar que buscar la relación directa entre ambos compuestos, siendo en principio tan diferentes, es una labor que pudiera llegar a ser estéril, pues es imposible buscar una equivalencia entre las mismas. No obstante, puede pensarse que, si podemos ver qué efectos tienen en el sujeto, podemos afirmar con mayor o menor seguridad si esto o aquello es similar o no; sin embargo, esto también, al menos de manera directa, no está falto de problemas conceptuales. Aun así, los organismos, en sus mecanismos reflejos, tienen una manera de operar y, a pesar de que estas raíces puedan ser muy distintas, aun dándonos el mismo resultado final, no es menos cierto que, si suceden ciertas semejanzas a un nivel concreto, el sustrato de las mismas nos pudiera, incluso llegado el caso, llegar a ser irrelevante. Si dos relojes dan las doce, poco nos importa, a cierto nivel, que uno sea digital y otro completamente analógico. Con esto no quiero dar a entender un desprecio hacia el nivel fisiológico de un organismo, sino que, para llegar a un mismo lugar, existen diferentes caminos.

Dicho esto, pasaremos a continuación a ver en qué campos tanto el CPF como el VPA provocan cambios similares. Esta observación se hará partiendo de un nivel más molecular hasta cambios más molar. Este desarrollo del análisis lo utilizo solamente como hilo conductor, no pretendiendo así sugerir ninguna causalidad inamovible directa de un nivel a otro.

3.1. Cómo afectan

Como hemos apuntado más arriba, la característica más predominante del CPF es que produce la inhibición de manera irreversible de la actividad enzimática de la AChE. No obstante, nosotros, en este trabajo, nos vamos a centrar en dosis subclínicas (—no así en algunas de las

referencias, pues pretendemos dar muestras de los efectos de la sustancia en distintos grados—), mencionando los indicios existentes de manera laxa, ya que los mecanismos de acción son actualmente, y como también hemos mencionado ya, mayormente desconocidos. Con el VPA, ocurre un tanto de lo mismo. Se tienen indicios de cómo actúa en algunos casos, pero no se conoce perfectamente la cantidad de modificaciones que produce en los organismos, cuando este es administrado de forma prenatal.

Así pues, emulando un tanto los dos puntos anteriores, haremos una comparativa en aquellos aspectos donde los indicios son fuertes y las investigaciones han arrojado algo de luz.

3.1.1. Estrés oxidativo

Ambos compuestos, CPF y VPA, aumentan considerablemente el estrés oxidativo y, junto con ello, provocan apoptosis y cambios en la estructura morfológica de las capas corticales (Kataoka et al., 2013; Tara Sankar Roy et al., 2004, 2005; Tung & Winn, 2011). Por ejemplo, en relación al CPF, se ha visto cómo este puede aumentar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y sensibilizar a las células a otros compuestos que también generasen estrés oxidativo, algo que, además, sería más grave en sistemas nerviosos en desarrollo por la alta demanda metabólica que conlleva el crecimiento (Crumpton et al., 2000a; Theodore A. Slotkin et al., 2005). Asimismo, en el VPA se ha visto, tanto en animales expuestos prenatalmente como en cultivos celulares, cómo aumentan las ROS, siendo estas partícipes en los efectos teratogénicos que después se ven en las crías (Ornoy, 2009; Tung & Winn, 2011). Así pues, y como suma, tanto el CPF como el VPA ejercen modificaciones en la migración celular (Deacon et al., 1980; Umka, 2010) alterando la proliferación celular tras dosis prenatales (Crumpton et al., 2000b; Fujimura et al., 2016). Evidentemente esto conlleva cambios de orden superior, como por ejemplo son los efectos teratogénicos, que también han sido encontrados y estudiados

en ambas sustancias (Farag et al., 2003; Tara Sankar Roy et al., 2005; Y. Tian et al., 2005); aunque ciertamente, en el CPF, las dosis para producir estos efectos de manera prominente han de ser altas. No obstante, como hemos referido, los cambios morfológicos surgen incluso con dosis subclínicas del plaguicida.

3.1.2. Estructura y comportamiento neuronal

El tipo de cambios mencionados anteriormente, no solo afectan a la propia distribución y cantidad de las poblaciones neuronales, sino que también, ambas sustancias, ejercen cambios de orden estructural en las propias neuronas, haciendo que estas vean alteradas sus funciones. Por ejemplo, tenemos que la exposición neonatal al CPF, inclusive en dosis subclínicas, produce anormalidades que afectan a las funciones sinápticas colinérgicas del hipocampo, produciendo un daño que realmente se sostiene a lo largo de la vida de los sujetos (T. A. Slotkin et al., 2001), provocando unos elevados niveles de AChE en el espacio sináptico (Abou-Donia, 2003). En cuanto al VPA podemos encontrar también que estos niveles se encuentran elevados (Kim et al., 2014).

Las alteraciones, tanto en una sustancia como en la otra, han mostrado ser también comunes en el sistema serotoninérgico. En la exposición gestacional al CPF existen cambios en la regulación (produciendo una regulación al alza) y mantenimiento de la homeostasis de este sistema (Aldina Venerosi et al., 2010); sugiriéndose, además, que conlleva cambios como la falta de un orden dentro de las conexiones neuronales serotoninérgicas (Aldridge, Meyer, et al., 2005a). Con el VPA tenemos que ocurren cosas hasta cierto punto similares. Como, por ejemplo, la distribución propia de las neuronas se encuentra alterada con el consecuente efecto que provoca déficits y desórdenes en las conexiones (Oyabu et al., 2013); donde, por otro lado, se ha visto un incremento de los niveles de 5-HT generalizado (N. Narita et al., 2002). Cambios

que, en ambos casos, parecen perdurar a lo largo de la vida del individuo (Aldridge, Meyer, et al., 2005a; Miyazaki et al., 2005).

En muchísimos casos, los sujetos que sufren del TEA, presentan ataques epilépticos (Jokiranta et al., 2014). Así pues, los equipos de investigación se han dedicado a estudiar este fenómeno, descubriendo que existe en sus cerebros un desequilibrio excitatorio/inhibitorio en el comportamiento electrofisiológico de sus neuronas (como hemos comentado más arriba). En cuanto a esto, también encontramos similitudes en ambas sustancias, pues, por ejemplo, en la administración de CPF se ha podido ver cómo la amplitud de las mEPSC (corrientes postsinápticas excitatorias en miniatura) se encuentra reducida¹ (Speed et al., 2012), así como también sucede lo mismo con la administración del VPA en útero (Walcott et al., 2011). Siguiendo con el comportamiento electrofisiológico, tenemos la arquitectura del sueño, en la cual pueden verse los ritmos y la sincronización del cerebro modulada esta por el comportamiento eléctrico del mismo. En los sujetos autistas, se ha visto cómo también estos patrones se encuentran alterados (Limoges et al., 2005; Ornitz et al., 1969). De igual forma parece ser que, tanto la exposición a CPF como a VPA, perturba dichos patrones. Como ejemplo de esto tenemos que ambos provocan dificultades en obtener un sueño profundo más efectivo y que, además, el número de husos de sueño o ritmo sigma, los cuales son necesarios para pasar del estado despierto al sueño, están también alterados (Cusmano & Mong, 2014; Timofeeva & Gordon, 2001). Asimismo, parece ser que ambos, tanto los expuestos a una como a otra sustancia, presentan una especie de incremento en la producción de altas frecuencias en el EEG (Cusmano & Mong, 2014; M. Muller et al., 2014b). Las altas frecuencias se han

¹ En este estudio, las administraciones se llevaron a cabo en ratones con 10-12 semanas. La falta de publicaciones referente a exposiciones en útero y la actividad electrofisiológica, ha hecho imposible acercarnos más en este punto a la comparación “ideal” de la administración in útero del VPA. No obstante, vemos comportamientos parecidos en un factor básico de la propia estructura fisiológica del sistema entre ambas sustancias.

detectado en pacientes autistas y han sido relacionadas con los desequilibrios de los procesos de excitación/inhibición neuronal (Cellot & Cherubini, 2014). Así pues, también vemos aquí ciertas similitudes.

3.1.3. Neuropeptidos: oxitocina y vasopresina

Por otro lado, y en relación con esto último, tenemos que, un neuropeptido como la oxitocina, se encuentra estrechamente relacionado con las propiedades excitatorias/inhibitorias de las sinapsis, así como con la propia reorganización del citoesqueleto (Falougy et al., 2019). De esta forma, casi forzosamente, se ha relacionado la oxitocina con la etiología del TEA (Feldman et al., 2014). En cuanto al efecto del CPF sobre este neuropeptido, se ha comprobado que sus niveles se encuentran alterados en el hipotálamo, incrementando estos de forma significativa (Tait et al., 2009), algo que en principio puede contradecir resultados obtenidos con el VPA, donde al parecer, de manera general, los niveles de oxitocina se encuentra significativamente disminuidos (Dai et al., 2018). Aun así, por otro lado, encontramos que, la exposición al CPF de forma prenatal, provoca selectivamente en los machos una disminución drástica de la oxitocina en la amígdala (Aldina Venerosi et al., 2015), estructura muy relacionada con el control afectivo y las respuestas sociales. Además de este neuropeptido, la vasopresina, involucrada también como la oxitocina en el comportamiento social (Caldwell, 2017), se ha visto incluida dentro de varios estudios. En concreto, el CPF parece que disminuye los niveles de vasopresina en el hipotálamo, especialmente en los machos (Tait et al., 2009). Con el VPA tenemos que también se encuentran disminuidos en el hipotálamo (R. Zhang et al., 2017), aunque se han publicado datos de que, a lo largo del desarrollo vital, estos niveles aumentan. No obstante, la aplicación del VPA interactúa con los receptores *Avr1*, haciendo que estos disminuyan acercándose más aún al cerebro de las hembras, las cuales, al parecer, de manera

general en muchas especies, tienen menos cantidad de estos receptores (De Vries & Panzica, 2006).

3.1.4. Comportamiento

Teniendo en cuenta que el tema principal de la tesis es saber la semejanza que puede provocar el CPF en comparación con el VPA, es fundamental que nos centremos, dentro del comportamiento, en su comportamiento social. Aunque comentaremos, a su vez, otros hallazgos que pudieran poner de resalto algunas otras similitudes.

En relación con el comportamiento social, la administración prenatal al CPF ha arrojado algunos hallazgos interesantes. Por ejemplo, uno de los comportamientos de nexo social más importante (si no el más importante) es la comunicación entre congéneres, la cual se empieza a desarrollar desde el mismo momento de su nacimiento. Como hemos apuntado más arriba, el sistema serotoninérgico se ve afectado tanto por el CPF como por el VPA. Sistema este que tiene un papel muy importante en la modulación de las vocalizaciones ultrasónicas (USV) (Weller et al., 2003). Así pues, se ha podido comprobar cómo, en la administración gestacional del CPF en ratones, el número total de USV se ven disminuidas, así como también la duración de las mismas, a la par que se incrementa el tiempo que tardan en emitir la primera de ellas (Aldina Venerosi et al., 2009). Datos todos ellos que nos indican que parece existir una falta de motivación y comunicación entre madre y cría, cuando esta última ha sido puesta en una situación de aislamiento (estrés). De igual manera, en las crías de roedores, la exposición prenatal al VPA, provoca efectos equivalentes (Gandal et al., 2010; M. Servadio et al., 2016). Además de este comportamiento, se ha mirado muy de cerca si el efecto prenatal del CPF, en roedores, tiene algún tipo de efectos en la interacción social de los sujetos en la prueba de Crawley (también conocida en inglés como *3-chambered test*) y similares. En cuanto al test de Crawley, la exposición prenatal al CPF ha provocado cambios en tanto que, los sujetos macho (específicamente, pues los efectos al CPF parecen evidenciar dimorfismo sexual), han pasado

menos tiempo con otro conespecífico suyo que los del grupo control (Lan et al., 2017, 2019a). Siguiendo con esta línea, las publicaciones al respecto con la administración prenatal de VPA, referencian que los sujetos se muestran menos sociales, interactuando menos con sus congéneres, tanto en el índice de sociabilidad como en el índice de novedad social (Bambini-Junior et al., 2014; Kumar & Sharma, 2016a).

No obstante, relacionados con el fenotipo del autismo, hay además otro tipo de comportamientos que también son resaltables, como, por ejemplo, el comportamiento hiperactivo que muchas veces acompaña al TEA. En cuanto a esto se ha podido ver cómo, la exposición prenatal a CPF, provoca niveles altos de actividad cuando se ha evaluado su movimiento en el laberinto en T (Icenogle et al., 2004; Levin et al., 2002). Incluso, en algunos otros casos, los sujetos expuestos han mostrado indicadores relacionados con el ADHD como alta ansiedad, agitación motora elevada, problemas de sueño (Grabovska & Salyha, 2015a; Timofeeva & Gordon, 2002). En común con estos factores, el VPA, como modelo animal del TEA y ha sabida cuenta de que este trastorno presenta una seria comorbilidad con el ADHD, también se han obtenido resultados similares, como la alta ansiedad (Ellenbroek et al., 2016), la agitación y actividad locomotora (Icenogle et al., 2004) y los problemas de sueño (Cusmano & Mong, 2014).

En suma a todo lo comentado, y siguiendo con aquellos factores que son comunes entre el CPF y el VPA, por ejemplo, en niños expuestos prenatalmente a CPF, se ha comprobado que estos presentan déficits en aprendizaje y memoria (Rauh et al., 2012); algo corroborado por otros estudios de exposición prenatal en ratas, cuando los sujetos han sido evaluados con la prueba de 16-brazos (Icenogle et al., 2004), en el laberinto en cruz (Levin et al., 2002) o en el laberinto en T (Chen et al., 2012). Además, y a colación, tenemos, como habíamos comentado ya, que la exposición prenatal a CPF provoca niveles alterados de oxitocina (Dai et al., 2018), la cual tiene relación directa con procesos de aprendizaje, tales como el aprendizaje social (Lan

et al., 2019a). Cuando comparamos estos datos con el modelo VPA del TEA, comprobamos que existen semejanzas, pues también tiene problemas en procesos de aprendizaje y memoria en diversas pruebas (Hou et al., 2018; M. Narita et al., 2010; Vorhees, 1987), así como también alteraciones en el aprendizaje emocional (Sakade et al., 2019) estrechamente relacionado también con los niveles de oxitocina (Adolphs, 2009; Quattrocki & Friston, 2014).

Con todo esto, como podemos ver, existen indicadores que, a veces de manera indirecta a veces de manera directa, nos apuntan a una posibilidad: y es que el CPF puede, dependiendo de la dosis y el momento de exposición, provocar una serie de efectos cercanos a aquellos que se situarían dentro de los esperados en el TEA.

4. Justificación del estudio

El TEA, como bien indica su nombre, es un trastorno que se mueve dentro de un espectro sustentado este al parecer por multitud de causas fisiológicas —algunas presumiblemente heredadas genéticamente y otras provocadas por causas de carácter ambiental—, de las cuales depende a su vez el fenotipo tan intrincado que presenta. Así pues, esto hace que sea muy complicado, en ciertos casos leves, establecer una línea de separación entre el comportamiento catalogado como normal y el esperable en una persona que padezca del TEA.

La exposición a plaguicidas organofosforados, como el CPF, ha sido señalada ya como una posible causa por el que los sujetos pueden desarrollar un TEA (Lan et al., 2017; Philippat et al., 2018). Aunque, hay que decir que, por otro lado, ya existe una publicación científica que descarta dicha hipótesis, tras el estudio sobre las investigaciones publicadas que apuntan a la posibilidad de que el CPF pueda provocar autismo (Williams & Desesso, 2014a). Pero, como también hemos apuntado ya en el capítulo anterior, no es menos cierto que existen otras publicaciones que nos dejan entrever comportamientos similares a los esperados en sujetos que sufren del TEA, después de una exposición pre- y posnatal al CPF. Así pues, el objetivo de esta tesis es profundizar algo más, aportar más datos de las posibles consecuencias del CPF tanto como potenciador como causante de, si bien no un trastorno grave autista, sí de un leve retazo del mismo.

- **Hipótesis general**

La hipótesis general de esta tesis es que la exposición prenatal al plaguicida clorpirifós, en dosis por debajo del nivel tóxico inhibitor de la AChE, conlleva efectos perjudiciales en el

desarrollo, equiparables a los que pueden encontrarse en el modelo animal autista de ácido valproico tras una exposición menor. Llevando por ello implícito que, la exposición prenatal a clorpirifós, puede dar lugar a un cuadro de síntomas, tanto fisiológicos como comportamentales, cercanos a lo visto en sujetos autistas de grado leve.

Objetivos por estudio:

4.1. Estudio 1º

En este estudio nos hemos centrado en la interacción madres-crías y la comunicación refleja de estas últimas cuando son separadas de sus progenitoras, las cuales habían sido expuestas a CPF y VPA en días equivalentes a los del primer trimestre de la gestación humana. La separación fue efectuada entre 7-8 días de edad, momento propicio para grabar sus llamadas ultrasónicas (Berg et al., 2018; Hofer et al., 2002a; Wöhr & Schwarting, 2008), a la espera de que las emitieran por la exposición a un ambiente que pudiera dar lugar a un estado de angustia (Fish et al., 2000). La evaluación de esta interrelación es muy importante, pues la comunicación y pedir ayuda, por parte de los sujetos que padecen del TEA, se encuentra muy reducida o es disfuncional. Así pues, la evaluación de la cantidad de llamadas (y de la morfología o carácter de las mismas), puede llegar a ser un factor esencial para averiguar, a edades muy tempranas, si los sujetos expresan “el germen” de algún tipo de déficit comunicativo como el visto en el autismo (Esposito et al., 2017); pues, con solamente unos días de edad, los mecanismos reflejos son muy preponderantes, ya que forman parte de las herramientas de supervivencia base del sujeto, el cual aún no ha tenido experiencias de aprendizaje social que le ayuden a tener otro tipo de estrategias compensatorias que puedan enmascarar un posible problema (Hofer et al., 2002a).

Así, por tanto, en dicho estudio, hemos explorado diversas características de las llamadas de los sujetos como, por ejemplo: la cantidad de llamadas que realizan durante la prueba, la latencia de la primera llamada que emiten, las frecuencias de las llamadas y la morfología de las mismas. Todos estos factores han demostrado ofrecernos información de diversa índole y permiten evaluar si existe algún tipo de déficit asociado con este comportamiento en alguno de los tres grupos utilizados: grupo control, grupo expuesto prenatalmente a CPF y grupo expuesto prenatalmente a VPA.

- **Hipótesis del primer estudio:**

Los animales expuestos prenatalmente a dosis subclínicas de clorpirifós presentan semejanzas con los expuestos a ácido valproico en la producción de ultravocalizaciones.

4.2. Estudio °2

En este segundo estudio hemos focalizado nuestra atención sobre la locomoción espontánea de los sujetos. Estos procesos, en modelos animales autistas, pueden denotar diferentes aspectos como estereotipias motoras o comportamientos repetitivos (Sheryl S Moy et al., 2008). Además, también se sabe, por las publicaciones científicas existentes, que la comorbilidad existente entre el TEA y el TDAH sucede bastante a menudo (Sokolova et al., 2017), así pues, y teniendo en cuenta que la exposición a CPF ha sido relacionada con el TDAH tanto en humanos (Rohlman et al., 2019) como en roedores (Grabovska & Salyha, 2015b), en pos de buscar semejanzas, hemos explorado el comportamiento motor espontáneo utilizando el paradigma de campo abierto en tres grupos experimentales de ratas Wistar: el grupo control, un grupo expuesto prenatalmente a CPF y otro expuesto prenatalmente a VPA. Además de esta prueba, ante la probabilidad de que, ya sea el CPF, el cual se ha visto que puede provocar retrasos y

problemas en el desarrollo motor (Dam et al., 2000; De Felice et al., 2015a), como en el VPA, el cual, por cuestiones teratogénicas puede también afectar al desempeño locomotor por deformaciones (Main & Kulesza, 2017), hemos utilizado la prueba de equilibrio locomotor llamada “paso de viga” (o “*Beam Walking*” en inglés) para averiguar si existe algún tipo de alteración en la locomoción de los distintos grupos experimentales. El Paso de Viga ha sido validado por numerosas investigaciones como un método bien establecido para la evaluación de la coordinación y balance locomotor en roedores (Carter et al., 2001). Y esta cuestión es importante, pues nos permite discernir si los problemas locomotores que pueden evidenciarse en la tarea de campo abierto se deben a un problema motor, del desarrollo, o, por el contrario, forman parte de un aspecto más emocional o dependiente de mecanismos reflejos.

Los registros tuvieron lugar en dos puntos del desarrollo para el test de campo abierto: adolescentes y adultas de tres grupos experimentales: grupo control, grupo expuesto prenatalmente a CPF y grupo expuesto prenatalmente a VPA; mientras que, el paso de viga fue solamente evaluado durante la adultez, una vez obtenidos los datos de ambas pruebas locomotoras, lo que nos permitió descartar si los animales poseían algún problema motor o no. Además, durante la adultez, también les fue practicado un *challenge* de drogas, para averiguar la posible relación de sus comportamientos con ciertos circuitos farmacológicos del cerebro, los cuales a su vez tienen efectos sobre el comportamiento motor y cognitivo. Las drogas utilizadas han sido la escopolamina hidrobromida (que actúa en el Sistema Nervioso Central [SNC]), la escopolamina metilbromida (con similares efectos a la hidrobromida pero que actúa en el Sistema Nervioso Periférico [SNP]) y la ketanserina (droga que bloquea los receptores serotoninérgicos relacionados con la modulación de liberación de hormonas como la oxitocina y la vasopresina, ambas relacionadas con la etiología del TEA (Quattrocki & Friston, 2014).

Así pues, hemos evaluado, en la de campo abierto, variables como la distancia recorrida, tiempo en los márgenes, velocidad de movimiento, inmovilidad, etc. Mientras que, en el paso

de viga hemos evaluado el tiempo que tardan en salir de la plataforma, el tiempo que tardan en recorrer la pasarela, los errores que cometen, así como el tiempo que tardan en entrar en el habitáculo estanco. Variables, todas ellas, que pueden ofrecernos una idea de sus capacidades motoras, así como la relación de estas con sus estados emocionales.

- **Hipótesis del segundo estudio:**

Los animales expuestos prenatalmente a dosis subclínicas de clorpirifós muestra un comportamiento locomotor espontáneo muy activo semejante al de los sujetos pertenecientes al modelo autista de ácido valproico.

4.3. Estudio nº3

La falta de interés en la interacción social es uno de los aspectos más resaltados en cuanto al comportamiento desplegado por pacientes que sufren del TEA y en modelos animales ha sido asimismo uno de los aspectos más estudiados. Según la bibliografía existente, la exposición a plaguicidas organofosforados de forma prenatal parece haber tenido consecuencias en la aparición de este trastorno en humanos (Shelton et al., 2014). En ratones, por ejemplo, la exposición prenatal a CPF también ha sido relacionada con este trastorno y en concreto con el reducido interés de interacción social (Lan et al., 2017), mientras que en ratas, la exposición prenatal a dicho plaguicida y su relación con la interacción social no ha sido profundamente estudiada, y los datos que existen no muestran ningún efecto o débiles tendencias (Perez-Fernandez, Morales-Navas, Aguilera-Sáez, et al., 2020; Aldina Venerosi et al., 2008). En cuanto al modelo de VPA, los datos son más esclarecedores, pues sí que se ha visto que de forma general reduce la interacción y el interés social de los sujetos expuestos prenatalmente al mismo (Kim et al., 2014; Mohammadi et al., 2020). Así pues, en este estudio, nos hemos

centrado en analizar la interacción social de ratas Wistar (adolescentes y adultas) expuestas prenatalmente a CPF y a VPA, en igual de condiciones que en los anteriores estudios, con el objetivo de ver si, una dosis de CPF de 1 mg/kg, dosis por debajo del umbral de la inhibición fetal de la colinesterasa cerebral (Qiao et al., 2002) puede dar lugar a comportamientos sociales equiparables a una exposición de VPA de 400 mg/kg. Para dicha evaluación hemos utilizado el paradigma de las tres habitaciones o también llamado test de Crawley por su creadora Jacqueline N. Crawley (Crawley, 2004). Con dicha prueba, la cual se compone de un espacio cerrado con tres habitaciones, dos de ellas dispuestas con espacios de interacción para los congéneres según la fase, se pueden obtener datos sobre la sociabilidad que muestra el sujeto ante un nuevo congénere, tanto en aproximación (dentro de la habitación en la que se encuentra) como de contacto (oliéndose), como su reacción a la novedad social, momento en el que además de ese sujeto ya presentado se introduce otro al lado contrario del aparato. Así pues, podemos observar su fijación a lo conocido, su interés general para crear nuevos vínculos y explorar lo desconocido, etc.

Además de esto, hemos realizado exámenes sobre la metabolómica de los sujetos (recién en adolescentes y adultos) en el cerebelo y el hipocampo izquierdos, ambas, estructuras que tienen que ver con la emoción y la memoria, y por ende con el comportamiento social (Bejjani et al., 2012; Moscovitch et al., 2016; Phelps, 2004). En ellas, hemos buscado la posible relación entre la exposición a CPF y a VPA.

- **Hipótesis del tercer estudio:**

Los animales expuestos prenatalmente a dosis subclínicas de clorpirifós mostrarán una merma de interacción social con sus congéneres, equiparándose por ello al modelo autista de ácido valproico.

Los animales expuestos prenatalmente a dosis subclínicas de clorpirifós manifestarán alteraciones en los metabolitos semejantes a las del modelo animal autista VPA.

5. Estudio n°1

Abstract

En los últimos años, las vocalizaciones ultrasónicas (USV) se han establecido como una buena herramienta en psicología básica para evaluar conductas relacionadas con los déficits de comunicación y estados emocionales que son propios del trastorno del espectro autista (TEA). Por otro lado, se sabe que la exposición prenatal a ácido valproico (VPA) causa alteraciones en el comportamiento social que son muy similares a las que se producen en el autismo, considerándose por ello que, los animales expuestos prenatalmente a este fármaco, representan un modelo animal autista confiable. Algunos estudios también sugieren que la exposición prenatal al clorpirifós (CPF) podría dar lugar a comportamientos autistas. Para explorar estas similitudes, en el presente estudio hemos investigado si la exposición prenatal a CPF en GD12.5-14.5 produce efectos que son comparables a los producidos por la exposición prenatal a VPA en GD12.5, en ratas Wistar lactantes. Utilizando el software Deep Squeak hemos evaluado el número total de USV, el tiempo que transcurre hasta que se produce la primera llamada, la duración media de las llamadas, el pico de frecuencia principal y el pico de alta frecuencia de estas. De acuerdo con nuestra hipótesis, hemos encontrado que la exposición prenatal, tanto a CPF como a VPA, conduce a un número significativamente menor de llamadas, así como también a una latencia superior antes de producir la primera de ellas. Por otro lado, no se encontraron efectos significativos en el resto de variables dependientes. Estos resultados sugieren que la exposición prenatal a CPF podría producir ciertos comportamientos que se asemejan a los observados en pacientes que padecen del TEA.

5.1. Introducción

Las ultravocalizaciones pueden, dependiendo de su frecuencia y propiedades temporales, usarse para comunicar diversos estados, entre los que podemos incluir: el miedo, el juego, la agresión o la proximidad de un depredador. En 1956, Zippelius y Schleidt crearon un

dispositivo para detectar vocalizaciones ultrasónicas (USV; aquellas que tienen un rango entre 20-100kHz) de pequeñas crías, las cuales, muy probablemente, supongan el tipo de vocalizaciones más interesantes, pues en recién nacidos es la herramienta principal de comunicación con sus madres. Por ello, las USV son un parámetro de gran utilidad en aras de investigar el comportamiento neonatal, sobre todo si tenemos en cuenta que las crías, en etapas tempranas del desarrollo, son incapaces de realizar otro tipo de comportamientos complejos para expresar sus estados emocionales. Por ejemplo, recientemente se ha sugerido que cuando las ratas bebés emiten USV de 40 kHz, se debe a que éstas están experimentando un episodio muy negativo, como un gran miedo o ansiedad, o la posibilidad de que un depredador ande cerca. Sin embargo, normalmente se entiende que USV de 66 kHz son utilizados para indicar situaciones de poco nivel aversivo o incluso alguna experiencia positiva (Boulanger-Bertolus et al., 2017).

El trastorno de espectro autista (TEA) es un trastorno heterogéneo y complejo del desarrollo caracterizado por déficits en las habilidades de comunicación e interacciones sociales, así como por comportamientos repetitivos y restringidos que perduran para toda la vida (Posar & Visconti, 2017). Por ejemplo, varios estudios han revelado que niños muy pequeños que padecen de autismo evidencian patrones anormales de llanto, con frecuencias más altas de lo normal y una producción fónica alterada (Sheinkopf et al., 2012).

La etiopatogenia del TEA aún se desconoce, pero se acepta formalmente que es una entidad en la que intervienen múltiples factores, entre los que encontraríamos también una base poligénica (Gentile et al., 2013; Gyawali & Patra, 2019). Además, la apreciación de factores ambientales como posibles causantes de este trastorno, también ha sido fuertemente estudiada y respaldada, pues se conoce que la exposición durante el embarazo a ciertos agentes, tales como la talidomida, ha provocado que los neonatos sufrieran de este tipo de trastorno (Antonio M. Persico & Merelli, 2014).

Ya situados en investigaciones con animales, tenemos que existe un modelo aceptado que parece emular los comportamientos y los efectos propios del TEA. Este es el modelo de ácido valproico (VPA). Este modelo ha sido muy popular en los últimos años, pues nos ofrece la posibilidad de estudiar una gran diversidad de cambios estructurales y conductuales que han sido ampliamente observados en personas que padecen de autismo (Mabunga et al., 2015; Nicolini & Fahnstock, 2018).

Más concretamente, en el paradigma de las 3 habitaciones, las ratas que fueron expuestas a VPA mostraron una reducción significativa de la sociabilidad, ya que pasaron menos tiempo en la habitación en la que se encontraba el congénere que en la habitación que no encontraban nada (Bronzuoli et al., 2018). Además, en la tercera fase de este paradigma, en la que se medía la reacción ante la novedad social, tampoco mostraron estas ratas preferencia alguna por el nuevo igual, pues pasaron más o menos el mismo tiempo con el congénere ya conocido que con el desconocido (Bambini-Junior et al., 2014). Sumado a esto y siguiendo con los comportamientos esperables en un individuo con autismo, en el paradigma de campo abierto, las ratas expuestas a VPA también mostraron menos conductas de juego con otros congéneres que las ratas controles (Schneider & Przewłocki, 2005b).

Así pues, teniendo en cuenta el global de los hallazgos comentados y algunos otros que pueden hallarse en la bibliografía científica, encontramos que la exposición prenatal a este compuesto da lugar a comportamientos que se relacionan estrechamente con el TEA. Y en esta línea, las grabaciones de los USV que emiten los neonatos no son una excepción. Concretamente, se ha visto cómo ratas recién nacidas que habían sido expuestas prenatalmente a VPA emiten menos USV, y con distinta proporción en el tipo de llamadas que realizaban, que las ratas neonatas que pertenecían al grupo control (Felix-Ortiz & Febo, 2012a; Moldrich et al., 2013; Wellmann et al., 2014).

Como hemos dicho más arriba, entre los diferentes actores encontramos los ambientales como uno de los posibles involucrados en la etiología del TEA. Dentro de estos, la exposición a los plaguicidas organofosforados (OP) han sido uno de los señalados como preponderantes (Shelton et al., 2014), y más concretamente el clorpirifós (CPF), el cual ha sido uno de los plaguicidas más utilizados en los últimos años (Eaton et al., 2008), y por ello uno de los compuestos que ha sido más investigado. De hecho, en referencia al uso de este tipo de plaguicidas y el aumento de las posibilidades de padecer autismo, el residir cerca de un campo de cultivo en el que se utilizan ha sido considerado por algunos como un factor de riesgo (Roberts et al., 2007a).

Así pues, teniendo en cuenta esta premisa, y a pesar de las críticas que se han dirigido al uso de ratas expuestas a CPF como modelo animal de autismo (Williams y Desesso, 2014), tenemos sin embargo que animales expuestos prenatalmente a CPF han mostrado síntomas similares a los esperados en el autismo. Por ejemplo, en ratones nacidos de madres que habían sido expuestas a 5mg/kg entre GD12-15 (*Gestational Day*) se ha visto que existe un deterioro de las interacciones sociales comparados con el grupo control (Lan et al., 2017), o cómo, en crías de madres tratadas con 6mg/kg entre GD14-17, se evidenciaron déficits de comunicación social (Aldina Venerosi et al., 2009), además de comportamientos ansiogénicos en los neonatos de madres que habían sido tratadas con dosis de 0.1, 1 y 10 mg/kg/día entre GD14-20 (Silva et al., 2017b).

Con todo ello, en esta investigación hemos examinado los efectos de la administración subcutánea de CPF durante los días GD12.5-15.5. Lo que aproximadamente equivale al final del primer trimestre de un embarazo humano. En concreto, hemos evaluado las similitudes entre animales expuestos prenatalmente a CPF y animales expuestos prenatalmente a VPA en el día GD12.5 (el cual es, como hemos dicho, un modelo aceptado de autismo). A su vez, estos grupos han sido comparados con un grupo control (CNT). Así pues, contemplando estudios

previos existentes en la literatura científica, planteamos la hipótesis de que las ratas VPA y las CPF mostrarán alteraciones en la emisión de USV en comparación con el CNT, guardando además los dos primeros grupos más similitudes entre sí, como, por ejemplo, en la frecuencia máxima y duración media de los USV.

5.2. Materiales y método

5.2.1. Animales experimentales

Se utilizaron 25 ratas preñadas Wistar (Janvier Labs; Le Genest-Saint-Isle, Francia) de 3 meses de edad alojadas en nuestras instalaciones de forma individual, en jaulas de policarbonato transparente (50 × 15 × 24 cm). A lo largo de 6 días, estas madres gestantes estuvieron aclimatándose a su nuevo ambiente, el cual estaba regulado a una temperatura de 22 ± 2 °C y a una humedad al $50 \pm 10\%$. El ciclo de luz/oscuridad era invertido, encendiéndose las luces a las 19:00 y apagándose a las 07:00 h. Todas dieron a luz el día previsto, siendo este designado como día posnatal 0 (PND0).

Al siguiente día (PND1), las crías fueron separadas de sus madres y fueron distribuidas al azar manteniendo una relación de 5 hembras y 5 machos por madre, en aras de minimizar, lo máximo posible, diferencias en cuanto a la crianza. Las madres tuvieron siempre acceso ad libitum a agua y comida. Las crías fueron pesadas regularmente desde el día PND10 para monitorear posibles signos de intoxicación. Escoger este día fue a razón de no afectar demasiado a las madres, las cuales podrían tener comportamientos adversos que afectasen a la crianza de los neonatos. Este estudio formó parte del proyecto PSI2017-86847-C2-1-R y se realizó de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 y la Directiva de la Comunidad Europea (2010/63 / UE) para la investigación animal y aprobada por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Almería.

5.2.2. Protocolo de administración

Las madres fueron asignadas en el GD11 al azar a uno de los siguientes tres grupos: grupo control (CNT), grupo clorpirifós (CPF) y grupo ácido valproico (VPA). En GD12.5 se inició el tratamiento según el siguiente protocolo:

- **CNT (n = 8):** Una inyección subcutánea de 1 mL / kg de dimetilsulfóxido (DMSO) durante cuatro días (vehículo).
- **CPF (n = 8):** una inyección subcutánea de 1 mg / kg de CPF [O, O-dietil O-3,5,6-tricloropiridin-2-ilo fosforotioato (Pestanal, Sigma Aldrich)] disuelto en DMSO, por cuatro días.
- **VPA (n = 9):** Una inyección subcutánea de 400 mg / kg de VPA (con el objetivo de evitar una posible muerte materna (Kim et al., 2011)), disuelto en una solución salina al 0,9% a una concentración de 250 mg / mL; y tres inyecciones subcutáneas diarias con, solamente. solución salina.

Todas ellas se pesaron diariamente para asegurarse de que se administraron las dosis correctas.

El programa de administraciones terminó el GD15.5, momento en el que todas habían recibido cuatro inyecciones subcutáneas cada una (Tabla 1).

Grupo	12.5 GD	13.5 GD	14.5 GD	15.5 GD
CONTROL	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
CPF	CPF	CPF	CPF	CPF
VPA	VPA	Salino	Salino	Salino

Tabla 5.1. Calendario de administraciones

5.2.3. Vocalizaciones ultrasónicas (USV)

Las vocalizaciones ultrasónicas se obtuvieron mediante la utilización de un micrófono ultrasónico (Dodotronic ultramic 250K), que fue situado dentro de una cámara insonorizada de 80x60x70cm. El micrófono fue colocado a una altura aproximada de 10cm del suelo de la cámara y en la parte central de la misma (Blazevic et al., 2017). El software que se utilizó para grabar fue el SeaWave versión 2.0 (CIBRA), en una frecuencia de 250kHz y en formato 16bits. Las temperaturas de las cajas en las que se encontraban los animales, así como la de la sala experimental y la adyacente, se mantuvieron en torno a los $22\pm 2^{\circ}\text{C}$.

En primer lugar, todas las jaulas en las que se encontraban los sujetos experimentales se llevaron a una habitación contigua a la sala en la que se realizaría el experimento (ambas con los mismos niveles de humedad y condiciones lumínicas). En esta habitación contigua estuvieron por 20 minutos para que pudieran aclimatarse. Después de este lapso de tiempo se comenzó con el procedimiento de aislamiento, que fue el mismo que el que emplearon Hofer, Shair y Brunelli (2002), aunque con una sola excepción, ya que, con el objetivo de evitar lo máximo posible un aumento en los niveles de estrés de las madres, las crías, antes de la prueba, fueron colocadas en una caja de policarbonato con una manta térmica debajo para que mantuviesen sus temperaturas. Al mismo tiempo, los neonatos fueron cubiertos por algodón extraído del nido, así como también serrín y algunos excrementos de su caja de residencia. De esta forma, ofrecíamos a las crías un entorno hogareño con el fin de sortear efectos que podrían influir en la prueba.

Hecho esto, se tomó con el máximo de cuidado cada cría y se la llevó a la sala experimental para colocarla dentro de la cámara insonorizada durante 3 minutos, tiempo durante el que se realizaron las grabaciones. Después de cada sesión, la cámara se limpió con etanol al 70%.

Todas las grabaciones se llevaron a cabo entre las 8:00 y las 13:00h.

En total se analizaron los registros de 42 crías en PND7 (Machos: 7 CNT, 7 CPF y 7 VPA; Hembras: 7 CNT, 7 CPF y 7 VPA), escogidas al azar del total de realizadas.

Los parámetros analizados fueron los siguientes: número total de llamadas, latencia de la primera llamada, duración media de la llamada, pico de frecuencia principal y pico de alta frecuencia. El programa utilizado para realizar estos análisis fue el DeepSqueak (Coffey et al., 2019), el cual utiliza redes neuronales de convoluciones regionales (Faster-RCNN) para realizar los análisis (Ren et al., 2017). Los scripts que se utilizaron para mantener el rigor experimental fueron: All Short Calls_Network_V1 y Long Rat Call Network_V2; ambos incluidos de forma predeterminada en el programa. Los parámetros de estos scripts en la detección fueron los siguientes:

Longitud de fragmento de análisis: 6

Superposición (segundos): 0,1

Corte de alta frecuencia (kHz): 100

Corte de baja frecuencia (kHz): 18

Score Threshold (0-1): 0

La computadora utilizada fue un MSI GT72VR 7RE Dominator Pro con una CPU Intel Core i7-7700HQ y una Nvidia GTX1070 con 8GB de VRAM como Tarjeta Gráfica.

Después de esta fase de detección, todas las grabaciones se verificaron de manera manual para corregir así posibles errores y rechazar que contabilizase ruido.

5.2.4. Actividad acetilcolinesterásica

21 crías en PND1 fueron sacrificadas (10 CNT, 4 CPF y 7 VPA) mediante dislocación cervical. El cerebro se les extrajo muy rápidamente y fue congelado de forma instantánea almacenándose a -80°C.

Para analizar la actividad de la AChE, los cerebros fueron descongelados y homogeneizados con Triton X-100 en tampón fosfato 0,1 M (pH 8) utilizando una proporción de 1/10 (p/v). A continuación, las muestras fueron sedimentadas a 15000 xg por 15 minutos y las alícuotas del sobrenadante se diluyeron con un tampón fosfato de sodio de 0,1 M (pH 8) en una proporción 1/10 (p/v). Siguiendo una versión ligeramente modificada del Método de Ellman (Ellman et al., 1961), usamos 10 μ L de esta dilución (todas ellas determinadas por duplicado) mezcladas con ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) (60 μ L; concentración final = 0,33 nM) y 206 μ L de tampón de fosfato de sodio (0,1 M; pH 8,0). Esta mezcla fue homogeneizada durante 30 segundos a temperatura ambiente para incubarse después por 5 minutos a 37°C. Tras esto, fue añadido 15 μ L del bloqueador de butirilcolinesterasa tetra isopropil pirofosforamida (concentración final = 0,5 nM). Como sustrato fueron utilizados 9 μ L de yoduro de acetilcolina (diluido en tampón fosfato de sodio 0,1 M; pH 8,0; concentración final = 0,5 mM). Los huecos vacíos fueron rellenados con un tampón de fosfato de sodio extra. Con la utilización de un espectrómetro se midió la velocidad de hidrólisis del yoduro de acetilcolina a 412 nm durante 22 minutos a 37°C.

5.2.5. Análisis estadísticos

Para analizar el número total de llamadas, la latencia a la primera llamada, la duración de la llamada, la frecuencia principal y el pico de alta frecuencia, se utilizó un ANOVA bidireccional, siendo las variables independientes el sexo (masculino y femenino) y el tipo de tratamiento prenatal recibido (CNT, CPF y VPA). Para el análisis post hoc se utilizó Bonferroni. El peso de los neonatos se analizó con un ANOVA de medidas repetidas.

En el cálculo de la actividad de la acetilcolinesterasa se seleccionó una muestra de 1 minuto de reacción enzimática, la cual fue utilizada para un posterior análisis mediante el uso de la ley de Beer-Lambert (Içelli et al., 2014). Tras esto, se corrigió de acuerdo con la cantidad

total de proteína analizada, para lo que se siguió el ensayo de proteína de Bradford. Después, con el tratamiento como variable independiente, se realizó una prueba univariante.

En aquellos casos en los que el Test de Levene fue significativo, se aplicó bootstrapping para poder realizar las comparaciones por pares con más confianza. Para todos los análisis se adoptó un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los resultados se expresan como medias \pm SEM. Todos los análisis se realizaron con IBM SPSS (versión 22.0.0.0) y los gráficos se crearon con GraphPad Prism versión 6.0.

5.3. Resultados

5.3.1. Marcadores de desarrollo

En cuanto al peso corporal, no se encontraron diferencia alguna entre los distintos grupos experimentales. La progresión normal continuó incluso después del destete. Además, tampoco encontramos signos de inhibición de la AChE ni en los CPF ni en los VPA en comparación con los CNT (Figura 5.1a, b).

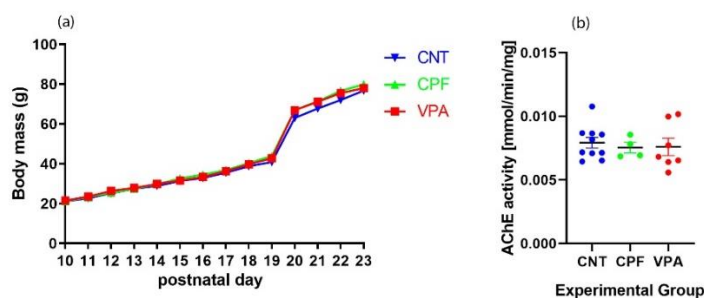


Figura 5.1. (a) Comparación de pesos de las crías. No encontramos ninguna diferencia significativa en los grupos referente a los diferentes tratamientos prenatales recibidos por cada uno de los grupos. (b) Efectos en la expresión de la AChE. Tampoco hemos encontrado diferencias significativas en los niveles de expresión de la AChE en los distintos grupos experimentales (CNT = 10; CPF = 4; VPA = 7).

5.3.2. Grabaciones de vocalización ultrasónica

En este caso sí hemos encontrado diferencias significativas entre el tipo de tratamiento recibido prenatalmente y el número total de llamadas realizadas por los neonatos [$F(2, 36) = 6.120, p = 0.005$] y Sexo [$F(1, 36) = 5.007, p = 0.032$]. Los análisis post hoc indicaron que los CNT fueron los que emitieron más llamadas, siendo esta diferencia significativa tanto con los CPF ($p = 0.019$) como con los VPA ($p = 0.01$). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre estos dos últimos grupos (Figura 5.2a). Además, se encontraron diferencias significativas en el sexo (Figura 5.2b). Por el contrario, no se hallaron ningún tipo de diferencia significativa cuando tuvimos en cuenta las dos variables independientes: sexo y tratamiento (Figura 5.2c).

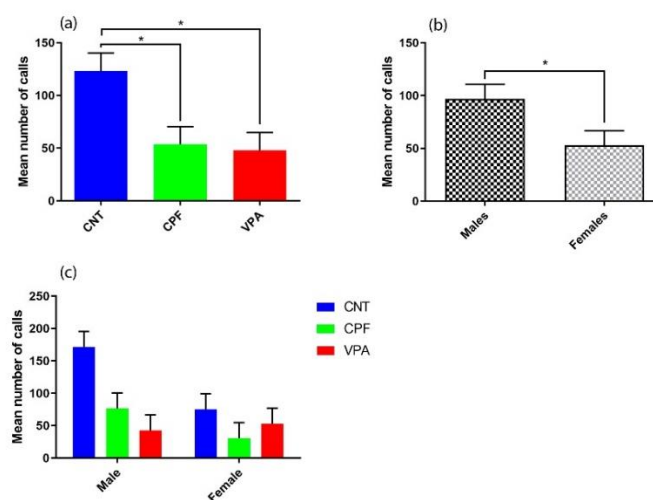


Figura 5.2. (a) Número total de llamadas según el tratamiento. Hay una diferencia significativa en el número de llamadas que efectúan los CNT ($n = 14$) en comparación con los otros dos grupos experimentales: CPF ($n = 14$) y VPA ($n = 14$). (b) Número total de llamadas según el sexo. Encontramos que los machos ($n = 21$) emiten más llamadas que las hembras ($n = 21$). (c) Número total de llamadas según Sexo y Tratamiento. No se encuentran diferencias significativas entre los distintos grupos (CNT machos $n = 7$; CNT hembras $n = 7$; CPF machos $n = 7$; CPF hembras $n = 7$; VPA machos $n = 7$; VPA hembras $n = 7$).

En cuanto a las latencias antes de realizar la primera llamada, también encontramos una diferencia significativa entre los CNT y los CPF y VPA [$F(2, 36) = 4.201, p = 0.023$]. Siendo

que en el análisis post hoc estos dos últimos grupos, los CPF y los VPA, tardaban más que los CNT en realizar su primera ultravocalización ($p = 0,013$ y $p = 0,042$; respectivamente) (Figura 5.3a). Ni en Sexo ni en Sexo y Tratamiento como variables independientes se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos (Figura 5.3b, c).

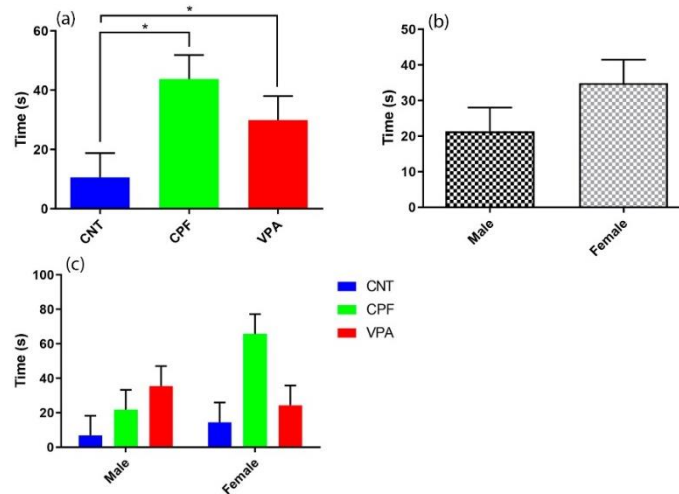


Figura 5.3. (a) Latencia en la primera llamada según tratamiento. Hubo diferencias significativas entre los CNT ($n = 14$) y los otros dos grupos experimentales: CPF ($n = 14$) y VPA ($n = 14$); siendo los CNT los que menos tardaban en realizar la primera llamada. (b) Latencia en la primera llamada según el sexo. No se encontraron diferencias significativas. (c) Latencia en la primera llamada según sexo y tratamiento. Tampoco se encontraron diferencias significativas.

En relación a la media de duración de las llamadas, la frecuencia de pico de frecuencia principal y la frecuencia de pico alta (Figuras 5.4a, b y c), no se encontraron ningún tipo de diferencia significativa entre los grupos.

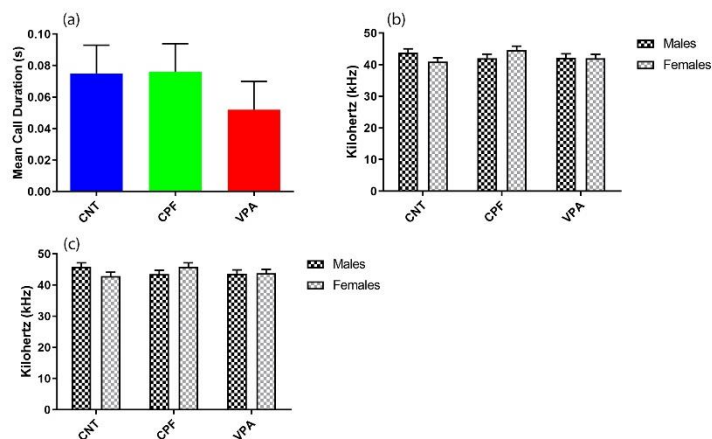


Figura 5.4. (a) Duración media de las llamadas según tratamiento (Total n = 42; CNT n = 14; CPF n = 14 y VPA n = 14). No se obtuvieron diferencias significativas. (b) Pico de frecuencia principal según tratamiento. Tampoco se obtuvieron diferencias entre los distintos grupos. (c) Pico de alta frecuencia según tratamiento. No se obtuvo ninguna diferencia significativa entre los distintos grupos.

5.4. Discusión

El presente estudio ha intentado explorar los efectos de una dosis subclínica prenatal de CPF sobre las UVs de ratas neonatas en un periodo equivalente al primer trimestre de la gestación humana (Ross et al., 2015). A su vez, estos efectos han sido comparados con un grupo VPA, el cual representa un modelo aceptado de autismo, y un grupo CNT. Hasta donde sabemos, este estudio es el primero en estudiar dichas similitudes entre la administración de VPA y de CPF en contraposición a un grupo CNT.

Como hemos visto, no existen diferencias en cuanto al peso corporal de las crías. Algo que podría verse afectado tanto por la exposición a CPF como a VPA. Por ejemplo, concretamente con CPF se ha visto como la exposición prenatal a altas dosis de este compuesto puede dar lugar a una pérdida significativa de peso corporal en ratas lactantes (Breslin et al., 1996; Lan et al., 2017). En ratas expuestas prenatalmente a VPA, este menor peso en los neonatos lactantes también ha sido registrado (Schneider & Przewłocki, 2005a). Por otro lado, con el ánimo de detectar posibles signos de intoxicación (a pesar de que usamos una dosis subclínica), se realizaron análisis sobre la actividad de la AChE en PND1. Como hemos visto en el apartado de resultados, ninguno de estos aspectos se vio afectado por lo que se sugiere que lo observado es independiente de la inhibición de la AChE, el cual es el principal mecanismo de acción del CPF (Silva et al., 2017c).

Para la evaluación de nuestra hipótesis era muy importante encontrar datos en la literatura científica que apoyasen los datos obtenidos, algo que sucedió, pues nuestros

resultados son consistentes con otros estudios publicados en relación a dos de las variables: el número de llamadas y la latencia en la primera llamada (Gandal et al., 2010; R. Tyzio et al., 2014; Zieminska et al., 2018). Así pues, contemplando que esto se produce, y viendo que los expuestos a CPF muestran tanto un número de llamadas inferior como una latencia de primera llamada superior, hallazgo este último que ya fue previamente reportado por Venerosi et al. (2009), aunque con la salvedad de que justo en el día PND7, (que es el de nuestro estudio) no hubo diferencias entre los CPF y los CNT, podemos decir que nuestra hipótesis se cumplió parcialmente. No obstante, esta discrepancia podría deberse a cuestiones metodológicas, pues entre el estudio de Venerosi y el nuestro existen algunas diferencias como: la clase de roedor (ellos utilizaron ratones y nosotros ratas), las vías y ventanas de administración (ellos hicieron una administración intraoral los días GD14-17, mientras que la nuestra fue subcutánea y entre los días GD12.5-15.5), y la cantidad de CPF que usaron (ellos administraron 5mg/kg, y nosotros dosis de 1mg/kg).

Sobre el dimorfismo sexual que suele ser tenido en cuenta como uno de los efectos del CPF y de la propia incidencia del autismo, no obtuvimos diferencias significativas, por lo que no podemos realizar aseveraciones en este aspecto.

Dada la ausencia de efectos en la actividad de la AChE podemos descartar la posibilidad de que las diferencias observadas se deban a un efecto tóxico por la dosis. No obstante, y como limitación de este estudio, somos bien conscientes de que haber realizado una batería de observación funcional habría ofrecidos datos más consistentes y detallados en este aspecto, pues podrían haber puesto de manifiesto déficits producidos por los distintos tratamientos que quizás nos han pasado inadvertidos. Junto a esto, podríamos resaltar los posibles problemas que supone la subjetividad que conlleva que parte del proceso de supervisión de las UVS sean efectuados de forma manual (Vogel et al., 2019). No obstante, la cantidad de parámetros evaluados por los scripts a la hora de seleccionar las llamadas ha permitido identificar aquellas

variables que son más sensibles, por lo que el repaso manual se ha reducido únicamente a mínimas modificaciones sobre lo que el programa automáticamente había realizado.

Si bien es cierto que existen algunos estudios similares que han tratado y obtenido resultados parecidos a los que aquí hemos expuesto (Lan et al., 2017; Sagiv et al., 2018), sin embargo —y como hemos mencionado más arriba— este parece ser el primer estudio en el que se comparan directamente los CPF y los VPA a la vez que un grupo CNT de ratas. Empero, aunque los datos que hemos obtenido van en dirección a nuestra hipótesis, la cual presupone que el CPF puede dar lugar a la aparición de algunas similitudes conductuales con lo observado en pacientes que padecen de TEA, tenemos que tratar estos datos con cuidado. Pues es importante también señalar que parte de la bibliografía en la que apoyamos las comparativas de nuestros resultados son de investigaciones realizadas en ratones (Hofer et al., 2002c; Portfors, 2007), y la diferencia entre estas dos especies existe; e incluso las hay entre las distintas cepas de ratas (Graham et al., 2009; Sales, 1979; Wöhr et al., 2008), lo que hace difícil extrapolar algunos de los hallazgos o que las inferencias puedan llegar a ser arriesgadas.

Por otro lado, como bien se sabe, el embarazo es posiblemente la etapa del desarrollo humano más importante y cambios mínimos durante el mismo pueden terminar desencadenando problemas muy graves, que pueden afectar a la persona durante el resto de su vida. En este aspecto, los resultados en este estudio sugieren que la exposición prenatal a CPF puede representar un factor ambiental potencialmente de riesgo y que podría dar lugar a que la persona desarrollase ciertos déficits relacionados con el TEA. De hecho, en esta línea, datos epidemiológicos indican que, entre la población general, la incidencia de autismo es de 1 en 152 niños (Presmanes Hill et al., 2015), mientras que cuando se observan las poblaciones que están cerca de campos de cultivo en los que se utiliza el CPF como plaguicida, el riesgo de padecer TEA aumenta hasta en un 60% (Posar & Visconti, 2017). Asimismo, y apoyando más aún esta idea, en la literatura científica pueden encontrarse publicaciones en las que la

administración prenatal de ambas sustancias, tanto CPF como VPA, provocan efectos similares, como por ejemplo: aumento del estrés oxidativo (Tara Sankar Roy et al., 2004; Tung & Winn, 2011) y alteraciones en las conexiones serotoninérgicas (Aldridge, Meyer, et al., 2005a; Oyabu et al., 2013); entre otros. Por tanto, si bien se necesita más investigación al respecto, podemos al menos tomar al CPF como un potencial factor de riesgo para el desarrollo del TEA.

5.5. Conclusión

Como hemos visto por los resultados obtenidos, la exposición prenatal a CPF puede dar lugar al desarrollo de deficiencias comunicativas similares a lo observado en animales expuestos prenatalmente a VPA. El número de llamadas realizadas por los neonatos, así como la latencia en realizar la primera llamada, son prácticamente idénticas en estos dos grupos expuestos en comparación con los controles. Sin embargo, en el resto de variables no hemos encontrado diferencias significativas.

Así pues, esta investigación ofrece información empírica que vincula directamente la exposición gestacional de un plaguicida común, con el desarrollo de comportamientos similares a los observados en ratas pertenecientes a un modelo autista aceptado, complementando datos ya existentes en la literatura científica. Por tanto, los efectos del CPF durante el desarrollo fetal deben seguir investigándose incluso en exposiciones que se presumen por debajo del umbral tóxico.

6. Estudio nº2

Abstract

Uno de los aspectos relacionados con el desarrollo del autismo ha sido la exposición ambiental. Por ello, la utilización de plaguicidas como los organofosforados se han contemplado como posibles copartícipes en el desarrollo de este trastorno. En este estudio hemos realizado una serie de experimentos exponiendo ratas Wistar prenatalmente a clorpirifós (CPF) (1mg/kg) en GD12.5-15.5 y a ácido valproico (VPA) (400mg/kg) GD12.5, para ver si existen similitudes comportamentales entre la exposición a plaguicidas y un modelo animal aceptado de autismo; ambos comparados a su vez con un grupo control. El comportamiento analizado ha sido el locomotor espontáneo en el paradigma de campo abierto, en ratas adolescentes y adultas. También hemos utilizado un desafío de drogas con dos tipos de escopolamina (0.5 y 1 mg/kg; ambas): hidrobromida y metilescopolamina; y ketanserina (1 y 3 mg/kg), para saber sobre la integridad del sistema colinérgico y serotoninérgico en las ratas ya adultas. A su vez hemos analizado si los sujetos adultos presentan problemas de coordinación motora con el test de Paso de Viga. Los resultados nos indican que las CPF se muestran más activas que las CNT en la adolescencia. En adultas estas diferencias desaparecen, no existiendo resultados significativos ni en la locomoción espontánea ni en el desafío de drogas entre los grupos experimentales, aunque sí dentro del grupo VPA, los cuales se muestran menos activos conforme la dosis de ketanserina sube, dato soportado concretamente por las hembras de este grupo. En el paso de viga, los resultados tampoco nos han advertido de ningún tipo de deficiencia motora. La conclusión es que no podemos decir que la exposición a CPF produzca datos similares a los del VPA en las dosis utilizadas, aunque sí parece existir una alteración serotoninérgica sexodimórfica que afecta a las hembras VPA.

6.1. Introducción

Los organofosforados (OPs) son uno de los plaguicidas más importantes desde que su uso comenzó allá por los años 40 (Costa, 2006). Dentro de la gran categoría que representan estos plaguicidas, el clorpirifós (CPF) es quizás uno de los que ha tenido más éxito, pues sigue siendo uno de los más utilizados a pesar de que, en 2001, fue prohibido por la EPA para su uso residencial (Eaton et al., 2008; Saunders et al., 2012). No obstante, su uso en cultivos ha continuado y las investigaciones en poblaciones expuestas a OPs que contemplan el uso de estos plaguicidas organofosforados como un posible co-factor medioambiental en el desarrollo de diversas patologías, como el Trastorno de Espectro Autista (TEA), han dado resultados que apuntan a que, efectivamente, podrían estar involucrados de alguna forma (Philippat et al., 2018; Shelton et al., 2014). Además, en roedores, también existen algunos datos que refieren cierta similitud en cuanto al desempeño mostrado por sujetos expuestos prenatalmente a CPF (Lan et al., 2017, 2019b).

En cuanto al propio TEA, al ser un trastorno tan complejo y afectar de manera sistémica al organismo, se ha podido ver cómo muestra comorbilidad con otros cuadros patológicos como el epiléptico (Jokiranta et al., 2014; Mbeya Mpaka et al., 2016) o el TDAH (May et al., 2016; Sokolova et al., 2017). Centrándonos en este último, es por tanto esperable que, si los sujetos expuestos prenatalmente a CPF pueden mostrar un fenotipo, en algunos casos, parecidos a lo visto en aquellos que padecen TEA, también observemos similitudes en ciertos aspectos comórbidos con, por ejemplo, la actividad locomotora característica de aquellos sujetos que se muestran hiperactivos. En relación con esto, tenemos investigaciones que evidencian que la exposición prenatal de ratas a CPF, usando dosis que están por debajo del umbral de inhibición de la AChE, provoca un aumento en la locomoción espontánea en el

paradigma de campo abierto (B. Gómez-Giménez et al., 2018a; Silva et al., 2017b), así como también en el laberinto en T (Levin et al., 2002).

En principio, teniendo en cuenta que el mecanismo principal de acción del CPF es la inhibición de la AChE, se observaron si este tipo de alteraciones dependía de canales colinérgicos. Sin embargo, utilizando un paradigma de exposición a drogas (drug challenge) con escopolamina (antagonista de la ACh) vieron que, las alteraciones locomotoras se seguían sucediendo, sugiriendo quizás la participación de los receptores muscarínicos (Perez-Fernandez, Morales-Navas, Guardia-Escote, et al., 2020a). Algo que tendría sentido teniendo en cuenta que la regulación de la actividad locomotora ha sido relacionada con el estriado, pues los receptores muscarínicos, aun siendo solamente el 1% de la población neuronal de esta estructura, modulan sin embargo la excitabilidad de las neuronas GABAérgicas, las cuales suponen el 95% de la población neuronal en esa zona del cerebro (Crans et al., 2020; Lv et al., 2017).

Volviendo al incremento de la actividad locomotora en el paradigma de campo abierto cuando los sujetos han sido expuestos prenatalmente a CPF, tenemos también que, dicho efecto de hiperactividad, ha podido registrarse con el uso de otros paradigmas, como, por ejemplo, el del laberinto en cruz. Donde se comprobó que existía un aumento significativo en el número de veces que, los sujetos expuestos a CPF durante la gestación (GD9-12) cruzaban por el espacio central en comparación con los controles (Icenogle et al., 2004). Mismo efecto de hiperactividad fue encontrado por Levin (2002), en este último paradigma, en ratas también tratadas prenatalmente (GD17-20), con dosis subtóxicas de CPF. Incluso, este efecto de hiperactividad en la locomoción espontánea ha llegado a verse en animales expuestos también postnatalmente (PND11-14) a dosis subtóxicas de CPF, en, de nuevo, el paradigma de campo abierto (Ricceri et al., 2003). Así pues, tenemos que la exposición prenatal a CPF parece provocar cierto incremento en el movimiento de los sujetos.

En semejanza con lo presentado más arriba sobre el CPF, tenemos que los animales expuestos a VPA, un aceptado modelo animal de autismo (Mabunga et al., 2015; Nicolini & Fahnstock, 2018), también presentan elevados niveles de actividad que concuerdan o se asemejan a los que muestran personas con TEA. Por ejemplo, Kumar (Kumar et al., 2015; Kumar & Sharma, 2016a, 2016b), en sus investigaciones, obtuvo claros resultados de que los animales expuestos prenatalmente a VPA mostraban signos claros de hiperactividad locomotora, así como también otros investigadores han notificado efectos en diversas variables de actividad, como: mayores distancias recorridas, *rearing* (*oteamiento*), *etc.*, por los animales tratados con VPA prenatalmente que por animales controles (C. S. Choi et al., 2014; Sandhya et al., 2012; Schneider et al., 2006b).

Las distintas alteraciones que pueden ser provocadas por la administración perinatal de CPF también incluyen aspectos de la coordinación motora. De hecho, Dam, Seidler y Slotkin (2000) encontraron que sujetos expuestos a dosis de CPF, que no provocaron los efectos de toxicidad sistémica, mostraron profundas deficiencias en cuanto al desarrollo de habilidades dependientes primordialmente de la coordinación motora. De hecho, profundizando en los efectos del CPF, un estudio de administración posnatal crónica de CPF en dosis de 1mg/kg y 5 mg/kg (durante 6 semanas) encontró serios problemas motores en la prueba del paso de viga (Hallal et al., 2019). No obstante, teniendo en cuenta que la administración crónica durante el desarrollo puede provocar distinta gravedad y efectos, existen estudios en la bibliografía actual que demuestran cómo una dosis prenatal de CPF, que no afectó a la expresión de la AChE cerebral, afectó por contra al desarrollo motor de las crías con efectos tanto en su coordinación motora como en los patrones motores de los neonatos (De Felice et al., 2015b). Estas deficiencias y retrasos del desarrollo y la coordinación motora, también han sido registrados en animales expuestos prenatalmente a VPA (Hou et al., 2018). Por ejemplo, se ha registrado en estos sujetos una atenuada integración de los reflejos de nado (Schneider & Przewłocki,

2005b). También, en otra prueba llamada *Beam changelling*, en la que los sujetos pasan una viga agarrándose a una rejilla, los expuestos prenatalmente a VPA mostraron, efectivamente, que tenían problemas de coordinación motora. Estudio en el que también examinaron una pérdida de células significativa específicamente en la corteza motora y el cerebelo (Al Sagheer et al., 2018).

En relación con esta última estructura cerebral mencionada, el cerebelo, el cual tiene un papel primordial en trastornos motores, se sabe que la fuerte exposición a organofosforados como el CPF puede provocar ataxia, temores (Cunha et al., 2018); algo que también ha sido observado en animales expuestos prenatalmente a VPA (Main & Kulesza, 2017).

En cuanto a la teoría mencionada más arriba —en la que quizás los receptores muscarínicos influirían en los animales expuestos prenatalmente a CPF cuando se utilizasen dosis subclínicas—, esta podría ser la mayor diferencia con respecto a los expuestos a VPA, pues existen estudios que apuntan a que sustancias como el VPA y parecidas, no juegan un papel fundamental en dichos neuroreceptores (Bymaster & Felder, 2002). Por el contrario, los receptores serotoninérgicos sí que se sabe que son afectados por ella (Miyazaki et al., 2005; Oyabu et al., 2013); algo que también podemos hallar en los animales expuestos a CPF (Aldridge, Meyer, et al., 2005a; Savy et al., 2015; Theodore A. Slotkin et al., 2015; Aldina Venerosi et al., 2010).

Así pues, a la luz de los datos arrojados, creemos que, tanto los animales expuestos prenatalmente a dosis subtóxicas de CPF, como los expuestos prenatalmente a VPA, mostrarán una actividad locomotora semejante, así como también parecido índice de déficits en la coordinación motora; ambos en comparación con los sujetos pertenecientes al CNT.

6.2. Materiales y método

6.2.1. Animales experimentales

Los sujetos provienen de 25 ratas preñadas Wistar (Janvier Labs; Le Genest-Saint-Isle, Francia) de 3 meses de edad, alojadas individualmente en nuestras instalaciones, en jaulas de policarbonato transparente (50 × 15 × 24 cm). Las ratas estuvieron aclimatándose a su nuevo ambiente durante 6 días, el cual estaba regulado con una temperatura de 22 ± 2 °C y una humedad al $50 \pm 10\%$; así como un ciclo de luz / oscuridad invertido, con luces encendidas de 19:00 a 07:00 h. Todas ellas dieron a luz el día esperado, siendo por ello este día denominado como día posnatal 0 (PND0).

En el PND1, las crías se separaron de sus madres y fueron distribuidas al azar de modo que se asignaron 10 crías a cada madre (5 hembras y 5 machos). Durante todo el procedimiento experimental, las madres tuvieron acceso libre a agua y comida. Para monitorear los signos de intoxicación, las crías se pesaron regularmente. Comenzamos con esta última rutina en el PND10, con el ánimo de prevenir reacciones maternas extremas que puedan afectar a las crías. Este estudio forma parte del proyecto PSI2017-86847-C2-1-R y se realizó de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 y la Directiva de la Comunidad Europea (2010/63 / UE) para la investigación animal y aprobada por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Almería.

6.2.2. Protocolo de administración

En el día de gestación (GD) 11, las madres fueron asignadas al azar a uno de los siguientes tres grupos experimentales: grupo control (CNT), grupo clorpirifós (CPF) y grupo ácido valproico (VPA). En GD12.5, todas las madres gestantes iniciaron el tratamiento según el siguiente protocolo:

- **CNT (n = 8):** Una inyección subcutánea de 1 mL / kg de dimetilsulfóxido (DMSO) durante cuatro días (vehículo).

- **CPF (n = 8):** una inyección subcutánea de 1 mg / kg de CPF [O, O-dietil O-3,5,6-tricloropiridin-2-ilo fosforotioato (Pestanal, Sigma Aldrich)] disuelto en DMSO, por cuatro días.
- **VPA (n = 9):** Una inyección subcutánea de 400 mg / kg de VPA (con el objetivo de evitar una posible muerte materna (Kim et al., 2011)), disuelto en una solución salina al 0,9% a una concentración de 250 mg / mL; y tres inyecciones subcutáneas diarias con, solamente. solución salina.

Para asegurarse de que se administraron las dosis correctas, las ratas se pesaron diariamente.

El programa se completó en GD15.5, cuando todas las madres habían recibido cuatro inyecciones subcutáneas cada una (Tabla 6.1).

Grupo	12.5 GD	13.5 GD	14.5 GD	15.5 GD
CONTROL	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
CPF	CPF	CPF	CPF	CPF
VPA	VPA	Salino	Salino	Salino

Tabla 6.1. Calendario de administraciones.

6.2.3. Actividad locomotora espontánea

Para la medición de la actividad locomotora se usaron un total de 8 cajas hechas de plexiglás (39 x 39 x 15), en las que haces de fotocélulas conectadas a un ordenador se encargaban de registrar el movimiento de los sujetos experimentales. El software utilizado fue el dispuesto por VersaMax® para la configuración y la recolección de datos. Las variables medidas fueron: Distancia Total, Tiempo en Movimiento Total, Actividad Vertical y Actividad Horizontal.

Una hora antes de la prueba, los animales fueron trasladados a la habitación donde se realizaría. Las condiciones ambientales de la habitación fueron controladas siendo de 22 ± 2

°C la temperatura y la humedad de un $50 \pm 10\%$ la humedad. La luz fue atenuada para no molestar o distraer a los sujetos y las pruebas se llevaron a cabo entre las 8:00 y las 15:00 horas. Después de cada tanda de animales las cajas fueron limpiadas completamente utilizando etanol al 70%.

Una vez los animales eran colocados en el centro de la caja, se comenzó a grabar su actividad locomotora durante 60 min.

6.2.4. Desafío de drogas (Drug challenge) en campo abierto

Para el desafío de drogas en campo abierto se escogieron los siguientes compuestos:

- **Escopolamina Hidrobromida:** las dosis administradas fueron intraperitoneales de 1 mg/kg y 0.5 mg/kg, en orden de conocer la integridad del sistema colinérgico.
- **Metilescopolamina:** las dosis administradas fueron intraperitoneales de 1 mg/kg y 0.5 mg/kg para poder dilucidar si los aspectos vistos en la Escopolamina Hidrobromida son propios del SNC o también incluyen al SNP, ya que la metilescopolamina actúa únicamente a nivel de este último.
- **Ketanserina:** las dosis utilizadas fueron de 1 mg/kg y de 3 mg/kg con administración intraperitoneal. Compuesto para saber si existían también alteraciones a nivel del sistema serotoninérgico. Además, teniendo en cuenta el efecto de esta droga en las hembras, donde pueden dar picos de fiebre dependiendo del estado menstrual en el que se encuentren, efecto que puede afectar al desempeño locomotor, las temperaturas y el ciclo menstrual fueron controlados.

6.2.5. Coordinación y habilidad motora

El equipo utilizado para esta prueba consta de una estructura de madera en la que dos soportes, con plataformas propias, están unidos por una barra de madera de 90cm de largo y 3cm de

ancho. Cada plataforma representa el principio y el final del trayecto que debe efectuar el sujeto. La plataforma de salida (9x13x0.5cm) se encontraba a una altura de 87cm mientras que la segunda plataforma, la de llegada (19x17x0.5cm), la cual además contaba con un habitáculo cubierto para dar refugio al animal (23x13x14cm), estaba situada a una altura de 100cm, por lo que entre la plataforma de salida y la de llegada existía una leve pendiente para provocar así una pequeña dificultad adicional.

Los sujetos fueron entrenados el día anterior al de la prueba. El entrenamiento consistió en situar a la rata en la plataforma de salida y esperar a que realizara el recorrido completo hasta la plataforma de llegada. Completar el entrenamiento requirió que la rata hiciera este trayecto tres veces. Para que sintiera más atracción a llegar al otro lado, un par de pellet de sacarosa le eran situados en el habitáculo de llegada. La duración aproximada del entrenamiento era de 5 min. Entre tanda y tanda de entrenamiento, todo el aparato era limpiado con la utilización de etanol al 70%.

Una vez terminado. Al día siguiente se realizaba el test, el cual no era otro que la realización de la prueba una sola vez. Como el día anterior, entre cada sujeto, el aparato al completo era limpiado con etanol al 70%.

Todos, tanto los entrenamientos como la prueba, fueron grabados en vídeo con una cámara web Logitech modelo C922 Pro conectada a un ordenador. Con dichas grabaciones se realizaron el registro de las siguientes variables, las cuales dictaminarían el nivel de realización de la prueba:

- **Tiempo en la plataforma de salida (s):** tiempo que tarda el sujeto en abandonar la plataforma de salida.
- **Fallos:** número de veces que, durante el trayecto, el sujeto sitúa su pata fuera de la parte superior del travesaño de unión entre la salida y la llegada.

- **Giros:** número de veces que el sujeto se gira durante su trayecto cuando circula por encima del travesaño.
- **Paradas:** número de veces que el sujeto se para durante su trayecto cuando circula por la parte superior del travesaño.
- **Detención en el umbral:** registro de si el sujeto se ha parado enfrente del habitáculo de entrada al final del travesaño (cuenta también como parada normal).
- **TDE (s):** tiempo que tarda el sujeto en entrar al habitáculo de llegada una vez se ha parado en el final del travesaño.
- **Tiempo total (s):** tiempo total que tarda el sujeto en la realización de la prueba.

6.2.6. Análisis estadísticos

En la prueba de la actividad locomotora espontánea en campo abierto, incluyendo a su vez la parte perteneciente, dentro del mismo paradigma, al desafío de drogas, los análisis se realizaron con la utilización de una ANOVA de medidas repetidas para los datos paramétricos y Bonferroni para los post-hoc, mientras que para los de naturaleza no paramétrica fueron analizados utilizando el test de Friedman y el de Kruskal-Wallis de análisis de la varianza. Para las comparaciones múltiples, dentro de estos análisis no paramétricos, se utilizó la comparación múltiple de Dunn. Cuando los análisis han costado solamente de dos grupos, se han realizado para los paramétricos la T de Student y para los no paramétricos el test de Mann -Whitney.

En cuanto a los análisis de las variables pertenecientes a la prueba del paso de viga, los registros de la plantilla utilizada fueron tomados por dos personas distintas que no sabían qué animales pertenecían a uno u otro grupo. Tras esto, los datos obtenidos para el análisis estadístico fueron datos no paramétricos, por lo que se analizaron con Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn, este último para ver dónde se encontraban las diferencias entre grupos.

Todos los cálculos se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0 (san Diego, CA, USA).

6.3. Resultados

6.3.1. Actividad locomotora espontánea en ratas adolescentes

Para la distancia total recorrida no se encontraron diferencias significativas a pesar de que, tanto el grupo CPF como el VPA, se parecen más entre sí (figura 6.1a). Al igual, ni en tiempo en movimiento ni en actividad vertical observamos ninguna diferencia significativa entre los distintos tratamientos, guardando, como en el caso anterior, los grupos CPF y VPA, algo más de relación entre ellos (figura 6.1b y c).

En donde sí encontramos diferencias significativas, por el efecto del tratamiento, es en la Actividad Horizontal [$F(2, 57) = 3.346, p = 0.005$] (figura 6.1d). Donde el post hoc nos reveló que la diferencia residía entre el grupo CNT y el grupo CPF, siendo los CPF los que muestran más actividad en este aspecto. Dentro de esta comparativa, realizamos un análisis incluyendo las variables independientes de sexo y tratamiento. En él vimos que también existían diferencias significativas entre los machos CNT y las hembras CPF y VPA [$F(5, 54) = 3.056, p = 0.0168$], siendo estas últimas más activas que los machos del CNT (figura 6.1e).

Además, donde también encontramos diferencias significativas, entre grupos de distinto tratamiento, es en el tiempo en los márgenes (figura 6.1f). Concretamente, entre los CNT y los CPF [Kruskal-Wallis análisis de la varianza, $p = 0.03333$], siendo los CPF los que menos tiempo pasan en los márgenes. Diferencia que no existe en el análisis de sexo-tratamiento (figura 6.1g).

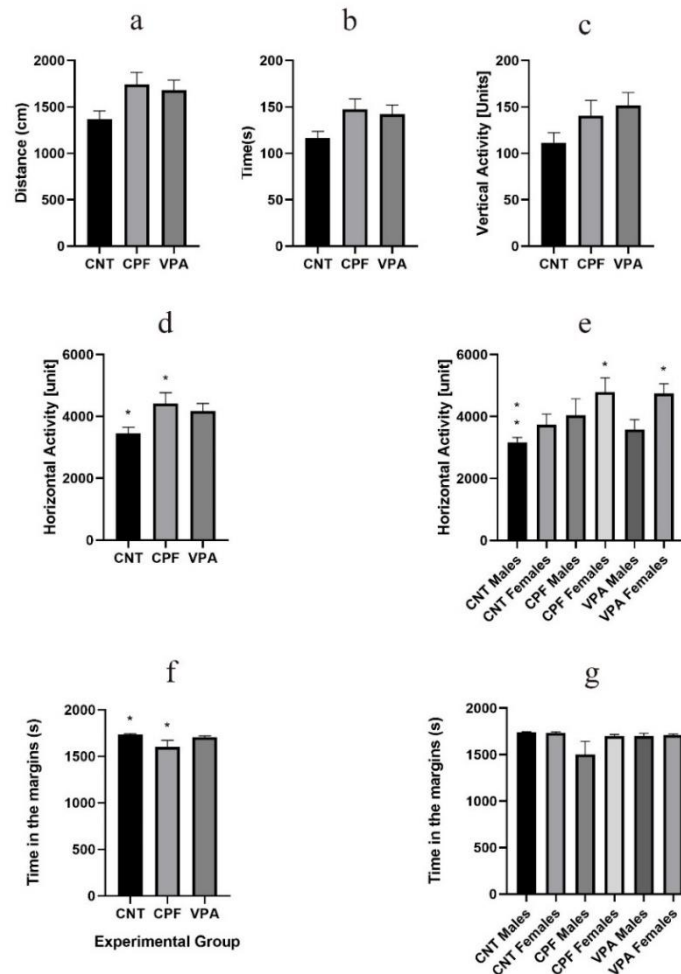


Figura 6.1. Resultados de la prueba de actividad locomotora espontánea en adolescentes ($n = 48$; CNT = 16 [8 hembras y 8 machos], CPF = 16 [8 hembras y 8 machos], VPA = 16 [8 hembras y 8 machos]): (a, b, c) Ni en Distancia Total recorrida ni en Tiempo en Movimiento ni en Actividad Vertical encontramos diferencias significativas. (f) En Actividad Horizontal, sí que encontramos diferencias significativas entre los CPF y los CNT, donde los CPF se muestran más activos. (e) En cuanto a la interrelación Tratamiento-Sexo encontramos que, la diferencia vista entre los CPF y los CNT, la sostiene principalmente la diferencia entre las CPF hembras y las CNT machos, mientras que, a este nivel, aparece una nueva diferencia significativa entre las VPA hembras y los CNT machos. (f) En el Tiempo en los Márgenes, nuevamente, encontramos diferencias significativas en Tratamiento entre los CPF y lo CNT, siendo los CNT los sujetos que más tiempo están en dichos márgenes. (g) Dentro de

esta, encontramos que, en Tratamiento-Sexo, no existen diferencias significativas; por tanto, el resultado anterior es un efecto global que incluye a ambos sexos.

6.3.2. Actividad locomotora espontánea en ratas adultas

En la Distancia Total recorrida (figura 6.2a), tenemos que no se muestra ningún tipo de diferencia significativa entre los distintos grupos experimentales, algo que sucede igual con el Tiempo en Movimiento (figura 6.2b) y con el resto de variables: Actividad Vertical y Actividad Horizontal (figura 6.2c, d). El tiempo en los márgenes no fue evaluado en estas ratas, puesto que el tamaño del campo abierto no era lo suficientemente grande como para tener datos confiables sobre ese tipo de comportamiento.

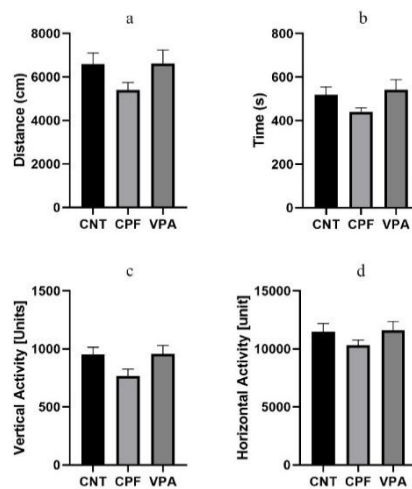


Figura 6.2. Resultados de la prueba de actividad locomotora espontánea en adultos² (n = 48; CNT = 16 [8 hembras y 8 machos], CPF = 16 [8 hembras y 8 machos], VPA = 16 [8 hembras y 8 machos]): En ninguna de las variables: Distancia Total, Tiempo en Movimiento, Actividad Vertical y Actividad Horizontal; se observaron diferencias significativas (a, b, c y d; respectivamente).

² Distintos sujetos que los evaluados durante la adolescencia, pero pertenecientes a las mismas camadas.

6.3.3. Desafío de drogas en el paradigma de campo abierto en ratas adultas

6.3.3.1. Escopolamina Hidrobromida

En cuanto a las siguientes variables: Distancia Total, Tiempo en Movimiento, Actividad Vertical y Actividad Horizontal; no encontramos ninguna diferencia significativa entre los grupos. Así como tampoco las hay en los comportamientos observados con el uso de las distintas dosis (gráficas no adjuntadas).

6.3.3.2. Metilescopolamina

En el uso de esta sustancia, los resultados son también muy parecidos a los de la hidrobromida, pues solamente encontramos diferencias significativas en la Actividad Vertical de los CNT con los CPF, donde estos últimos se muestran menos activos con el uso de salino en comparación con el resto de grupos [$F(2, 44) = 3.395, p = 0.0426$] (figura 6.3a); diferencia que no parece estar soportada por ningún subgrupo cuando observamos la variable independiente Tratamiento-Sexo (figura 6.3b). Esta diferencia significativa, tampoco existe cuando comparamos dicha Actividad Vertical con el resto de dosis dentro de su mismo grupo (figura 6.3c).

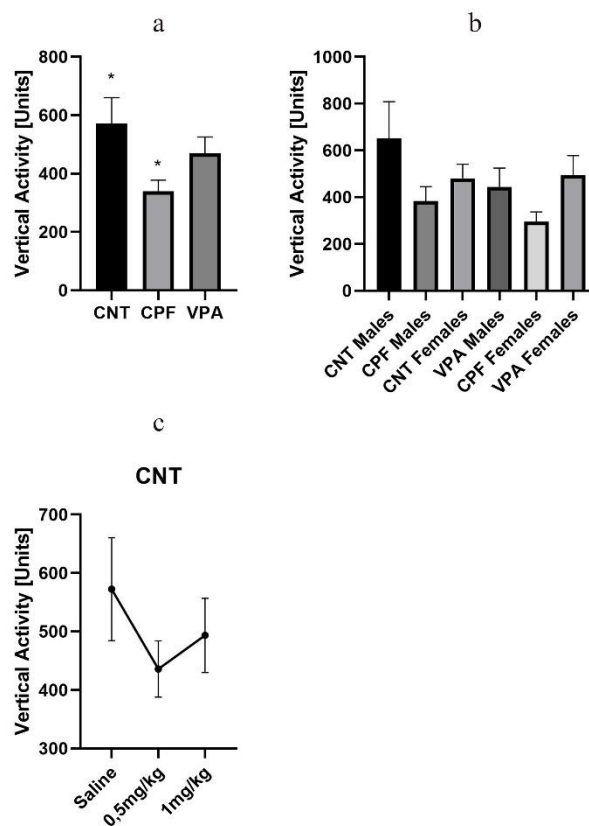


Figura 6.3. Resultados de la prueba de actividad locomotora durante el desafío de drogas con metilscopolamina en adultos ($n = 47$; CNT = 15 [8 hembras y 7 machos], CPF = 16 [8 hembras y 8 machos], VPA = 16 [8 hembras y 8 machos]): (a) Diferencia significativa entre el CNT y las CPF, donde las ratas pertenecientes al CNT mostraron más Actividad Vertical que las CPF. No existen diferencias significativas en Sexo-Tratamiento en la Actividad Vertical (b), así como tampoco existen diferencias significativas, dentro de los CNT, en el uso de las distintas dosis de escopolamina hidrobromide (c).

6.3.3.3. Ketanserina

En cuanto al desafío con ketanserina, tenemos que las únicas diferencias significativas que han arrojado los resultados pertenecen a los VPA, cuando comparamos las distintas dosis. En la Distancia Total recorrida, vemos cómo con el uso de salino, las ratas VPA recorren menos distancia conforme la dosis de ketanserina es mayor [$F(1.592, 23, 88) = 6.808, p = 0.0072$] (figura 6.4a). En el caso de Tiempo en Movimiento, vemos que la diferencia significativa se encuentra entre la administración de salino y la dosis de 3 mg/kg, siendo esta última administración la que realmente disminuye su actividad a pesar de que la de 1mg/kg también

muestra esa tendencia (test de Friedman, $p = 0.0119$) (figura 6.4b). Idéntico resultado obtenemos en la Actividad Horizontal entre la dosis de salino y la de 3 mg/kg, mostrando, la de 1 mg/kg, solamente una tendencia [$F(1.716, 25,74) = 5.290, p = 0.0101$] (figura 6.4c). Además, cuando miramos las diferencias entre machos y hembras, vemos que, tanto en la Distancia Total recorrida (test de Mann-Whitney, $p = 0.0019$) (figura 6.4d) como en el Tiempo en Movimiento (T de Student, $p = 0.003$), quienes alcanzan el dato en la administración de salino son las hembras (figura 6.4e).

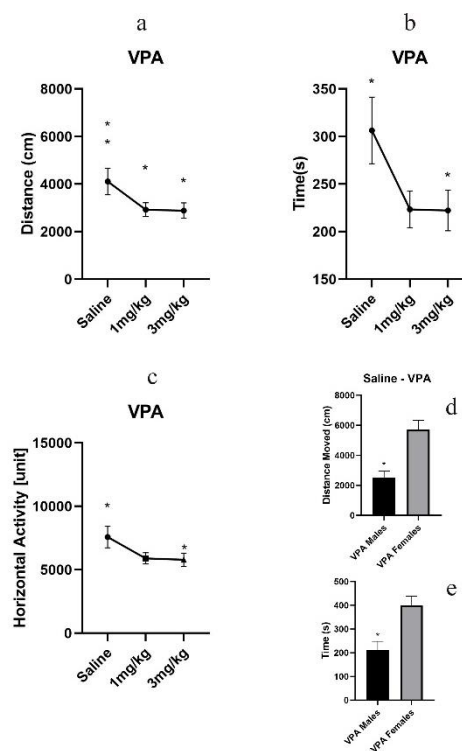


Figura 6.4. Resultados de la prueba de actividad locomotora durante el desafío de drogas con ketanserina en adultos ($n = 47$; CNT = 15 [8 hembras y 7 machos], CPF = 16 [8 hembras y 8 machos], VPA = 16 [8 hembras y 8 machos]): (a) El Total de Distancia recorrida es inferior significativamente cuando a los animales VPA se les administran las dosis de 1 mg/kg y 3 mg/kg de ketanserina. (b) Los sujetos tratados prenatalmente con VPA, se muestran menos tiempo en movimiento cuando se les administra las dos dosis ya mencionadas de ketanserina, siendo significativamente menor con la dosis de 3 mg/kg; (c) lo mismo ocurre con la Actividad Horizontal, la cual es inferior, nuevamente, con las dos dosis en las que se utiliza ketanserina. (d y e) Dentro de la actividad normativa del grupo cuando se utiliza salino, las hembras son las que se muestran más activas dentro del grupo VPA.

6.3.3. Test de paso de viga en ratas adultas

En el Tiempo Total de realización de la prueba no ha habido ningún tipo de diferencia significativa en cuanto al tratamiento (figura 3.4a), así como tampoco en los Fallos cometidos (figura 3.4b) ni en el resto de variables (gráficas no adjuntadas).

6.4. Discusión

Este estudio intenta dilucidar si existe algún tipo de relación entre la exposición prenatal a CPF en un estadio equivalente al tercer trimestre de la gestación humana, y los efectos provocados por la exposición prenatal a VPA, el cual configura un modelo animal autista. Hasta donde nosotros sabemos, la comparativa del desempeño motor en estos dos grupos experimentales no había sido aún realizada.

En cuanto los posibles efectos en el desarrollo sobre las crías de estas camadas, tenemos que el peso, factor que puede verse comprometido tanto por la administración de CPF (Breslin et al., 1996; Lan et al., 2017) como por la de VPA (Schneider & Przewłocki, 2005a), no se vio afectado, así como tampoco encontramos efectos alterados en la actividad de la AChE en PND1³. Por tanto, entendemos que los efectos que observamos en esta investigación son independientes de esa posible inhibición de la AChE, que el CPF tiene como principal mecanismo de acción (Silva et al., 2017a).

En relación al comportamiento motor, tenemos que el grupo VPA adolescentes no muestran realmente diferencias, en contraposición a otras investigaciones ya publicadas incluso con dosis más bajas que la nuestra (Mony et al., 2016). No obstante, aunque esto podría disminuir la relevancia del firme pilar en el que basar los resultados obtenidos con los CPF

³ Análisis perteneciente al primer estudio de esta tesis.

para la comparativa de ambos modelos entre sí, tenemos que investigaciones similares a la nuestra, usando el mismo paradigma, han obtenido, en sujetos adolescentes, incluso una reducción de la actividad locomotora (Olexová et al., 2013). Por lo que nos retrotraemos a que la incidencia del cuadro de hiperactividad dentro del TEA, la cual, aun siendo alta, no quiere decir que todos los sujetos con TEA tienen síntomas de hiperactividad (Antshel et al., 2013). Quizás, para ver este tipo de comportamientos, teniendo en cuenta datos como los de Goldstein y Schwebach (2004) en humanos, quienes obtuvieron un 59% de incidencia dentro del grupo de niños con TEA, nos hiciera falta realizar experimentos con una muestra más amplia.

Los resultados obtenidos en la adolescencia en cuanto a los CPF, nos dejan un dato algo más claro. Y es que, en comparación con los CNT, buscan mucho más explorar lo nuevo, algo que es importante en orden de calificar a estos animales como muy activos, y más aún si tenemos en cuenta que, en su periodo adolescente, las ratas muestran ya de base un comportamiento hiperactivo en este aspecto (Spear, 2000). Pero, es más, cuando observamos los efectos del tratamiento en los diferentes sexos de los grupos experimentales, tenemos que, tanto las hembras CPF como las VPA, muestran un comportamiento prácticamente idéntico y significativamente diferente al de los machos CNT. Si bien es cierto que podríamos decir que, en contra de nuestra hipótesis tenemos que los machos VPA y los CNT muestran también un comportamiento casi idéntico y en tendencia diferente a lo mostrado por los CPF; no podemos dejar de obviar que hemos utilizado una dosis baja de VPA, algo que puede dar lugar a que, en ciertas pruebas, no se vean diferencias significativas o los resultados obtenidos, en algunos casos, den lugar a inferencias confusas. De hecho, en otro tipo de comportamientos, se ha visto cómo las dosis bajas incluso aumentan comportamientos que con dosis altas se encuentran disminuidos, como, por ejemplo, el juego (Wellmann et al., 2014). Lo que ha conllevado a sugerir que se debería estudiar cómo la curva de administración de esta droga puede afectar a ciertos comportamientos (Cohen et al., 2013). Además, tenemos que el VPA parece afectar

también de manera distinta a machos y a hembras según la naturaleza de la prueba, la cantidad y la edad de los sujetos (Chaliha et al., 2020; Jeon et al., 2018). Por tanto, si esto que hemos expuesto es finalmente así, podríamos ver que la similitud en el comportamiento motor espontáneo que da lugar la exposición prenatal de CPF se asemejaría más al modelo VPA. De hecho, estos datos cuadran perfectamente con el tiempo mostrado por estos animales en los márgenes del aparato, comportamiento tenido por normal en roedores que exploran un lugar nuevo (Treit & Fundytus, 1988), pues, los CPF, están significativamente menos tiempo realizando este tipo de “exploración segura”, explorando más fuera de ellos. Este comportamiento ansioso, hiperactivo, también ha podido verse en el paradigma de laberinto en cruz, donde ratas adolescentes expuestas prenatalmente a CPF han pasado menos tiempo en los brazos abiertos (Silva et al., 2017a), además de cruzar más veces por la parte central (Icenogle et al., 2004). La tendencia ansiosa en pacientes con TDAH (Schatz & Rostain, 2006) es bastante importante en este punto.

En los sujetos adultos los resultados nos cuentan otra historia. Y es que no existen diferencias significativas en ninguno de los tres grupos, parte de este efecto podría deberse a la crianza conjunta de las crías. Pues, prácticamente desde que nacieron se hicieron grupos conjuntos y, como apuntan investigaciones como la de Compolongo et al. (2018), el que animales tratados con VPA se críen con CNT hace que ciertos síntomas propios del cuadro del TEA se atenúen. A lo que habría que sumar el efecto del enriquecimiento ambiental, como el que han tenido a disposición nuestros animales, el cual ha demostrado que también disminuye la aparición de ciertos comportamientos idiosincrásicos del TEA (Yamaguchi et al., 2017). Todo ello, sumado a que la dosis era baja en ambas sustancias, podría provocar que los sujetos pudieran recuperarse hasta conseguir comportamientos normales.

Para conocer la integridad de los circuitos colinérgico y serotoninérgico hemos hecho que estos animales pasen un desafío de drogas, en el que hemos comprobado, mediante la

administración de escopolamina hidrobromida, que sus sistemas colinérgicos a nivel del SNC no están alterados. En cambio, sí hemos encontrado diferencias en cuanto al sistema colinérgico a nivel del SNP, como así muestran los resultados con la metilescopolamina (Meyers & Wilchin, 1969) en la Actividad Vertical entre los CNT y el CPF (figura 3.3.2a), lo cual puede indicarnos que existen atisbos de ansiedad debido a lo poco que realizan *rearing* (oteamiento), el cual está relacionado con un comportamiento exploratorio y este con una disminución de la ansiedad (Zimcikova et al., 2017). Por otro lado, el que no veamos esta alteración del sistema colinérgico con la escopolamina hidrobromida, podría significar que sería necesario una dosis mayor de esta, pues parte de ella se distribuiría también por el SNP, algo que no ocurre, como ya hemos dicho, con la metilescopolamina. No obstante, tenemos una última opción, pues, como no vemos otros comportamientos afectados, podría resultar que este efecto fuese un dato aislado.

En cuanto a los resultados obtenidos por la ketanserina en los VPA, estos animales parecen indicarnos cierto aletargamiento en el desempeño locomotor, aun no siendo anormal en su comparativa con los CNT. La cuestión aquí es que las hembras VPA se muestran más activas que los machos con la administración de salino, pero que, cuando comienzan las administraciones de ketanserina, estas vuelven a niveles normales. Este hecho podría obedecer al diferente efecto que puede crear la ketanserina durante los distintos estadios menstruales, pero no sucede así en ratas normales, donde la actividad locomotora no se ha visto influenciada por la administración de esta droga (Díaz-Véliz et al., 1997). Por tanto, aquí tenemos una cuestión que atañe de manera unilateral a las hembras VPA y su sistema serotoninérgico. En cuanto a esto, no he encontrado información concreta al respecto en la bibliografía actual, por lo que se abre una puerta para ahondar con nuevas investigaciones en esta línea.

La integridad de la capacidad motora de las ratas, la cual podía haberse visto perjudicada por la administración de CPF y VPA, ambos con capacidades de provocar deficiencias en ella (Dam et al., 2000; Hou et al., 2018) no ha sufrido merma ninguna. Por tanto,

los efectos reflejados en el paradigma de campo abierto deberían ser ajenos a estos posibles déficits, como tampoco a cuestiones de orden teratogénico, algo que puede llegar a ser provocado también por ambas sustancias (Abou-Donia et al., 2006b; Tara Sankar Roy et al., 2004; Vorhees, 1987).

6.5. Conclusiones

A pesar de que los datos en la adolescencia podrían apuntar a la veracidad de nuestra hipótesis, no encontramos suficientes datos de peso para decir que realmente los comportamientos motores de los sujetos expuestos prenatalmente a CPF y a VPA son más parecidos entre sí, que los arrojados por los del CNT. Creemos que para que esto se cumpliera debería verse un comportamiento mucho más semejante entre ellos y que las diferencias de estos con el CNT deberían ser superiores. Ciertamente, como hemos apuntado varias veces en este estudio, podría deberse a que la dosis de VPA fue baja, así como también al propio proceso analítico, el cual hace más difícil que obtengamos diferencias estadísticas cuando evaluamos los tres grupos al mismo tiempo y no en pares separados; o también, por el hecho de que se han criado juntas desde el primer momento. A pesar de esto último, podemos decir que las diferencias encontradas no son relevantes ni lo suficientemente fuertes como para ver cumplida la hipótesis de este estudio. Aunque sí hemos entreabierto la puerta a otra pregunta y es: cómo el VPA afecta al sistema serotoninérgico de las hembras en contraposición al de los machos.

7. Estudio nº3

Abstract

El trastorno de espectro autista (TEA) es caracterizado por comportamientos repetitivos, deficiencias cognitivas y muy preponderantemente por deficiencias en la producción de interacciones sociales. Mientras que la etiología del TEA sigue siendo desconocida, hay estudios que apuntan a un desorden sistémico que va, desde alteraciones genéticas a exposiciones ambientales a tóxicos que influyen en el neurodesarrollo de los fetos. En este último orden podemos encontrar que, en los últimos años, los plaguicidas organofosforados han sido uno de los actores señalados como posibles causantes o agravantes de este trastorno. En este estudio, hemos intentado dilucidar si, la exposición prenatal a clorpirifós (CPF), un plaguicida organofosforado, a dosis subclínicas (1 mg/kg) en GD12.5-15.5, en ratas wistar, provoca efectos similares en el comportamiento a las expuestas prenatalmente a ácido valproico (VPA) (400 mg/kg), un modelo animal aceptado de autismo. Para ello se ha utilizado el paradigma de las 3-habitaciones, en el cual se ha evaluado la sociabilidad y la reacción ante la novedad social, habiéndose realizado las medidas en dos clústeres de individuos: uno en la adolescencia y otro en la adultez; pero de la misma camada de ratas tratadas prenatalmente. Además, se ha hecho un estudio metabólico del glutamato, la glutamina, el GABA, el NAA y la colina en el cerebelo e hipocampo izquierdos, tanto en la adolescencia como en la adultez. Los resultados nos indican que ciertamente existe similitud entre los CPF y los VPA, comparados estos a su vez con un grupo control (CNT). Los CPF, en la adolescencia, mostraron un índice negativo en la reacción ante la novedad social, seguidos muy de cerca por los VPA. Mientras que, en la adultez, se produjo una recuperación en este aspecto, siendo los CPF incluso más sociales que los controles. En metabolómica, ambos

grupos, CPF y VPA, en contraposición cada uno con los CNT, mostraron números similares en cuanto a los metabolitos estudiados durante la adolescencia. Sin embargo, en la adultez, el grupo CPF difirió del VPA en la cantidad de GABA en el cerebelo. Apoyando pues la tesis de que la exposición a CPF puede provocar efectos similares en sociabilidad a los vistos en los modelos autistas y también que, quizás, la crianza conjunta y el enriquecimiento ambiental sean unos mecanismos propicios para la mejora hasta cierto grado de las alteraciones producidas por este trastorno.

7.1. Introducción

Como bien es sabido, el trastorno de espectro autista (TEA) es un trastorno del neurodesarrollo que se caracteriza por comportamientos repetitivos además de deficiencias cognitivas y déficits en habilidades sociales, lo que incluye verbales y no verbales (Gyawali & Patra, 2019). La prevalencia mundial del mismo parece estar en torno al 1%, afectando más a niños que a niñas, aunque parece ser que las estimaciones son superiores en países más desarrollados (Lai et al., 2014; Lord et al., 2020). Las causas por las que se produce este trastorno son aún desconocidas. No obstante, existe un consenso más o menos establecido que entiende que la etiología está soportada por aspectos multifactoriales, de entre los que podemos destacar, factores genéticos o ambientales (Schaaf et al., 2020). En cuanto a estos últimos, por ejemplo, podemos destacar la exposición a plaguicidas (Posar & Visconti, 2017).

Dentro de la exposición prenatal a plaguicidas, los organofosforados (OPs) han sido uno de los señalados como posibles causantes del autismo (Antonio M. Persico & Merelli, 2014). Y, más concretamente, por su popularidad de uso incluso después de haber sido prohibido para su uso doméstico por la EPA, allá por el 2001 (Saunders et al., 2012), el

clorpirifós (CPF) ha sido una de las variantes más estudiadas como posible agente interviniente en el desarrollo del TEA.

El principal mecanismo de acción de los OPs, como el CPF, es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), lo que da lugar a una acumulación de acetilcolina (ACh) y por ello una sobreestimulación de los receptores colinérgicos provocando colapsos del sistema nervioso (U.S. Department of health and human services, 1997). En dichas dosis toxicológicas, los efectos que provoca el CPF van desde la disrupción de la proliferación y la diferenciación y apoptosis celular (Raszewski et al., 2015), hasta la alteración de la maduración dendrítica (Howard et al., 2005). Alteraciones todas ellas que apoyarían el papel del CPF como factor ambiental a tener en cuenta durante el desarrollo de los fetos en relación al TEA.

De hecho, según un estudio llevado a cabo en California, en el cual se examinó si la proximidad a campos de cultivo donde se utilizaban plaguicidas (entre ellos el CPF) podía ejercer algún tipo de influencia negativa en el desarrollo de los niños, obtuvieron que el riesgo de presentar autismo era el doble que el de aquellas madres que no habían sido expuestas a esos plaguicidas durante su etapa de gestación (Shelton et al., 2014). Datos que fueron más tarde afianzados por otros estudios que han dado resultados en la misma línea, señalando anomalías en los cerebros de niños que fueron expuestos prenatalmente a CPF, mostrando estas puntuaciones menores en test de inteligencia. Algo que también ha sido visto en niños autistas (Gunter et al., 2017; Rauh et al., 2012).

Así pues, debido a estos datos sobre la incidencia del autismo en personas que habían sido expuestas de manera indirecta a CPF durante su desarrollo, se sucedieron estudios en roedores, en los cuales, aprovechando el control más exhaustivo de las posibles variables intervinientes, se ha pretendido observar más detalladamente el tipo de deficiencias que pueden presentar animales expuestos prenatalmente a dicha sustancia. Por ejemplo, en roedores expuestos durante su gestación a dosis de CPF que no provocan la inhibición de la AChE, se

ha podido comprobar que estos muestran deficiencias parecidas a las del autismo, tales como menos comportamientos sociales, así como también menos interés de exploración hacia objetos nuevos (Lan et al., 2017), reducido número de vocalizaciones ultrasónicas y longitud de las mismas (Aldina Venerosi et al., 2009), e incluso cómo estos sujetos muestran hiperactividad (Grabovska & Salyha, 2015a), algo que ha sido relacionado, debido a su alto índice de comorbilidad, con el autismo (Sokolova et al., 2017).

No obstante, a pesar de estos datos, algunos de ellos son controvertidos a la hora de asegurar si el CPF puede provocar o no autismo cuando estos animales han sido expuestos prenatalmente a él (Williams & Desesso, 2014b). Así pues, para avanzar en esta línea, se hace conveniente una comparativa con un modelo animal de exposición ambiental que, de manera general por el estamento científico, sí ha sido aceptado como un modelo animal de autismo, como es el de ácido valproico (VPA) (Ergaz et al., 2016; Mabunga et al., 2015). Este modelo ha corroborado tanto en ratones como en ratas que los aspectos que desarrollan los animales, cuando son expuestos al mismo de manera prenatal, son muy similares a lo que entendemos que ocurre en personas (Chaliha et al., 2020; Mabunga et al., 2015). Por ejemplo, en los ultrasonidos ya mencionados, se sabe que ratas expuestas a VPA prenatalmente mostraron una significativa reducción en el número de llamadas realizadas, y que estas tenían una duración mucho más corta (Cezar et al., 2018; Dai et al., 2018), así como también deficiencias en el comportamiento social en el test de las 3-habitaciones (Bambini-Junior et al., 2014; Bronzuoli et al., 2018; Kim et al., 2014), niveles de ansiedad incrementados y comportamientos estereotípicos (Bronzuoli et al., 2018; Michela Servadio et al., 2015). Como vemos, todos ellos aspectos pertenecientes al cuadro clínico autista.

En las exposiciones prenatales es importante entender cómo las alteraciones del metabolismo cerebral actúan en el desarrollo de las estructuras cerebrales. Así, por ejemplo, alteraciones en los niveles de glutamato (Glu), glutamina (Gln) y GABA han sido destacadas

como posibles intervinientes importantes en la patogénesis del TEA (Ziemska et al., 2018). Los tres, neurotransmisores que cumplen un papel importante en la regulación de la ansiedad, y que en crías pueden modular tanto la emisión de ultravocalizaciones, por separación de la madre (Takahashi et al., 2009), como más tarde, la propia sociabilidad mostrada por los sujetos en pruebas como el ya comentado paradigma de las 3-habitaciones (Silverman et al., 2015; Tzanoulinou et al., 2014). De hecho, alteraciones GABAérgicas han sido también encontradas en animales expuestos perinatalmente a dosis subclínicas de CPF, las cuales no inhiben de manera irreversible la AChE (Perez-Fernandez, Morales-Navas, Guardia-Escote, et al., 2020a), así como también en animales tratados prenatalmente con VPA (Hou et al., 2018; R. Wei et al., 2016). Algo muy importante teniendo en cuenta el rol que parecen tener las disfunciones del comportamiento del GABA en los balances electrofisiológicos excitatorios/inhibitorios y el posible papel de estos en la etiología del autismo (Gogolla et al., 2009; Hou et al., 2018). Así pues, la identificación de biomarcadores que nos provean de datos que puedan arrojar algo de luz en los caminos moleculares que sostienen dichas alteraciones, podrían ser de suma importancia para entender mejor la etiología neurológica del TEA.

Con todo ello, este estudio se centra en saber si la exposición prenatal a dosis subclínicas de CPF provoca cambios en la sociabilidad de los sujetos, similares a los que se presentan cuando, en la misma ventana de desarrollo fetal, se utiliza VPA. Para ello se han realizado dos principales experimentos utilizando el paradigma de las 3-habitaciones: uno en la adolescencia y otro en la adultez; de grupos distintos de ratas, pero todas provenientes de las mismas camadas. Aparte del uso del paradigma de las 3-habitaciones para la medida del comportamiento social, también se realizaron análisis de la expresión metabólica del Gln, del Glu y del GABA en el hipocampo y el cerebelo. Ambas, estructuras importantes en la etiología del autismo y sus efectos sobre la conducta social.

7.2. Materiales y método

7.2.1. Animales experimentales

Las madres gestantes fueron 25 ratas preñadas Wistar (Janvier Labs; Le Genest-Saint-Isle, Francia) de 3 meses de edad alojadas individualmente en jaulas de policarbonato transparente (50 × 15 × 24 cm), en nuestras instalaciones. Durante 6 días, las ratas estuvieron aclimatándose a su nuevo ambiente, regulado este a una temperatura de 22 ± 2 °C y a una humedad al $50 \pm 10\%$. El ciclo de luz / oscuridad era invertido, con luces encendidas de 19:00 a 07:00 h. Todas dieron a luz el día esperado, siendo este denominado como día posnatal 0 (PND0).

Al siguiente día (PND1), todas las crías fueron separadas de sus madres para ser distribuidas al azar entre ellas guardando una relación de 5 hembras y 5 machos por madre, con el ánimo de que se produjeran las menores diferencias posibles en cuanto a la crianza. Las madres siempre tuvieron acceso libre a agua y comida. Para monitorear posibles signos de intoxicación, las crías se pesaron regularmente. Comenzamos con esta última rutina en el PND10, pues queríamos prevenir reacciones maternas extremas que pudieran acabar afectando a las crías. Este estudio forma parte del proyecto PSI2017-86847-C2-1-R y se realizó de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 y la Directiva de la Comunidad Europea (2010/63 / UE) para la investigación animal y aprobada por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Almería.

7.2.2. Protocolo de administración

En el día de gestación (GD) 11, las madres fueron asignadas al azar a uno de los siguientes tres grupos experimentales: grupo control (CNT), grupo clorpirifós (CPF) y grupo ácido valproico (VPA). En GD12.5, todas las madres gestantes iniciaron el tratamiento según el siguiente protocolo:

- **CNT (n = 8):** Una inyección subcutánea de 1 mL / kg de dimetilsulfóxido (DMSO) durante cuatro días (vehículo).
- **CPF (n = 8):** una inyección subcutánea de 1 mg / kg de CPF [O, O-dietil O-3,5,6-tricloropiridin-2-ilo fosforotioato (Pestanal, Sigma Aldrich)] disuelto en DMSO, por cuatro días.
- **VPA (n = 9):** Una inyección subcutánea de 400 mg / kg de VPA (con el objetivo de evitar una posible muerte materna (Kim et al., 2011)), disuelto en una solución salina al 0,9% a una concentración de 250 mg / mL; y tres inyecciones subcutáneas diarias con, solamente. solución salina.

Las madres gestantes se pesaron diariamente, para asegurarse de que se administraron las dosis correctas.

El programa de administraciones se completó en GD15.5, cuando todas las madres habían recibido cuatro inyecciones subcutáneas cada una (Tabla 7.1).

Grupo	12.5 GD	13.5 GD	14.5 GD	15.5 GD
CONTROL	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
CPF	CPF	CPF	CPF	CPF
VPA	VPA	Salino	Salino	Salino

Tabla 7.1. Calendario de administraciones.

7.2.3. Test de Sociabilidad

Este test consiste en una caja rectangular (96 x 105 cm) basa en la diseñada por Jacquelin Crawley (Crawley, 2004), la cual posee tres departamentos distintos (96 x 35 cm): uno en el centro y otros dos en ambos lados. La separación entre ellos está realizada con un cristal para

poder dejar que el animal vea desde el compartimento de salida (el central) qué hay en los otros dos. Los habitáculos laterales, estaban divididos virtualmente en:

- **Zona Total:** comprendiendo todo el compartimento.
- **Zona de contacto:** comprendiendo el perímetro de las jaulas en las que después se iban a situar los congéneres de las dos últimas sesiones de la prueba.

Todos los animales que pasaron la prueba estuvieron el día anterior en el aparato explorándolo por 10 minutos, con el objetivo de evitar un comportamiento novedoso ante el mismo que pudiera interferir con las mediciones. Los experimentos se realizaron entre las 8:00 y las 14:00 horas. La prueba consistió en 3 fases consecutivas, todas ellas de 10 minutos de duración. Después de cada una, el aparato era limpiado con una solución de alcohol al 70%.

- **Sesión n°1: aclimatación del animal.** Durante esta sesión se dejó al animal explorar sola y exclusivamente el compartimento central, teniendo los accesos a los dos otros compartimentos cerrados. Esta sesión se utilizó para medir la actividad locomotora de los sujetos. Tras los diez minutos se extrajeron los sujetos momentáneamente del aparato antes de pasar a la siguiente fase.
- **Sesión n°2: sociabilidad.** En esta parte se medía la conducta social del animal, consistiendo en la ubicación de un congénere en uno de los compartimentos laterales. Dicho congénere (Extraño 1), estaba encerrado en una jaula de metal que permitía, llegado el caso, incluso el contacto entre los sujetos. En esta fase se midieron el tiempo que pasaba en cada compartimento y el tiempo de contacto con el congénere; así como el Índice de Sociabilidad (aquel calculado con los tiempos de cada compartimento) y el Índice de Sociabilidad Contacto (aquel calculado con los tiempos que permanecían dentro de los perímetros cercanos a las jaulas donde se disponían los congéneres). Además, se calcularon también las Latencias de la Primera Entrada a cada

compartimento, así como el Número de Entradas que realizaban a la Zona de Contacto. Antes de la siguiente prueba el sujeto era sacado del aparato momentáneamente.

- **Sesión n°3: reacción ante la novedad social.** Durante esta fase se evaluó la respuesta ante la novedad social que mostraban los sujetos. Por tanto, basándonos en las apreciaciones de Bambini-Junior et al. (2014), aquellos sujetos que no pasaron ningún tiempo con el congénere anterior y los que en esta fase no visitaron los tres compartimentos, fueron eliminados. Así pues, en esta fase, además del congénere, ahora ya conocido (Familiar), se situó en la jaula del otro compartimento un nuevo individuo (Extraño 2). Se midió entonces el tiempo que pasaba en cada compartimento y en contacto con cada individuo, así como el Índice de Reacción ante la Novedad Social Total (aquel calculado con los tiempos en cada compartimento) y el Reacción ante la Novedad Social Contacto (aquel calculado con los tiempos que permanecían dentro de los perímetros cercanos a las jaulas donde se disponían los congéneres). Además, nuevamente, se calcularon las Latencias de la Primera Entrada a cada compartimento, así como el Número de Entradas que realizaban a la Zona de Contacto.

El rastreo de los animales se realizó utilizando Ethovision 3.1, con una cámara cenital como input de entrada. La luz era taimada para no perturbar a los animales.

Los grupos de animales que formaron parte de los dos experimentos fueron:

- **En adolescentes (día posnatal 37-46; [PND37-46]):** 20 CNT (10 hembras y 10 machos), 21 CPF (11 hembras y 10 machos) y 20 VPA (10 hembras y 10 machos)
- **En adultas (PND 180-189):** 20 CNT (10 hembras y 10 machos), 21 CPF (10 hembras y 11 machos) y 20 VPA (10 hembras y 10 machos)

7.2.4. Metabolómica

Para la obtención de las muestras, individuos tanto de los adolescentes como del grupo de las adultas fueron decapitados rápidamente, siendo el cerebro completo extraído y diseccionado, obteniendo diversas estructuras: lóbulos frontales, hipotálamo, cerebelo, hipocampo y el dorsal estriado. Todas estas estructuras fueron almacenadas a -80°C hasta los análisis de resonancia magnética nuclear (NMR). En este experimento solamente expondremos los datos obtenidos de los análisis de las estructuras del hipocampo y cerebelo izquierdos de los cerebros.

Los análisis se realizaron utilizando un espectrómetro de alta resolución para bases líquidas junto con una criosonda altamente sensible. La espectrometría NMR da rápidamente información cualitativa y cuantitativa de alrededor de 10^2 pequeñas moléculas diferentes encontradas en las muestras (Vignoli et al., 2019), ofreciendo pues un acercamiento a caminos bioquímicos generales que después nos permiten un análisis más específico (Lutz et al., 2014). Además de esto, el NMR nos ofrece un análisis de alto rendimiento y reproducibilidad, y es, intrínsecamente, una técnica cuantitativa, en la que los valores se muestran dentro de un espectro fruto de la comparativa de las concentraciones de las muestras con otra muestra de referencia.

7.2.5. Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos utilizados para la prueba de 3-habitaciones, fueron para datos paramétricos una ANOVA y test de múltiples comparaciones Holm-Sidak para los post-hoc. Mientras que, para los de naturaleza no paramétrica, fueron analizados utilizando el estadístico de Friedman y el de Kruskal-Wallis de análisis de la varianza. Para las comparaciones múltiples, dentro de estos análisis no paramétricos, se utilizó la comparación múltiple de Dunn. Cuando los análisis han constado solamente de dos grupos, se han realizado para los paramétricos la T de Student y para los no paramétricos el test de Wilcoxon.

Además, para el cálculo de los índices de sociabilidad y reacción ante la novedad social se utilizaron las siguientes fórmulas (Bambini-Junior et al., 2014; Kim et al., 2014):

Fase 2 – Sociabilidad:

$$\text{Índice de Sociabilidad} = \frac{\text{tiempo con el extraño 1} - \text{tiempo en compartimento vacío}}{\text{tiempo con el extraño 1} + \text{tiempo en compartimento vacío}}$$

Índice de Sociabilidad Contacto

$$= \frac{\text{tiempo en el perímetro más cercano al extraño 1} - \text{tiempo en el perímetro más cercano al compartimento vacío}}{\text{tiempo en el perímetro más cercano al extraño 1} + \text{tiempo en el perímetro más cercano al compartimento vacío}}$$

Fase 3 – Reacción ante la Novedad Social:

$$\text{Índice de Reacción ante la Novedad Social} = \frac{\text{tiempo con el extraño 2} - \text{tiempo con el familiar}}{\text{tiempo con el extraño 2} + \text{tiempo con el familiar}}$$

Índice de Reacción ante la Novedad Social

$$= \frac{\text{tiempo en el perímetro más cercano al extraño 2} - \text{tiempo en el perímetro más cercano al familiar}}{\text{tiempo en el perímetro más cercano al extraño 2} + \text{tiempo en el perímetro más cercano al familiar}}$$

Todos los cálculos se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0 (san Diego, CA, USA).

7.3. Resultados

7.3.1. Sociabilidad en adolescentes

7.3.1.1. Fase 1 — Comportamiento locomotor

En esta fase de aclimatación se obtuvieron diferencias significativas entre grupos de tratamiento en la variable de Distancia Total Recorrida (Kruskal-Wallis análisis de la varianza, $p = 0.01$), siendo el grupo CPF el que menos distancia hacía en comparación a los grupos CNT y VPA (figura 7.1a). Además, con ánimo de averiguar posibles trazas de hiperactividad en sus periodos de movimiento, se midió la Velocidad, de la que también obtuvimos que los CPF no solo se movían menos, sino que también más lento que los CNT y los VPA (Kruskal-Wallis

análisis de la varianza, $p = 0.01$; figura 7.1b). En cuanto al Rearing, no obtuvimos ningún tipo de diferencia significativa (figura 7.1c).

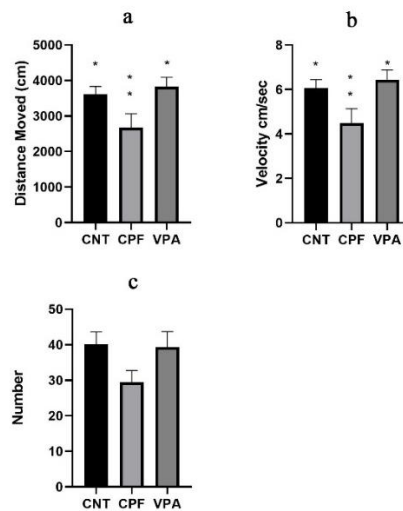


Figura 7.1. Resultados de aspectos locomotores la prueba de 3-habitaciones en adolescentes – Fase 1 ($n = 61$; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [11 hembras y 10 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): En Distancia Total Recorrida encontramos diferencias significativas entre el grupo CPF y los otros dos grupos; siendo el CPF el que menos distancia recorre (a). En Velocidad, también hay diferencias significativas mostrando que los CPF se mueven más lento que los sujetos del resto de grupos (b). En el comportamiento de Rearing, no vemos diferencias significativas. (*) Diferencia significativas con un grupo. (**) Diferencias significativas con dos grupos.

7.3.1.2. Fase 2 — Sociabilidad

En cuanto al tiempo en cada compartimento por Tratamiento, tenemos que, de manera aislada, tanto el grupo CNT (estadístico de Friedman, $p = 0.000$) como el grupo VPA (estadístico de Friedman, $p = 0.000$), estuvieron significativamente más tiempo con el Extraño 1 (figuras 7.2a y 7.2c, respectivamente). Sin embargo, el grupo CPF no pareció mostrar una clara diferencia entre estar en el compartimento del Extraño 1 o en el que se encontraba vacío (figura 7.2b).

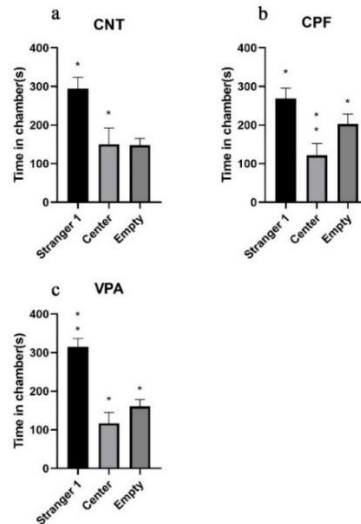


Figura 7.2. Tiempo en cada compartimento en la prueba de 3-habitaciones en adolescentes – Fase 2 (n = 61; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [11 hembras y 10 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): Tanto los CNT como los VPA pasan claramente más tiempo con el extraño 1 que en departamento central (CNT) como también en el que se encuentra vacío (VPA) (a y c). Mientras que los CPF, aun mostrando esa diferencia significativa entre estar con el Extraño 1 o en el departamento central, también muestran diferencias significativas entre estar en el vacío y en el central (b).

Ya dentro de cada grupo, vemos cómo los machos CNT no vemos una diferencia significativa en estar más tiempo con el Extraño 1, aunque sí una tendencia a estar cerca de su compartimento (figura 7.3a). Por el contrario, las hembras CNT, sí que muestran una clara preferencia por estar en el compartimento del Extraño 1 y no en el central o en el vacío [F (1.606, 16.06) = 86,91, $p < 0.000$] (figura 7.3b). En los CPF, ambos sexos muestran preferencia por el compartimento del extraño 1 (Machos - estadístico de Friedman, $p = 0.001$; Hembras – estadístico de Friedman, $p = 0.006$; figuras 7.3c y d), aunque, concretamente, las hembras muestran una fuerte tendencia a estar también en el compartimento vacío, dato que sostiene esa indiferencia vista en el análisis general por Tratamiento. En cuanto a los VPA, los machos muestran una muy clara preferencia por estar en el compartimento del Extraño 1 (estadístico de Friedman, $p < 0.000$), obteniendo diferencias significativas incluso con el compartimento vacío (figura 7.3e); las hembras, si bien muestran también esa preferencia por el compartimento

con su congénere [estadístico de Friedman, $p = 0.006$], no mostraron diferencias con el compartimento vacío (Figura 7.3f).

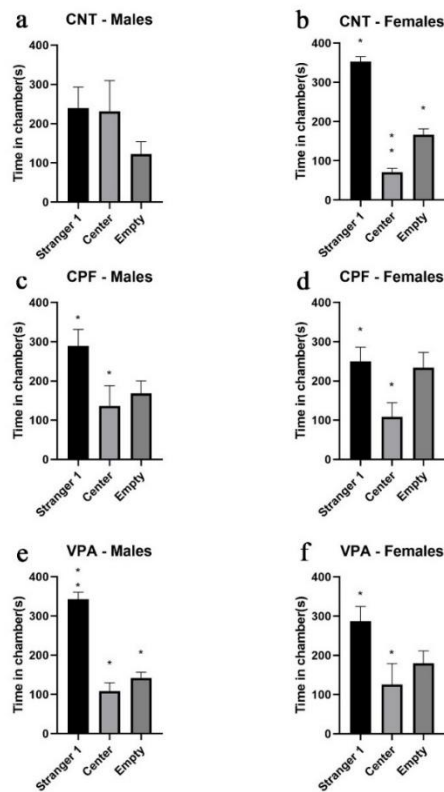


Figura 7.3. Tiempo en cada compartimento según sexo dentro de cada tratamiento en la prueba de 3-habitaciones en adolescentes – Fase 2 ($n = 61$; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [11 hembras y 10 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): En los machos CNT no encontramos diferencias significativas en la preferencia por estar en ninguno de los compartimentos (a), mientras que en las hembras CNT sí que encontramos una diferencia significativa en sus preferencias, tanto por estar en el compartimento con el Extraño 1, como también por estar en el compartimento vacío (b). En los machos y hembras CPF, sí vemos que tienen preferencia por estar con el Extraño 1 en contraposición a estar en el compartimento central (c y d), mostrándose además cómo en las hembras existe una fuerte tendencia también a estar en el compartimento vacío. En cuanto a los machos VPA, vemos que, como grupo, son los que más preferencias muestran por estar con el Extraño 1, pues evidencian diferencias significativas entre el compartimento de este y el resto de compartimentos (e). Mientras que las hembras VPA, solamente muestran significativamente su preferencia por estar con el Extraño 1 (f).

No obstante, para saber si estos animales son más o menos sociales, los datos importantes son los Índices de Sociabilidad, pues es ahí donde se comparan los distintos tratamientos. Así pues, tenemos que ni en el índice de Sociabilidad ni en el índice de

Sociabilidad Contacto, encontramos ninguna diferencia significativa (figura 7.4a y b, respectivamente), a pesar de que los CPF evidencian una tendencia a ser menos sociables.

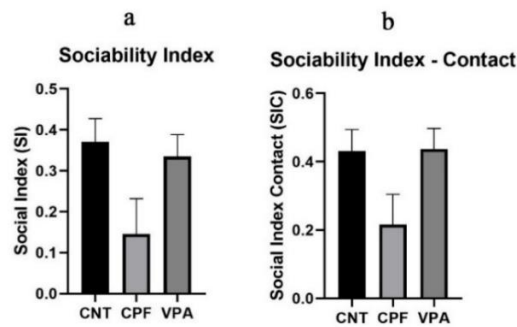


Figura 7.4. Índices de Sociabilidad en la prueba de 3-habitaciones en adolescentes – Fase 2 (n = 61; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [11 hembras y 10 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): A pesar de encontrar una tendencia en los CPF, no existen diferencias significativas ni en el índice Total ni en el de Contacto (a y b, respectivamente).

Por otro lado, en las Latencia de la Primera Entrada, tenemos que, durante esta fase, intrínsecamente, los CNT mostraron una latencia de entrada en el compartimento del Extraño 1 significativamente menor que el resto de grupos experimentales (estadístico de Wilcoxon, $p = 0.015$; figura 7.5b). Aunque esta diferencia no era significativa cuando los grupos eran comparados entre sí (figura 7.5a).

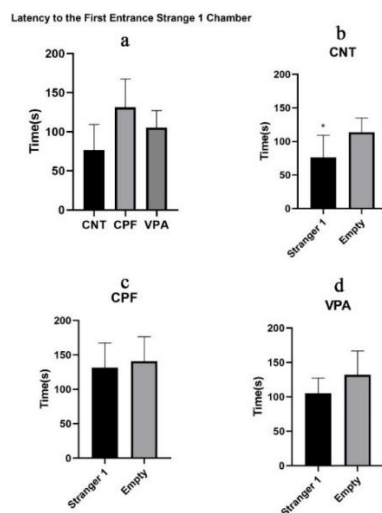


Figura 7.5. Latencia de primera entrada en el compartimento del Extraño 1, así como también en comparativa con la que realizan en el compartimento del Familiar, en adolescentes – Fase 2 (n = 61;

CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [11 hembras y 10 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): En el tiempo transcurrido antes de la primera entrada en el compartimento del Extraño 1, no vemos diferencias significativas entre grupos (a). Sin embargo, dentro de ellos, vemos cómo, los CNT (b) tardan significativamente menos en entrar en el compartimento del extraño 1 en comparación con los otros dos grupos (c y d).

En relación al Número de Entradas en cada compartimento, vemos que no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales (figura 7.6a). No obstante, intrínsecamente, tenemos que, tanto el grupo CNT (estadístico de Wilcoxon, $p = 0.000$) (figura 7.6b) como el grupo VPA (T de Student, $p = 0.004$) (figura 7.6d), realizaron más entradas en el compartimento del Extraño 1 que en el compartimento vacío. Algo que no ocurre en los CPF (figura 7.6c).

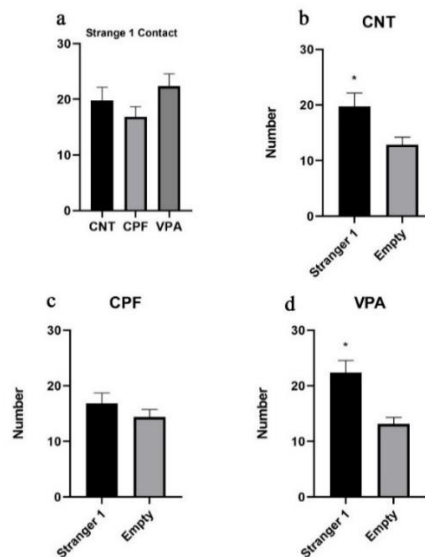


Figura 7.6. Frecuencia de entradas en contacto con el Extraño 1, así como también en comparativa con las del compartimento del Familiar, en adolescentes – Fase 2 ($n = 61$; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [11 hembras y 10 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): En el número de entradas, vemos que no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos (a). Dentro de los grupos observamos cómo, tanto los CNT como los VPA, entran significativamente más veces a dicho compartimento (b y d, respectivamente), mientras que dicha diferencia no existe en los CPF (c).

7.3.1.3. Fase 3 — Reacción ante la novedad social

En esta fase, el tiempo total en cada compartimento mostrado por los distintos tratamientos mostraron diferencias significativas. Por ejemplo, los CNT (figura 7.7a) evidenciaron una

diferencia significativa por estar con el Extraño 2, más que en el compartimento central o en el que se encontraba el Familiar (estadístico de Friedman, $p = 0.000$). Sin embargo, tanto los CPF (estadístico de Friedman, $p < 0.000$) como los VPA (estadístico de Friedman, $p < 0.000$), no encontramos esta preferencia por el nuevo extraño, sino que parecían mostrar indiferencia entre pasar tiempo con el Familiar o con el Extraño 2 (figura 7.7b y c).

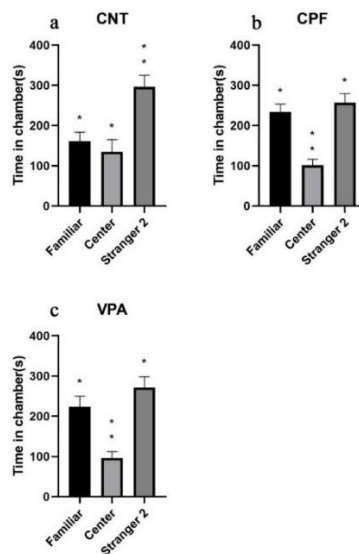


Figura 7.7. Tiempo en cada habitación en la fase de Reacción ante la Novedad Social en adolescentes - Fase 3 ($n = 54$; CNT = 16 [10 hembras y 6 machos], CPF = 19 [10 hembras y 9 machos], VPA = 19 [9 hembras y 10 machos]): Los CNT muestran una diferencia significativa entre el tiempo pasado con el Extraño 2 y los otros dos compartimentos (a). Por el contrario, los CPF y los VPA muestran diferencias significativas en el tiempo invertido tanto con el Familiar como con el Extraño 2, en contraposición con el invertido en el compartimento central (b y c; respectivamente).

El cálculo de las diferencias sexuales, en este caso no podemos hacerlo puesto que no tenemos suficientes sujetos machos de CNT. Así pues, suspendemos el resto de análisis en esta sección por imposibilidad comparativa.

Después de estos interesantes resultados, nos toca saber si estas diferencias son intrínsecas de los grupos experimentales o por el contrario existen también entre ellos. Y como vemos en la figura 7.8a existen diferencias significativas entre los CNT y los CPF (estadístico Kruskal-Wallis, $p = 0.044$), siendo los CPF los que menos reactivos ante la novedad social se

muestran. En cuanto al SNI de Contacto, no observamos diferencias significativas entre los grupos experimentales, aunque el índice muestra fielmente una “huella” del resultado total (figura 7.8b).

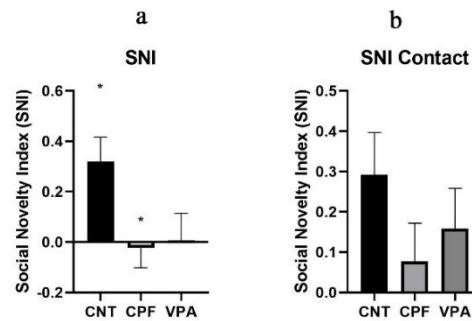


Figura 7.8. Índices de Reacción ante la Novedad Social en adolescentes - Fase 3 (n = 54; CNT = 16 [10 hembras y 6 machos], CPF = 19 [10 hembras y 9 machos], VPA = 19 [9 hembras y 10 machos]): En el SNI, podemos observar cómo los CPF muestran diferencias significativas con los CNT, mostrándose los mucho menos reactivos ante el nuevo congénere. En el SNI de Contacto, a pesar de que la forma básica del gráfico es la misma, desaparecen las diferencias significativas.

En relación a las latencias, lo que tardan en entrar los distintos grupos de tratamiento al encuentro del Extraño 2, vemos que no existen diferencias significativas ni entre ellos ni en ninguno de los grupos por separado (figura 7.9).

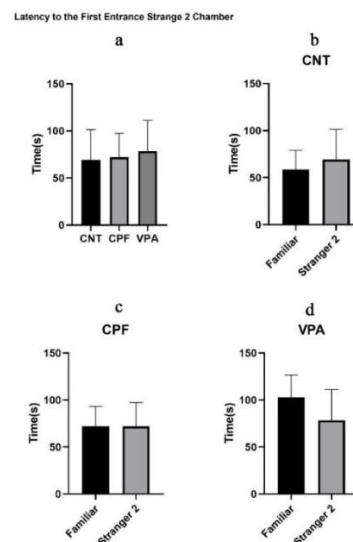


Figura 7.9. Latencia de primera entrada en el compartimento del Extraño 2, así como también en comparativa con la que realizan en el Compartimento del Familiar, en adolescentes - Fase 3 (n = 54; CNT = 16 [10 hembras y 6 machos], CPF = 19 [10 hembras y 9 machos], VPA = 19 [9 hembras y 10 machos]).

machos]): Los distintos grupos experimentales no muestran diferencias significativas en relación al tiempo que tardan en acercarse al nuevo congénere (Extraño 2) (a). Así como tampoco existen diferencias entre el tiempo que tardan en ir a ver al congénere Familiar o al Extraño 2, en ninguno de los grupos por separado (b, c y d).

En la frecuencia de entradas en la habitación del Extraño 2, no encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (Figura 7.10a). No obstante, sí vemos que existe una diferencia significativa en el número de entradas que hacen los CNT al habitáculo de del nuevo congénere (Wilcoxon test, $p = 0.000$) (figura 7.10b). Efecto que ya no vemos en los otros dos grupos experimentales (figuras 7.10c y d).

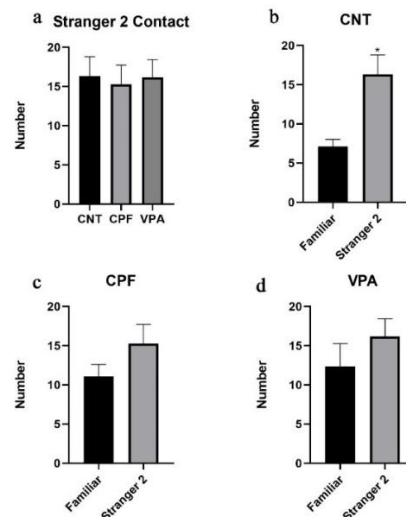


Figura 7.10. Frecuencia de entradas en contacto con el Extraño 2, así como también en comparativa con las del compartimento del Familiar, en adolescentes - Fase 3 ($n = 54$; CNT = 16 [10 hembras y 6 machos], CPF = 19 [10 hembras y 9 machos], VPA = 19 [9 hembras y 10 machos]): Los distintos grupos experimentales no muestran diferencias significativas en las veces que entran en el habitáculo del Extraño 2 (a). Sin embargo, los CNT sí que muestran diferencias significativas en las veces que entran en el perímetro de contacto con el Extraño 2 (b). Mientras que los CPF y los VPA no manifiestan diferencias significativas entre las entradas que realizan en el habitáculo donde se encuentra el Familiar con respecto al Extraño 2 (c y d; respectivamente).

7.3.2 Sociabilidad en adultas

7.3.2.1. Fase 1 — Comportamiento locomotor

En esta fase, no hemos observado ninguna diferencia significativa en ninguna de las variables analizadas: Distancia Total Recorrida, Velocidad y Rearing; en ninguno de los grupos experimentales (figuras 7.11a, b y c).

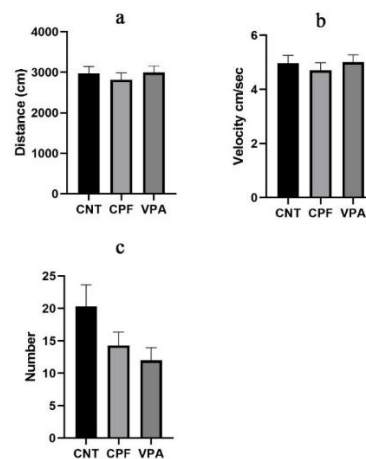


Figura 7.11. Resultados de aspectos locomotores la prueba de 3-habitaciones en adultas – Fase 1 (n = 61; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [10 hembras y 11 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): Ninguno de los grupos presentan diferencias significativas en ninguna de las variables: Distancia Total Recorrida (a), Velocidad (b) y Rearing (c).

7.3.2.2. Fase 2 — Sociabilidad

En el tiempo invertido por los sujetos entre los compartimentos vacío y central, y donde se encuentra el Extraño 1, tenemos que tanto los CNT (estadístico de Friedman, $p < 0.000$; figura 7.12a) como los CPF (estadístico de Friedman, $p < 0.000$; figura 7.12b) muestran que prefieren significativamente pasar más tiempo con el Extraño 1 que en los compartimentos central o vacío. Por el contrario, en los VPA vemos que, aunque ciertamente tienen preferencia por pasar más tiempo en el compartimento del Extraño 1 en relación con el compartimento central, no la muestran con el compartimento vacío. De hecho, solamente existen diferencias entre estar en

alguno de estos dos compartimentos en comparación con el central (estadístico de Friedman, $p < 0.000$; figura 7.12c).

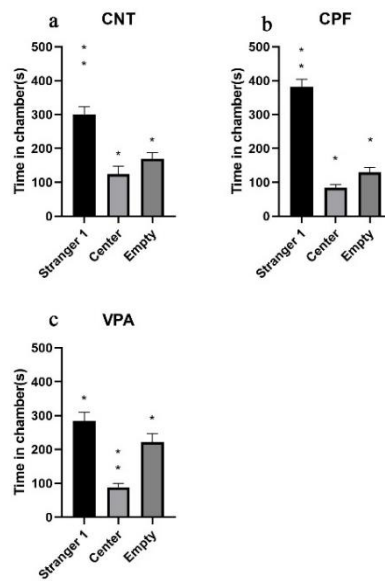


Figura 7.12. Tiempo en cada compartimento en la prueba de 3-habitaciones en adultas – Fase 2 ($n = 61$; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [10 hembras y 11 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): Los CNT y los CPF muestran que pasan más tiempo en el compartimento del Extraño 1 que en los otros dos compartimentos central (a y b, respectivamente). Los VPA, por el contrario, muestran que prefieren estar con el Extraño 1 o en el compartimento vacío, más que en la habitación central (c).

Como en las adolescentes, teniendo en cuenta el dimorfismo sexual que se presenta tanto en los efectos del CPF, como en la incidencia de autismo, hemos analizado el tiempo que pasan en cada compartimento las hembras y los machos de cada grupo (figura 7.13). En cuanto a los CNT, vemos que tanto los machos (estadístico de Friedman, $p = 0.017$; figura 7.13a) como las hembras (estadístico de Friedman, $p = 0.011$; figura 7.13b) prefieren pasar más tiempo significativamente con el Extraño 1 que en el departamento central. En el caso de los CPF, los machos prefieren estar mucho más tiempo con el Extraño 1 que en los otros dos departamentos (estadístico de Friedman, $p < 0.000$; figura 7.13c), mientras que las hembras, además, prefieren también estar significativamente más en el departamento vacío que en el central [$F(1, 079, 9, 707) = 23,50$, $p = 0.000$; figura 7.13d]. En los VPA, vemos que sucede algo distinto que en los anteriores grupos. Los machos prefieren estar o en el compartimento con el Extraño 1 o en

el compartimento vacío más que en el central (estadístico de Friedman, $p = 0.006$; figura 7.13e), mientras que las hembras, además, muestran una preferencia significativa por estar más con el Extraño 1 que en el compartimento vacío [$F(1,424, 12,82) = 30,94, p < 0.001$] (figuras 7.13f).

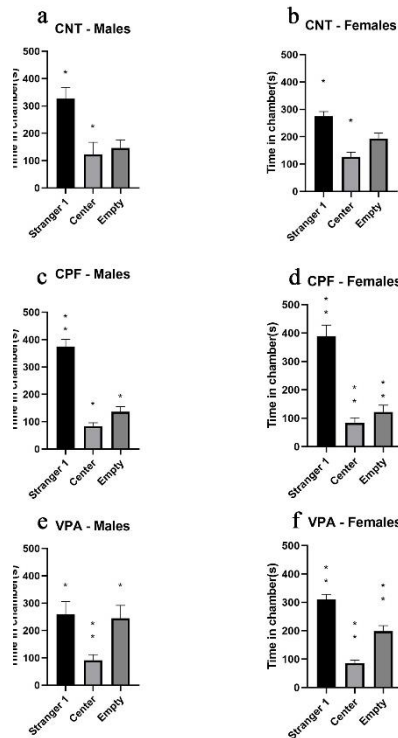


Figura 7.13. Tiempo en cada compartimento según sexo dentro de cada tratamiento en la prueba de 3-habitaciones en adultas – Fase 2 ($n = 61$; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [10 hembras y 11 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): Los CNT machos y hembras, pasan significativamente más tiempo con el Extraño 1 que en el compartimento central (a y b), aunque no en comparación con el vacío. Los CPF machos prefieren pasar significativamente más tiempo en el compartimento del Extraño 1 que en los otros dos compartimentos (c), mientras que, además, las hembras de este grupo, muestran diferencias significativas estando más tiempo en el compartimento vacío que en el central (d). En los VPA, los machos pasan significativamente más tiempo con el Extraño 1 y en el compartimento vacío que en el habitáculo central (e). En las hembras VPA, la preferencia por estar con el Extraño 1 se mantiene, pero, además, como las hembras CPF, esta preferencia es significativa si la comparamos con el tiempo que pasan en el compartimento vacío (f).

De todas formas, para saber si existen diferencias de sociabilidad entre estos distintos grupos de animales, debemos compararlos utilizando el Índice de Sociabilidad, así como también el de Contacto. En dichos índices encontramos que existe una diferencia significativa entre los CPF y los VPA, siendo los primeros más sociales que los segundos, tanto en el SI

(estadístico Kruskal-Wallis, $p = 0.028$; figura 7.14a) como en el SIC (estadístico Kruskal-Wallis, $p = 0.020$; figura 7.14b).

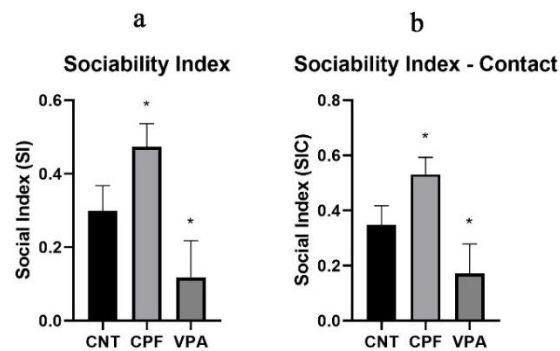


Figura 7.14. Índices de Sociabilidad en la prueba de 3-habitaciones en adultas – Fase 2 ($n = 61$; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [10 hembras y 11 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): Tanto en el Índice de Sociabilidad que tiene en cuenta todo el espacio de los compartimentos, como en el Índice de Sociabilidad de Contacto, los CPF se muestran significativamente más sociales que los VPA (figura a y b).

Lo que podemos observar en la Latencia de la Primera Entrada, es que, aunque existe una fuerte tendencia de los CPF en tardar menos en visitar al Extraño 1 que en el resto de grupos, esta no termina de ser significativa (figura 7.15a). Ya dentro de cada grupo, observamos esa misma tendencia de los CPF, aunque no termina de ser significativa ni siquiera en la propia comparativa entre los dos compartimentos: el del Extraño 1 y el vacío (figura 7.15c). Ni los CNT ni los VPA muestran diferencias significativas en cuanto al tiempo que tardan en visitar uno u otro compartimento (figuras 7.15b y d).

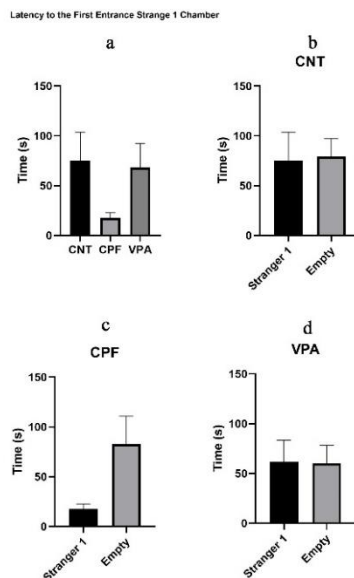


Figura 7.15. Latencia de primera entrada en el compartimento del Extraño 1, así como también en comparativa con la que realizan en el Compartimento del Familiar, en adultas – Fase 2 (n = 61; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [10 hembras y 11 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): Aunque hay una fuerte tendencia a tardar menos en visitar al Extraño 1 por parte de los CPF en comparativa con el resto de tratamientos, no existen diferencias significativas (a). A pesar de que esa tendencia se visualiza también en los análisis comparativos de cada grupo y los dos compartimentos: el del Extraño 1 y el vacío; no existen diferencias significativas en ninguno de los grupos por separado (b, c y d).

En el número de entradas que los sujetos realizan a la zona de contacto del Extraño 1, no observamos diferencias significativas entre los distintos tratamientos (figura 7.16a). Sin embargo, dentro de cada grupo, encontramos que los CNT (T de Student, $p = 0.019$), los CPF (estadístico de Wilcoxon, $p = 0.001$) y los VPA (T de Student, $p = 0.041$) muestran más número de entradas en esta zona en comparación con el número de entradas que realizan en el compartimento vacío (figuras 7.16a, b, c y d).

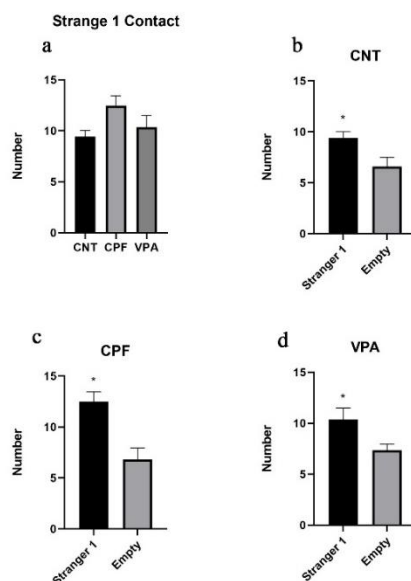


Figura 7.16. Frecuencia de entradas en contacto con el Extraño 1, así como también en comparativa con las del compartimento del Familiar, en adultas – Fase 2 (n = 61; CNT = 20 [10 hembras y 10 machos], CPF = 21 [11 hembras y 10 machos], VPA = 20 [10 hembras y 10 machos]): No se observan diferencias significativas entre tratamientos (a). Sin embargo, todos los grupos realizan más entradas a la zona de contacto del Extraño 1 que en la de donde se encuentra la jaula vacía (b, c y d, respectivamente).

7.3.2.3. Fase 3 — Reacción ante la Novedad Social

Aquí, a diferencia de la fase anterior en el análisis intrínseco de los grupos, tenemos que los CNT no muestran diferencias significativas en el tiempo que pasan con el extraño 2 o con el familiar o incluso el central (figura 7.17a). Sin embargo, tanto los CPF (estadístico de Friedman, $p = 0.000$) como los VPA [$F(1,810, 28,96) = 27,18$; $p < 0.000$], muestran diferencias significativas en cuanto al tiempo que pasan con el Extraño 2 y el resto de compartimentos (figura 7.17b y c).

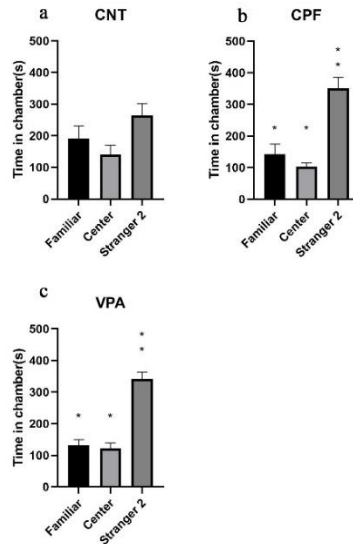


Figura 7.17. Tiempo en cada compartimento en la prueba de 3-habitaciones en adultas – Fase 3 (n = 50; CNT = 15 [9 hembras y 6 machos], CPF = 18 [9 hembras y 9 machos], VPA = 17 [9 hembras y 8 machos]): Los CNT no muestran ninguna preferencia por estar con el nuevo congénere o cualquiera de los dos compartimentos (a). Los CPF y los VPA si evidencian una clara preferencia por estar con el Extraño 2 antes que en alguno de los otros dos compartimentos (b y c).

En relación a los CNT, no podemos realizar una estadística confiable en comparativas sexuales, pues no tenemos un número suficiente de machos que hayan cumplido los requisitos de la fase 3. Así pues, tampoco realizaremos los análisis de los otros grupos, puesto que sería simplemente una información que no podríamos comparar con el grupo uno de los grupos de referencia.

Cuando observamos tanto el SNI como el SNIC, podemos observar que no existen diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (figura 7.18).

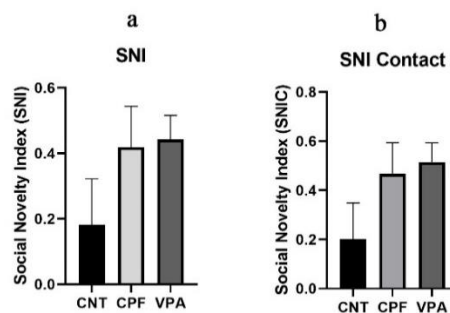


Figura 7.18. Índices de reacción ante la novedad social – Fase 3 (n = 50; CNT = 15 [9 hembras y 6 machos], CPF = 18 [9 hembras y 9 machos], VPA = 17 [9 hembras y 8 machos]): Ningún grupo experimental muestra diferencias significativas, ni en el SNI (a) ni en el SNIC (b).

En las latencias de la primera entrada en contacto con el Extraño 2, entre grupos experimentales no vemos ninguna diferencia significativa. Así como tampoco vemos diferencias significativas dentro de cada uno de los grupos ni en cuánto tardan en ir a visitar a uno u otro congénere (figura 7.19).

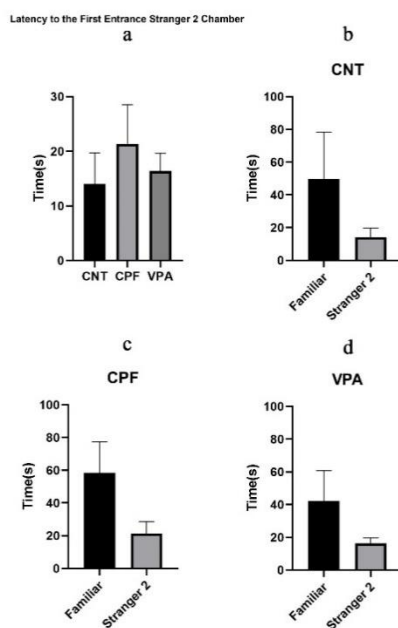


Figura 7.19. Latencia de primera entrada en el compartimento del Extraño 2 en la prueba de 3-habitaciones en adultas – Fase 3 (n = 50; CNT = 15 [9 hembras y 6 machos], CPF = 18 [9 hembras y 9 machos], VPA = 17 [9 hembras y 8 machos]): Entre los distintos grupos, no encontramos diferencias significativas (a). Así como tampoco la encontramos ni en los CNT (b) ni en los CPF (c) ni en los VPA (d).

En cuanto al número de entradas que realizan en la zona de contacto, no encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales (figura 7.20a), así como tampoco intrínsecamente en los CNT (figura 7.20b). No obstante, en los CPF (estadístico de Wilcoxon, $p = 0.009$) y en los VPA (T de Student, $p < 0.000$), sí que encontramos que realizan más entradas en contacto con el Extraño 2 que con el congénere Familiar (figuras 7.20c y d, respectivamente).

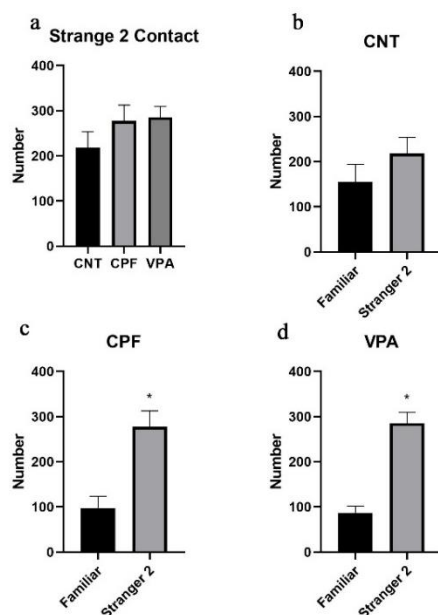


Figura 7.20. Número de entradas en el compartimento del Extraño 2 – Fase 3 n = 50; CNT = 15 [9 hembras y 6 machos], CPF = 18 [9 hembras y 9 machos], VPA = 17 [9 hembras y 8 machos]): No se observan diferencias significativas entre tratamientos (a), así como tampoco en la comparativa intrínseca de los CNT (b). Por el contrario, sí que observamos cómo los CPF y los VPA realizan más entradas en contacto con el Extraño 2 (c y d, respectivamente).

7.3.3. Metabólica

Los cambios metabólicos fueron estudiados de manera separada en adolescentes y adultas centrándose los análisis en las estructuras del hipocampo y el cerebelo.

Como podemos ver, tanto en el hipocampo como en el cerebelo, los niveles de concentración de *N*-acetil-aspartato (NAA) se encuentran aumentados en los sujetos adolescentes y adultos tratados prenatalmente con CPF y VPA en comparación con los CNT (tabla 7.2). Además, si comparamos los niveles de Glx (término que engloba colectivamente al glutamato y la glutamina) en adolescentes, también tenemos que los CPF y los VPA muestran niveles significativamente más altos que los CNT. En referencia al GABA, los datos en adultas también evidencian una similitud entre los CPF y los VPA, siendo los niveles de estos dos grupos más altos en comparación con los CNT.

Treatment						
Group	Teen (a)				Adults (b)	
Comparative	Metab.	ppm	FC ^a	<i>p</i> – value ^b	FC ^a	<i>p</i> – value ^b
CPF/CNT	NAA	2.52	1.20	0.010*	1.33	0.034*
	Glx	2.46	1.17	0.042*	-	-
	GABA	2.30	-	-	1.23	0.043*
	Cho	3.22	-	-	-	-
VPA/CNT	NAA	2.52	1.20	0.0016*	1.61	7.8×10 ⁻⁴ *
	Glx	2.46	1.20	0.025*	1.36	8.4×10 ⁻⁴ *
	GABA	2.30	-	-	1.24	0.025*
	Cho	3.22	-	-	-	-

Tabla 7.2. Resumen de los cambios metabólicos observados en el hipocampo de los sujetos expuestos a CPF y VPA en comparación con los CNT en la adolescencia (a) y la adultez (b).

En el cerebelo, encontramos también que los cambios metabólicos de los grupos CPF y VPA en su comparativa con el control, muestran resultados en la misma línea (tabla 7.3). Por ejemplo, en las adultas de ambos grupos se encuentra un incremento del NAA y de Glx, mientras que en la adolescencia encontramos un detrimento del GABA, algo que en la adultez se modifica en el grupo VPA, el cual pasa a valores positivos. Además, en cuanto al contenido de la colina (Cho), tenemos que, en la adultez, ambos grupos muestran una disminución.

Treatment						
Group	Comparative		Teen (a)		Adults (b)	
	Metab.	ppm	FC ^a	<i>p</i> – value ^b	FC ^a	<i>p</i> – value ^b
CPF/CNT	NAA	2.52	1.27	0.041*	1.54	0.002*
	Glx	2.46	1.25	0.045*	1.64	9.1×10 ⁻⁴ *
	GABA	2.30	-1.34	0.003*	-1.35	0.039*
	Cho	3.22	-1.33	0.042	-1.36	0.048
VPA/CNT	NAA	2.52	-	-	1.37	0.023*
	Glx	2.46	-	-	1.36	0.026*
	GABA	2.30	-1.34	0.017*	1.36	0.026*
	Cho	3.22	-1.45	0.013*	-1.31	0.038*

Tabla 7.3. Resumen de los cambios metabólicos observados en el cerebelo de los sujetos expuestos a CPF y VPA en comparación con los CNT en la adolescencia (a) y la adultez (b).

7.4. Discusión

En este estudio, se ha intentado vislumbrar la posible similitud que pueden mostrar los animales prenatalmente expuestos a CPF usando dosis subclínicas en el cerebro de los fetos (Gu et al., 2020), en una ventana de administración que equivaldría al primer trimestre del desarrollo fetal del ser humano (Ross et al., 2015), momento que, además, es usado frecuentemente en el modelo autista animal de VPA (Bambini-Junior et al., 2014; Chaliha et al., 2020; Mabunga et al., 2015; Schneider & Przewłocki, 2005a). Los datos expuestos en este estudio son muy novedosos, pues, hasta donde nosotros sabemos, no existe en la literatura actual un estudio que compare dos puntos de desarrollo, como son la adolescencia y la adultez, en ratas expuestas a estos dos compuestos con el ánimo de encontrar posibles similitudes.

Atendiendo a la posibilidad de que los efectos del CPF pudieran ser debidos a la inhibición de la AChE, a pesar de la baja dosis, los animales fueron pesados durante su primera etapa de desarrollo, no encontrándose alteración alguna (ver estudio 1). Así también se realizaron dichas medidas con los animales expuestos a VPA, pues también se sabe que su peso puede verse comprometido, aunque, nuevamente, quizás por la baja dosis utilizada, estos animales tampoco presentaron alteraciones al respecto (ver estudio 1). Además de esto, se midió la expresión de la actividad de la AChE en dichos grupos, no encontrándose tampoco diferencias significativas entre ellos (ver estudio 1).

Conductualmente, los resultados obtenidos son amplios, pues el estudio ha sido bastante pormenorizado con respecto a las variables que la prueba de las 3 habitaciones puede ofrecernos.

En adolescentes, en cuanto a las medidas del aspecto locomotor de la fase 1, tenemos que los CPF muestran una menor locomoción que el resto de grupos. Esta diferencia, podría ser entendida como un primer punto en contra de nuestra hipótesis, pues la comorbilidad entre TDAH y TEA es alta (Antshel et al., 2013; Sokolova et al., 2017), esperándose por ello un desempeño locomotor superior. No obstante, el TEA parece poseer una base etiológica muy compleja, con muchos y diferentes factores, por lo que esta comorbilidad no es total. De hecho, con el uso de VPA, aun en dosis más altas que las utilizadas en este estudio, se han obtenido datos que señalan incluso, en algunos casos, hacia una reducción en la locomoción de ratas adolescentes en referencia a un grupo CNT (Olexová et al., 2013). Así pues, es un dato a tener en cuenta, pero muy de seguro exprese un aspecto distinto que tiene que ver más con la baja ansiedad de estos animales (pues ya conocían el aparato de los 10 minutos en el que lo estuvieron explorando el día anterior).

En relación a la sociabilidad mostrada por los sujetos de los distintos grupos (fase 2), cuando observamos el tiempo que invierten en cada compartimento, nos sorprende ver que el

que más tiempo pasa con el Extraño 1 es el VPA, mientras que el CPF es el que se muestra más indiferente entre estar en uno y otro compartimento. Los CNT, por su parte muestran su clara preferencia, aun no mostrando una diferencia significativa con el compartimento vacío. Sin embargo, aunque estos datos son interesantes, la realidad es que, cuando comparamos entre sí los tres grupos en el cálculo de los índices, no vemos diferencias significativas entre ellos (a pesar de la tendencia a pasar menos tiempo con el Extraño 1 de los CPF). Por lo tanto, no podemos decir que los comportamientos vistos en esta fase sean anormales o estén alterados. De hecho, en otra investigación en la que utilizaron una dosis de VPA idéntica a la nuestra, los animales tampoco mostraron diferencias significativas en esta fase (Bambini-Junior et al., 2014), pero es que, además, esto es algo que ha pasado incluso con dosis más altas (Štefánik et al., 2015). Por lo que, en un principio, el VPA estaría comportándose dentro de lo visto en otros estudios. Así pues, en nuestro afán comparativo, que el CPF muestre este tipo de comportamiento, también estaría dentro de las expectativas expuestas con nuestra hipótesis. Además, esto se ve apoyado también por experimentos como el de Pérez-Fernández et al. (2020), en el que, usando una modificación de este mismo paradigma, encontró también que, durante la fase de sociabilidad, no se encontraron diferencias significativas entre los expuestos perinatalmente a CPF con los sujetos CNT. Aprovechando este punto sobre las diferencias sexuales, podemos ver cómo, intrínsecamente, los que se muestran más dispares son los CNT, mientras que los CPF y los VPA, independientemente del sexo, se encuentran más cercanos en sus comportamientos mostrados, en tanto al tiempo que pasan en cada uno de los compartimentos. Este dato podría acercar más a ambos grupos entre sí, mientras que los alejaría de lo visto por los CNT. Aunque, al mismo tiempo, entraría en discusión la teoría que apunta a la sobremasculinización en ciertos aspectos de los sujetos con TEA (McCarthy & Wright, 2017). Pues lo que vemos aquí es que, si bien es cierto que la diferencia conductual es más acusada

en los CNT que en los CPF y los VPA, estos últimos muestran en esta fase, en cambio, un comportamiento más similar al de las hembras CNT.

En cuanto al tiempo que tardan en entrar en la zona de contacto donde se encuentra el Extraño 1, los CNT tardan menos tiempo significativamente en acercarse a la ubicación de este, que el que tardan en explorar la jaula que está vacía. Los CPF y los VPA se muestran de nuevo en este aspecto más similares, pues no presentan diferencias intrínsecas. Esto podría deberse a que, tanto los CPF como los VPA, no encontrasen tan atractivo, en primera instancia, el ir al compartimento de su congénere. No obstante, aunque este dato es interesante, no podemos ir más allá, pues realmente no existen diferencias significativas entre los distintos grupos. Además, a diferencia de la latencia, en el número de entradas que realizan a cada compartimento, las similitudes intrínsecas se establecen entre los CNT y los VPA, pues realizan más entradas en el compartimento del Extraño 1 que los CPF. Aunque de nuevo, no existen diferencias significativas entre los grupos experimentales, cosa que provoca que buscar algún tipo de sustrato teórico a lo que está sucediendo no se vería soportado por los datos.

Ya en la fase 3, referente a la reacción ante la novedad social, sí vemos de forma más evidente que los CPF y los VPA se muestran más similares entre sí que con los CNT. De hecho, a través del comportamiento del control positivo VPA, el cual no muestra una preferencia clara en el tiempo que está en cada compartimento entre el Extraño 2 y el Familiar, tenemos que el CPF prácticamente lo imita, evidenciando una falta de preferencia ante la novedad social. Este dato, además, se ve sustentado por la diferencia que encontramos en los índices de sociabilidad. Concretamente en el que comprende el perímetro del habitáculo completo (SNI), donde los CPF muestran una diferencia significativa evidente en comparación con el grupo CNT pero no con el VPA, el cual parece situarse muy cerca del CPF. Este dato, con los VPA, se ve reforzado por otras investigación en la que se usó una dosis idéntica en las cuales, la diferencia entre los VPA y los CNT, se vio justamente en esta fase de la prueba (Bambini-Junior et al., 2014). Si

bien es cierto que, en cuanto al CPF, investigaciones como la de Venerosi et al. (2008) o la de Perez-Fernandez, et al. (2020) similares a la nuestra, no encontraron dichas diferencias en esta fase es también probable que se deba a que ninguna de ellas fueron dosis prenatales. No obstante, el dato obtenido en nuestro estudio es bastante importante, pues muestra claramente cómo los CPF y los VPA se comportan de manera casi idéntica ante la reacción a la novedad social, aspecto preponderante en el comportamiento propio de los sujetos que sufren del TEA.

Siguiendo con el paradigma de las 3 habitaciones, pero ahora en adultas, observamos un cuadro totalmente distinto. En la fase 1, han desaparecido totalmente las diferencias que presentaban los CPF con los otros dos grupos; algo que puede ser debido directamente al paso del tiempo, pues se sabe que las ratas adolescentes son de por sí más activas (Spear, 2000).

En cuanto a la fase social, lo que vemos es que tanto las CNT como las CPF guardan similitud intrínseca entre ellas, mientras que las VPA no muestran una preferencia clara por estar con el Extraño 1 en contraposición con el compartimento vacío. De hecho, este dato se ve fortalecido por los índices de sociabilidad, tanto en el SI como en el SIC (mostrando este último una estabilidad en el dato), pues en ellos se evidencia que la diferencia está entre los propios CPF y los VPA, quedando esta vez los CNT como grupo intermedio. La razón de este cambio podría deberse a que el daño sistémico que provoca el VPA es más severo y se mantiene más en el tiempo en comparación con el que provoca el CPF. No olvidemos que el VPA es un modelo aceptado por la comunidad científica como autista, mientras que el CPF, aunque contemplado también, es más más criticado en este aspecto (Williams & Desesso, 2014a). No obstante, volveremos sobre este punto más adelante.

Como bien se sabe y hemos hecho alusión más arriba, según la literatura, parece haber un efecto dimórfico sexual, tanto en la exposición a CPF (Burke et al., 2017) como en la incidencia de autismo (McCarthy & Wright, 2017). No obstante, lo que aquí vemos es que ambos tienden a comportarse de la misma manera. Esto podría deberse a que, quizás, la

administración de CPF en una ventana temprana del desarrollo fetal, no es un periodo tan sensible sensitivo como para que se produzcan estas diferencias referentes al sexo (Gu et al., 2020). En el caso de los VPA, quizás, en principio más llamativo por la más que evidente superior incidencia del TEA en niños que en niñas, es que ambos se comportan de manera muy parecida, aunque esto podría estar justificado porque con el uso del VPA, esta incidencia parece ser de 1:1 (Baio, 2014; Rasalam et al., 2005). No obstante, tampoco obviamos que existen estudios de sociabilidad como el Kazlauskas et al. (2019) en el que sí muestran diferencias, aunque también apuntamos que la dosis que utilizan ellos es bastante más alta que la nuestra (600 mg/kg).

En la fase de reacción a la novedad social, vemos, en el tiempo que cada grupo invierte en estar con el Familiar o el Extraño 2, que los CPF y los VPA se parecen más entre sí, mostrando una clara preferencia por el nuevo congénere, algo que, sorpresivamente no sucede con el CNT, del cual se espera que esté más tiempo con el nuevo integrante (Crawley, 2004; S. S. Moy et al., 2004). El problema de esto, es que nuestros datos, en primera instancia, arrojan una incógnita extraña, pues son los VPA y los CPF los que se muestran más sociales en esta fase, algo que, como acabamos de comentar, contradeciría lo esperable en el modelo TEA. No obstante, tenemos que tener en cuenta un factor, y es que se ha visto como, animales expuestos prenatalmente a VPA, con enriquecimiento ambiental y que se han criado junto a otros que no están relacionados con el cuadro del TEA, mejoran su comportamiento, incluso provocando cambios positivos a nivel estructural del cerebro (Campolongo et al., 2018; Schneider et al., 2006b; Yamaguchi et al., 2017). Así pues, este hecho de la crianza, podría significar que, si el CPF es una versión muy lábil de ciertos aspectos autistas, es de esperar que muestre una recuperación más fácilmente y palpable que los VPA. Y vuelvo a remarcar lo de ciertos aspectos autistas, pues tenemos que existe una posible recuperación en la fase social, solamente en los CPF, mientras que en la reacción ante la novedad social sería de ambos. En resumen, los CPF

encontrarían una mejoría algo más genérica, pues los cambios que provocaría este compuesto son más débiles, mientras que los VPA, en algunos aspectos, encontrarían más dificultades a la hora de recuperar ciertas funciones y establecerlas en niveles normales, y de ahí que solo se evidencia mejoría en el SNI. El resultado de los controles, los cuales no muestran lo esperable de ellos, podrían representar la otra cara de la moneda y es que, por estar criados con sujetos CPF y VPA, vieran de algún modo modificada también la forma de comportarse con otros congéneres. Sin embargo, para aseverar esto, haría falta más investigación al respecto.

En los análisis de metabolómica, lo que encontramos está también en la línea general que vemos en las pruebas conductuales y esto es que, los CPF y los VPA, se parecen más entre ellos en su comparación con los controles. En concreto, vemos que la expresión de N-acetil-aspartato (NAA) se encuentra aumentada en adolescencia y adultez, tanto en el hipocampo como en el cerebelo. Ciertamente, en la literatura, suelen encontrarse ejemplos de lo contrario, un descenso de la expresión metabólica del NAA de forma generalizada en el cerebro de pacientes autistas (Corrigan et al., 2013; Friedman et al., 2003; Fujii et al., 2010; Gabis et al., 2008; Kleinhans et al., 2007), algo que ha sido relacionado con una alteración en la densidad, plasticidad y función neuronal (Aoki et al., 2012). No obstante, las contradicciones contrariedades en este campo son difíciles de explicar, pues en el autismo tenemos un espectro que podría estar sustentando distintas causas, además de que los estudios han sido realizados con metodologías distintas y en sujetos de diferentes edades (Kleinhans et al., 2007).

Por otro lado, además, tenemos un aumento del Glx, nuevamente en el cerebelo en adolescentes expuestos a CPF y VPA en comparación con los CNT, mientras que en el hipocampo, este aumento en los CPF, solamente se ve en adolescentes, estando en los VPA aumentado en ambos periodos. Este hecho podría significar una sobreexcitación de estas dos estructuras, ya que el glutamato, junto con el GABA (el cual en este caso se encuentra disminuido en la adolescencia pero aumentado en la adultez de los VPA), son los principales

neurotransmisores de regulación excitación/inhibición de los procesos electrofisiológicos del cerebro. De hecho, el incremento de Glx se ha podido ver en pacientes epilépticos (Helms et al., 2006), y no podemos olvidar que los eventos abruptos excitatorios son también característicos de los sujetos que padecen del TEA (Canitano, 2007). En esta misma línea, estudios como el de Bejjani (2012) encontraron un incremento del Glx en niños autistas. Lo que podría estar relacionado con la alteración en la sociabilidad vista en ambos grupos CPF y VPA, así como su semejanza en comparación con el CNT, pues, por ejemplo, se ha visto cómo la interrelación entre el hipocampo y la amígdala es básica para la regulación de las emociones (Phelps, 2004). De hecho, perspectivas que apuntan hacia una mayor importancia del hipocampo en las regulación de las respuestas emocionales ya ha sido planteada (Moscovitch et al., 2016), y es más, incluso se ha relacionado el volumen del propio hipocampo con las respuestas empáticas (Stern et al., 2019). Sin embargo, habría que tomar resultados como estos con mucha precaución, pues otras investigaciones han evidenciado un descenso de la presencia de Glx (Tebartz Van Elst et al., 2014). Y así, nuevamente nos enfrentamos al hecho de que el TEA depende de una gran diversidad de factores y, muy probablemente, debido a esta gran variabilidad, encontremos este tipo de incongruencias. En relación con el cerebelo y su alta expresión metabólica de Glx, tenemos que como en el caso anterior, también podría suponer un dato en favor de la alteración del equilibrio electrofisiológico del cerebro. Además, la afectación de esta estructura en pacientes con autismo es muy relevante y ha sido señalada como una de las que presenta anormalidades más consistentes en los pacientes con TEA (Yu et al., 2011). Es más, en concreto, se ha comprobado cómo la exposición prenatal a VPA reproduce las anormalidades cerebelosas relacionadas con el autismo (Ingram et al., 2000), tales como la reducción del número de células de Purkinje en la vermis, algo que también ha sido observado (Sandhya et al., 2012), de manera más general en cuanto a la estructura, en ratas

adultas expuestas prenatalmente a CPF (Abou-Donia et al., 2006b). Así pues, tenemos investigaciones que apuntan también a similitudes de orden estructural.

Como hemos mencionado anteriormente, el GABA es un neurotransmisor de vital importancia en la homeostasis del cerebro. En nuestro caso, tanto en las expuestas a CPF como a VPA, hemos encontrado que este neurotransmisor se encuentra aumentado en el hipocampo de las ratas adultas. Asimismo, en el cerebelo de los sujetos adolescentes, también pertenecientes a ambos tratamientos, hallamos una reducción. Algo que cambia en estos grupos en la adultez, pues en el cerebelo de las VPA encontramos un aumento del GABA en comparación con los CNT, mientras que, por el contrario, en los CPF, este se encuentra disminuido. En principio, esto podría deberse a irregularidades en la propia estructura y configuración de las neuronas GABAérgicas, las cuales, al parecer, en cuadros autistas, no pasan a ser neuronas inhibitoras en su desarrollo madurativo (Cellot et al., 2016; Cellot & Cherubini, 2014; Pizzarelli & Cherubini, 2011). Algo que podría estar sucediendo en las VPA (Hou et al., 2018), como modelo autista aceptado, y no en las CPF, el cual podría provocar solamente ciertos cambios semejantes en algunos aspectos similares al los visto en el TEA. En cualquier caso, suceda esto o no en mayor o menor medida, podríamos suponer que, ya que los niveles de Glx se encuentran alterados, se encuentren también afectados los niveles de GABA, pues es uno de los neurotransmisores encargados de reducir la excitabilidad provocada por la actividad glutamatérgica. A lo que podríamos sumar también que, quizás, ese cambio de concentración en el GABA de las adolescentes a las adultas en los VPA, dependa también del tamaño de la dosis administrada de VPA, siendo más probable que se produzcan daños más graves y estables con dosis más altas. No obstante, en cuanto al comportamiento de las neuronas GABAérgicas y su relación con la cantidad de VPA administrada, la planteo solamente como una posibilidad, pues no he encontrado referencias que puedan apoyarla.

Aunando todos estos datos, los del Glx y los del GABA, tanto en el hipocampo como en el cerebelo, podríamos estar ante una alteración del ciclo de reciclaje y producción de las concentraciones de Glx y GABA, algo que, de nuevo, nos conduciría a un probable desequilibrio de los procesos inhibitorios/excitatorios del cerebro. Tanto podría ser esto así, que alteraciones en este ciclo han sido relacionadas con los sujetos que sufre de TEA (Ben-Ari, 2018; Cellot & Cherubini, 2014; Pizzarelli & Cherubini, 2011).

En cuanto a la colina, la cual muestra una disminución en su concentración en CPF y VPA, en adolescente y adultos, en comparación con los CNT en el cerebelo, tenemos que, las alteraciones en las concentraciones de este aminoácido, ya han sido remarcadas como un factor que posiblemente esté relacionado con deficiencias en el comportamiento social de las personas con TEA (L. Wang et al., 2015). Y más concretamente, en cuanto a la sociabilidad y el cerebelo, como hemos apuntado más arriba, parece haber un consenso más creciente que pone énfasis en el papel de esta estructura en la regulación de los estados emocionales (Adamaszek et al., 2017). En expuestos prenatalmente a VPA, por ejemplo, ha podido observarse cómo los niveles de colina se encuentran reducidos en la población adolescente (siendo los resultados de la población adulta inconclusos) (Ford & Crewther, 2016). Esta reducción puede ser un tanto controvertida, pues en realidad hay numerosas publicaciones científicas que, incluso estudiando unas y otras las mismas estructuras, han encontrado gran variabilidad en los niveles de este neurotransmisor en relación con el autismo (Li et al., 2017). No obstante, viendo el comportamiento del GABA y la posible relación entre sus mecanismos moleculares (Perez-Fernandez, Morales-Navas, Guardia-Escote, et al., 2020b), el comportamiento similar de ambos podría ser algo a tener en cuenta, y más aun sabiendo que la colina tiene implicación en ciertos mecanismos como los de plasticidad, cognición, memoria, etc., siendo todos estos campos alterados en el TEA, y habiéndose probado que la desregularización de la colina y sus receptores es común en los cerebros de estas personas (Kim et al., 2014).

7.5. Conclusiones

A la luz de todo lo comentado, parece ser que, efectivamente, los animales expuestos prenatalmente a dosis subclínica de CPF en el día 12.5-15.5, muestran ciertos aspectos similares a los vistos en animales expuestos a VPA. Más concretamente, una alteración en el comportamiento de reacción ante la novedad social, que se mueve desde una merma en la adolescencia, que está incluso más alterada que la de los VPA, hasta una recuperación de la misma en la adultez, probablemente por cuestiones de crianza conjunta con congéneres CNT y enriquecimiento ambiental.

Por otro lado, vemos cómo en relación a la sociabilidad, los VPA, el modelo de control positivo, muestra un comportamiento social disminuido en la edad adulta en comparación con los CPF, algo que podríamos interpretar como una estabilidad dentro de este modelo aceptado autista, y que, estaría sujeto a una dificultad mayor a ser recuperado por el mero hecho de una crianza y posterior vida compartida con otros congéneres que no presentasen el mismo trastorno. No siendo así en la utilización de CPF, el cual, al no ser un modelo autista aceptado, pero sí quizás presentar ciertos aspectos, encontraría una recuperación más palpable.

Además, esta relación vista entre ambos grupos experimentales, no es algo solo soportado por los datos conductuales referentes a su sociabilidad desplegada, sino también por factores metabólicos de neurotransmisores muy ligados a estados de humor y sociabilidad, en los cuales hemos podido ver que, prácticamente en todos ellos, el CPF se muestra mucho más parejo con el VPA que con el CNT.

Así pues, con todo lo expuesto, y sabiendo que más investigación es necesaria, el CPF es un compuesto que debería tenerse muy en cuenta como factor de riesgo en el desarrollo, ya

sea como agravante o como elicitador, de ciertas disfunciones relacionadas con la etiología del TEA.

8. Discusión General

8.1. Objetivo de la presente tesis

El objetivo principal de esta tesis era saber, teniendo en cuenta la complejidad y en parte desconocida etiología que parece sustentar el TEA, si la exposición prenatal a un plaguicida organofosforado (OPs) durante el periodo fetal podría desembocar en el desarrollo de aspectos comportamentales propios del autismo. La razón de haber escogido los OPs, es que existen datos que apuntan a que la exposición prenatal a estos plaguicidas produce alteraciones de orden de desarrollo cognitivo y comportamental, tanto en poblaciones cerca de emplazamientos agrícolas como urbanas (Rauh et al., 2012). De entre los OPs, el clorpirifós (CPF) es quizás el más popular, siendo uno de los más utilizados en el mundo a pesar de que la EPA, en 2001, prohibió su uso residencial (Saunders et al., 2012). Además, existen datos que apuntan a que la exposición prenatal a CPF podría estar relacionado con retrasos en el desarrollo y autismo (Shelton et al., 2014), así como otras investigaciones realizadas en modelos animales que han obtenido resultados destacables en esta misma dirección (De Felice et al., 2016; Lan et al., 2017, 2019b). No obstante, también podemos encontrar artículos como el de Williams y Desesso (2014) quienes, observando los datos existentes en la bibliografía científica, apuntan a que esta relación entre la exposición prenatal a CPF y el desarrollo del autismo no parece suceder. Con esto en mente, parecen incluso más importantes los estudios expuestos en esta tesis, pues en ellos se han comparado los efectos de la exposición prenatal a CPF con un grupo control (CNT) expuesto solamente al vehículo (DMSO) y otro grupo control positivo de ácido valproico (VPA), el cual representa un modelo aceptado de autismo (Mabunga et al., 2015; Nicolini & Fahnestock, 2018; Weinstein-Fudim et al., 2019).

Además, intentando entender mejor si las alteraciones de la exposición prenatal a CPF son propias de cierta parte del ciclo vital o se producen de manera estable en el tiempo, hemos realizado pruebas y análisis en distintas partes del desarrollo de las camadas obtenidas, para poder tener un cuadro más completo de lo que pudiera estar sucediendo por la exposición a este compuesto.

En cuanto a los resultados obtenidos, de forma general, parecen apuntar a que, efectivamente, existe una similitud comportamental del grupo expuesto prenatalmente a CPF y ciertos aspectos propios del TEA, validada esta por la comparativa realizada con el modelo VPA.

Hasta el día de hoy, no conocemos de ningún otro estudio que haya realizado esta comparativa, ni con ambos compuestos: CPF y VPA; ni con las dosis utilizadas ni con la misma ventana de administración, así como tampoco con las pruebas llevadas a cabo ni que estas hubieran sido realizadas en los mismos periodos del desarrollo de los sujetos. Por lo tanto, este estudio ofrece una información valiosa que puede poner una piedra más en el muro que debemos construir, para poder entender las causas por las que ocurre este trastorno, el cual, según estudios epidemiológicos, tiene una prevalencia entorno al 1%, aunque se estima superior en países desarrollados (Lai et al., 2014; Lord et al., 2020).

8.2 Ultravocalizaciones y el perfil de un modelo autista en comparación con el CPF

Las ultravocalizaciones (UVs) han demostrado ser una herramienta muy útil para estudiar el comportamiento y el estado de los roedores, especialmente los muy pequeños, pues es su principal vía de comunicación. Con ellas, podemos averiguar, debido a sus características, producción y frecuencias, los distintos estados emocionales en los que se encuentran, así como

también las intenciones de su comportamiento (Wöhr et al., 2008). Por ello, el registro de estas UVs ha sido una técnica muy utilizada en la evaluación de los aspectos comunicativos de ratas pertenecientes a modelos autistas, las cuales han arrojado datos consistentes en su comparativa con sujetos CNT (Berg et al., 2018; Gandal et al., 2010; Moldrich et al., 2013; Scattoni et al., 2008). Por ello, en nuestro caso, que las crías tratadas prenatalmente con CPF muestren un perfil parecido a los VPA en el número de producción de llamadas (siendo esta, quizás, una de las características más importantes a la hora de evaluar a los animales en esta prueba), es muestra más que suficiente para que, como mínimo, pensemos que algo puede estar ocurriendo. Pero es que, además, en comunión con los sujetos expuestos a VPA, los CPF también tardan más que los CNT en la emisión de esa primera llamada, que los animales pequeños e indefensos emiten cuando se encuentran en un ambiente estresante.

Las consecuencias de esto son importantes, pues no nos estamos refiriendo a algo adquirido por la convivencia entre ellas, sino que debe de existir algún tipo de alteración fisiológica en estos organismos expuestos que provoque la existencia de una tendencia a mostrarse ansiosas, pues la naturaleza de las llamadas de 22-kHz es propia de ambientes estresantes (Jelen et al., 2003). Estos cambios, además, deben producirse a nivel subcortical, pues como decimos, estamos hablando de comportamientos reflejos, los cuales muy probablemente están relacionados con desajustes del sistema GABAérgico, ya que es uno de los principales cuando hablamos de la regulación de la ansiedad (Kalueff & Nutt, 2007). Algo que tendría muchísima relevancia, pues es uno de los principales sistemas señalados cuando se habla de la etiología del autismo (Ben-Ari, 2018; Cellot & Cherubini, 2014; Pizzarelli & Cherubini, 2011).

En este punto, me gustaría puntualizar que, ateniéndonos a la supuesta equivalencia que deberíamos resaltar entre el llanto y las ultravocalizaciones de las ratas pequeñas, no se me escapa tampoco la posibilidad de que esta investigación se haya quedado corta al respecto.

Puesto que las madres de niños autistas han reportado que, cuando estos empiezan a llorar, su llanto, aparte de ser distinto y más molesto que el usual, es sostenido por muchísimo tiempo, tanto, que admiten cierta impotencia a la hora de hacerlos callar (Olsson et al., 2013; Sheinkopf et al., 2012). Así pues, a pesar de que nosotros hemos investigado las frecuencias y no hemos encontrado diferencias significativas como sí se ha visto en otros estudios (Felix-Ortiz & Febo, 2012c), hubiera sido interesante, o más informativo, una modificación de este paradigma y ver si, efectivamente, una vez que empiezan a emitir ultravocalizaciones y situamos a la madre dentro de la caja insonorizada, las CPF y las VPA, al cabo del tiempo, superan incluso en número de UVs a las CNT, en aras de averiguar cuántos datos puede darnos este paradigma sobre la fenomenología comportamental en animales que parecen evidenciar un trastorno autista.

8.3. La locomoción como aspecto evaluador de un modelo autista

En relación a la locomoción y el TEA, tenemos que muchos estudios, resaltando la comorbilidad existente entre dicho trastorno y el TDAH, han investigado este aspecto, llegando en numerosas ocasiones a encontrar comportamientos propiamente hiperactivos en ratas expuestas prenatalmente a VPA (C. S. Choi et al., 2014). Así pues, lo que esperábamos en un principio era encontrar que las CPF y las VPA expresasen más actividad locomotora que las CNT en el paradigma de campo abierto. No obstante, en nuestro estudio, esto no ha sucedido. Es cierto que hemos hallado diferencias significativas en la actividad horizontal y el tiempo en los márgenes de las ratas adolescentes expuestas a CPF en contraposición a las CNT, y que esto podría relacionarse con un menor nivel de ansiedad y sin embargo una mayor actividad locomotora cuando se explora un nuevo ambiente (Ricceri et al., 2006; Simon et al., 1994) por

parte de las CPF, sin embargo, la diferencia principal que esperábamos entre los CPF y los VPA con el CNT no sucede.

Algo que hasta cierto punto sí podría resultar interesante, y más en línea con nuestra hipótesis, es que tanto las hembras VPA como las CPF mostraron diferencias significativas con el grupo CNT de machos, diferencias que podrían estar sustentadas por la teoría de la sobremasculinización que algunos autores destacan como parte de la etiología del autismo (Knickmeyer et al., 2008; Lai et al., 2013; McCarthy & Wright, 2017), algo que se vería reforzado por el efecto dimórfico sexual que también parece tener el CPF (Perez-Fernandez, Morales-Navas, Aguilera-Sáez, et al., 2020; Raines et al., 2001; A. Venerosi et al., 2012). Sin embargo, teniendo en cuenta estudios como el de Gu et al., (2020), el cual parece apuntar a que esta diferencia podría estar al menos discutida cuando la exposición es prenatal, así como que la ratio de incidencia de autismo en el VPA es de 1:1 (Baio, 2014; Rasalam et al., 2005), hace que apuntar en esta dirección deba ser algo cauteloso, además de ser necesaria más investigación al respecto.

Por otro lado, en orden de poder conocer si existía algún tipo de alteración en la coordinación motora de estos animales, debido a la capacidad de ambas sustancias de causar teratogenia, pudimos comprobar que, en nuestro caso, aun siendo visible que los VPA presentaban pequeñas deformaciones en el rabo (la cual es común y una de las más visibles), los sujetos realizaron la prueba del paso de viga perfectamente, la cual ha sido validada por otras investigaciones (Abou-Donia et al., 2006a; Carter et al., 2001; Luong et al., 2011; Pritchett & Mulder, 2003). Tampoco los CPF mostraron ninguna dificultad, por lo que podríamos descartar en primera instancia algún problema de coordinación motora.

Teniendo en cuenta la comorbilidad mencionada, ¿es probable que nuestros resultados sean causa de que hemos utilizado las dosis bajas en ambos compuestos? Es una posibilidad, pero también tenemos que tener en cuenta que la comorbilidad entre el TDAH y el TEA, aun

siendo alta, no es completa. Por tanto, podemos llegar a asumir que, aunque la actividad locomotora puede darnos información interesante, en principio no sería definitorio a la hora de buscar una similitud entre ambos grupos y menos cuando lo que se postula es una afectación leve en ciertos aspectos propios del TEA.

Otra cosa totalmente distinta, es evaluar la locomoción como indicador de posibles alteraciones de circuitos cerebrales, cuando los sujetos son sometidos a un desafío de drogas, pues lo que se testea es la integridad de dicha circuitería. En nuestro caso, en el sistema nervioso central (SNC), no hemos encontrado causas que apunten a problemas de los receptores muscarínicos, o al menos en parte, pues en el sistema nervioso periférico (SNP), usando la metilescopolamina, sí que hemos encontrado diferencias. Esto podría significar que hace falta una dosis más alta de la variante hidrobromida para ver los posibles efectos, pues quizás parte de esta sustancia también se distribuyó por el SNP, haciendo que parte de su efecto se diluyera. No obstante, como bien decimos en el estudio, podría ser simplemente un dato aislado.

En cuanto a la integridad del sistema serotoninérgico, la ketanserina, nos ha dado algo más relevante, y es que parece ser que, a cuanta más dosis, los VPA se muestran menos activos, algo que parece afectar más a las hembras que a los machos. La discusión de este dato es complicada una vez descartada, como hemos hecho en el estudio nº2, los ciclos menstruales, al no ser que el comportamiento intrínseco de estos se vean a su vez alterados por la administración de VPA, que, aunque existiendo algo de información al respecto en humanos (Jones, 1991), no he encontrado datos concretos en administraciones prenatales que puedan asegurarlo.

Por lo tanto, en este estudio, no hemos podido afianzar de manera aislada que la similitud existe entre los CPF y los VPA.

8.4. Deficiencias sociales, y el enriquecimiento ambiental y social como tratamiento

En el último estudio de esta tesis, nos hemos referido a uno de los aspectos más relevantes por los que se define el TEA: la disfunción en la interrelación social. Como primer acercamiento a los datos, curiosamente, tenemos que los CPF adolescentes se muestran menos activos que ningún otro grupo en la fase 1 de la prueba, la cual está destinada a la evaluación del comportamiento motor. Este resultado es contrario a lo visto en el campo abierto del estudio 2, aunque también hay que decir que la naturaleza de estos datos es distinta. Pues en esta fase, ya que los animales habían estado explorando el aparato el día anterior por 10 minutos, no estamos evaluando, a diferencia de en el campo abierto, la actividad locomotora espontánea. Así pues, debido a esta diferencia, la razón de este comportamiento que en primera instancia parecería contrario podría ser la misma, estando determinada de nuevo (como en el estudio nº2) por la reducción de los niveles de ansiedad que el CPF puede provocar en ratas adolescentes cuando han recibido dosis prenatales subclínicas (Carr et al., 2017; Ricceri et al., 2006). Me explico, la característica propia de la actividad horizontal vista en el estudio nº2, está relacionada con un comportamiento exploratorio en un ambiente nuevo (Spear, 2000), por lo que se espera que el animal esté menos tiempo realizando este tipo de comportamiento, además de pasar más tiempo deambulando pegado a los márgenes (tigmotaxis). Sin embargo, esto no fue lo que sucedió en el estudio nº2, donde los CPF pasaron significativamente menos tiempo que los CNT moviéndose en los márgenes del aparato, además de estar mostrando significativamente más actividad horizontal. De todo esto, lo que podemos inferir es que estos animales habían demostrado poseer unos bajos niveles de ansiedad cuando exploran un entorno novedoso, mientras que, en un entorno conocido, como el del paradigma de las 3-habitaciones, por el que habían estado deambulando el día anterior por 10 minutos, estos animales expuestos prenatalmente a CPF, no sienten la necesidad de explorarlo más, de nuevo mostrando un bajo

nivel de ansiedad. De hecho, su conducta de otear, aun no siendo significativamente distinta a la de los CNT, si es bastante menor que esta. Además de que su velocidad de movimiento es también significativamente menor que la del resto de grupos.

Ya en la fase social (fase 2), hemos visto como la tendencia de los CPF era la de ser los menos sociables, algo que termina confirmándose por la falta de interacción con el nuevo congénere (extraño 2) en la reacción ante la novedad social (fase 3). Sumado a esto y en línea con nuestra hipótesis, tenemos que los VPA se muestran prácticamente igual que los CPF. Así pues, tenemos que, en la adolescencia, los CPF y los VPA se parecen realmente los unos a los otros en este aspecto, mientras que ambos distan mucho del comportamiento de los CNT. Algo que también se ve reforzado por ser, las VPA y las CPF, las únicas que no muestran una diferencia significativa en la presteza con la que acuden al encuentro del extraño 1 en la fase 2; como indicándonos que no se sienten tan interesadas por el congénere como las CNT. Factor que puede corroborarse por el ya mencionado índice de reacción ante la novedad social (SNI), donde el tiempo invertido por las CPF o las VPA se reparte casi a partes iguales entre estar con el congénere ya conocido (familiar) o con el extraño 2; mostrándonos pues que estos grupos no parecen tener un interés especial por interactuar con “la novedad social”. Algo contrario a lo que debería esperarse de un comportamiento normal y más aún en ratas adolescentes, periodo en el que, como en los humanos, parece que encuentran un pico alto de exploración e interacciones con nuevos congéneres (Spear, 2000). Así pues, todo esto parece indicar que nuestra hipótesis se cumple, pues esta falta de interés forma parte de lo esperable en modelos autistas evaluados en este aparato durante esta fase (Crawley, 2004).

Aunque estos datos son interesantes, sobre todo desde la perspectiva de la que partimos en esta tesis, vemos que, en la adultez, los CPF parecen evidenciar una recuperación en su interés por la interacción social, ya que, tanto en la fase de sociabilidad como en la fase de reacción ante la novedad social, interactúan más con los congéneres de la forma esperable por

un grupo CNT. Sin embargo, los VPA, no muestran esta mejoría generalizada, pues en la fase social interactúan significativamente menos que los CPF con el extraño 1. A la vista de este efecto que distancia a los CPF de los VPA, tenemos por otro lado que, al igual que las CPF en la adolescencia, en esta fase, la de la reacción ante la novedad social, las VPA también muestran una recuperación por el interés de interactuar con el nuevo congénere. Sin poder dilucidar muy bien por qué puede suceder esto en este único ámbito, lo que sí podemos suponer es que quizás sus déficits son más estructurales (y estables en el tiempo), muy probablemente debido al efecto más potente que se produce por la exposición prenatal a VPA (el cual es un modelo aceptado de autismo) en comparación con el CPF. Esto nos trae a colación la recuperación o aminoración de las deficiencias vistas en sociabilidad en modelos autistas por enriquecimiento ambiental y social, la cual ha podido verse en otros estudios (Campolongo et al., 2018; Yamaguchi et al., 2017). Empero, en el otro lado de la moneda, tenemos que el comportamiento de los CNT, los cuales se comportan de manera esperable por un modelo autista. Como dijimos en las conclusiones del estudio, bien podría deberse a un efecto bidireccional, siendo las ratas CNT afectadas también por la crianza con ratas que evidencia rasgos propios del TEA.

Si bien la sociabilidad nos ha dado datos valiosos que apoyan nuestra hipótesis, lo cierto es que la metabolómica también ha corroborado en parte lo visto en el comportamiento de estas ratas, pues la expresión metabólica de Glx (glutamato y glutamina), GABA, NAA (N-acetylaspartate) y Cho (colina), siguen el mismo cuadro, siendo más parecidas entre sí las CPF y las VPA en la adolescencia en la expresión de estos metabolitos que en la adultez, periodo este último en el que sí encontramos diferencias en la expresión del GABA, el cual está aumentado en el cerebelo de los VPA adultos. Refiriéndonos primero a las similitudes encontradas, tenemos que los valores de Glx estaban aumentados de forma generalizada en el cerebelo y el hipocampo de los CPF y los VPA en contraposición a los CNT, algo que podría significar que existen desajustes en el balance excitatorio/inhibitorio (E/I) electrofisiológico.

De hecho, los bloqueadores de glutamato se han sugerido como posible tratamiento en aras de aminorar los déficits mostrados por personas autistas (Markram & Markram, 2010). En cuanto a la alteración en las concentraciones de GABA, apunta en la misma dirección, cosa que parece completamente normal, pues si pensamos que el GABA es el principal inhibidor de la actividad glutamatérgica y vemos que las concentraciones de este se encuentran alteradas, lo esperable es que también se encuentren las de GABA, indicando pues una perturbación en los ciclos de reciclaje y producción de estos neurotransmisores, algo que nos conduciría de nuevo a la posible existencia de un desequilibrio E/I. Esta alteración en los ciclos de glutamato/GABA-glutamina ha sido relacionada con fenotipos de comportamiento propios del TEA (Ben-Ari, 2018; Cellot & Cherubini, 2014; Pizzarelli & Cherubini, 2011). No obstante, la naturaleza del comportamiento excitatorio o inhibitorio de las neuronas GABAérgicas, es algo también a tener en cuenta, pues estudios como el de Tyzio et al., (2014) indican que estas no realizan el cambio de excitatorio a inhibitorio propio de su maduración (Leonzino et al., 2016), por lo que se explicarían en parte las alteraciones electrofisiológicas que se producen en el cerebro de personas autista (Cellot et al., 2016; Fueta et al., 2018b) y su comorbilidad con la epilepsia (Canitano, 2007).

En relación a las concentraciones de NAA, como hemos mencionado en la discusión del estudio nº3, hemos encontrado un aumento, mientras que en la literatura actual suele indicarse lo contrario (Ford & Crewther, 2016). Lamentablemente esto podría deberse a distintas causas, entre las que estarían metodologías distintas y las diferentes edades de los sujetos (Kleinhans et al., 2007). Diferente es en la colina, en la cual hemos encontrado una disminución generalizada. Hecho que ha sido señalado como posible factor de importancia en las alteraciones del comportamiento social de personas autistas (L. Wang et al., 2015).

Lo sorprendente de este estudio, es que nos hemos encontrado que, tanto las adolescentes CPF como las VPA, mostraron un comportamiento más propio del cuadro clínico

autista, mientras que en la adultez evidenciaron cierta recuperación, siendo esta más acusada en los CPF que en los VPA (algo que en las CPF también pudimos ver en relación al comportamiento locomotor en adolescentes en comparación con las adultas). Teniendo en cuenta que hay investigaciones como las ya mencionadas más arriba, que apuntan a que los sujetos que reciben enriquecimiento ambiental y social revierten parte de las alteraciones conductuales propias del TEA, y que por ellas se producen hasta modificaciones estructurales del cerebro, podríamos aventurar que los resultados obtenidos, efectivamente, parecen ir en esta misma dirección. Siendo los CPF, que son el grupo que más recuperación muestra (después de haberse mostrado incluso menos sociales que los VPA durante la adolescencia) el que probablemente se vea más beneficiado de este enriquecimiento. Fenómeno esperable, pues el VPA, como modelo aceptado autista, mostraría más dificultades en verse beneficiado en el mismo grado, ya que el compuesto causa daños más severos y estables que el CPF. Así pues, el CPF, aun no provocando autismo, podría ser sin embargo un factor muy importante como variable interviniente en los casos en que los sujetos pertenecen al fenotipo autista-amplio (Antonio M. Persico & Merelli, 2014), siendo estos aquellos que no cumplen con los criterios de diagnóstico, pero que sí muestran algunos síntomas; así como también podría ser contemplado el CPF como elemento externo agravante del TEA. En esta última línea, tenemos investigaciones como la de De Felice et al., (2016), en la que la exposición prenatal a CPF de un modelo animal autista (BTBR) provocó que aumentasen aún más los niveles de estrés oxidativo, algo que se ha visto en pacientes que padecen TEA (Pangrazzi et al., 2020).

9. Final conclusions

- The CPF and VPA animals show an alteration in the emission of ultrasonic vocalizations, emitting a much smaller number than the CNT animals, as well as taking longer to make the first call; both, aspects related to the deficiencies of social interaction typical of the autistic clinical features. This shows that prenatal subclinical doses of CPF can lead to behaviors similar to those expected in an ASD in neonatal rats.
- Adolescent animals exposed to subclinical prenatal doses of CPF, in the open field paradigm, showed more horizontal activity than CNT when they were in a novel environment, in addition to a shorter time on the margins than the latter. This means that there is an anxiolytic effect from gestational exposure to this compound. On the other hand, those exposed prenatally to VPA did not show significant differences with any of the groups except for the females, which, like the CPF females, in contrast to the CNT males, showed more horizontal activity. Despite this, the data obtained did not indicate the existence of an important similarity in the locomotor aspect between the CPF and the VPA, as we had expected in our hypothesis, taking into account the existing comorbidity between ASD and TDAH.
- Adult animals exposed prenatally to subclinical doses of CPF and VPA did not show similarities between them or significant differences with CNT in spontaneous locomotor activity in the open field paradigm. Therefore, at this point, our similarity hypothesis was not fulfilled either.
- Adult rats exposed prenatally to subclinical doses of CPF and VPA did not obtain similar or differentiated results with the CNT group in the drug challenge carried out in the open field paradigm, when scopolamine hydrobromide, a cholinergic antagonist, was administered intraperitoneally. However, the intraperitoneal administration of methyl

scopolamine, which exerts its action as a cholinergic antagonist in the peripheral nervous system, showed us a decrease in vertical activity by CPF compared to CNT, which could indicate an anxiolytic effect. On the other hand, the intraperitoneal administration of ketanserin, an antagonist of the serotonergic 5-HT₂ receptors, only influenced the locomotor behavior of the VPA rats, being that, increasing the dose, the subjects showed less locomotor activity, where the VPA females were the most affected, which could mean that there is some type of selective alteration of these receptors or that this compound interacts by altering the behavior derived from the different menstrual cycles. However, based on our hypothesis, we cannot say that CPF and VPA have equivalent results in either spontaneous locomotor activity or locomotor disturbances when evaluated in the open field paradigm during a drug challenge.

- Alterations in motor coordination are also part of the symptoms that people with ASD present. Thus, the subjects were evaluated using the beam walk test, a proven test that assesses this ability. In it, neither the rats exposed prenatally to CPF nor to VPA showed deficiencies, obtaining data very similar to those of the CNT group. Therefore, contrary to what we expected, neither the CPF nor the VPA were different from the CNT.
- During adolescence, CPF rats showed less locomotor activity in phase 1 than the rest of the groups: VPA and CNT; which showed low anxiety (as had already been seen in previous studies). In phase 2, which evaluated sociability, there were no significant differences between the experimental groups. In phase 3, in which the reaction to the social novelty was evaluated, the CPF were the ones that were least interested in the new congener (stranger 2), even scoring negatively in the calculation of the index, this difference being significant with the CNT group. For their part, the VPA, although not showing a significant difference with the CNT, was almost identical to that of the CPF, thus showing a strong

trend towards disinterest in this new subject. At this point, then, we see that there is a similarity between the CPF and the VPA of patients suffering from ASD.

- In adults, in the 3-chambered paradigm, during the first phase with which we evaluated locomotor activity, no relevant differences were obtained between the experimental groups. In phase 2, the one that evaluated sociability, the CPF, unlike the adolescent subjects exposed to this same substance, was the one that was more sociable, with a significant difference compared to the VPA group, which was the one that showed the least sociability. In phase 3, it happened that those who showed a strong tendency of low reaction to social novelty were the CNT, while the CPF and the VPA obtained almost identical results between them. Therefore, at this point, we see that adult CPF animals show a recovery of sociability compared to adolescents. While the VPA, even having recovered their interest in reacting to the social novelty, however, were not sociable in phase 2. The explanation for this change could be that both groups grew up in enriched environments, something that may reduce certain deficits typical of autistic clinical features. The fact that CNT showed a deterioration in the face of social novelty could mean that there is some alteration in their behavior patterns when they are raised with groups that present alterations in their social behavior.
- The metabolomic data of tissues belonging to the cerebellum and the hippocampus suggest that both the expression of Glx and the alteration of the expression of GABA seem to point to a dysfunction in the recycling and production cycles of these neurotransmitters, which would cause an excitatory/inhibitory imbalance of the electrophysiological behavior of the brain. Furthermore, the decrease in Cho seen in both groups compared to CNT is also an important factor within the alterations in social behavior seen in autistic people. In reference to the NAA, increased levels were found. Thus, we see that both the CPF and the VPA, have similar values between them compared to the CNT, in the expression of various

metabolites that have a special connection with the inhibitory/excitatory cycles of the central nervous system, being, this type of alterations, one of those raised as central in the etiological explanation of autism.

-

- As a final conclusion, we can say, in view of the studies carried out in this thesis, that prenatal exposure to subclinical doses of CPF, although not positioned as an autistic model, does express certain behaviors that do belong to the clinical features of the TEA, validated by their similarity with the data obtained in the group exposed prenatally to VPA. Therefore, we could venture that perhaps prenatal exposure to subclinical doses of CPF could cause deficiencies similar to those seen in individuals who show an autistic-broad phenotype, thus being more susceptible to experiencing the recovery of certain deficits shown thanks to the environmental and social enrichment; or, on the other hand, aggravate said deficiencies in subjects who for other reasons (be they genetic or environmental exposure) are diagnosed as autistic.

9. Conclusiones finales

- Los animales CPF y VPA evidencian una alteración en la emisión de ultravocalizaciones emitiendo un número mucho menor que los animales CNT, así como también tardan más tiempo en realizar la primera llamada; ambos, aspectos relacionados con las deficiencias de interacción social propias del cuadro clínico autista. Esto muestra que dosis subclínicas prenatales de CPF pueden dar lugar a conductas similares a las esperables en un TEA en ratas neonatas.
- Los animales adolescentes expuestos a dosis prenatales subclínicas de CPF, en el paradigma de campo abierto, mostraron más actividad horizontal que los CNT cuando se encontraron en un ambiente novedoso, además de un menor tiempo en los márgenes que estos últimos. Lo que significa que existe un efecto ansiolítico por la exposición gestacional a este compuesto. Por su parte, los expuestos prenatalmente a VPA, no mostraron diferencias significativas con ninguno de los grupos a excepción de las hembras, las cuales, a semejanza de las hembras CPF, en contraposición a los machos CNT, mostraron más actividad horizontal. A pesar de ello, los datos obtenidos no nos indicaron la existencia de una similitud importante en el aspecto locomotor entre los CPF y los VPA, como habíamos esperado en nuestra hipótesis, teniendo en cuenta la comorbilidad existente entre el TEA y el TDAH.
- Los animales adultos expuestos prenatalmente a dosis subclínicas de CPF y a VPA, no mostraron similitudes entre ellos ni diferencias significativas con los CNT en la actividad locomotora espontánea en el paradigma de campo abierto. Por tanto, en este punto, tampoco se cumplió nuestra hipótesis de semejanza.

- Las ratas adultas expuestas prenatalmente a dosis subclínicas de CPF y a VPA, no obtuvieron resultados similares ni diferenciados con el grupo CNT en el desafío de drogas llevado a cabo en el paradigma de campo abierto, cuando se les administró intraperitonealmente escopolamina hidrobromida, un antagonista colinérgico. Sin embargo, la administración intraperitoneal de metilescopolamina, la cual ejerce su acción como antagonista colinérgico en el sistema nervioso periférico, nos mostró una disminución en la actividad vertical por parte de los CPF en comparación con los CNT, lo que podría indicar un efecto ansiolítico de esta. Por otro lado, la administración intraperitoneal de ketanserina, un antagonista de los receptores serotoninérgicos 5-HT₂, solo influyó en el comportamiento locomotor de las ratas VPA, siendo que, aumentando la dosis, los sujetos mostraban menos actividad locomotora, donde las hembras VPA fueron las más afectadas, lo que podría significar que existe algún tipo de alteración selectiva de estos receptores o que este compuesto interactúe alterando el comportamiento derivado de los distintos ciclos menstruales. No obstante, basándonos en nuestra hipótesis, no podemos decir que los CPF y los VPA tengan resultados equivalentes ni en la actividad locomotora espontánea ni en alteraciones locomotoras cuando son evaluadas en el paradigma de campo abierto durante un desafío de drogas.
- Las alteraciones en la coordinación motora son también parte de los síntomas que presentan las personas que padecen TEA. Así pues, a los sujetos se les evaluó utilizando el test de paso de viga, una prueba contrastada que evalúa dicha capacidad. En ella, ni las ratas expuestas prenatalmente a CPF ni a VPA mostraron deficiencias, obteniendo unos datos muy parecidos a los del grupo CNT. Por tanto, en contra de lo que esperábamos, ni los CPF ni los VPA fueron distintos a los CNT.
- Durante la adolescencia, las ratas CPF mostraron menos actividad locomotora en la fase 1 que el resto de grupos: VPA y CNT; lo que evidenciaba una baja ansiedad (tal como

se había visto ya en los estudios previos). En la fase 2, la cual evaluaba la sociabilidad, no hubo diferencias significativas entre los grupos experimentales. En la fase 3, en la cual se evaluó la reacción ante la novedad social, los CPF fueron los que se mostraron menos interesados por el nuevo congénere (extraño 2), incluso puntuando de manera negativa en el cálculo del índice, siendo esta diferencia significativa con el grupo CNT. Por su parte, los VPA, aun no evidenciando una diferencia significativa con el grupo CNT, fue casi idéntica a la de los CPF, mostrando así una fuerte tendencia en dirección al desinterés por este nuevo sujeto. En este punto, vemos pues, que existe similitud entre los CPF y los VPA propia de los pacientes que sufre del TEA.

- En adultas, en el paradigma de las 3-habitaciones, durante la primera fase con la que evaluamos la actividad locomotora, no se obtuvieron diferencias relevantes entre los grupos experimentales. En la fase 2, la que evaluaba sociabilidad, los CPF, a diferencia de los sujetos adolescentes expuestos a esta misma sustancia, fue el que se mostró más sociable, siendo su diferencia significativa comparada con el grupo VPA, el cual fue el que mostró menos sociabilidad. En la fase 3, ocurrió que los que evidenciaron una fuerte tendencia de baja reacción ante la novedad social fueron los CNT, mientras que los CPF y los VPA obtuvieron resultados casi idénticos entre ellos. Por tanto, en este punto, vemos que los animales adultos CPF muestran una recuperación de la sociabilidad en comparación con los adolescentes. Mientras que los VPA, aun habiendo recuperado su interés por la reacción ante la novedad social, sin embargo, no se mostraron sociables en la fase 2. La explicación de este cambio podría estar en que ambos grupos se criaron en ambientes enriquecidos, algo que puede aminorar ciertos déficits propios del cuadro clínico autista. El hecho de que los CNT muestren un empeoramiento ante la novedad social, podría significar que existe cierta alteración en

sus patrones de comportamiento cuando son criados con grupos que presentan alteraciones en su comportamiento social.

- Los datos metabolómicos de tejidos pertenecientes al cerebelo y al hipocampo, apuntan a que tanto la expresión de Glx, como la alteración de la expresión del GABA, parecen apuntar a una disfunción en los ciclos de reciclaje y producción de estos neurotransmisores, lo cual provocaría un desequilibrio excitatorio/inhibitorio del comportamiento electrofisiológico del cerebro. Además, la disminución de Cho vista en ambos grupos en comparación con los CNT, es también un factor importante dentro de las alteraciones del comportamiento social visto en personas autistas. En referencia al NAA, se encontraron los niveles aumentados. Así pues, vemos que tanto los CPF como los VPA, poseen valores similares entre ellos en comparación con los CNT, en la expresión de diversos metabolitos que tienen una conexión especial con los ciclos inhibitorios/excitatorios del sistema nervioso central, siendo, este tipo de alteraciones, una de las enarboladas como centrales en la explicación etiológica del autismo.

Como conclusión final, podemos decir, a la vista de los estudios llevados a cabo en esta tesis, que la exposición prenatal a dosis subclínicas de CPF, si bien no se posicionan como un modelo autista, expresan ciertos comportamientos que sí que pertenecen al cuadro clínico del TEA, validados estos por su similitud con los datos obtenidos en el grupo expuesto prenatalmente a VPA. Por tanto, podríamos aventurar que quizás, la exposición prenatal a dosis subclínicas de CPF, podría provocar deficiencias semejantes a aquellas vistas en individuos que muestran un fenotipo autista-amplio, siendo por ello estos más susceptibles a experimentar la recuperación de ciertos déficits mostrados gracias al enriquecimiento ambiental y social; o, por otro lado, agravar dichas deficiencias en sujetos que por otras cuestiones (ya sean estas de orden genético o de exposición ambiental) se diagnostican como autistas.

Referencias

- Abou-Donia, M. B. (2003). Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. In *Archives of Environmental Health* (Vol. 58, Issue 8, pp. 484–497).
<https://doi.org/10.3200/AEOH.58.8.484-497>
- Abou-Donia, M. B., Khan, W. A., Dechkovskaia, A. M., Goldstein, L. B., Bullman, S. L., & Abdel-Rahman, A. (2006a). In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Archives of Toxicology*, *80*(9), 620–631.
<https://doi.org/10.1007/s00204-006-0077-1>
- Abou-Donia, M. B., Khan, W. A., Dechkovskaia, A. M., Goldstein, L. B., Bullman, S. L., & Abdel-Rahman, A. (2006b). In utero exposure to nicotine and chlorpyrifos alone, and in combination produces persistent sensorimotor deficits and Purkinje neuron loss in the cerebellum of adult offspring rats. *Archives of Toxicology*, *80*(9), 620–631.
<https://doi.org/10.1007/s00204-006-0077-1>
- Adamaszek, M., D'Agata, F., Ferrucci, R., Habas, C., Keulen, S., Kirkby, K. C., Leggio, M., Mariën, P., Molinari, M., Moulton, E., Orsi, L., Van Overwalle, F., Papadelis, C., Priori, A., Sacchetti, B., Schutter, D. J., Styliadis, C., & Verhoeven, J. (2017). Consensus Paper: Cerebellum and Emotion. In *Cerebellum* (Vol. 16, Issue 2, pp. 552–576). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s12311-016-0815-8>
- Adolphs, R. (2009). The social brain: Neural basis of social knowledge. In *Annual Review of Psychology* (Vol. 60, pp. 693–716).
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.60.110707.163514>
- Al-Amin, M. M., Rahman, M. M., Khan, F. R., Zaman, F., & Mahmud Reza, H. (2015). Astaxanthin improves behavioral disorder and oxidative stress in prenatal valproic acid-

induced mice model of autism. *Behavioural Brain Research*, 286, 112–121.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.041>

Al Sagheer, T., Haida, O., Balbous, A., Francheteau, M., Matas, E., Fernagut, P. O., & Jaber, M. (2018). Motor impairments correlate with social deficits and restricted neuronal loss in an environmental model of autism. *International Journal of*

Neuropsychopharmacology, 21(9), 871–882. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyy043>

Aldridge, J. E., Levin, E. D., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2005). Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood, involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression. *Environmental*

Health Perspectives, 113(5), 527–531. <https://doi.org/10.1289/ehp.7867>

Aldridge, J. E., Meyer, A., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2005a). 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>

Aldridge, J. E., Meyer, A., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2005b). 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>

Aldridge, J. E., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2004). Developmental exposure to chlorpyrifos elicits sex-selective alterations of serotonergic synaptic function in adulthood: critical periods and regional selectivity for effects on the serotonin transporter, receptor subtypes, and cell signaling. *Environmental Health Perspectives*, 112(2), 148–155. <https://doi.org/10.1289/ehp.6713>

American Psychiatric Association. (2013). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. In *Arlington*. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596.744053>

- Anderson, G. M., Horne, W. C., Chatterjee, D., & Cohen, D. J. (1990). The Hyperserotonemia of Autism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 600(1), 331–340. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1990.tb16893.x>
- Antshel, K. M., Zhang-James, Y., & Faraone, S. V. (2013). The comorbidity of ADHD and autism spectrum disorder. In *Expert Review of Neurotherapeutics* (Vol. 13, Issue 10, pp. 1117–1128). <https://doi.org/10.1586/14737175.2013.840417>
- Aoki, Y., Abe, O., Yahata, N., Kuwabara, H., Natsubori, T., Iwashiro, N., Takano, Y., Inoue, H., Kawakubo, Y., Gono, W., Sasaki, H., Murakami, M., Katsura, M., Nippashi, Y., Takao, H., Kunimatsu, A., Matsuzaki, H., Tsuchiya, K. J., Kato, N., ... Yamasue, H. (2012). Absence of age-related prefrontal NAA change in adults with autism spectrum disorders. *Translational Psychiatry*, 2. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.108>
- Arteaga, O., Álvarez, A., Revuelta, M., Santaolalla, F., Urtasun, A., & Hilario, E. (2017). Role of antioxidants in neonatal hypoxic–ischemic brain injury: New therapeutic approaches. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18020265>
- Atwood, D., & Paisley-Jones, C. (2017). Pesticides Industry Sales and Usage. *United States Environmental Protection Agency, November, 24*. https://www.epa.gov/sites/production/files/2017-01/documents/pesticides-industry-sales-usage-2016_0.pdf
- Bagchi, D., Bhattacharya, G., & Stohs, S. J. (1996). In vitro and in vivo induction of heat shock (stress) protein (Hsp) gene expression by selected pesticides. In *Toxicology* (Vol. 112). ELSEVIER.
- Baio, J. (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries* (Washington, D.C. :

2002), 63(2), 1–21.

- Balali-Mood, M., & Abdollahi, M. (2014). Basic and clinical toxicology of organophosphorus compounds. In *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*. Springer-Verlag London Ltd. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-5625-3>
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Della Flora Nunes, G., Mueller de Melo, G., Michels, M., Fontes-Dutra, M., Nogueira Freire, V., Riesgo, R., & Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neuroscience Letters*, 583, 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>
- Banerjee, A., Engineer, C. T., Sauls, B. L., Morales, A. A., Kilgard, M. P., & Ploski, J. E. (2014). Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00387>
- Barnard, J., Harvey, V., Potter, D., & Prior, A. (2001). Ignored or ineligible? The reality for adults with autism spectrum disorders. *The National Autistic Society*, 1–31.
- Bates, N., & Campbell, A. (2008). Organophosphate Insecticides. In *Handbook of Poisoning in Dogs and Cats* (pp. 199–204). Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470699010.ch50>
- Bejjani, A., O'Neill, J., Kim, J. A., Frew, A. J., Yee, V. W., Ly, R., Kitchen, C., Salamon, N., McCracken, J. T., Toga, A. W., Alger, J. R., & Levitt, J. G. (2012). Elevated glutamatergic compounds in pregenual anterior cingulate in pediatric autism spectrum disorder demonstrated by ¹H MRS and ¹H MRSI. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038786>
- Ben-Ari, Y. (2018). Oxytocin and vasopressin, and the GABA developmental shift during labor and birth: Friends or foes? In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00254>

- Berg, E. L., Copping, N. A., Rivera, J. K., Pride, M. C., Careaga, M., Bauman, M. D., Berman, R. F., Lein, P. J., Harony-Nicolas, H., Buxbaum, J. D., Ellegood, J., Lerch, J. P., Wöhr, M., & Silverman, J. L. (2018). Developmental social communication deficits in the Shank3 rat model of phelan-mcdermid syndrome and autism spectrum disorder. *Autism Research, 11*(4), 587–601. <https://doi.org/10.1002/aur.1925>
- Bernier, R., Golzio, C., Xiong, B., Stessman, H. A., Coe, B. P., Penn, O., Witherspoon, K., Gerds, J., Baker, C., Vulto-Van Silfhout, A. T., Schuurs-Hoeijmakers, J. H., Fichera, M., Bosco, P., Buono, S., Alberti, A., Failla, P., Peeters, H., Steyaert, J., Vissers, L. E. L. M., ... Eichler, E. E. (2014). Disruptive CHD8 mutations define a subtype of autism early in development. *Cell, 158*(2), 263–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.017>
- Betancourt, A. M., Burgess, S. C., & Carr, R. L. (2006). Effect of developmental exposure to chlorpyrifos on the expression of neurotrophin growth factors and cell-specific markers in neonatal rat brain. *Toxicological Sciences, 92*(2), 500–506. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl004>
- Bjørklund, G., Saad, K., Chirumbolo, S., Kern, J., Geier, D., Geier, M., & Urbina, M. (2016). Immune dysfunction and neuroinflammation in autism spectrum disorder. *Acta Neurobiologiae Experimentalis, 76*(4), 257–268. <https://doi.org/10.21307/ane-2017-025>
- Blazevic, S., Merkler, M., Persic, D., & Hranilovic, D. (2017). Chronic postnatal monoamine oxidase inhibition affects affiliative behavior in rat pupso. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 153*, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.12.008>
- Boulanger-Bertolus, J., Rincón-Cortés, M., Sullivan, R. M., & Mouly, A. M. (2017). Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. *Scientific Reports, 7*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13518-6>

- Braquenier, J. B., Quertemont, E., Tirelli, E., & Plumier, J. C. (2010). Anxiety in adult female mice following perinatal exposure to chlorpyrifos. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(2), 234–239. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2009.08.008>
- Breslin, W. J., Liberackj, A. B., Dittenber, D. A., & Quast, J. F. (1996). Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos in the rat. *Fundamental and Applied Toxicology*, 29(1), 119–130. <https://doi.org/10.1006/faat.1996.0013>
- Bromley, R. L., Mawer, G., Clayton-Smith, J., & Baker, G. A. (2008). Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. *Neurology*, 71(23), 1923–1924. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000339399.64213.1a>
- Bronzuoli, M. R., Facchinetti, R., Ingrassia, D., Sarvadio, M., Schiavi, S., Steardo, L., Verkhatsky, A., Trezza, V., & Scuderi, C. (2018). Neuroglia in the autistic brain: evidence from a preclinical model. *Molecular Autism*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13229-018-0254-0>
- Burke, R. D., Todd, S. W., Lumsden, E., Mullins, R. J., Mamczarz, J., Fawcett, W. P., Gullapalli, R. P., Randall, W. R., Pereira, E. F. R., & Albuquerque, E. X. (2017). Developmental neurotoxicity of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos: from clinical findings to preclinical models and potential mechanisms. *Journal of Neurochemistry*, 142, 162–177. <https://doi.org/10.1111/jnc.14077>
- Bymaster, F. P., & Felder, C. C. (2002). Role of the cholinergic muscarinic system in bipolar disorder and related mechanism of action of antipsychotic agents. *Molecular Psychiatry*, 7, S57–S63. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001019>
- Caldwell, H. K. (2017). Oxytocin and Vasopressin: Powerful Regulators of Social Behavior. In *Neuroscientist* (Vol. 23, Issue 5, pp. 517–528). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1073858417708284>
- Californians for Pesticide Reform. (2017). *Chlorpyrifos Why California needs to phase out*

this brain- harming pesticide to protect children ' s health.

<http://www.pesticidereform.org/wp->

[content/uploads/2017/08/201708CPRChlorpyrifosFactsheet.pdf](http://www.pesticidereform.org/wp-content/uploads/2017/08/201708CPRChlorpyrifosFactsheet.pdf)

Camarata, M., Wistar, G., & Rosenberg, M. (2006). *Guidance for Evaluating Residual Pesticides on Lands Formerly Used for Agricultural Production Oregon Department of Environmental Quality Cleanup Program*. 23.

Campolongo, M., Kazlauskas, N., Falasco, G., Urrutia, L., Salgueiro, N., Höcht, C., & Depino, A. M. (2018). Sociability deficits after prenatal exposure to valproic acid are rescued by early social enrichment. *Molecular Autism*, 9(1).

<https://doi.org/10.1186/s13229-018-0221-9>

Canitano, R. (2007). Epilepsy in autism spectrum disorders. *European Child and Adolescent Psychiatry*, 16(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s00787-006-0563-2>

Carey, J. L., Dunn, C., & Gaspari, R. J. (2013). Central respiratory failure during acute organophosphate poisoning. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 189(2), 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2013.07.022>

Carr, R. L., Armstrong, N. H., Buchanan, A. T., Eells, J. B., Mohammed, A. N., Ross, M. K., & Nail, C. A. (2017). Decreased anxiety in juvenile rats following exposure to low levels of chlorpyrifos during development. *NeuroToxicology*, 59, 183–190.

<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.11.016>

Carter, R. J., Morton, J., & Dunnett, S. B. (2001). Motor Coordination and Balance in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 15(1), 8.12.1-8.12.14.

<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0812s15>

Cauda, F., Geda, E., Sacco, K., D'Agata, F., Duca, S., Geminiani, G., & Keller, R. (2011). Grey matter abnormality in autism spectrum disorder: An activation likelihood estimation meta-analysis study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*,

82(12), 1304–1313. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.239111>

Cellot, G., & Cherubini, E. (2014). GABAergic signaling as therapeutic target for autism spectrum disorders. In *Frontiers in Pediatrics* (Vol. 2, Issue JUL). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fped.2014.00070>

Cellot, G., Maggi, L., Di Castro, M. A., Catalano, M., Migliore, R., Migliore, M., Scattoni, M. L., Calamandrei, G., & Cherubini, E. (2016). Premature changes in neuronal excitability account for hippocampal network impairment and autistic-like behavior in neonatal BTBR T+tf/J mice. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep31696>

Cezar, L. C., Kirsten, T. B., da Fonseca, C. C. N., de Lima, A. P. N., Bernardi, M. M., & Felicio, L. F. (2018). Zinc as a therapy in a rat model of autism prenatally induced by valproic acid. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 84(October 2017), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.02.008>

Chaliha, D., Albrecht, M., Vaccarezza, M., Takechi, R., Lam, V., Al-Salami, H., & Mamo, J. (2020). A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. In *Developmental Neuroscience* (Vol. 42, Issue 1, pp. 12–48). S. Karger AG.

<https://doi.org/10.1159/000509109>

Chambers, J. E., Ma, T., Scott Boone, J., & Chambers, H. W. (1994). Role of detoxication pathways in acute toxicity levels of phosphorothionate insecticides in the rat. *Life Sciences*, 54(18), 1357–1364. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00515-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00515-X)

Cheaha, D., & Kumarnsit, E. (2015). Alteration of spontaneous spectral powers and coherences of local field potential in prenatal valproic acid mouse model of autism. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 75(4), 351–363.

Chen, X. P., Chen, W. Z., Wang, F. S., & Liu, J. X. (2012). Selective cognitive impairments are related to selective hippocampus and prefrontal cortex deficits after prenatal chlorpyrifos exposure. *Brain Research*, 1474, 19–28.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.036>

Cho, H., Kim, C. H., Knight, E. Q., Oh, H. W., Park, B., Kim, D. G., & Park, H. J. (2017). Changes in brain metabolic connectivity underlie autistic-like social deficits in a rat model of autism spectrum disorder. *Scientific Reports*, 7(1).

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-13642-3>

Choi, C. S., Gonzales, E. L., Kim, K. C., Yang, S. M., Kim, J. W., Mabunga, D. F., Cheong, J. H., Han, S. H., Bahn, G. H., & Shin, C. Y. (2016). The transgenerational inheritance of autism-like phenotypes in mice exposed to valproic acid during pregnancy. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep36250>

Choi, C. S., Hong, M., Kim, K. C., Kim, J. W., Yang, S. M., Seung, H., Ko, M. J., Choi, D. H., You, J. S., Shin, C. Y., & Bahn, G. H. (2014). Effects of atomoxetine on hyperlocomotive activity of the prenatally valproate-exposed rat offspring. *Biomolecules and Therapeutics*, 22(5), 406–413. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.027>

Choi, J., Lee, S., Won, J., Jin, Y., Hong, Y., Hur, T. Y., Kim, J. H., Lee, S. R., & Hong, Y. (2018). Pathophysiological and neurobehavioral characteristics of a propionic acid-mediated autism-like rat model. *PLoS ONE*, 13(2).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192925>

Coffey, K. R., Marx, R. G., & Neumaier, J. F. (2019). DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations.

Neuropsychopharmacology, 44(5), 859–868. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0303-6>

Cohen, O. S., Varlinskaya, E. I., Wilson, C. A., Glatt, S. J., & Mooney, S. M. (2013). Acute prenatal exposure to a moderate dose of valproic acid increases social behavior and alters gene expression in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(8), 740–750. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.09.002>

Corrigan, N. M., Shaw, D. W. W., Estes, A. M., Richards, T. L., Munson, J., Friedman, S. D.,

- Dawson, G., Artru, A. A., & Dager, S. R. (2013). Atypical developmental patterns of brain chemistry in children with autism spectrum disorder. *JAMA Psychiatry*, *70*(9), 964–974. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.1388>
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, *366*(1–2), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.10.008>
- Crans, R. A. J., Wouters, E., Valle-León, M., Taura, J., Massari, C. M., Fernández-Dueñas, V., Stove, C. P., & Ciruela, F. (2020). Striatal Dopamine D2-Muscarinic Acetylcholine M1 Receptor–Receptor Interaction in a Model of Movement Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00194>
- Crawley, J. N. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. In *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* (Vol. 10, Issue 4, pp. 248–258). <https://doi.org/10.1002/mrdd.20039>
- Crumpton, T. L., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2000a). Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? *Developmental Brain Research*, *121*(2), 189–195. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(00\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(00)00045-6)
- Crumpton, T. L., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2000b). Is oxidative stress involved in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos? *Developmental Brain Research*, *121*(2), 189–195. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(00\)00045-6](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(00)00045-6)
- Cunha, A. F., Felipe, I. S. A., Ferreira-Junior, N. C., Resstel, L. B. M., Guimarães, D. A. M., Bejamini, V., Paton, J. F. R., & Sampaio, K. N. (2018). Neuroreflex control of cardiovascular function is impaired after acute poisoning with chlorpyrifos, an organophosphorus insecticide: Possible short and long term clinical implications. *Toxicology*, *398–399*, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.02.005>
- Cusmano, D. M., & Mong, J. A. (2014). In Utero Exposure to Valproic Acid Changes Sleep in Juvenile Rats: A Model for Sleep Disturbances in Autism. *Sleep*, *37*(9), 1489–1499.

<https://doi.org/10.5665/sleep.3998>

Dai, Y. C., Zhang, H. F., Schön, M., Böckers, T. M., Han, S. P., Han, J. S., & Zhang, R.

(2018). Neonatal oxytocin treatment ameliorates autistic-like behaviors and oxytocin deficiency in valproic acid-induced rat model of autism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00355>

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)

De Cock, M., Maas, Y. G. H., & Van De Bor, M. (2012). Does perinatal exposure to endocrine disruptors induce autism spectrum and attention deficit hyperactivity disorders? Review. In *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* (Vol. 101, Issue 8, pp. 811–818). <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2012.02693.x>

De Felice, A., Greco, A., Calamandrei, G., & Minghetti, L. (2016). Prenatal exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos enhances brain oxidative stress and prostaglandin E2 synthesis in a mouse model of idiopathic autism. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0617-4>

De Felice, A., Scattoni, M. L., Ricceri, L., & Calamandrei, G. (2015a). Prenatal exposure to a common organophosphate insecticide delays motor development in a mouse model of idiopathic autism. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121663>

De Felice, A., Scattoni, M. L., Ricceri, L., & Calamandrei, G. (2015b). Prenatal Exposure to a Common Organophosphate Insecticide Delays Motor Development in a Mouse Model of Idiopathic Autism. *PLOS ONE*, 10(3), e0121663.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121663>

De Vries, G. J., & Panzica, G. C. (2006). Sexual differentiation of central vasopressin and

vasotocin systems in vertebrates: Different mechanisms, similar endpoints.

Neuroscience, 138(3), 947–955. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.07.050>

Deacon, M. M., Murray, J. S., Pilny, M. K., Rao, K. S., Dittenber, D. A., Hanley, T. R., & John, J. A. (1980). Embryotoxicity and Fetotoxicity of Orally Administered Chlorpyrifos in Mice Embryotoxicity and Fetotoxicity of Orally Administered Chlorpyrifos in Mice. DEACON. In *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY* (Vol. 54).

Degroote, S., Hunting, D., Sébirea, G., & Takser, L. (2014). Autistic-like traits in Lewis rats exposed perinatally to a mixture of common endocrine disruptors. *Endocrine Disruptors*, 2(1). <https://doi.org/10.4161/23273747.2014.976123>

Díaz-Véliz, G., Dussaubat, N., & Mora, S. (1997). Ketanserin effects on rat behavioral responses: Modifications by the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57(4), 687–692. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(96\)00394-2](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00394-2)

Dominah, G. A., McMinimy, R. A., Kallon, S., & Kwakye, G. F. (2017). Acute exposure to chlorpyrifos caused NADPH oxidase mediated oxidative stress and neurotoxicity in a striatal cell model of Huntington's disease. *NeuroToxicology*, 60, 54–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2017.03.004>

Dufour-Rainfray, D., Vourc'h, P., Le Guisquet, A. M., Garreau, L., Ternant, D., Bodard, S., Jaumain, E., Gulhan, Z., Belzung, C., Andres, C. R., Chalon, S., & Guilloteau, D. (2010). Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: A model for autism. *Neuroscience Letters*, 470(1), 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.054>

Eaton, D. L., Daroff, R. B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L. G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W. C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R., & Spencer, P. S. (2008). Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human

Exposure and Neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(sup2), 1–125.

<https://doi.org/10.1080/10408440802272158>

Edalatmanesh, M. A., Nikfarjam, H., Vafae, F., & Moghadas, M. (2013). Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain Research*, 1526, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.06.024>

Ellenbroek, B. A., August, C., & Youn, J. (2016). Does prenatal valproate interact with a genetic reduction in the serotonin transporter? A rat study on anxiety and cognition. *Frontiers in Neuroscience*, 10(SEP). <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00424>

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Engineer, C. T., Centanni, T. M., Im, K. W., Borland, M. S., Moreno, N. A., Carraway, R. S., Wilson, L. G., & Kilgard, M. P. (2014). Degraded auditory processing in a rat model of autism limits the speech representation in non-primary auditory cortex. *Developmental Neurobiology*, 74(10), 972–986. <https://doi.org/10.1002/dneu.22175>

Ergaz, Z., Weinstein-Fudim, L., & Ornoy, A. (2016). Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*, 64, 116–140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.024>

Esposito, G., Hiroi, N., & Scattoni, M. L. (2017). Cry, baby, cry: Expression of distress as a biomarker and modulator in autism spectrum disorder. In *International Journal of Neuropsychopharmacology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 498–503). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx014>

Falougy, H. El, Filova, B., Ostatnikova, D., Bacova, Z., & Bakos, J. (2019). Neuronal morphology alterations in autism and possible role of oxytocin. *Endocrine Regulations*, 53(1), 46–54. <https://doi.org/10.2478/enr-2019-0006>

- Farag, A. T., El Okazy, A. M., & El-Aswed, A. F. (2003). Developmental toxicity study of chlorpyrifos in rats. *Reproductive Toxicology*, *17*(2), 203–208.
[https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00121-1](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00121-1)
- Feldman, R., Golan, O., Hirschler-Guttenberg, Y., Ostfeld-Etzion, S., & Zagoory-Sharon, O. (2014). Parent-child interaction and oxytocin production in pre-schoolers with autism spectrum disorder. *British Journal of Psychiatry*, *205*(2), 107–112.
<https://doi.org/10.1192/bjp.bp.113.137513>
- Felix-Ortiz, A. C., & Febo, M. (2012a). Gestational valproate alters BOLD activation in response to complex social and primary sensory stimuli. *PLoS ONE*, *7*(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037313>
- Felix-Ortiz, A. C., & Febo, M. (2012b). Gestational valproate alters BOLD activation in response to complex social and primary sensory stimuli. *PLoS ONE*, *7*(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037313>
- Felix-Ortiz, A. C., & Febo, M. (2012c). Gestational valproate alters BOLD activation in response to complex social and primary sensory stimuli. *PLoS ONE*, *7*(5).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037313>
- Fernandez, S. P., Muzerelle, A., Scotto-Lomassese, S., Barik, J., Gruart, A., Delgado-García, J. M., & Gaspar, P. (2017). Constitutive and Acquired Serotonin Deficiency Alters Memory and Hippocampal Synaptic Plasticity. *Neuropsychopharmacology*, *42*(2), 512–523. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.134>
- Fish, E. W., Sekinda, M., Ferrari, P. F., Dirks, A., & Miczek, K. A. (2000). Distress vocalizations in maternally separated mouse pups: Modulation via 5-HT1(A), 5-HT1(B) and GABA(A) receptors. *Psychopharmacology*, *149*(3), 277–285.
<https://doi.org/10.1007/s002130000370>
- Fisher, B. e. (1999). Most unwanted: Persistent organic pollutants. *Environmental Health*

Perspectives, 107(1), A18–A23.

Ford, T. C., & Crewther, D. P. (2016). A comprehensive review of the 1H-MRS metabolite spectrum in autism spectrum disorder. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 9, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00014>

Friedman, S. D., Shaw, D. W., Artru, A. A., Richards, T. L., Gardner, J., Dawson, G., Posse, S., & Dager, S. R. (2003). Regional brain chemical alterations in young children with autism spectrum disorder. *Neurology*, 60(1), 100–107.
<https://doi.org/10.1212/WNL.60.1.100>

Fueta, Y., Sekino, Y., Yoshida, S., Kanda, Y., & Ueno, S. (2018a). Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus. *NeuroToxicology*, 65, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.01.001>

Fueta, Y., Sekino, Y., Yoshida, S., Kanda, Y., & Ueno, S. (2018b). Prenatal exposure to valproic acid alters the development of excitability in the postnatal rat hippocampus. *NeuroToxicology*, 65, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.01.001>

Fujii, E., Mori, K., Miyazaki, M., Hashimoto, T., Harada, M., & Kagami, S. (2010). Function of the frontal lobe in autistic individuals : a proton magnetic resonance spectroscopic study. *The Journal of Medical Investigation*, 57(1,2), 35–44.
<https://doi.org/10.2152/jmi.57.35>

Fujimura, K., Mitsunashi, T., Shibata, S., Shimozato, S., & Takahashi, T. (2016). In utero exposure to valproic acid induces neocortical dysgenesis via dysregulation of neural progenitor cell proliferation/differentiation. *Journal of Neuroscience*, 36(42), 10908–10919. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0229-16.2016>

G. Salazar, J., Ribes, D., Cabre, M., L. Domingo, J., Sanchez-Santed, F., & Teresa Colomina, M. (2011). Amyloid β Peptide Levels Increase in Brain of AβPP Swedish Mice after Exposure to Chlorpyrifos. *Current Alzheimer Research*, 8(7), 732–740.

<https://doi.org/10.2174/156720511797633197>

Gabis, L., Wei, H., Azizian, A., DeVincent, C., Tudorica, A., Kesner-Baruch, Y., Roche, P., &

Pomeroy, J. (2008). ¹H-magnetic resonance spectroscopy markers of cognitive and language ability in clinical subtypes of autism spectrum disorders. *Journal of Child Neurology*, *23*(7), 766–774. <https://doi.org/10.1177/0883073808315423>

Gandal, M. J., Edgar, J. C., Ehrlichman, R. S., Mehta, M., Roberts, T. P. L. L., & Siegel, S. J.

(2010). Validating γ Oscillations and Delayed Auditory Responses as Translational Biomarkers of Autism. *Biological Psychiatry*, *68*(12), 1100–1106.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.031>

Garcia, S. J., Seidler, F. J., Crumpton, T. L., & Slotkin, T. A. (2001). Does the developmental

neurotoxicity of chlorpyrifos involve glial targets? Macromolecule synthesis, adenylyl cyclase signaling, nuclear transcription factors, and formation of reactive oxygen in C6 glioma cells. *Brain Research*, *891*(1–2), 54–68. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03189-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03189-9)

Gentile, I., Zappulo, E., Militerni, R., Pascotto, A., Borgia, G., & Bravaccio, C. (2013).

Etiopathogenesis of autism spectrum disorders: Fitting the pieces of the puzzle together. *Medical Hypotheses*, *81*(1), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.04.002>

Geter, D. R., Kan, H. L., Lowe, E. R., Rick, D. L., Charles, G. D., Gollapudi, B. B., &

Mattsson, J. L. (2008). Investigations of oxidative stress, antioxidant response, and protein binding in chlorpyrifos exposed rat neuronal PC12 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, *18*(1), 17–23. <https://doi.org/10.1080/15376510701389530>

Ghodke-Puranik, Y., Thorn, C. F., Lamba, J. K., Leeder, J. S., Song, W., Birnbaum, A. K.,

Altman, R. B., & Klein, T. E. (2013). Valproic acid pathway: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenetics and Genomics*, *23*(4), 236–241.

<https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32835ea0b2>

- Gogolla, N., LeBlanc, J. J., Quast, K. B., Südhof, T. C., Fagiolini, M., & Hensch, T. K. (2009). Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, *1*(2), 172–181. <https://doi.org/10.1007/s11689-009-9023-x>
- Goines, P. E., & Ashwood, P. (2013). Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment. *Neurotoxicology and Teratology*, *36*, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.07.006>
- Goldstein, S., & Schwebach, A. J. (2004). The comorbidity of pervasive developmental disorder and attention deficit hyperactivity disorder: Results of a retrospective chart review. In *Journal of Autism and Developmental Disorders* (Vol. 34, Issue 3, pp. 329–339). <https://doi.org/10.1023/B:JADD.0000029554.46570.68>
- Gómez-Giménez, B., Felipo, V., Cabrera-Pastor, A., Agustí, A., Hernández-Rabaza, V., & Llansola, M. (2018a). Developmental Exposure to Pesticides Alters Motor Activity and Coordination in Rats: Sex Differences and Underlying Mechanisms. *Neurotoxicity Research*, *33*(2), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9823-9>
- Gómez-Giménez, B., Felipo, V., Cabrera-Pastor, A., Agustí, A., Hernández-Rabaza, V., & Llansola, M. (2018b). Developmental Exposure to Pesticides Alters Motor Activity and Coordination in Rats: Sex Differences and Underlying Mechanisms. *Neurotoxicity Research*, *33*(2), 247–258. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9823-9>
- Gómez-Giménez, Belén, Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Malaguarnera, M., Agusti, A., & Felipo, V. (2017a). Sex-dependent effects of developmental exposure to different pesticides on spatial learning. The role of induced neuroinflammation in the hippocampus. *Food and Chemical Toxicology*, *99*, 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.028>
- Gómez-Giménez, Belén, Llansola, M., Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A.,

- Malaguarnera, M., Agusti, A., & Felipo, V. (2017b). Sex-dependent effects of developmental exposure to different pesticides on spatial learning. The role of induced neuroinflammation in the hippocampus. *Food and Chemical Toxicology*, *99*, 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.11.028>
- Gonzalez, R. (2015). Toxicity characteristic leaching procedure of the active ingredient chlorpyrifos in the commercial organophosphate pesticide attamix sb used in Colombia. In *Chlorpyrifos: Toxicological Properties, Uses and Effects on Human Health and the Environment* (Issue January).
- Grabovska, S., & Salyha, Y. (2015a). ADHD-like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, *66*(2), 121–127. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2624>
- Grabovska, S., & Salyha, Y. (2015b). ADHD-like behaviour in the offspring of female rats exposed to low chlorpyrifos doses before pregnancy. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, *66*(2), 121–127. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2624>
- Graham, L. K., Yoon, T., Lee, H. J., & Kim, J. J. (2009). Strain and sex differences in fear conditioning: 22 kHz ultrasonic vocalizations and freezing in rats. *Psychology & Neuroscience*, *2*(2), 219–225. <https://doi.org/10.3922/j.psns.2009.2.015>
- Green, C. C., Dissanayake, C., Loesch, D. Z., Bui, M., & Barbaro, J. (2018). Skeletal Growth Dysregulation in Australian Male Infants and Toddlers With Autism Spectrum Disorder. *Autism Research*, *11*(6), 846–856. <https://doi.org/10.1002/aur.1952>
- Gu, J., Xu, S., Liu, Y., & Chen, X. (2020). Chlorpyrifos-induced toxicity has no gender selectivity in the early fetal brain. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, *55*(9), 803–812. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1786326>
- Gunier, R. B., Bradman, A., Castorina, R., Holland, N. T., Avery, D., Harley, K. G., &

- Eskenazi, B. (2017). Residential proximity to agricultural Pesticide use and IQ, in 7-year old children. *Environ. Health Perspect.*, 1–8.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1289/EHP504>
- Gurunathan, S., Robson, M., Freeman, N., Buckley, B., Roy, A., Meyer, R., Bukowski, J., & Lioy, P. J. (1998). Accumulation of chlorpyrifos on residential surfaces and toys accessible to children. *Environmental Health Perspectives*, 106(1), 9–16.
<https://doi.org/10.1289/ehp.981069>
- Gyawali, S., & Patra, B. N. (2019). Autism spectrum disorder: Trends in research exploring etiopathogenesis. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 73(8), 466–475.
<https://doi.org/10.1111/pcn.12860>
- Haddad, P. M., Das, A., Ashfaq, M., & Wieck, A. (2009). A review of valproate in psychiatric practice. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* (Vol. 5, Issue 5, pp. 539–551). <https://doi.org/10.1517/17425250902911455>
- Hallal, N., El Khayat El Sabbouri, H., Salami, A., Ramadan, W., Khachfe, H., Moustafa, M. E., Khalil, M., & Joumaa, W. H. (2019). Impacts of prolonged chlorpyrifos exposure on locomotion and slow-and fast- twitch skeletal muscles contractility in rats. *Toxicology Reports*, 6, 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.006>
- Hamzawy, M. A., El-Ghandour, Y. B., Abdel-Aziem, S. H., & Ali, Z. H. (2018). Leptin and camel milk abate oxidative stress status, genotoxicity induced in valproic acid rat model of autism. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 32, 1–11.
<https://doi.org/10.1177/2058738418785514>
- Helms, G., Ciumas, C., Kyaga, S., & Savic, I. (2006). Increased thalamus levels of glutamate and glutamine (Glx) in patients with idiopathic generalised epilepsy. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 77(4), 489–494.
<https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.074682>

- Herbert, M. R., Ziegler, D. A., Makris, N., Filipek, P. A., Kemper, T. L., Normandin, J. J., Sanders, H. A., Kennedy, D. N., & Caviness, V. S. (2004). Localization of White Matter Volume Increase in Autism and Developmental Language Disorder. *Annals of Neurology*, *55*(4), 530–540. <https://doi.org/10.1002/ana.20032>
- Hofer, M. A., Shair, H. N., & Brunelli, S. A. (2002a). Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. In *Current Protocols in Neuroscience*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0814s17>
- Hofer, M. A., Shair, H. N., & Brunelli, S. A. (2002b). Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. In *Current Protocols in Neuroscience* (pp. 8.14.1-8.14.16). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0814s17>
- Hofer, M. A., Shair, H. N., & Brunelli, S. A. (2002c). Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. In *Current Protocols in Neuroscience*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0814s17>
- Hou, Q., Wang, Y., Li, Y., Chen, D., Yang, F., & Wang, S. (2018). A Developmental Study of Abnormal Behaviors and Altered GABAergic Signaling in the VPA-Treated Rat Model of Autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*(August), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00182>
- Howard, A. S., Bucelli, R., Jett, D. A., Bruun, D., Yang, D., & Lein, P. J. (2005). Chlorpyrifos exerts opposing effects on axonal and dendritic growth in primary neuronal cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *207*(2), 112–124. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.12.008>
- Hrubec, T. C., Yan, M., Ye, K., Salafia, C. M., & Holladay, S. D. (2006). Valproic acid-induced fetal malformations are reduced by maternal immune stimulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interferon- γ . *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, *288*(12), 1303–

1309. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20397>

Hu, H., Liu, X., Jiang, F., Yao, X., & Cui, X. (2010). A novel chemiluminescence assay of organophosphorous pesticide quinalphos residue in vegetable with luminol detection.

Chemistry Central Journal, 4(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-4-13>

Huber-Mollema, Y., Oort, F. J., Lindhout, D., & Rodenburg, R. (2019). Behavioral problems in children of mothers with epilepsy prenatally exposed to valproate, carbamazepine, lamotrigine, or levetiracetam monotherapy. *Epilepsia*, 60(6), 1069–1082.

<https://doi.org/10.1111/epi.15968>

Içelli, O., Yalçın, Z., Karakaya, V., & Ilgaz, I. P. (2014). The spectral applications of Beer-Lambert law for some biological and dosimetric materials. *AIP Conference Proceedings*, 1611, 199–203. <https://doi.org/10.1063/1.4893831>

Icenogle, L. M., Christopher, N. C., Blackwelder, W. P., Caldwell, D. P., Qiao, D., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., & 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>

Ingram, J. L., Peckham, S. M., Tisdale, B., & Rodier, P. M. (2000). Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism.

Neurotoxicology and Teratology, 22(3), 319–324. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00083-5)

Iossifov, I., O’Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H. A., Witherspoon, K. T., Vives, L., Patterson, K. E., Smith, J. D., Paepker, B., Nickerson, D. A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L. E., Mandell, J. D., Mane, S. M., Murtha, M. T., ... Wigler, M. (2014). The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, 515(7526), 216–221. <https://doi.org/10.1038/nature13908>

- Ivanov, H. Y., Stoyanova, V. K., Popov, N. T., & Vachev, T. I. (2015). Autism Spectrum Disorder - A Complex Genetic Disorder. In *Folia medica* (Vol. 57, Issue 1, pp. 19–28).
<https://doi.org/10.1515/folmed-2015-0015>
- Jacquemont, S., Coe, B. P., Hersch, M., Duyzend, M. H., Krumm, N., Bergmann, S., Beckmann, J. S., Rosenfeld, J. A., & Eichler, E. E. (2014). A higher mutational burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. *American Journal of Human Genetics*, *94*(3), 415–425.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.02.001>
- Jaga, K., & Dharmani, C. (2003). Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Revista Panamericana de Salud Pública*, *14*(3), 171–185.
<https://doi.org/10.1590/S1020-49892003000800004>
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., Nydén, A., Philippe, A., Cohen, D., Chabane, N., Mouren-Siméoni, M. C., Brice, A., Sponheim, E., Spurkland, I., ... Van Maldergem, L. (2003). Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*, *34*(1), 27–29.
<https://doi.org/10.1038/ng1136>
- Jelen, P., Soltysik, S., & Zagrodzka, J. (2003). 22-kHz Ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: Behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behavioural Brain Research*, *141*(1), 63–72. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00321-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00321-2)
- Jeon, S. J., Gonzales, E. L., Mabunga, D. F. N., Valencia, S. T., Kim, D. G., Kim, Y., Adil, K. J. L., Shin, D., Park, D., & Shin, C. Y. (2018). Sex-specific behavioral features of rodent models of autism spectrum disorder. *Experimental Neurobiology*, *27*(5), 321–343.
<https://doi.org/10.5607/en.2018.27.5.321>

- Jokiranta, E., Sourander, A., Suominen, A., Timonen-Soivio, L., Brown, A. S., & Sillanpää, M. (2014). Epilepsy among children and adolescents with autism spectrum disorders: A population-based study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *44*(10), 2547–2557. <https://doi.org/10.1007/s10803-014-2126-6>
- Jones, T. H. (1991). Sodium valproate-induced menstrual disturbance in young women. *Hormone Research in Paediatrics*, *35*(2), 82–85. <https://doi.org/10.1159/000181878>
- Kalkbrenner, A. E., Schmidt, R. J., & Penlesky, A. C. (2014). Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, *44*(10), 277–318. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2014.06.001>
- Kalueff, A. V., & Nutt, D. J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. In *Depression and Anxiety* (Vol. 24, Issue 7, pp. 495–517). <https://doi.org/10.1002/da.20262>
- Kamel, F., & Hoppin, J. A. (2004). Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 112, Issue 9, pp. 950–958). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. <https://doi.org/10.1289/ehp.7135>
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., & Matsuda, T. (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(1), 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714>
- Kazlauskas, N., Seiffe, A., Campolongo, M., Zappala, C., & Depino, A. M. (2019). Sex-specific effects of prenatal valproic acid exposure on sociability and neuroinflammation: Relevance for susceptibility and resilience in autism. *Psychoneuroendocrinology*, *110*. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104441>
- Khalil, M. (2018). Primary and Secondary Auditory Cortex. In *Encyclopedia of Evolutionary*

Psychological Science (pp. 1–2). Springer International Publishing.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-16999-6_996-1

Kim, J. W., Seung, H., Kwon, K. J., Ko, M. J., Lee, E. J., Oh, H. A., Choi, C. S., Kim, K. C., Gonzales, E. L., You, J. S., Choi, D. H., Lee, J., Han, S. H., Yang, S. M., Cheong, J. H., Shin, C. Y., & Bahn, G. H. (2014). Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *PLoS ONE*, *9*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104927>

Kleinhans, N. M., Schweinsburg, B. C., Cohen, D. N., Müller, R. A., & Courchesne, E. (2007). N-acetyl aspartate in autism spectrum disorders: Regional effects and relationship to fMRI activation. *Brain Research*, *1162*(1), 85–97.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.04.081>

Kloske, M., & Witkiewicz, Z. (2019). Novichoks – The A group of organophosphorus chemical warfare agents. In *Chemosphere* (Vol. 221, pp. 672–682). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.054>

Knickmeyer, R. C., Wheelwright, S., & Baron-Cohen, S. B. (2008). Sex-typical play: Masculinization/defeminization in girls with an autism spectrum condition. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *38*(6), 1028–1035.

<https://doi.org/10.1007/s10803-007-0475-0>

Koshlukova, S. E., & Reed, N. R. (2014). Chlorpyrifos. In *Encyclopedia of Toxicology* (Vol. 1, pp. 930–934). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00115-9>

Kulshreshtha, A., & Shinde, C. P. (2012). A Review: General Base Catalysis Hydrolysis of Organophosphorus Insecticides by Different Amines. *International Journal of Science and Research (IJSR) ISSN (Online Impact Factor)*, *3*(10), 2319–7064.

<https://pdfs.semanticscholar.org/212c/0cc7ddaf0cf9d15c772fed2ed31423167917.pdf>

Kumar, H., & Sharma, B. (2016a). Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced

- autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain Research*, 1630, 83–97. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.052>
- Kumar, H., & Sharma, B. (2016b). Memantine ameliorates autistic behavior, biochemistry & blood brain barrier impairments in rats. *Brain Research Bulletin*, 124, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.013>
- Kumar, H., Sharma, B. M., & Sharma, B. (2015). Benefits of agomelatine in behavioral, neurochemical and blood brain barrier alterations in prenatal valproic acid induced autism spectrum disorder. *Neurochemistry International*, 91, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.10.007>
- Kuo, H. Y., & Liu, F. C. (2017). Valproic acid induces aberrant development of striatal compartments and corticostriatal pathways in a mouse model of autism spectrum disorder. *FASEB Journal*, 31(10), 4458–4471. <https://doi.org/10.1096/fj.201700054R>
- Lai, M. C., Lombardo, M. V., & Baron-Cohen, S. (2014). Autism. *The Lancet*, 383(9920), 896–910. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61539-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61539-1)
- Lai, M. C., Lombardo, M. V., Suckling, J., Ruigrok, A. N. V., Chakrabarti, B., Ecker, C., Deoni, S. C. L., Craig, M. C., Murphy, D. G. M., Bullmore, E. T., & Baron-Cohen, S. (2013). Biological sex affects the neurobiology of autism. *Brain*, 136(9), 2799–2815. <https://doi.org/10.1093/brain/awt216>
- Lan, A., Kalimian, M., Amram, B., & Kofman, O. (2017). Prenatal chlorpyrifos leads to autism-like deficits in C57Bl6/J mice. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0251-3>
- Lan, A., Stein, D., Portillo, M., Toiber, D., & Kofman, O. (2019a). Impaired innate and conditioned social behavior in adult C57Bl6/J mice prenatally exposed to chlorpyrifos. *Behavioral and Brain Functions*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12993-019-0153-3>
- Lan, A., Stein, D., Portillo, M., Toiber, D., & Kofman, O. (2019b). Impaired innate and

- conditioned social behavior in adult C57Bl6/J mice prenatally exposed to chlorpyrifos. *Behavioral and Brain Functions*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12993-019-0153-3>
- Leonzino, M., Busnelli, M., Antonucci, F., Verderio, C., Mazzanti, M., & Chini, B. (2016). The Timing of the Excitatory-to-Inhibitory GABA Switch Is Regulated by the Oxytocin Receptor via KCC2. *Cell Reports*, 15(1), 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.013>
- Levin, E. D., Addy, N., Baruah, A., Elias, A., Christopher, N. C., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2002). Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicology and Teratology*, 24(6), 733–741. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(02\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(02)00272-6)
- Li, D., Karnath, H. O., & Xu, X. (2017). Candidate Biomarkers in Children with Autism Spectrum Disorder: A Review of MRI Studies. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 33, Issue 2, pp. 219–237). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0118-1>
- Lim, J. S., Lim, M. Y., Choi, Y., & Ko, G. (2017). Modeling environmental risk factors of autism in mice induces IBD-related gut microbial dysbiosis and hyperserotonemia. *Molecular Brain*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0292-0>
- Limoges, É., Mottron, L., Bolduc, C., Berthiaume, C., & Godbout, R. (2005). Atypical sleep architecture and the autism phenotype. *Brain*, 128(5), 1049–1061. <https://doi.org/10.1093/brain/awh425>
- Lin, H. C., Gean, P. W., Wang, C. C., Chan, Y. H., & Chen, P. S. (2013). The Amygdala Excitatory/Inhibitory Balance in a Valproate-Induced Rat Autism Model. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055248>
- Liu, F., Yang, L., Sun, X., Zhang, H., Pan, W., Wang, X., Yang, J., Ji, M., & Yuan, H. (2016). NOX2 Mediated-Parvalbumin Interneuron Loss Might Contribute to Anxiety-Like and Enhanced Fear Learning Behavior in a Rat Model of Post-Traumatic Stress Disorder.

Molecular Neurobiology, 53(10), 6680–6689. [https://doi.org/10.1007/s12035-015-9571-](https://doi.org/10.1007/s12035-015-9571-x)

x

Lord, C., Brugha, T. S., Charman, T., Cusack, J., Dumas, G., Frazier, T., Jones, E. J. H., Jones, R. M., Pickles, A., State, M. W., Taylor, J. L., & Veenstra-VanderWeele, J. (2020). Autism spectrum disorder. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0138-4>

Lotti, M. (2010). Clinical Toxicology of Anticholinesterase Agents in Humans. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1543–1589). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00072-0>

Luong, T. N., Carlisle, H. J., Southwell, A., & Patterson, P. H. (2011). Assessment of Motor Balance and Coordination in Mice using the Balance Beam. *Journal of Visualized Experiments*, 49, 5–7. <https://doi.org/10.3791/2376>

Luongo, F. J., Horn, M. E., & Sohal, V. S. (2016). Putative microcircuit-level substrates for attention are disrupted in mouse models of autism. *Biological Psychiatry*, 79(8), 667–675. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.04.014>

Lutz, N. W., Béraud, E., & Cozzone, P. J. (2014). Metabolomic analysis of rat brain by high resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy of tissue extracts. *Journal of Visualized Experiments*, 91. <https://doi.org/10.3791/51829>

Lv, X., Dickerson, J. W., Rook, J. M., Lindsley, C. W., Conn, P. J., & Xiang, Z. (2017). M1 muscarinic activation induces long-lasting increase in intrinsic excitability of striatal projection neurons. *Neuropharmacology*, 118, 209–222. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.03.017>

Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J.-W., Kim, K. C., & Shin, C. Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>

- Main, S. L., & Kulesza, R. J. (2017). Repeated prenatal exposure to valproic acid results in cerebellar hypoplasia and ataxia. *Neuroscience*, *340*, 34–47.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.052>
- Markram, K., & Markram, H. (2010). The intense world theory - A unifying theory of the neurobiology of autism. *Frontiers in Human Neuroscience*, *4*.
<https://doi.org/10.3389/fnhum.2010.00224>
- Matsuo, K., Yabuki, Y., & Fukunaga, K. (2020). 5-aminolevulinic acid inhibits oxidative stress and ameliorates autistic-like behaviors in prenatal valproic acid-exposed rats. *Neuropharmacology*, *168*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107975>
- Matta, S. M., Hill-Yardin, E. L., & Crack, P. J. (2019). The influence of neuroinflammation in Autism Spectrum Disorder. In *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 79, pp. 75–90). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.04.037>
- Maurissen, J. P. J., Hoberman, A. M., Garman, R. H., & Hanley, T. R. (2000). Lack of selective developmental neurotoxicity in rat pups from dams treated by gavage with chlorpyrifos. *Toxicological Sciences*, *57*(2), 250–263.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/57.2.250>
- May, T., Sciberras, E., Hiscock, H., & Rinehart, N. (2016). *The Comorbid Diagnosis of ASD and ADHD: Clinical and Neuropsychological Perspectives* (pp. 259–284).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-27171-2_14
- Mbeya Mpaka, D., Luwa E-Andjafono Okitundu, D., Omba Ndjukendi, A., Mankubu, A. N., Yabassi Kinsala, S., Ebwel Mukau, J., Malanda Ngoma, V., Kashala-Abotnes, E., Ma-Miezi-Mampunza, S., Vogels, A., & Steyaert, J. (2016). *Prevalence and comorbidities of autism among children referred to the outpatient clinics for neurodevelopmental disorders of the*. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.25.82.4151>
- McCarthy, M. M., & Wright, C. L. (2017). Convergence of Sex Differences and the

- Neuroimmune System in Autism Spectrum Disorder. In *Biological Psychiatry* (Vol. 81, Issue 5, pp. 402–410). <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.10.004>
- Meador, K. J., Baker, G. A., Browning, N., Cohen, M. J., Bromley, R. L., Clayton-Smith, J., Kalayjian, L. A., Kanner, A., Liporace, J. D., Pennell, P. B., Privitera, M., & Loring, D. W. (2013). Fetal antiepileptic drug exposure and cognitive outcomes at age 6 years (NEAD study): A prospective observational study. *The Lancet Neurology*, *12*(3), 244–252. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70323-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70323-X)
- Meleiro Porto, A. L., Zelayarán Melgar, G., Consiglio Kasemodel, M., & Nitschke, M. (2010). Biodegradation of Pesticides. *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*, 407–439. <https://doi.org/10.5772/17686>
- Meyer-Lindenberg, A., Kolachana, B., Gold, B., Olsh, A., Nicodemus, K. K., Mattay, V., Dean, M., & Weinberger, D. R. (2009). Genetic variants in AVPR1A linked to autism predict amygdala activation and personality traits in healthy humans. *Molecular Psychiatry*, *14*(10), 968–975. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.54>
- Meyers, B., & Wilchin, R. C. (1969). Some effects of scopolamine or locomotor activity in rats. *Psychonomic Science*, *17*(3), 174–175. <https://doi.org/10.3758/BF03336505>
- Middlemore-Risher, M. L., Buccafusco, J. J., & Terry, A. V. (2010). Repeated exposures to low-level chlorpyrifos results in impairments in sustained attention and increased impulsivity in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, *32*(4), 415–424. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2010.03.008>
- Mirza, R., & Sharma, B. (2019). Benefits of Fenofibrate in prenatal valproic acid-induced autism spectrum disorder related phenotype in rats. *Brain Research Bulletin*, *147*, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.02.003>
- Miyazaki, K., Narita, N., & Narita, M. (2005). Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: Implication for

pathogenesis of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23(2-3 SPEC. ISS.), 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.004>

Mohammadi, S., Asadi-Shekaari, M., Basiri, M., Parvan, M., Shabani, M., & Nozari, M. (2020). Improvement of autistic-like behaviors in adult rats prenatally exposed to valproic acid through early suppression of NMDA receptor function.

Psychopharmacology, 237(1), 199–208. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05357-2>

Moldrich, R. X., Leanage, G., She, D., Dolan-Evans, E., Nelson, M., Reza, N., & Reutens, D. C. (2013). Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behavioural Brain Research*, 257, 253–264.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.049>

Mony, T. J., Lee, J. W., Dreyfus, C., DiCicco-Bloom, E., & Lee, H. J. (2016). Valproic acid exposure during early postnatal gliogenesis leads to autistic-like behaviors in rats.

Clinical Psychopharmacology and Neuroscience, 14(4), 338–344.

<https://doi.org/10.9758/cpn.2016.14.4.338>

Moore, S. J., Turnpenny, P., Quinn, A., Glover, S., Lloyd, D. J., Montgomery, T., & Dean, J. C. S. (2000). A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes.

Journal of Medical Genetics, 37(7), 489–497. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.7.489>

Moscovitch, M., Cabeza, R., Winocur, G., & Nadel, L. (2016). Episodic memory and beyond:

The hippocampus and neocortex in transformation. *Annual Review of Psychology*, 67, 105–134. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143733>

Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., & Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: An approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287–302. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>

Moy, Sheryl S, Nadler, J. J., Young, N. B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R. P., Barbaro,

- J. R., West, L. M., Threadgill, D. W., Lauder, J. M., Magnuson, T. R., Crawley, J. N., Moy, S. S., & Holloway, P. (2008). *Mouse Behavioral Tasks Relevant to Autism: Phenotypes of Ten Inbred Strains*. <http://aretha.jax.org/pub-cgi/phenome/mpdcgi>
- Mullen, B. R., Khialeeva, E., Hoffman, D. B., Ghiani, C. A., & Carpenter, E. M. (2013). Decreased Reelin Expression and Organophosphate Pesticide Exposure Alters Mouse Behaviour and Brain Morphology. *ASN Neuro*, 5(1), AN20120060. <https://doi.org/10.1042/an20120060>
- Muller, C. L., Anacker, A. M. J., & Veenstra-VanderWeele, J. (2016). The serotonin system in autism spectrum disorder: From biomarker to animal models. In *Neuroscience* (Vol. 321, pp. 24–41). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.11.010>
- Muller, M., Hess, L., Tardivo, A., Lajmanovich, R., Attademo, A., Poletta, G., Simoniello, M. F., Yodice, A., Lavarello, S., Chialvo, D., & Scremin, O. (2014a). Neurologic dysfunction and genotoxicity induced by low levels of chlorpyrifos. *NeuroToxicology*, 45, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.08.012>
- Muller, M., Hess, L., Tardivo, A., Lajmanovich, R., Attademo, A., Poletta, G., Simoniello, M. F., Yodice, A., Lavarello, S., Chialvo, D., & Scremin, O. (2014b). Neurologic dysfunction and genotoxicity induced by low levels of chlorpyrifos. *NeuroToxicology*, 45, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.08.012>
- Murray, E. K., Varnum, M. M., Fernandez, J. L., De Vries, G. J., & Forger, N. G. (2011). Effects of Neonatal Treatment with Valproic Acid on Vasopressin Immunoreactivity and Olfactory Behaviour in Mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(10), 906–914. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02196.x>
- Narita, M., Oyabu, A., Imura, Y., Kamada, N., Yokoyama, T., Tano, K., Uchida, A., & Narita, N. (2010). Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat. *Neuroscience Research*, 66(1), 2–6.

<https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.09.001>

Narita, N., Kato, M., Tazoe, M., Miyazaki, K., Narita, M., & Okado, N. (2002). Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatric Research*, *52*(4), 576–579.

<https://doi.org/10.1023/01.PDR.0000028406.01104.76>

Nicolini, C., & Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. In *Experimental Neurology* (Vol. 299, pp. 217–227). Academic Press Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>

Olexová, L., Senko, T., Štefánik, P., Talarovičová, A., & Kršková, L. (2013). Habituation of exploratory behaviour in VPA rats: Animal model of autism. *Interdisciplinary Toxicology*, *6*(4), 222–227. <https://doi.org/10.2478/intox-2013-0033>

Olsson, M. B., Carlsson, L. H., Westerlund, J., Gillberg, C., & Fernell, E. (2013). Autism before diagnosis: Crying, feeding and sleeping problems in the first two years of life. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, *102*(6), 635–639.

<https://doi.org/10.1111/apa.12229>

Ornitz, E. M., Ritvo, E. R., Brown, M. B., La Franchi, S., Parmelee, T., & Walter, R. D. (1969). The EEG and rapid eye movements during REM sleep in normal and autistic children. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, *26*(2), 167–175.

[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(69\)90207-7](https://doi.org/10.1016/0013-4694(69)90207-7)

Ornoy, A. (2009). Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? In *Reproductive Toxicology* (Vol. 28, Issue 1, pp. 1–10).

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.014>

Ornoy, A., Liza, W. F., & Ergaz, Z. (2016). Genetic syndromes, maternal diseases and antenatal factors associated with autism spectrum disorders (ASD). In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 10, Issue JUL). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00316>

Oyabu, A., Narita, M., & Tashiro, Y. (2013). The effects of prenatal exposure to valproic acid on the initial development of serotonergic neurons. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *31*(3), 202–208.

<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.01.006>

Ozgen, H., Hellemann, G. S., Stellato, R. K., Lahuis, B., Van Daalen, E., Staal, W. G., Rozendal, M., Hennekam, R. C., Beemer, F. A., & Van Engeland, H. (2011). Morphological features in children with autism spectrum disorders: A matched case-control study. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *41*(1), 23–31.

<https://doi.org/10.1007/s10803-010-1018-7>

Pangrazzi, L., Balasco, L., & Bozzi, Y. (2020). Oxidative stress and immune system dysfunction in autism spectrum disorders. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21093288>

Pardo, C. A., Vargas, D. L., & Zimmerman, A. W. (2005). Immunity, neuroglia and neuroinflammation in autism. In *International Review of Psychiatry* (Vol. 17, Issue 6, pp. 485–495). <https://doi.org/10.1080/02646830500381930>

Parnas, J., Bovet, P., & Zahavi, D. (2002). Schizophrenic autism: clinical phenomenology and pathogenetic implications. *World Psychiatry : Official Journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, *1*(3), 131–136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946833>

Patterson, P. H. (2011). Modeling autistic features in animals. *Pediatric Research*, *69*(5 PART 2). <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e318212b80f>

Perez-Fernandez, C., Morales-Navas, M., Aguilera-Sáez, L. M., Abreu, A. C., Guardia-Escote, L., Fernández, I., Garrido-Cárdenas, J. A., Colomina, M. T., Giménez, E., & 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.

<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. (2020a). 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(September 2019), 110865.

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

Perez-Fernandez, C., Morales-Navas, M., Guardia-Escote, L., Garrido-Cárdenas, J. A., Colomina, M. T., Giménez, E., & Sánchez-Santed, F. (2020b). 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. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110865>

Persico, A M, D'agruma, L., Maiorano, N., Totaro, A., Militerni, R., Bravaccio, C., Schneider, C., Melmed, R., Trillo, S., Montecchi, F., Palermo, M., Pascucci, T., Puglisi-Allegra, S., Reichelt, K.-L., Conciatori, M., Marino, R., Baldi, A., Zelante, L., Gasparini, P., & Keller, F. (2001). Reelin gene alleles and haplotypes as a factor predisposing to autistic disorder. *Molecular Psychiatry*, 6(2), 150–159. www.nature.com/mp

Persico, Antonio M., & Bourgeron, T. (2006). Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 29, Issue 7, pp. 349–358). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.05.010>

Persico, Antonio M., & Merelli, S. (2014). Environmental Factors in the Onset of Autism Spectrum Disorder. *Current Developmental Disorders Reports*, 1(1), 8–19. <https://doi.org/10.1007/s40474-013-0002-2>

Phelps, E. A. (2004). Human emotion and memory: Interactions of the amygdala and

- hippocampal complex. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 14, Issue 2, pp. 198–202). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.03.015>
- Phiel, C. J., Zhang, F., Huang, E. Y., Guenther, M. G., Lazar, M. A., & Klein, P. S. (2001). Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), 36734–36741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101287200>
- Philippat, C., Barkoski, J., Tancredi, D. J., Elms, B., Barr, D. B., Ozonoff, S., Bennett, D. H., & Hertz-Picciotto, I. (2018). Prenatal exposure to organophosphate pesticides and risk of autism spectrum disorders and other non-typical development at 3 years in a high-risk cohort. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(3), 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.02.004>
- Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A., Lakitan, B., Kraus, T., Kleinman, P., Vancini, F., Roach, W. J., Graap, E., Keeton, W. S., & Selig, G. (1993). Environmental and economic effects of reducing pesticide use in agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(93\)90030-S](https://doi.org/10.1016/0167-8809(93)90030-S)
- Pizzarelli, R., & Cherubini, E. (2011). Alterations of GABAergic signaling in autism spectrum disorders. In *Neural Plasticity* (Vol. 2011). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2011/297153>
- Pope, C., Karanth, S., & Liu, J. (2005). Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(3), 433–446. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.12.048>
- Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. In *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* (Vol. 46, Issue 1, pp. 28–34).

- Posar, A., & Visconti, P. (2017). Autism in 2016: the need for answers. *Jornal de Pediatria*, 93(2), 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2016.09.002>
- Prendergast, M. A., Terry, A. V., & Buccafusco, J. J. (1998). Effects of chronic, low-level organophosphate exposure on delayed recall, discrimination, and spatial learning in monkeys and rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 20(2), 115–122. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(97\)00098-6](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(97)00098-6)
- Presmanes Hill, A., Zuckerman, K., & Fombonne, E. (2015). Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. In *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder* (pp. 13–38). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16321-5_2
- Pritchett, K., & Mulder, G. B. (2003). Other tests of strength and coordination. In *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* (Vol. 42, Issue 5, pp. 53–54).
- Puig-Lagunes, A. A., Manzo, J., Beltrán-Parrazal, L., Morgado-Valle, C., Toledo-Cárdenas, R., & López-Meraz, M. L. (2016). Pentylentetrazole-induced seizures in developing rats prenatally exposed to valproic acid. *PeerJ*, 2016(11), 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.2709>
- Qiao, D., Seidler, F. J., Padilla, S., & Slotkin, T. A. (2002). Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: What is the vulnerable period? *Environmental Health Perspectives*, 110(11), 1097–1103. <https://doi.org/10.1289/ehp.021101097>
- Qiao, D., Seidler, F. J., Tate, C. A., Cousins, M. M., & Slotkin, T. A. (2003). Fetal chlorpyrifos exposure: Adverse effects on brain cell development and cholinergic emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 111, Issue 4, pp. 536–544). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. <https://doi.org/10.1289/ehp.5828>
- Quattrocki, E., & Friston, K. (2014). Autism, oxytocin and interoception. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 47, pp. 410–430). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.09.012>

- Raafea, T. (2014). Role of folic acid in chlorpyrifos induced teratogenicity in mice. *African Journal of Biotechnology*, 13(37), 3821–3830. <https://doi.org/10.5897/ajb12.2780>
- Raines, K. W., Seidler, F. J., & Slotkin, T. . (2001). Alterations in serotonin transporter expression in brain regions of rats exposed neonatally to chlorpyrifos. *Developmental Brain Research*, 130(1), 65–72. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(01\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(01)00211-5)
- Rapaport, D. (1951). *Organization and pathology of thought: Selected sources*. Columbia University Press. <https://doi.org/10.1037/10584-000>
- Rasalam, A. D., Hailey, H., Williams, J. H. G., Moore, S. J., Turnpenny, P. D., Lloyd, D. J., & Dean, J. C. S. (2005). Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 47(8), 551–555. <https://doi.org/10.1017/S0012162205001076>
- Raszewski, G., Lemieszek, M. K., Łukawski, K., Juszczak, M., & Rzeski, W. (2015). Chlorpyrifos and cypermethrin induce apoptosis in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 116(2), 158–167. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12285>
- Rauh, V. A., Garcia, W. E., Whyatt, R. M., Horton, M. K., Barr, D. B., & Louis, E. D. (2015). Prenatal exposure to the organophosphate pesticide chlorpyrifos and childhood tremor. *NeuroToxicology*, 51, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.09.004>
- Rauh, V. A., Garfinkel, R., Perera, F. P., Andrews, H. F., Hoepner, L., Barr, D. B., Whitehead, R., Tang, D., & Whyatt, R. W. (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics*, 118(6). <https://doi.org/10.1542/peds.2006-0338>
- Rauh, V. A., Perera, F. P., Horton, M. K., Whyatt, R. M., Bansal, R., Hao, X., Liu, J., Barr, D. B., Slotkin, T. A., & Peterson, B. S. (2012). Brain anomalies in children exposed

prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(20), 7871–7876.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1203396109>

Ray, D. E., & Richards, P. G. (2001). The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Letters*, 120(1–3), 343–351.

[https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00266-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00266-1)

Raza, S., Himmler, B. T., Himmler, S. M., Harker, A., Kolb, B., Pellis, S. M., & Gibb, R. (2015). Effects of prenatal exposure to valproic acid on the development of juvenile-typical social play in rats. *Behavioural Pharmacology*, 26(8), 707–719.

<https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000169>

Ren, S., He, K., Girshick, R., & Sun, J. (2017). Faster R-CNN: Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 39(6), 1137–1149. <https://doi.org/10.1109/TPAMI.2016.2577031>

Reserved, A. R. (2014). *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States* (J. P. Giesy & K. R. Solomon (eds.); Vol. 231). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-03865-0>

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)

Ricceri, L., Venerosi, A., Capone, F., Cometa, M. F., Lorenzini, P., Fortuna, S., & Calamandrei, G. (2006). Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: Fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicological Sciences*, 93(1), 105–113. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl032>

Roberts, E. M., English, P. B., Grether, J. K., Windham, G. C., Somberg, L., & Wolff, C.

- (2007a). Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. *Environmental Health Perspectives*, 115(10), 1482–1489. <https://doi.org/10.1289/ehp.10168>
- Roberts, E. M., English, P. B., Grether, J. K., Windham, G. C., Somberg, L., & Wolff, C. (2007b). Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. *Environmental Health Perspectives*, 115(10), 1482–1489. <https://doi.org/10.1289/ehp.10168>
- Rocha, E. S., Santos, M. D., Chebabo, S. R., Aracava, Y., & Albuquerque, E. X. (1999). Low concentrations of the organophosphate VX affect spontaneous and evoked transmitter release from hippocampal neurons: Toxicological relevance of cholinesterase-independent actions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 159(1), 31–40. <https://doi.org/10.1006/taap.1999.8733>
- Rohlman, D. S., Ismail, A., Bonner, M. R., Abdel Rasoul, G., Hendy, O., Ortega Dickey, L., Wang, K., & Olson, J. R. (2019). Occupational pesticide exposure and symptoms of attention deficit hyperactivity disorder in adolescent pesticide applicators in Egypt. *NeuroToxicology*, 74(3), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.05.002>
- Ross, E. J., Graham, D. L., Money, K. M., & Stanwood, G. D. (2015). Developmental consequences of fetal exposure to drugs: What we know and what we still must learn. In *Neuropsychopharmacology* (Vol. 40, Issue 1, pp. 61–87). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.147>
- Roy, T S, Andrews, J. E., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (1998). Chlorpyrifos elicits mitotic abnormalities and apoptosis in neuroepithelium of cultured rat embryos. *Teratology*, 58(2), 62–68. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9926\(199808\)58:2<62::AID-TERA7>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9926(199808)58:2<62::AID-TERA7>3.0.CO;2-2)
- Roy, Tara Sankar, Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2004). Morphologic effects of subtoxic

neonatal chlorpyrifos exposure in developing rat brain: Regionally selective alterations in neurons and glia. *Developmental Brain Research*, 148(2), 197–206.

<https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.12.004>

Roy, Tara Sankar, Sharma, V., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (2005). Quantitative morphological assessment reveals neuronal and glial deficits in hippocampus after a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos in neonatal rats. *Developmental Brain Research*, 155(1), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.12.004>

Saeedi Saravi, S. S., & Shokrzadeh, M. (2011). Role of Pesticides in Human Life in the Modern Age: A Review. In *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*. InTech. <https://doi.org/10.5772/18827>

Sagiv, S. K., Harris, M. H., Gunier, R. B., Kogut, K. R., Harley, K. G., Deardorff, J., Bradman, A., Holland, N., & Eskenazi, B. (2018). Prenatal Organophosphate Pesticide Exposure and Traits Related to Autism Spectrum Disorders in a Population Living in Proximity to Agriculture. *Environmental Health Perspectives*, 126(4), 047012. <https://doi.org/10.1289/EHP2580>

Sailer, L., Duclot, F., Wang, Z., & Kabbaj, M. (2019). Consequences of prenatal exposure to valproic acid in the socially monogamous prairie voles. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39014-7>

Sakade, Y., Yamanaka, K., Soumiya, H., Furukawa, S., & Fukumitsu, H. (2019). Exposure to valproic acid during middle to late-stage corticogenesis induces learning and social behavioral abnormalities with attention deficit/hyperactivity in adult mice. *Biomedical Research (Japan)*, 40(5), 179–188. <https://doi.org/10.2220/biomedres.40.179>

Sales, G. D. (1979). Strain Differences in the Ultrasonic Behavior of Rats (*Rattus Norvegicus*). *American Zoologist*, 19(2), 513–527. <https://doi.org/10.1093/icb/19.2.513>

Sánchez-Santed, F., Cañadas, F., Flores, P., López-Grancha, M., & Cardona, D. (2004). Long-

term functional neurotoxicity of paraoxon and chlorpyrifos: Behavioural and pharmacological evidence. *Neurotoxicology and Teratology*, 26(2), 305–317.

<https://doi.org/10.1016/j.ntt.2003.10.008>

Sánchez-Santed, F., Colomina, M. T., & Herrero Hernández, E. (2016). Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. In *Cortex* (Vol. 74, pp. 417–426). Masson SpA. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.003>

Sandhya, T., Sowjanya, J., & Veeresh, B. (2012). Bacopa monniera (L.) Wettst ameliorates behavioral alterations and oxidative markers in sodium valproate induced autism in rats. *Neurochemical Research*, 37(5), 1121–1131. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0717-1>

Sarafian, T. A., & Bredesen, D. E. (1994). Invited Commentary is Apoptosis Mediated by Reactive Oxygen Species? *Free Radical Research*, 21(1), 1–8.

<https://doi.org/10.3109/10715769409056549>

Sass, J. (2007). *Pesticides and You*. 27(1).

Saunders, M., Magnanti, B. L., Correia Carreira, S., Yang, A., Alamo-Hernández, U., Riojas-Rodriguez, H., Calamandrei, G., Koppe, J. G., Kraymer von Krauss, M., Keune, H., & Bartonova, A. (2012). Chlorpyrifos and neurodevelopmental effects: a literature review and expert elicitation on research and policy. *Environmental Health*, 11(Suppl 1), S5.

<https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-S1-S5>

Savy, C. Y., Fitchett, A. E., McQuade, R., Gartside, S. E., Morris, C. M., Blain, P. G., & Judge, S. J. (2015). Low-level repeated exposure to diazinon and chlorpyrifos decrease anxiety-like behaviour in adult male rats as assessed by marble burying behaviour.

NeuroToxicology, 50, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.08.010>

Scattoni, M. L., Gandhi, S. U., Ricceri, L., & Crawley, J. N. (2008). Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *PLoS ONE*, 3(8), 48–52.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003067>

- Schaaf, C. P., Betancur, C., Yuen, R. K. C., Parr, J. R., Skuse, D. H., Gallagher, L., Bernier, R. A., Buchanan, J. A., Buxbaum, J. D., Chen, C. A., Dies, K. A., Elsabbagh, M., Firth, H. V., Frazier, T., Hoang, N., Howe, J., Marshall, C. R., Michaud, J. L., Rennie, O., ... Vorstman, J. A. S. (2020). A framework for an evidence-based gene list relevant to autism spectrum disorder. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 21, Issue 6, pp. 367–376). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0231-2>
- Schatz, D. B., & Rostain, A. L. (2006). ADHD with comorbid anxiety. A review of the current literature. In *Journal of Attention Disorders* (Vol. 10, Issue 2, pp. 141–149). <https://doi.org/10.1177/1087054706286698>
- Schneider, T., Labuz, D., & Przewlocki, R. (2001). Nociceptive changes in rats after prenatal exposure to valproic acid. *Polish Journal of Pharmacology*, *53*(5), 531–534.
- Schneider, T., & Przewlocki, R. (2005a). Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, *30*(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schneider, T., & Przewlocki, R. (2005b). Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, *30*(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>
- Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewlocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(6), 728–740. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011>
- Schneider, T., Turczak, J., & Przewlocki, R. (2006a). Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology*, *31*(1), 36–46.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300767>

Schneider, T., Turczak, J., & Przewłocki, R. (2006b). Environmental Enrichment Reverses Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Issues for a Therapeutic Approach in Autism. *Neuropsychopharmacology*, *31*(1), 36–46.

<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300767>

Schneider, T., Ziðłkowska, B., Gieryk, A., Tyminska, A., & Przewłocki, R. (2007). Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone, and emotional responses in an animal model of autism. *Psychopharmacology*, *193*(4), 547–555. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0795-y>

Servadio, M., Melancia, F., Manduca, A., Di Masi, A., Schiavi, S., Cartocci, V., Pallottini, V., Campolongo, P., Ascenzi, P., & Trezza, V. (2016). Targeting anandamide metabolism rescues core and associated autistic-like symptoms in rats prenatally exposed to valproic acid. *Translational Psychiatry*, *6*(9). <https://doi.org/10.1038/tp.2016.182>

Servadio, Michela, Vanderschuren, L. J. M. J., & Trezza, V. (2015). Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do “autistic” rodents exist? In *Behavioural Pharmacology* (Vol. 26, Issue 6, pp. 522–540). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000163>

Sheinkopf, S. J., Iverson, J. M., Rinaldi, M. L., & Lester, B. M. (2012). Atypical Cry Acoustics in 6-Month-Old Infants at Risk for Autism Spectrum Disorder. *Autism Research*, *5*(5), 331–339. <https://doi.org/10.1002/aur.1244>

Shelton, J. F., Geraghty, E. M., Tancredi, D. J., Delwiche, L. D., Schmidt, R. J., Ritz, B., Hansen, R. L., & Hertz-Picciotto, I. (2014). Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: The charge study. *Environmental Health Perspectives*, *122*(10), 1103–1109. <https://doi.org/10.1289/ehp.1307044>

Sherman, J. D. (1995). Organophosphate pesticides — neurological and respiratory toxicity.

Toxicology and Industrial Health, 11(1), 33–39.

<https://doi.org/10.1177/074823379501100103>

- Silva, J. G., Boareto, A. C., Schreiber, A. K., Redivo, D. D. B., Gambeta, E., Vergara, F.,
Morais, H., Zanoveli, J. M., & Dalsenter, P. R. (2017a). 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>
- Silva, J. G., Boareto, A. C., Schreiber, A. K., Redivo, D. D. B., Gambeta, E., Vergara, F.,
Morais, H., Zanoveli, J. M., & Dalsenter, P. R. (2017b). 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>
- Silva, J. G., Boareto, A. C., Schreiber, A. K., Redivo, D. D. B., Gambeta, E., Vergara, F.,
Morais, H., Zanoveli, J. M., & Dalsenter, P. R. (2017c). 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>
- Silverman, J. L., Pride, M. C., Hayes, J. E., Puhger, K. R., Butler-Struben, H. M., Baker, S.,
& Crawley, J. N. (2015). GABA B Receptor Agonist R-Baclofen Reverses Social
Deficits and Reduces Repetitive Behavior in Two Mouse Models of Autism.
Neuropsychopharmacology, 40(9), 2228–2239. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.66>
- Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. (1994). Thigmotaxis as an index of anxiety in mice.
Influence of dopaminergic transmissions. *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59–64.
[https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90008-6)
- Siniscalco, D., Schultz, S., Brigida, A. L., & Antonucci, N. (2018). Inflammation and neuro-
immune dysregulations in autism spectrum disorders. In *Pharmaceuticals* (Vol. 11, Issue
2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph11020056>
- Slotkin, T. A., Cousins, M. M., Tate, C. A., & Seidler, F. J. (2001). Persistent cholinergic

presynaptic deficits after neonatal chlorpyrifos exposure. *Brain Research*, 902(2), 229–243. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02387-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02387-3)

Slotkin, Theodore A., Oliver, C. A., & Seidler, F. J. (2005). Critical periods for the role of oxidative stress in the developmental neurotoxicity of chlorpyrifos and terbutaline, alone or in combination. *Developmental Brain Research*, 157(2), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.04.001>

Slotkin, Theodore A., & Seidler, F. J. (2005). The alterations in CNS serotonergic mechanisms caused by neonatal chlorpyrifos exposure are permanent. *Developmental Brain Research*, 158(1–2), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.06.008>

Slotkin, Theodore A., & Seidler, F. J. (2007). Prenatal chlorpyrifos exposure elicits presynaptic serotonergic and dopaminergic hyperactivity at adolescence: Critical periods for regional and sex-selective effects. *Reproductive Toxicology*, 23(3), 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.07.010>

Slotkin, Theodore A., & Seidler, F. J. (2009). Oxidative and excitatory mechanisms of developmental neurotoxicity: Transcriptional profiles for chlorpyrifos, diazinon, dieldrin, and divalent nickel in PC12 Cells. *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 587–596. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800251>

Slotkin, Theodore A., Skavicus, S., Levin, E. D., & Seidler, F. J. (2015). Prenatal nicotine changes the response to postnatal chlorpyrifos: Interactions targeting serotonergic synaptic function and cognition. *Brain Research Bulletin*, 111, 84–96. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2015.01.003>

Smith, A. E., & Secoy, D. M. (1975). Forerunners of pesticides in classical Greece and Rome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1050–1055. <https://doi.org/10.1021/jf60202a004>

Sokolova, E., Oerlemans, A. M., Rommelse, N. N., Groot, P., Hartman, C. A., Glennon, J. C.,

- Claassen, T., Heskes, T., & Buitelaar, J. K. (2017). A causal and mediation analysis of the comorbidity between attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorder (ASD). *Journal of Autism and Developmental Disorders, 47*(6), 1595–1604. <https://doi.org/10.1007/s10803-017-3083-7>
- Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 24*(4), 417–463. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00014-2)
- Speed, H. E., Blaiss, C. A., Kim, A., Haws, M. E., Melvin, N. R., Jennings, M., & Eisch, A. J. (2012). Delayed reduction of hippocampal synaptic transmission and spines following exposure to repeated subclinical doses of organophosphorus pesticide in adult mice. *Toxicological Sciences, 125*(1), 196–208. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr253>
- Štefáňik, P., Olexová, L., & Kršková, L. (2015). Increased sociability and gene expression of oxytocin and its receptor in the brains of rats affected prenatally by valproic acid. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 131*, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.01.021>
- Stern, J. A., Botdorf, M., Cassidy, J., & Riggins, T. (2019). Empathic responding and hippocampal volume in young children. *Developmental Psychology, 55*(9), 1908–1920. <https://doi.org/10.1037/dev0000684>
- Tait, S., Ricceri, L., Venerosi, A., Maranghi, F., Mantovani, A., & Calamandrei, G. (2009). Long-term effects on hypothalamic neuropeptides after developmental exposure to chlorpyrifos in mice. *Environmental Health Perspectives, 117*(1), 112–116. <https://doi.org/10.1289/ehp.11696>
- Takahashi, A., Yap, J. J., Bohager, D. Z., Faccidomo, S., Clayton, T., Cook, J. M., & Miczek, K. A. (2009). Glutamatergic and GABAergic modulations of ultrasonic vocalizations during maternal separation distress in mouse pups. *Psychopharmacology, 204*(1), 61–71.

<https://doi.org/10.1007/s00213-008-1437-8>

- Tan, D. H., Peng, S. Q., Wu, Y. L., Wang, Y. M., Lu, C. F., & Yan, C. H. (2009). Chronic organophosphate (OP)-induced neuropsychiatric disorder is a withdrawal syndrome. *Medical Hypotheses*, *72*(4), 405–406. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.11.026>
- Taylor, E. L., Holley, A. G., & Kirk, M. (2007). Pesticide Development. *Southern Regional Extension Forestry*, *10*, 1–7.
- Tebartz Van Elst, L., Maier, S., Fangmeier, T., Endres, D., Mueller, G. T., Nickel, K., Ebert, D., Lange, T., Hennig, J., Biscaldi, M., Riedel, A., & Perlov, E. (2014). Disturbed cingulate glutamate metabolism in adults with high-functioning autism spectrum disorder: Evidence in support of the excitatory/inhibitory imbalance hypothesis. *Molecular Psychiatry*, *19*(12), 1314–1325. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.62>
- Testai, E., Buratti, F. M., & Di Consiglio, E. (2010). Chlorpyrifos. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1505–1526). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00070-7>
- Tian, J., Dai, H., Deng, Y., Zhang, J., Li, Y., Zhou, J., Zhao, M., Zhao, M., Zhang, C., Zhang, Y., Wang, P., Bing, G., & Zhao, L. (2015). The effect of HMGB1 on sub-toxic chlorpyrifos exposure-induced neuroinflammation in amygdala of neonatal rats. *Toxicology*, *338*, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.10.010>
- Tian, Y., Ishikawa, H., Yamaguchi, T., Yamauchi, T., & Yokoyama, K. (2005). Teratogenicity and developmental toxicity of chlorpyrifos: Maternal exposure during organogenesis in mice. *Reproductive Toxicology*, *20*(2), 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.01.012>
- Tillman, K. K., Hakelius, M., Höijer, J., Ramklint, M., Ekselius, L., Nowinski, D., & Papadopoulos, F. C. (2018). Increased Risk for Neurodevelopmental Disorders in Children With Orofacial Clefts. *Journal of the American Academy of Child and*

Adolescent Psychiatry, 57(11), 876–883. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2018.06.024>

Timofeeva, O. A., & Gordon, C. J. (2001). Changes in EEG power spectra and behavioral states in rats exposed to the acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos and muscarinic agonist oxotremorine. *Brain Research*, 893(1–2), 165–177.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03309-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03309-6)

Timofeeva, O. A., & Gordon, C. J. (2002). EEG spectra, behavioral states and motor activity in rats exposed to acetylcholinesterase inhibitor chlorpyrifos. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72(3), 669–679. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)00737-2](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)00737-2)

Treit, D., & Fundytus, M. (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 31(4), 959–962.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(88\)90413-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(88)90413-3)

Tripi, G., Roux, S., Matranga, D., Maniscalco, L., Glorioso, P., Bonnet-Brilhault, F., & Roccella, M. (2019). Cranio-Facial Characteristics in Children with Autism Spectrum Disorders (ASD). *Journal of Clinical Medicine*, 8(5), 641.
<https://doi.org/10.3390/jcm8050641>

Tsuji, C., Fujisaku, T., & Tsuji, T. (2020). Oxytocin ameliorates maternal separation-induced ultrasonic vocalisation calls in mouse pups prenatally exposed to valproic acid. *Journal of Neuroendocrinology*, 32(4). <https://doi.org/10.1111/jne.12850>

Tung, E. W., & Winn, L. (2011). Valproic acid increases formation of reactive oxygen species and induces apoptosis in postimplantation embryos: A role for oxidative stress in valproic acid-induced neural tube. *Molecular Pharmacology*, 6(6), 979–987.
<https://doi.org/10.1124/mol.111.072314.such>

Tyszka, J. M., Kennedy, D. P., Paul, L. K., & Adolphs, R. (2014). Largely typical patterns of resting-state functional connectivity in high-functioning adults with autism. *Cerebral*

Cortex, 24(7), 1894–1905. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht040>

Tyzio, R., Nardou, R., Ferrari, D. C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., Lemonnier, E., Lozovaya, N., Burnashev, N., & Ben-Ari, Y. (2014). Oxytocin-Mediated GABA Inhibition During Delivery Attenuates Autism Pathogenesis in Rodent Offspring. *Science*, 343(6171), 675–679.
<https://doi.org/10.1126/science.1247190>

Tyzio, Roman, Nardou, R., Ferrari, D. C., Tsintsadze, T., Shahrokhi, A., Eftekhari, S., Khalilov, I., Tsintsadze, V., Brouchoud, C., Chazal, G., Lemonnier, E., Lozovaya, N., Burnashev, N., & Ben-Ari, Y. (2014). Oxytocin-mediated GABA inhibition during delivery attenuates autism pathogenesis in rodent offspring. *Science*, 343(6171), 675–679. <https://doi.org/10.1126/science.1247190>

Tzanoulinou, S., Riccio, O., De Boer, M. W., & Sandi, C. (2014). Peripubertal stress-induced behavioral changes are associated with altered expression of genes involved in excitation and inhibition in the amygdale. *Translational Psychiatry*, 4.
<https://doi.org/10.1038/tp.2014.54>

U.S. Department of health and human services. (1997). *Toxicological Profile for Chlorpyrifos*. file:///E:/Descargas/cdc_6297_DS1.pdf

Umka, J. (2010). *The control of adult neural stem cell proliferation and cognition by valproic acid* (Issue October) [University of Nottingham].
<http://eprints.nottingham.ac.uk/29337/1/523458.pdf>http://eprints.nottingham.ac.uk/end_user_agreement.pdf

Venerosi, A., Ricceri, L., Tait, S., & Calamandrei, G. (2012). Sex dimorphic behaviors as markers of neuroendocrine disruption by environmental chemicals: The case of chlorpyrifos. *NeuroToxicology*, 33(6), 1420–1426.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.08.009>

- Venerosi, Aldina, 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>
- Venerosi, Aldina, Ricceri, L., Rungi, A., Sanghez, V., & Calamandrei, G. (2010). Gestational exposure to the organophosphate chlorpyrifos alters social-emotional behaviour and impairs responsiveness to the serotonin transporter inhibitor fluvoxamine in mice. *Psychopharmacology*, *208*(1), 99–107. <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1713-2>
- Venerosi, Aldina, Ricceri, L., Scattoni, M. L., & Calamandrei, G. (2009). Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behavior and ultrasonic vocalization in cd-1 mouse pups. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-12>
- Venerosi, Aldina, Tait, S., Stecca, L., Chiarotti, F., De Felice, A., Cometa, M. F., Volpe, M. T., Calamandrei, G., & Ricceri, L. (2015). Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring - A mouse study. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0019-6>
- Vignoli, A., Tenori, L., Giusti, B., Takis, P. G., Valente, S., Carrabba, N., Balzi, D., Barchielli, A., Marchionni, N., Gensini, G. F., Marcucci, R., Luchinat, C., & Gori, A. M. (2019). NMR-based metabolomics identifies patients at high risk of death within two years after acute myocardial infarction in the AMI-Florence II cohort. *BMC Medicine*, *17*(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1240-2>
- Vogel, A. P., Tsanas, A., & Scattoni, M. L. (2019). Quantifying ultrasonic mouse vocalizations using acoustic analysis in a supervised statistical machine learning framework. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44221-3>

- Vorhees, C. V. (1987). Behavioral teratogenicity of valproic acid: selective effects on behavior after prenatal exposure to rats. *Psychopharmacology*, *92*(2), 173–179. <https://doi.org/10.1007/BF00177911>
- Walcott, E. C., Higgins, E. A., & Desai, N. S. (2011). Synaptic and intrinsic balancing during postnatal development in rat pups exposed to valproic acid in utero. *Journal of Neuroscience*, *31*(37), 13097–13109. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1341-11.2011>
- Walker, E. D., & Stachecki, J. A. (2002). *Livestock Pest Management: A Training Manual for Commercial Pesticide Applicators (Category 1D)*. 460–462. https://www.canr.msu.edu/ipm/uploads/files/TrainingManuals_Livestock/Livestock_WholeManual.pdf
- Wang, C. C., Lin, H. C., Chan, Y. H., Gean, P. W., Yang, Y. K., & Chen, P. S. (2013). 5-HT_{1A}-receptor agonist modified amygdala activity and amygdala-Associated social behavior in a valproate-induced rat autism model. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(9), 2027–2039. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000473>
- Wang, L., Almeida, L. E. F., Spornick, N. A., Kenyon, N., Kamimura, S., Khaibullina, A., Nouraie, M., & Quezado, Z. M. N. (2015). Modulation of social deficits and repetitive behaviors in a mouse model of autism: The role of the nicotinic cholinergic system. *Psychopharmacology*, *232*(23), 4303–4316. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4058-z>
- Wang, P., Xie, K., Wang, C., & Bi, J. (2014). Oxidative stress induced by lipid peroxidation is related with inflammation of demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *European Neurology*, *72*, 249–254. <https://doi.org/10.1159/000363515>
- Wei, H., Chadman, K. K., McCloskey, D. P., Sheikh, A. M., Malik, M., Brown, W. T., & Li, X. (2012). Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates

autism-like behaviors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(6), 831–842. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.01.011>

Wei, R., Li, Q., Lam, S., Leung, J., Cheung, C., Zhang, X., Sham, P. C., Chua, S. E., & McAlonan, G. M. (2016). A single low dose of valproic acid in late prenatal life alters postnatal behavior and glutamic acid decarboxylase levels in the mouse. *Behavioural Brain Research*, 314, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.006>

Weinstein-Fudim, L., Ergaz, Z., Turgeman, G., Yanai, J., Szyf, M., & Ornoy, A. (2019). Gender related changes in gene expression induced by valproic acid in a mouse model of autism and the correction by s-adenosyl methionine. Does it explain the gender differences in autistic like behavior? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215278>

Weller, A., Leguisamo, A. C., Towns, L., Ramboz, S., Bagiella, E., Hofer, M., Hen, R., & Brunner, D. (2003). Maternal effects in infant and adult phenotypes of 5HT1A and 5HT1B receptor knockout mice. *Developmental Psychobiology*, 42(2), 194–205. <https://doi.org/10.1002/dev.10079>

Wellmann, K. A., Varlinskaya, E. I., & Mooney, S. M. (2014). D-Cycloserine ameliorates social alterations that result from prenatal exposure to valproic acid. *Brain Research Bulletin*, 108, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2014.08.001>

Wells, P. G., Mccallum, G. P., Chen, C. S., Henderson, J. T., Lee, C. J. J., Perstin, J., Preston, T. J., Wiley, M. J., & Wong, A. W. (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: Teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. In *Toxicological Sciences* (Vol. 108, Issue 1, pp. 4–18). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn263>

Williams, A. L., & Desesso, J. M. (2014a). Gestational/Perinatal chlorpyrifos exposure is not associated with autistic-like behaviors in rodents. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 44, Issue 6, pp. 523–534). Informa Healthcare.

<https://doi.org/10.3109/10408444.2014.907772>

Williams, A. L., & Desesso, J. M. (2014b). Gestational/Perinatal chlorpyrifos exposure is not associated with autistic-like behaviors in rodents. In *Critical Reviews in Toxicology* (Vol. 44, Issue 6, pp. 523–534). <https://doi.org/10.3109/10408444.2014.907772>

Wöhr, M., Houx, B., Schwarting, R. K. W., & Spruijt, B. (2008). Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiology & Behavior*, *93*(4–5), 766–776. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.11.031>

Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2008). Maternal Care, Isolation-Induced Infant Ultrasonic Calling, and Their Relations to Adult Anxiety-Related Behavior in the Rat. *Behavioral Neuroscience*, *122*(2), 310–330. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.2.310>

Wu, H. F., Chen, Y. J., Chu, M. C., Hsu, Y. T., Lu, T. Y., Chen, I. T., Chen, P. S., & Lin, H. C. (2018). Deep brain stimulation modified autism-like deficits via the serotonin system in a valproic acid-induced rat model. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092840>

Wu, H., Wang, X., Gao, J., Liang, S., Hao, Y., Sun, C., Xia, W., Cao, Y., & Wu, L. (2017). Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life Sciences*, *173*, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.01.012>

Yamaguchi, H., Hara, Y., Ago, Y., Takano, E., Hasebe, S., Nakazawa, T., Hashimoto, H., Matsuda, T., & Takuma, K. (2017). Environmental enrichment attenuates behavioral abnormalities in valproic acid-exposed autism model mice. *Behavioural Brain Research*, *333*, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.035>

Yu, K. K., Cheung, C., Chua, S. E., & McAlonan, G. M. (2011). Can asperger syndrome be distinguished from autism? An anatomic likelihood meta-analysis of MRI studies.

Journal of Psychiatry and Neuroscience, 36(6), 412–421.

<https://doi.org/10.1503/jpn.100138>

Zhang, J., Dai, H., Deng, Y., Tian, J., Zhang, C., Hu, Z., Bing, G., & Zhao, L. (2015).

Neonatal chlorpyrifos exposure induces loss of dopaminergic neurons in young adult rats. *Toxicology*, 336, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.07.014>

Zhang, R., Xu, X. J., Zhang, H. F., Han, S. P., & Han, J. S. (2017). The role of the oxytocin/arginine vasopressin system in animal models of autism spectrum disorder. In *Advances in Anatomy Embryology and Cell Biology* (Vol. 224, pp. 135–158). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-319-52498-6_8

Zhang, W., Jiang, F., & Ou, J. (2011). Global pesticide consumption and pollution : with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(2), 125–144.

<http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2011-1%282%29/Global-pesticide-consumption-pollution.pdf>

Zhao, M. W., Yang, P., & Zhao, L. L. (2019). Chlorpyrifos activates cell pyroptosis and increases susceptibility on oxidative stress-induced toxicity by miR-181/SIRT1/PGC-1 α /Nrf2 signaling pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Implication for association between chlorpyrifos and Parkinson's . *Environmental Toxicology*, 34(6), 699–707. <https://doi.org/10.1002/tox.22736>

Zieminska, E., Toczyłowska, B., Diamandakis, D., Hilgier, W., Filipkowski, R. K., Polowy, R., Orzel, J., Gorka, M., & Lazarewicz, J. W. (2018). Glutamate, Glutamine and GABA Levels in Rat Brain Measured Using MRS, HPLC and NMR Methods in Study of Two Models of Autism. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11.

<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00418>

Zimcikova, E., Simko, J., Karesova, I., Kremlacek, J., & Malakova, J. (2017). Behavioral

effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open-field test? *Seizure*, 52, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2017.09.015>