Aproximación comportamental y glutamatérgica de un modelo de roedor del trastorno del espectro autista por exposición prenatal a ácido valproico.

Johana Andrea Moreno Avendaño

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia

2022

Aproximación comportamental y glutamatérgica de un modelo de roedor del Trastorno del espectro Autista por exposición prenatal a Ácido Valproico.

Johana Andrea Moreno Avendaño

Trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Neurociencias

Directora

Zulma Dueñas, Lic. Biol., MSc., Ph.D.

Codirector

Luis Fernando Cárdenas Parra, MSc., Ph.D. Profesor Titular Departamento Psicología, Universidad de los Andes

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia

2022

No es grande aquel que siempre triunfa,

sino el que jamás se desalienta.

(José Luis Martin Descalzo)

AGRADECIMIENTOS

- A la profesora ZULMA DUEÑAS GÓMEZ, profesora Titular de la Facultad de Medicina, por la dirección de este trabajo, por su apoyo y confianza constante.
- Al profesor LUIS FERNANDO CÁRDENAS, por su confianza y apoyo. Por proveer además de su conocimiento y experiencia, la posibilidad de aprender en las instalaciones de su laboratorio y su grupo de investigación.
- A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, especialmente al laboratorio de neurofisiología, por convertirse en el lugar de horas de trabajo y aprendizaje.
- Al bioterio de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a Joan Camilo Cortés Pinto y Arturo Cortés Tovar, por su valioso apoyo y su experiencia, entrega y compromiso con mi trabajo.
- Al laboratorio neurociencia y comportamiento de la Universidad de los Andes, por amablemente abrir sus puertas y permitirme aprender cuanto fue posible.
- A Yaneth Camargo, técnico del laboratorio de la Universidad de los Andes, por sus enseñanzas y sugerencias.
- A mis compañeros y amigos del grupo de Neurociencias de la Universidad Nacional de Colombia, especialmente Julián Naizaque por su apoyo durante la realización de los experimentos de Western Blot.
- A mi familia, mis amigos y todos aquellos que siempre creyeron en mí y mis proyectos. A quienes se alegraron de mis éxitos y me alentaron cuando las cosas no parecían ser tan fáciles. A la voz de aliento que siempre me mantuvo firme.
- A mis pacientes, quienes siempre me seguirán inspirando.

RESUMEN

Aproximación comportamental y glutamatérgica de un modelo de roedor del Trastorno del espectro Autista por exposición prenatal a Ácido Valproico.

El trastorno del espectro autista (TEA) es considerado un desorden en el neurodesarrollo caracterizado por déficit en la interacción social, la comunicación y presencia de comportamientos repetitivos y estereotipados. Se estima que aproximadamente un 16 % de la población menor de 15 años en Colombia padece algún tipo de trastorno del desarrollo, entre ellos los TEA. Colombia no cuenta con cifras oficiales que establezcan la prevalencia en el país de este trastorno. Estudios post-mortem y de imagenología diagnóstica se han aproximado a la neurobiología subyacente del TEA, sin embargo, los modelos animales permiten la exploración en detalle y en un entorno controlado de los mediadores neuroanatómicos, neurofisiológicos y moleculares, relacionados con el fenotipo del trastorno. La evidencia sugiere que los factores ambientales y las interacciones genético-ambientales contribuyen a la etiología del autismo, por ejemplo, la exposición prenatal a ácido Valpróico (por sus siglas en inglés: VPA), se asocia con una alta incidencia de autismo en los nacidos; de hecho, la embriogénesis temprana como periodo crítico para el desarrollo de trastornos del neurodesarrollo sustenta el desarrollo de biomodelos que emulan la complejidad fenotípica de la enfermedad. Teniendo en cuenta el potencial uso del modelo inducido por exposición prenatal al VPA para dilucidar aspectos biológicos y conductuales de la enfermedad en humanos, esta investigación pretendió describir los patrones morfológicos, comportamentales y moleculares de las crías de ratas hembra Wistar tratadas con una única dosis de 500 mg/Kg de VPA en el día 12.5 de gestación en comparación con controles expuestos a solución salina. Nuestros resultados evidencian una alta tasa de reabsorción fetal de las hembras tratadas, sin embargo, los embriones expuestos a VPA que sobrevivieron mostraron cambios neuroanatómicos, morfológicos y

alteraciones comportamentales significativas respecto al grupo control. Se halló aumento en el número de nacidos con malformaciones físicas, defectos en la formación falanges, longitud y forma de la cola y casos esporádicos de cromodacriorrea, mientras que las pruebas comportamentales revelan alteraciones en la sociabilidad y repetitividad, comportamientos típicos del fenotipo autista humano. Los resultados de esta investigación sustentan el uso experimental del biomodelo de autismo por exposición prenatal al VPA, demuestran la validez aparente y de constructo del modelo y su potencial utilidad para el desarrollo de futuras líneas de investigación que profundicen aspectos clave en la compresión de la neurobiología del TEA y el hallazgo de blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad.

Palabras clave: Autismo, Trastorno del espectro autista, Acido valproico, Modelo animal, Déficit comportamental, Glutamato. NMDA, VPA, TEA.

ABSTRACT

Behavioral and glutamatergic approach of a rodent model of autism spectrum disorder exposed to valproic acid prenatal.

Autism Spectrum Disorder (ASD) is considered a neurodevelopmental disorder characterized by deficits in social interaction, communication, and the presence of repetitive and stereotyped behaviors. It is estimated that approximately 16% of the population under 15 years of age in Colombia will suffer from some type of developmental disorder, including ASD. Colombia does not have official figures that established the prevalence of this disorder in the country. On the other hand, post-mortem and diagnostic imaging studies have come closer to the underlying neurobiology of ASD, however, animal models allow the exploration in detail and in a controlled environment of the neuroanatomical, neurophysiological, and molecular mediators related to the phenotype of the disorder. Evidence suggests that environmental factors and gene-environment interactions contribute to the etiology of autism, for example, prenatal exposure to valproic acid (VPA) is associated with a high incidence of autism in newborns; in fact, early embryogenesis as a critical period for the development of neurodevelopmental disorders supports the development of biomodels that emulate the phenotypic complexity of the disease. Considering the potential use of the model induced by prenatal exposure to VPA to elucidate biological and behavioral factors of the disease in humans, this research aimed to describe the morphological, behavioral and molecular patterns of the offspring of female Wistar rats treated with a single dose of 500 mg/Kg VPA on day 12.5 of gestation compared to controls exposed to saline. Our results show a high rate of fetal resorption of the treated females, however, the embryos exposed to VPA that survived showed significant neuroanatomical, morphological, and behavioral changes compared to the control group. An increase in the number of babies born with physical malformations, defects in phalangeal formation, tail length and shape, and sporadic cases of chromodacryorrhea were found, while behavioral tests revealed alterations

in sociability and repetitiveness, typical behaviors of the human autistic phenotype. The results of this research support the experimental use of the biomodel of autism due to prenatal exposure to VPA, demonstrate the apparent and construct validity of the model and its potential usefulness for the development of future lines of research that deepen key aspects in the understanding of neurobiology of ASD and the finding of therapeutic targets for the treatment of the disease.

Keywords: Autism, Autism spectrum disorder, Valproic acid, Animal Model, Behavioral deficit, Glutamate, NMDA, VPA, ASD.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....xiv
LISTA DE IMÁGENES xv
LISTA DE TABLAS.....xvi
LISTA DE ABREVIACIONES.....xvii
1. INTRODUCCIÓN 19
2. OBJETIVOS 21
2.1. Objetivo general..... 21
2.2. Objetivos específicos 21
3. MARCO TEÓRICO 22
3.1. Definición y etiología de Trastorno del espectro autista 22
3.2. Exposición ambiental y etiología del TEA 25
3.3. Modelo animal de TEA por exposición intrauterina a VPA..... 27
3.4. Alteración del metabolismo glutamatérgico en el TEA 30
3.5. Disfunción sináptica mediada por subunidades del NMDAR en el TEA..... 37
4. MATERIALES Y MÉTODOS..... 40
4.1.1. Diseño experimental 40
4.2. Sujetos experimentales..... 41
4.2.1. Fase pre – experimental..... 42
4.2.2. Estandarización del protocolo para técnica de citología vaginal 42
4.2.3. Estandarización del biomodelo para Inducción de autismo por exposición prenatal a VPA 42
4.3. Fase experimental 44
4.3.1. inducción de autismo por exposición *in útero* a VPA 44
4.3.2. Caracterización morfológica de la progenie expuesta in útero a VPA..... 45

4.3.3. Caracterización comportamental de la progenie expuesta in útero a VPA 45
4.3.4. Caracterización del perfil molecular de la subunidad NR2B 48
4.4. Consideraciones éticas 50

5. RESULTADOS 51
5.1. Impacto De La Exposición Intrauterina Al Ácido Valproico En La Preñez Y Natalidad 51

5.2. Impacto De La Exposición Intrauterina Al Ácido Valproico En La y Morfología De Las Crías De Hembras Gestantes Tratadas. 56

5.3. Impacto De La Exposición Intrauterina Al Ácido Valproico En La Sociabilidad 62

5.4. Impacto De La Exposición Intrauterina Al Ácido Valproico En El Aumento De Comportamientos Repetitivos Y Estereotipados 65

5.5. Nivel de expresión de la subunidad NR2B en cerebro ratas expuestas prenatalmente a VPA .. 67

6. DISCUSIÓN 71
6.1. Recomendaciones y propuestas futuras 82

7. CONCLUSIONES 83
7.1. Impacto alcanzado 83

8. ANEXOS 85
Anexo A. Protocolo Determinación De Las Fases Del Ciclo Estral En Ratas Wistar 85

Anexo B. Protocolo Para La Inducción De Un Biomodelo De Autismo Por Exposición Prenatal Al Ácido Valproico En Ratas Wistar 87

Anexo C. Protocolo Para La Prueba De Interacción Social De Tres Cámaras En Ratas Wistar 90

Anexo D. Protocolo Para La Prueba De Auto – Acicalamiento En Ratas Wistar 94

Anexo E. Protocolo Para Eutanasia Por Decapitación 97

Anexo F. Protocolo de extracción de tejido para ensayos moleculares 97

Anexo G. Protocolo de homogenización de tejidos RIPA BUFFER (Alfa aesar) 98

Anexo H. Protocolo Cuantificación Proteínas Pierce 66º nm Microplacas 96 pozos 99

Anexo I. Protocolo de western blot para la subunidad NR2B del RMNDA 102

Anexo J. Acta de aprobación comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia 108

9. REFERENCIAS 110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dominios e interacciones proteicas establecidas por el NMDAR. 35

Figura 2. Protocolo experimental 41

Figura 3. Protocolo para la Inducción de autismo por exposición prenatal a VPA. 43

Figura 4. Aparato para prueba de interacción social. 47

Figura 5. Efecto en la reabsorción fetal de hembras expuestas a una dosis de 500 mg/kg y 600 mg/kg. . 52

Figura 6. Efecto de la exposición a VPA (500 mg/kg) en la ganancia de peso corporal de hembras gestantes respecto al grupo control. 53

Figura 7. Efecto de la exposición intrauterina al VPA (500mg/kg) en la gestación y natalidad. 55

Figura 8. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la morfología de las colas. 57

Figura 9. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la sociabilidad. 63

Figura 10. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en el aumento de comportamientos repetitivos y estereotipados 66

Figura 11. Revelado de membrana de Western Blot, para la subunidad NR2B del NMDAR. 68

Figura 12. Membrana posterior al protocolo de transferencia, teñida con rojo Ponceau. 69

Figura 13. Revelado de membrana sometida a protocolo de Dot Blot, para la subunidad NR2B del NMDAR. 70

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la morfología de las colas de sujetos experimentales. 59

Imagen 2. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la morfología de las colas de sujetos experimentales 60

Imagen 3. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la morfología de falanges de sujetos experimentales. 61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Observaciones morfológicas después de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg). 57

LISTA DE ABREVIACIONES

AMPAR: Receptor α-amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazol propiónico

cPFM: Córtex Prefrontal Medial

CTRL: Grupo Control, expuesto a solución salina

DSM: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

DPN: Dia post natal, periodo de vida fuera del útero.

fRM: Resonancia Magnética Funcional

G: Día de gestación

GluN1: Subunidad N1 del receptor de Glutamato

GluN2: Subunidad N2 del receptor de Glutamato

GluN3: Subunidad N3 del receptor de Glutamato

GluR: Receptores de glutamato

HDAC: Histonas deacetilasas

iGluR: Receptores Ionotrópicos De Glutamato

LTP: Potenciación a largo plazo (Long Term Potentiation)

LTD: Depresión a largo plazo (Long Term Depression)

mGluR: Receptores metabotrópicos de glutamato

NMDAR: Receptores N-metil-D-aspartato

PCR: Reacción en Cadena de la Polimersa (Polymerase Chain Reaction)

SFV: Síndrome Fetal por Valproato

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

TEA: Trastorno del espectro autista

VPA: Ácido Valpróico

1. INTRODUCCIÓN

El autismo y el trastorno del espectro autista comprenden una amplia gama de condiciones que afectan la comunicación y el comportamiento social de un individuo. Debido a la variabilidad en el fenotipo conductual del trastorno entre pacientes, se ha establecido el término trastorno del espectro autista (TEA). Aunque la evidencia señala un vínculo genético con la presencia de la enfermedad, tan solo entre el 10 – 20% de TEA se vincula con mutaciones específicas, síndromes genéticos y/o presencia en variación del número de copias (Vorstman et al., 2017). Si bien el modelo genético más popular para el autismo es la herencia poligénica, la heterogeneidad observada en la neuropatología y el fenotipo comportamental sugiere una fuerte relación entre factores ambientales e interacciones genético-ambientales que contribuyen a la etiología del autismo.

Actualmente la prevalencia del TEA oscila entre el 1-2 % de la población mundial, en países como Estados Unidos, según el centro de control y prevención de enfermedades, (CDC, por sus siglas en ingles Center for Disease Control and Prevention), aproximadamente 1 en cada 54 nacidos es diagnosticado con TEA, cifra que entre el 2000 y 2010 aumentó un 119.4 por ciento. Se estima que aproximadamente un 16 % de la población menor de 15 años en Colombia padece algún tipo de trastorno del desarrollo, entre ellos los trastornos del espectro autista; sin embargo, Colombia no cuenta con cifras oficiales que establezcan la prevalencia en el país de este trastorno (Ministerio de salud de Colombia, 2015) . A pesar de la creciente prevalencia mundial, este sigue siendo un trastorno de lenta exploración farmacológica y con una fisiopatología no del todo consolidada. La exploración de los múltiples mecanismos fisiopatológicos que subyacen a la enfermedad es clave para identificar blancos terapéuticos y proponer estrategias efectivas de intervención que mejoren el panorama clínico y de salud pública mundial.

La experimentación con modelos murinos forma parte de una alternativa real de investigación, fundamental para generar avances transcendentales en las ciencias de salud y el bienestar humano. El uso de biomodelos puede apoyar la evidencia epidemiológica que revela la interacción entre las exposiciones químicas ambientales y el TEA. Los modelos animales, permiten la investigación de los complejos eventos neurobiológicos que ocurren durante las primeras etapas del neurodesarrollo, que puede resultar etiológicamente importante para el abordaje del autismo. La embriogénesis temprana como periodo crítico para la inducción de los trastornos del neurodesarrollo, en específico para el autismo, facilita el desarrollo de modelos que emulan la complejidad fenotípica de la enfermedad; la exposición a agentes teratógenos ha sido empleada para modelar los signos principales del TEA e identificar las vías moleculares vinculadas a la enfermedad.

Los modelos animales, son importantes para la comprensión de la etiología y la patogénesis de cualquier enfermedad humana, incluido el TEA. Diversas investigaciones son compatibles con la premisa de que el modelo del TEA inducido por VPA posee alta validez predictiva y de constructo. Ratas y ratones son particularmente útiles para modelar trastornos del neurodesarrollo en los que comportamientos sociales inusuales son componentes principales. Estas especies sociales poseen un amplio repertorio de comportamientos que van desde la crianza y la anidación de sus crías y el juego juvenil, hasta el comportamiento sexual y agresivo en la adultez.

Por otro lado, debido al comportamiento epidemiológico mundial de la enfermedad y la escasa investigación actual en nuestro país; es necesario estandarizar un modelo experimental con el fin de comprender la interacción entre los fenómenos neurobiológicos que subyacen al trastorno y la presencia de fenotipos comportamentales identificables en el modelo. Este proyecto buscó dar apertura a una línea de investigación de neurodesarrollo, en la cual se estandarizó y validó el protocolo para inducción del

autismo por exposición prenatal a VPA. Esta investigación pretendía aproximarse a niveles de abordaje comportamental y molecular, indagando la relación entre la disfunción en la expresión la subunidad conformacional NR2B del NMDAR y la presencia de fenotipos comportamentales asociados al TEA, datos que revelaran aspectos importantes desde enfoques tanto fisiopatológicos como farmacológicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

- Evaluar en un biomodelo del TEA, inducido por exposición prenatal a VPA, respuestas comportamentales y cambios en la expresión proteica de la subunidad NR2B de los NMDARs.

2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo para la inducción del biomodelo TEA a través de la exposición prenatal a VPA, que cumpla con las características descritas por grupos de investigación internacional.
- Identificar los fenómenos de sociabilidad, estereotipación y repetitividad en el modelo de TEA, por medio de dos baterías comportamentales (Prueba de sociabilidad de tres cámaras y prueba de auto acicalamiento).
- Identificar mediante la técnica de Wester Blot, cambios en la expresión proteica de las subunidades conformacionales NR2B del NMDAR en tejido cerebral de progenie de ratas de cepa Wistar expuestas prenatalmente a VPA.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Definición y etiología de Trastorno del espectro autista

El **Trastorno del Espectro Autista (TEA)** se define como un grupo de alteraciones generalizadas del neurodesarrollo, caracterizado por déficit persistente en la interacción social, la comunicación y comportamientos e interés restrictivos, repetidos y estereotipados. Dentro del cuadro clínico se contemplan dificultades en la reciprocidad social y emocional, déficit en las conductas comunicativas no verbales, dificultad para desarrollar y mantener relaciones apropiadas. Una proporción importante de pacientes muestran síntomas concomitantes como hipo o hiperreactividad a estímulos sensoriales auditivos o táctiles, comportamientos agresivos y epilepsia. (Grzadzinski et al., 2013). Los síntomas han de estar presentes en las primeras fases del período de desarrollo, pero pueden no manifestarse totalmente hasta que la demanda social supera las capacidades limitadas o pueden estar enmascarados por estrategias aprendidas en fases posteriores de la vida (Baronio, Castro, Gonchoroski, de Melo, Nunes, et al., 2015). En cuanto al funcionamiento cognitivo, los individuos con TEA muestran amplia variedad fenotípica que va desde discapacidad intelectual severa hasta niveles de inteligencia superior. Sin embargo, estos síntomas frecuentemente cambian con relación a la edad del individuo, (Grzadzinski et al., 2013). Un amplio porcentaje de individuos con TEA presenta deficiencias en el lenguaje y problemas de hiperactividad durante la primera infancia, pero experimentan dificultades con las relaciones interpersonales y la regulación emocional durante la adolescencia (Nazeer & Ghaziuddin, 2012).

Las primeras descripciones consolidadas como relevantes, sobre lo que actualmente se denominan trastornos del espectro autista corresponden a las publicaciones de Leo (Kanner, 1944) y Hans Asperger (1944). El cuadro clínico bajo el cual se relataron los primeros casos de pacientes diagnosticados con **psicopatía autista**, término empleado para aquel entonces, conserva aspectos clínicos esenciales del

autismo los cuales hoy día se exploran y contemplan como criterios de diagnóstico por el DSM (Diagnostic and statistical manual of mental disorders). La compilación de las características de los pacientes descritos por Kanner tanto como por Asperger se reduce a un patrón de conducta caracterizado por falta de empatía, ingenuidad, poca habilidad para hacer amigos, lenguaje pedante o repetitivo, pobre comunicación no verbal, interés desmesurado por ciertos temas, torpeza motora y mala coordinación (Artigas-Pallares & Paula, 2012). En 1980, 35 años después de la primera descripción clínica del TEA, la tercera publicación del DSM incorpora el autismo como categoría diagnóstica específica, una entidad única denominada *autismo infantil.* Para el año 2000, gracias a avances en la caracterización fenotípica de la enfermedad, se definen 5 categorías del espectro autista: trastorno autista, trastorno de Asperger, síndrome de Rett, trastorno desintegrativo infantil y trastorno generalizado del desarrollo no específico. Una vez definida esta caracterización, se incorpora el término de *trastornos generalizados del desarrollo* como denominación genérica para englobar los subtipos de autismo. La edición vigente del DSM, publicada el 18 de mayo del 2013, consolida conceptualmente el autismo y sustituye la denominación de trastornos generalizados del desarrollo por la de **Trastorno del Espectro Autista (TEA)** (Artigas-Pallares & Paula, 2012).

La prevalencia del TEA se estima la entre el 1 - 2% de la población mundial, siendo 4.3 veces más común en hombres (1 en cada 42) que en mujeres (1 en cada 160). Para 2016, en países como Estados Unidos la prevalencia estimada del TEA fue de 18.5 por 1.000 (1 por cada 54 nacidos), cifra que entre el 2000 y 2010 aumentó un 119.4 por ciento. Más de 3.5 millones de americanos padecen algún desorden del espectro autista, la prestación de servicios para estos individuos tiene un costo anual entre 236 y 262 millones de dólares, unos $ 2.4 millones para pacientes con algún déficit cognitivo o $1.4 millones para una persona sin discapacidad cognitiva, (*Center for Diesease Control and Prevention*, 2015), (*Autism Society*, 2016). La prevalencia del TEA muestra una tendencia hacia el género masculino, muchas

investigaciones sugirieren diversos factores de riesgo y asocian las diferencias de género con: excesos de testosterona fetal, anormalidades ligadas al cromosoma X, anomalías ligadas al cromosoma Y y variaciones *de novo* en el número de copias, sin embargo, ninguna de estas hipótesis explica la predominancia entre los TEA. Las bases biológicas y moleculares que expliquen la tendencia masculina, no se han clarificado del todo y pocos estudios comparan los fenotipos comportamentales y moleculares en diferentes estadios del desarrollo, entre sujetos masculinos y femeninos a la vez (K. C. Kim, Kim, Go, Choi, Park, Kim, Jeon, Dela Pena, et al., 2013).

Respecto a la etiología del TEA, este es un trastorno complejo, variable en el fenotipo expresado y relacionado con una causal heterogénea. Argumentos epidemiológicos apoyan un papel importante de los factores genéticos en la etiología del autismo. El autismo, es definido como un trastorno con patrón de herencia poligénica, en el cual diversos genes interactúan como factores de susceptibilidad al síndrome. Avances en la genética humana han identificado un número significativo de mutaciones que son ampliamente asociadas al TEA, en algunos casos las mutaciones se limitan a un gen específico y resultan en trastornos del neurodesarrollo sindrómicos con características muy penetrantes del autismo, entre las condiciones monogénicas causadas por mutaciones penetrantes que se superponen sintomáticamente el trastorno se incluyen: la duplicación de 15q11-13 (2%), deleciones y duplicaciones de 16p11 (1%), así como los TEA sindrómicos entre los que se incluye el síndrome X frágil (FXS; 3 %), (Ronesi et al., 2012), síndrome de Rett (1%) (Calfa. et. Al., 2012), complejo de esclerosis tuberosa (TSC; 2%) (Kirschstein T.,et. Al, 2012), neurofibromatosis tipo 1 (NF1) (Spooren et al., 2012), síndrome de Angelman (Greer et al., 2010) y el de síndrome de Timothy (Zoghbi & Bear, 2012). Mientras que hasta el 25% de los casos de TEA son identificados por llevar genes únicos heredables o raras mutaciones genéticas, los estudios demográficos sugieren que los factores ambientales durante el período prenatal contribuyen a un aumento de la incidencia de autismo infantil (E. J. Yang et al., 2016).

3.2. Exposición ambiental y etiología del TEA

Si bien el modelo genético más popular para el autismo es la herencia poligénica con múltiples genes que interactúan como factores de susceptibilidad para el síndrome, algunos factores ambientales han sido fuertemente asociados con la neurobiología del trastorno. La evidencia sugiere que los factores ambientales y las interacciones genético-ambientales contribuyen a la etiología del autismo (Belzung et al., 2005). Al menos tres agentes teratógenos han sido ampliamente descritos y relacionados con una o varias características del TEA: la talidomida (Stromland et al., 1994), el etanol (Nanson, 1992) y el ácido Valpróico (Christianson et al, 1994, (Williams & Hersh, 1997), Williams et al, 2001, Rasalam et al, 2005).

El ácido valproico o ácido 2 - propilpentanoico fue descubierto por sus propiedades anticonvulsivantes, prescrito como un estabilizador del ánimo, en el tratamiento de la migraña y actualmente se usa en el ensayo clínico como un agente anti-cáncer Favre et al. (2013). Se dio a conocer como un potente agente teratógeno dado que su exposición durante la gestación incrementa el riesgo de varias malformaciones congénitas en los embriones humanos (Ornoy, 2009). Originalmente se asoció con el incremento del riesgo de lesiones por mielomeningocele, después a una entidad clínica denominada síndrome fetal por valproato (SFV). Síndrome caracterizado por anomalías fenotípicas faciales, déficit en el desarrollo y ocasionalmente perturbaciones orgánicas que comprometían los sistemas respiratorio, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinario y esquelético, entidad denominada (DiLiberti et al., 1984), Meador et al., 2008). La asociación entre SFV y el autismo tuvo implicaciones clínicas cuando se documentó el incremento en la frecuencia de síntomas de autismo en niños diagnosticados con SFV (Christianson et al., 1994; Williams et al., 2001; Williams and Hersh, 1997).

En humanos el VPA causa cambios a corto y largo plazo en la trayectoria del neurodesarrollo, la exposición a VPA durante el primer trimestre de gestación está asociada con una alta incidencia de

autismo en particular, después de la exposición durante el tiempo de cierre del tubo neural y la génesis de células del tronco cerebral (Kemper y Bauman, 1998, Arndt et al, 2005). El 60% de los pacientes diagnosticados con SFV presentan 2 o más características autistas y el 11% desarrolla completamente el trastorno, en promedio el 8.9% de los individuos expuestos a VPA en el útero desarrollan rasgos autistas (Moore, 2000), Rasalam et al., 2005).

Estudios in vitro como in vivo han proporcionado detalles respecto a la manera en que el VPA influye en el neurodesarrollo. Algunos estudios han vinculado la exposición al VPA con defectos en el cierre del tubo neural y otras malformaciones tanto en humanos como animales, incluyendo embriones de pollo tratados in vitro. Los análisis han demostrado defectos del tubo neural dependientes de la dosis, pero el mecanismo de acción teratogénico del VPA sigue siendo poco claro, las hipótesis incluyen interferencia con el metabolismo embrionario de los lípidos, zinc o de los neurotransmisores, alteración en el pH intracelular, interferencia con el metabolismo del folato embrionario, inhibición de la división celular e inhibición de la motilidad celular entre otros (Bennett et al., 2000). Un modelo de cultivo tisular de segmentos de tubo neural de embriones de pollo contribuye a explicar el mecanismo de teratogénesis del VPA relacionado con interferencias en la migración de las células de la cresta neural (CCN) (Fuller et al., 2002), el VPA inhibe la capacidad de los tejidos del tubo neural explantados para adherirse a la superficie de cultivo e iniciar la migración celular, reduciendo sustancialmente el número de células que migran. Así, la acción del VPA altera la transición epitelio mesenquimal desde el tubo neural y desacelera la motilidad de las CCN, lo que podría explicar parcialmente los defectos del tubo neural inducidos por el mismo. Otros estudios, han mostrado la influencia del VPA en los mecanismos de regulación de apoptosis neuronal, específicamente de las células progenitoras neuronales (NPCs, por sus siglas en inglés Neural Progenitor Cells), la disminución en la apoptosis de las células progenitoras neuronales, resulta en hiper-diferenciación neuronal, precedente de crecimiento excesivo y desorganización funcional. La evidencia

sugiere que el VPA puede suprimir la muerte celular de las células progenitoras neuronales a través de la regulación del complejo proteico NF-kB y la expresión de Bcl-XL así, la reducción en la muerte de las células progenitoras neuronales subyace a defectos en el neurodesarrollo como los asociados a SFV y está estrechamente asociado a fenómenos clínicos como el autismo (Go et al., 2011).

3.3. Modelo animal de TEA por exposición intrauterina a VPA

Al igual que cualquier otro modelo animal de un trastorno neurológico, los modelos animales del TEA se desarrollaron para obtener información y hacer predicciones de la condición humana de la enfermedad. Un modelo animal no puede simular en su totalidad un trastorno humano, sin embargo, la mayoría de los síntomas pueden ser reflejados lo suficiente como para permitir un riguroso estudio de las alteraciones moleculares, proteómicas, celulares y/o conductuales de la enfermedad (Favre et al., 2013). El desarrollo e interpretación de un biomodelo para el TEA representa un mayor reto, dado que, no existe una causa conocida ni un biomarcador específico para el trastorno, no obstante, algunos modelos animales se han desarrollado con el fin de dilucidar la neurobiología subyacente del TEA (Roullet et al., 2013).

Todo modelo animal de una condición psiquiátrica descrita en los seres humanos, para ser considerado relevante, debe encajar en varios criterios generalmente descritos como validez de constructo, aparente y predictiva. La validez de constructo se basa principalmente en la identidad de causalidad entre el fenotipo del modelo y la enfermedad humana. La exposición a agentes teratogénicos, como el VPA, en periodos sensibles del neurodesarrollo induce fenotipos asociados a la enfermedad, tanto en humanos como en animales. La validez aparente, implica que el aspecto fenomenológico observado en el animal sea similar al observado en los pacientes, esto podría corresponder a modificaciones neuroanatómicas, neuroquímicas, conductuales y/o cognitivas idénticas o al menos simuladas en el

modelo en comparación con la enfermedad humana. Por último, la validez predictiva significa que los tratamientos que suprimen o reducen algunos de los síntomas de la enfermedad en los seres humanos, también reducen los síntomas que se encuentran en el modelo animal. En este caso los tratamientos eficaces para tratar los síntomas principales del espectro siguen siendo difíciles de alcanzar (Famitafreshi & Karimian, 2018; Palermo & Curatolo, 2004).

El primer modelo animal del TEA inducido por exposición ambiental a un agente teratógeno data de 1996. Rodier y colobaradores usaron una única dosis de 350mg/Kg de VPA vía intraperitoneal en ratas preñadas (Long Evans y Sprague Dawley), esta aproximación reveló por primera vez cambios cerebrales morfológicos significativos en los tejidos de la progenie de ratas tratadas con VPA, lo que consolidó el modelo como un potente referente para el estudio del TEA. (Rodier et al., 1996). Diferentes acercamientos se han realizado en torno a la inducción de un modelo que replique a cabalidad el fenotipo del TEA, sin embargo, el umbral para la aplicación de dosis y el tiempo de exposición para una mayor incidencia de autismo varía de acuerdo con la cepa animal usada y las condiciones propias de cada experimentador. Los rangos de tratamiento de VPA oscilan entre 200 mg a 3600 mg por día en poblaciones de pacientes humanos, la cual equivale a una dosis significativamente inferior a la utilizada en estudios con animales; esta variación se asocia a la diferencia farmacocinética de VPA entre roedores y seres humanos y en particular a la biodisponibilidad, que es mayor en los seres humanos (70-100%) que en roedores (34-47%) (Löscher, 1999). Los estudios más recientes, indican que la exposición a altas dosis de VPA entre 500 mg/kg y 600 mg/kg resultan en un comportamiento autista tanto en ratas como en ratones. Para las ratas se recomienda el tratamiento VPA en el día G12.5, mientras que para los ratones se recomienda durante el periodo comprendido entre el día G9-13, respecto a la frecuencia de exposición a VPA; una distinción importante entre los modelos animales que administran VPA y el tratamiento clínico, es que en los animales una sola exposición a VPA en el útero conduce a cambios en el comportamiento

que se relacionan con los signos principales del trastorno. La progenie resultante de madres expuestas a VPA, revela anormalidades estructurales, funcionales y comportamentales similares a las de los humanos con TEA ((Rodier et. Al., 2009), (Schneider & Przewłocki, 2005), (Banerjee et al., 2013a), incluyendo déficit en la interacción social, aumento en los niveles de ansiedad y anormalidades en la regulación emocional, aprendizaje del miedo (Markram et al., 2008),(Banerjee et al., 2013), dificultad para la integración y percepción de señales auditivas, táctiles y facultades sensoriales como el olfato (Cheaha et al., 2015; Gandal et al., 2010; Mehta et al., 2011).

En contraste a los modelos por exposición ambiental, varios modelos transgénicos que implican genes asociados con el autismo necesitan una mayor exploración (Dufour-Rainfray et al., 2010) (Belzung et. Al., 2005). De hecho, cada gen candidato podría representar un modelo valioso para ser estudiado, teniendo en cuenta que el modelo clásico del autismo es un modelo poligénico, algunos de los modelos basados en el genotipo representan disfunción en el sistema de la oxitocina (Modi & Young, 2012), la vía de señalización Reelin (Lakatosova & Ostatnikova, 2012; Folsom y Fatemi, 2013), la vía canónica de Wnt (Kallkman, 2012), los genes engrailed (Kuemerle et al., 2007), MeCP2 (Gonzales y LaSalle, 2010), neuroligina - 3 (Burrows et al., 2015) y, las neuroliginas 1- 2 (Xu et al., 2012). No obstante, es imperativo resaltar que modificaciones dramáticas en un único gen, podrían ser equivalentes a sutiles cambios en el mismo gen asociado con otros factores genéticos o ambientales y viceversa.

En cuanto a la etiología del TEA, la evidencia señala cierto vínculo genético con la presencia de la enfermedad. Se han identificado alrededor de 60 genes involucrados y aproximadamente 600 variaciones que causan perturbaciones fisiológicas diversas, algunas de las cuales recaen en dos vías comunes: las de función sináptica y las de remodelación cromosómica, lo que sugiere que estos mecanismos básicos podrían subyacer al trastorno (Lee et al., 2015). Entre las proteínas sinápticas involucradas con el TEA se

hallan algunos de los receptores de glutamato, variantes específicas en los genes que codifican para las subunidades del NMDAR se han señalado. El hipotético vínculo entre la disfunción los NMDARs y el TEA, actualmente se basa en un reducido número de estudios clínicos y experimentales.

3.4. Alteración del metabolismo glutamatérgico en el TEA

Los neurotransmisores, como moléculas de señalización neuronal desempeñan un papel importante en el desarrollo normal del cerebro y son necesarios para mantener funciones tales como la memoria, el aprendizaje, el comportamiento y la actividad motora, entre otras. La acción de los neurotransmisores en la sinapsis se regula a través de una serie de mecanismos, que incluyen la remoción del neurotransmisor desde la hendidura sináptica por las células gliales y la recaptación de este por las neuronas que lo han liberado y bloquean el flujo de ligandos para receptores específicos. Por sus características moleculares, los neurotransmisores se clasifican en tres categorías: (1) Aminoácidos (primariamente ácido glutámico, ácido gamma aminobutírico GABA, ácido aspártico y glicina), (2) Péptidos (vasopresina, somatostatina, neurotensina, etc., (3) Monoaminas (Norepinefrina, dopamina y serotonina) y la acetilcolina. Mientras el glutamato regula la transmisión sináptica excitatoria, el ácido γ-aminobutírico (GABA) está implicado en la neurotransmisión inhibitoria. El equilibrio entre la neurotransmisión excitatoria e inhibitoria se mantiene en el cerebro para evitar muchas de las condiciones patológicas.

El glutamato, es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro y ha mostrado estar directamente involucrado en funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje, alteraciones en sus mecanismos de acción, son candidatos potenciales para muchos de los desórdenes neurológicos y psiquiátricos entre los que se incluyen: la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, desordenes emocionales, depresión, epilepsia, ansiedad, estrés y lesiones relacionadas con traumatismos (Rojas,

2015). La función del glutamato en el sistema nervioso central (SNC) está ligada no sólo a las interacciones sinápticas neuronales, sino también a otras funciones, entre ellas la maduración cerebral y la organización cortical. La liberación del glutamato está regulada por los transportadores de glutamato vesicular desde las terminales nerviosas y los astrocitos y también, por mecanismos no vesiculares los cuales ejercen una acción paracrina en la migración neuronal, desempeñando un papel crucial en la formación de la citoarquitectura cerebral a través de su acción de señalización paracrina en el cerebro inmaduro, principalmente porque sus mecanismos de control regulan la sinaptogénesis neuronal. Dicha propiedad morfogénica, atribuida a los neurotransmisores es transitoria y eficaz sólo durante etapas específicas del desarrollo. Por lo que se ha observado, los neurotransmisores y sus receptores hacen su aparición durante etapas tempranas, lo que sugiere que están involucrados en la modulación de procesos clave durante el crecimiento del cono axónico y la sinaptogénesis (Choudhury, Lahiri, & Rajamma, 2012).

Dada la diversidad funcional tanto del glutamato como de sus receptores, se indican en una amplia variedad de alteraciones neurobiológicas y comportamentales asociadas con el TEA. Durante la señalización excitatoria los receptores de glutamato (GluRS) desempeñan un papel relevante en el desarrollo cortical, que probablemente explica su asociación con la patogénesis de ciertos trastornos. Su disrupción es clave, dada su función durante la migración neuronal, la diferenciación, el crecimiento de neuritas, la sinaptogénesis y la supervivencia de las neuronas en el cerebro en desarrollo. Perturbación en las concentraciones de glutamato y disfunción en marcadores periféricos han sido reportados en pacientes autistas. En el 2010 se propuso la teoría hiperglutamatergica en el autismo, en referencia a un conjunto de resultados de aumento en los niveles del aminoácido en muestras de sangre de niños y adultos con el trastorno (Fatemi et al., 2010). Estudios neuropatológicos realizados en cerebros autistas post mortem, también han reportado alteraciones en el metabolismo del glutamato (Purcell, Jeon, Zimmerman, Blue, & Pevsner, 2001), así mismo, cuantificación directa de tejido cerebral mediante

cromatografía líquida de alta resolución ha mostrado elevaciones de glutamato y glutamina en muestras de corteza cingulada anterior de individuos con autismo, altos niveles en plasma y niveles bajos en plaquetas se han hallado, aspectos importantes a tener en cuenta desde enfoques tanto fisiopatológicos como farmacológicos (Moreno Fuenmayor, Borjas, Arrieta, Valera, & Socorro Candanoza, 1996) (Rolf, Haarmann, Grotemeyer, & Kehrer, 1993).

El metabolismo postsináptico del glutamato, los receptores y su composición estructural juegan un papel elemental tanto para el cerebro en desarrollo como en la fisiopatología de TEA. Los GluRs, se distinguen en dos familias según el mecanismo de transmisión de la señal de activación: La familia de los receptores metabotrópicos (mGluRs), constituida por receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas, que modulan la transmisión sináptica mediante la activación de cascadas de señalización intracelular dependientes de segundos mensajeros; y la familia de los receptores ionotrópicos (iGluRs) formada por canales iónicos acoplados a ligando. Los iGluRs son responsables de la hiperpolarización y despolarización de la membrana plasmática neuronal en las sinapsis excitatorias y a su vez se clasifican respecto a su afinidad selectiva por agonistas sintéticos y sus características electrofisiológicas, distinguiéndose tres tipos: receptores AMPA (α-amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazol propiónico), receptores de tipo kainato y receptores N-metil-D-aspartato (NMDAR).

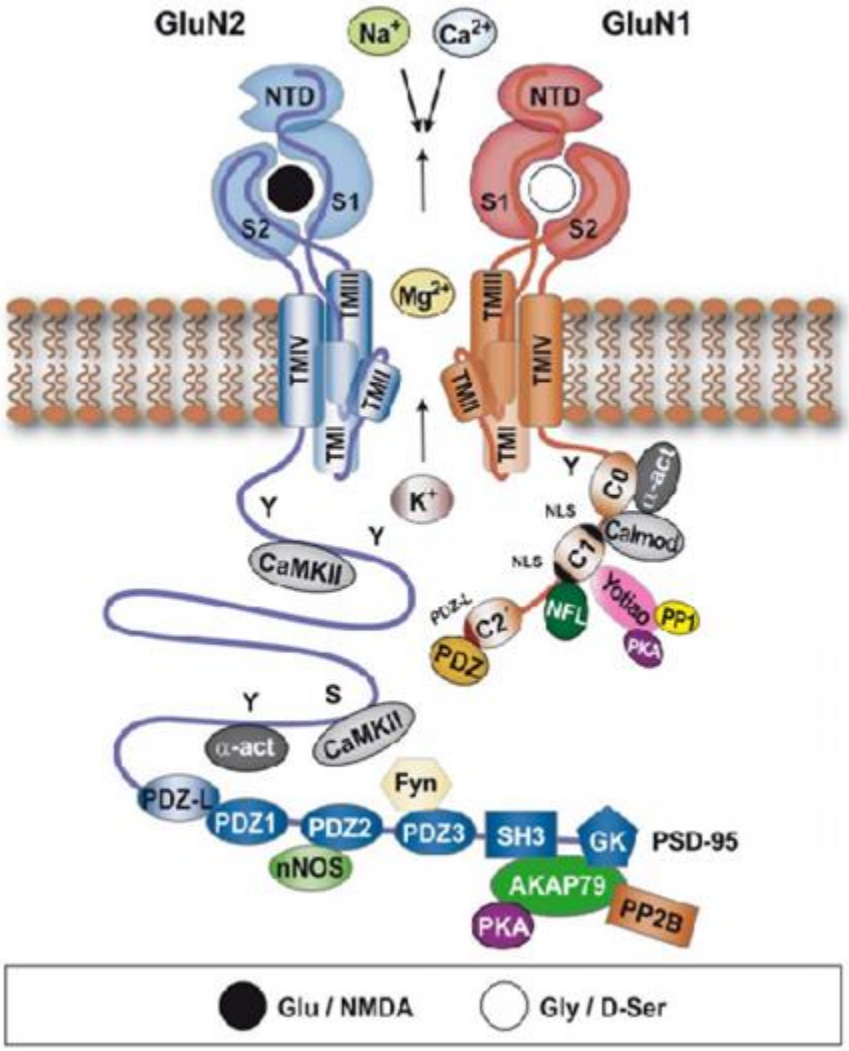
Estudios de secuenciación de exómica y de variantes en el número de copias sugieren que hay cientos de loci genéticos relevantes para la neurobiología del TEA. La correlación genética entre el autismo y el metabolismo glutamatérgico subyace en el hallazgo de un número importante de polimorfismos en genes que codifican para ciertos transportadores y receptores de glutamato, entre los que se incluye el transportador mitocondrial de Aspartato – Glutamato (SLC25A12) y el receptor ionotrópico tipo 2 de Kainato (GRIK2). Anomalías cromosómicas como la deleción en la región 4q32-34 también se ha visto en

pacientes autistas, esta región contiene el gen AMPA 2, que codifica para la subunidad de GluR2, el mayor determinante estructural del receptor de glutamato tipo AMPA. Los AMPAR median la neurotransmisión excitatoria rápida, pueden ser dinámicamente insertados y retirados de la membrana sináptica, lo que a su vez afecta la fuerza de la respuesta postsináptica al glutamato liberado en la sinapsis. La expresión de este tipo de receptores es abundante en la capa piramidal de las células del hipocampo y de Purkinje en el cerebelo**,** regiones del cerebro que se caracterizan por tener importantes correlaciones anatómicas con el fenotipo autista (Purcell et al., 2001). Otra región cromosómica aparentemente vinculada es la 7q31, la cual contiene el gen para el receptor metabotrópico de glutamato 8 (GRM8), que es un buen candidato posicional y funcional para la susceptibilidad al autismo. La señalización mediada por el glutamato es regulada negativamente por GRM8, a través de la inhibición de la liberación de glutamato en las sinapsis, este receptor desempeña un papel en la prevención de la hiperexcitabilidad neuronal y el mantenimiento de la homeostasis. Polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (Sencillo Nucleotide Polymorphism) en el gen GRM8 se han explorado para hallar la correlación genética con el trastorno, los resultados indican evidencias sugestivas de asociación entre el trastorno autista y las variantes del gen GRM8 (Serajee et al., 2003).

Los receptores NMDA (NMDAR) por su parte, se abren y conducen la corriente sólo cuando se despolariza la membrana postsináptica y simultáneamente el glutamato se une al receptor, proporcionando una detección de coincidencia y una señal que induce formas de plasticidad sináptica (Luscher, C. & Malenka, 2012). Funcionalmente, los NMDAR son heterodimeros compuestos por diferentes subunidades, cada una con propiedades distintas, (GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B), (Figura 1). Típicamente, los NMDAR son di-heterómeros que comprenden dos subunidades obligatorias de GluN1 y dos subunidades GluN2 o GluN3, que se asocian como un dímero de dímeros, sin embargo, también son capaces de ensamblarse como tri-heterómeros, específicamente los complejos GluN1/GluN2B/GluN3A o

GluN1/GluN2B/GluN2D se expresan en las etapas tempranas de desarrollo y GluN1/GluN2A/GluN2B o GluN1/GluN2A/ GluN2C en la adultez. La distribución, las características electrofisiológicas y moleculares de los NMDAR varían notablemente durante el desarrollo cerebral, haciendo al cerebro vulnerable a fluctuaciones en la neurotransmisión de glutamato en ciertos estadios de maduración neuronal (Sanz-Clemente, Antonio Nicoll & Roche, 2012).

Figura 1. Dominios e interacciones proteicas establecidas por el NMDAR.



Esquema general de los principales dominios de las subunidades GluN1 (rojo) y GluN2 (azul) del NMDAR y su topología en la membrana, Adaptada de: (Lopez-Menendez, 2009). En las secuencias extracelulares se distingue un dominio N-terminal (NTD), que contiene los sitios para la unión de moduladores de la actividad del NMDAR. Los 150 aminoácidos anteriores a la secuencia transmembrana TMI (dominio S1) y el bucle comprendido entre las TMIII y el TMIV (dominio S2) constituyen el sitio de interacción con el ligando: glutamato (o su agonista sintético NMDA) en subunidades de tipo GluN2, y glicina o D-serina en subunidades de tipo GluN1. Los cuatro dominios transmembrana forman un canal iónico permeable a Na+, Ca2+ y K+, y sensible al bloqueo por Mg2+. Los dominios

C-terminales citoplasmáticos son de longitud variable y contienen numerosas regiones de unión a proteínas de señalización y andamiaje de la PSD. El dominio C-terminal de GluN1 es más corto pero complejo, y su estructura depende del procesamiento alternativo de los exones 21 y 22 que dan lugar a las unidades C1, C2 y C2', conteniendo también un dominio independiente, C0.

La activación de los NMDAR permite el flujo interno de calcio induciendo múltiples vías señalización calcio dependientes en las dendritas, incluyendo CaMKs y la vía Ras - mitogen-activated protein kinase (MAPK), que modifican la sinapsis a nivel local y estimulan la transcripción de genes en el núcleo. Por ejemplo, la activación de CaMKII fosforila los receptores alterando su conductividad y provocando reorganización del citoesqueleto de actina para regular el crecimiento dendrítico. En el cerebro adulto los receptores de glutamato de tipo NMDA se requieren para la potenciación a largo plazo, proceso fisiológico subyacente al aprendizaje y la memoria, lo que indica que el metabolismo glutamatérgico mediado por NMDAR puede ser importante en la adquisición y regulación de la conducta emocional (Choudhury et al., 2012), mientras que otros hallazgos sugieren que las alteraciones en el equilibrio electrofisiológico neuronal durante el desarrollo resultan en fenotipos neurológicos variables y pueden estar fuertemente asociados a variaciones dramáticas en la conformación estructural de los NMDARs (O'Roak et al., 2011).

Entre las asociaciones genéticas relacionadas con algunas de las subunidades de los NMDAR se han vinculado SNPs en GRIN2A y GRIN2B (codificantes de la subunidad GluN2A y GluN2B, respectivamente), (Lee et al., 2015). Estas variantes genéticas alteran las propiedades funcionales de los NMDARs y/o la plasticidad dependiente de los mismos. Una estimación, en la cual se secuenciaron 44 genes candidatos de 2.446 pacientes con TEA, reveló mutaciones disruptivas recurrentes en seis genes, entre los que se encuentran: CHD8, DYRK1A, GRIN2B, TBR1, PTEN, y TBL1XR, y las cuales podrían contribuir al 1% de los TEA esporádicos (O'Roak et al., 2011). En el caso de GRIN2A, ubicado en el

cromosoma 16p, se encuentra en una región identificada como posible locus de susceptibilidad al autismo, mientras que otros dos SNPs en el exón 6 y en 3 ' UTR (del inglés untranslated region) mostró evidencia de asociación entre el autismo y esta variante genética, la cual aumenta el riesgo de padecer el trastorno. (O'Roak et al., 2011).

3.5. Disfunción sináptica mediada por subunidades del NMDAR en el TEA

Las subunidades reguladoras del NMDAR imparten diversas variaciones funcionales en el receptor, entre las que se incluyen alteración de las propiedades biofísicas del receptor y en la afinidad por las proteínas de unión intracelular. Esto es ciertamente evidente para dos de las subunidades reguladoras más altamente expresadas en el hipocampo, las subunidades NR2A y NR2B. Las subunidades NR2 pueden ser la clave para entender las diferencias funcionales de los NMDAR en la neurogénesis adulta. Además de otorgar las propiedades de conductancia específicas para los NMDAR, también se sabe que las subunidades NR2 tienen un patrón de expresión regulado por el desarrollo. Durante el desarrollo neuronal temprano, la subunidad NR2B se expresa predominantemente, mientras que la subunidad NR2A tiene solo una expresión mínima, más adelante en el desarrollo, la expresión de NR2A aumenta significativamente hasta que es aproximadamente igual a la de la subunidad NR2B. Si bien se cree que este patrón de desarrollo de la expresión de la subunidad NR2B se conserva durante la neurogénesis adulta, la línea de tiempo de expresión de la subunidad GluN2A en neuronas del hipocampo adulto es poco comprendida. Si la expresión de NR2A aumenta tarde durante la neurogénesis adulta, los receptores que contienen NR2A pueden no desempeñar un papel prominente durante las primeras etapas de la neurogénesis.

A nivel electrofisiológico, algunos trabajos han investigado los mecanismos relacionados con la disfunción en las corrientes de trasmisión sináptica mediadas por glutamato y la plasticidad en ratas

expuestas prenatalmente a VPA. En la vida postnatal temprana - 2 semanas - la progenie expuesta prenatalmente a VPA muestra cambios en la fisiología y la conectividad sináptica de la neocorteza, estos hallazgos revelan una sobreexpresión selectiva de las subunidades NR2 que se refleja en el mejoramiento de las corrientes sinápticas mediadas por el NMDAR y en una forma de plasticidad sináptica amplificada en las neuronas piramidales de la neocorteza (Rinaldi, 2008). La sobreexpresión selectiva de los NMDAR no depende da la subunidad NR1 la cual es indispensable para el acople de este tipo de receptores, en contraste la disfunción se debe a la sobrexpresión de dos subunidades (NR2A y NR2B) que generan altas conductancias de apertura de canal y que a su vez son expresadas diferencialmente durante el desarrollo. La expresión de la subunidad NR2B suele ser alta al nacer y durante el desarrollo postnatal y decrece significativamente durante la adultez, mientras que la expresión de NR2A aparece alrededor de P7 e incrementa durante las siguientes 2 o 3 semanas hasta los niveles de la adultez (Rinaldi et al., 2007). En este caso, la disfunción en la expresión proteica de dichas subunidades se evalúa durante un estadio único de desarrollo y un área cerebral específica, lo que reduce la posibilidad de hallar condiciones de variabilidad en la expresión proteica asociada con el neurodesarrollo y la fisiopatología de la enfermedad.

En contraste a los resultados anteriormente citados, Walcott y colaboradores se concentraron en el estudio de fisiología sináptica en neuronas de la corteza prefrontal medial (mPFC) a lo largo del desarrollo postnatal de ratas expuestas a VPA. En este caso los registros electrofisiológicos a través de Patch Clamp en neuronas de ratas expuestas, en el día posnatal 4 y 36 respectivamente, revelan fenómenos de aumento excitabilidad neuronal intrínseca y en las corrientes sinápticas dependientes del NMDAR. Sin embargo, estos hallazgos indican un pico de excitabilidad poco después del nacimiento, que es corregido gradualmente a medida que los animales maduran hasta la adolescencia temprana, periodo en el que logran la normalización de la fisiología sináptica y la excitabilidad neuronal a niveles basales (Walcott, Higgins, & Desai, 2011).

Aunque los registros fisiológicos apuntan a una preponderancia específica de variabilidad en las corrientes dependientes de NMDAR durante los diferentes estadios del desarrollo, y aun cuando la correlación entre la expresión selectiva de las subunidades del NMDAR y el aumento en las corrientes dependientes del mismo están directamente relacionadas, no existe literatura que compile los hallazgos parcialmente sugeridos y trace un perfil longitudinal de la expresión conformacional del NMDAR. Teniendo en cuenta la alta variabilidad fenotípica de expresión espacial, temporal y estructural de los NMDAR, su vinculación con el trastorno autista y los fenómenos subyacentes como la plasticidad, estos ameritan ser explorados en otras áreas cerebrales vinculadas con el TEA y durante estadios posnatales diferenciales.

El interés específico en la subunidad NR2B del NMDAr, subyace a la importancia de esta subunidad en la determinación de propiedades farmacológicas y funcionales del receptor, además de asociarse fuertemente con un amplio número de sucesos fisiopatológicos. Eventos sinápticos específicos como la potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD) se han utilizado para modelar y generar inferencias respecto a los fenómenos relacionados con el aprendizaje, estudios previos asocian específicamente la subunidad NR2B con eventos relacionados con LTP, el procesamiento de la memoria y la percepción del dolor. No obstante, pocos son los enfoques experimentales que evalúan a detalle la conformación estructural del NMDAR y su correlación con la presencia de fenómenos comportamentales específicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. Diseño experimental

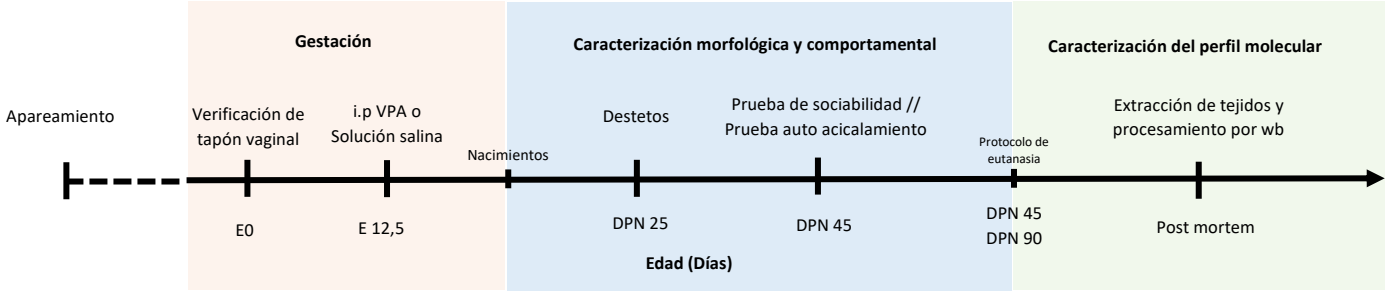
Para el desarrollo de los objetivos de este estudio y la respectiva validación de un modelo para trastornos neuropsiquiátricos por manipulación teratogénica; se hizo necesario el desarrollo de una fase pre – experimental**,** que incluyo experimentos piloto y de estandarización de protocolos. Una segunda fase, propiamente experimental evaluó el fenotipo morfológico y comportamental, esperado para un modelo de autismo inducido por exposición prenatal a VPA como se muestra en la Figura 2.

Se utilizó un diseño de estudio experimental posprueba y grupo control. Este diseño incluyo dos grupos: Un grupo experimental que recibió una dosis única de 500 mg/kg VPA (Valproato de Sodio, Valcote® I.V, Abbott, equivalente a 100 mg/ml) vía intraperitoneal (i.p). Mientras, el grupo control recibió solución salina equivalente al volumen inoculado la dosis del grupo experimental.

La asignación de las variables fue la siguiente:

- Variable independiente: Exposición prenatal a una única dosis de VPA.
- Variable Dependiente 1: Presencia o ausencia del fenotipo morfológico
- Variable Dependiente 2: Presencia o ausencia del fenotipo comportamental
- Variable Dependiente 3: Disfunción en el nivel de expresión proteica de la subunidad conformacional NR2B del NMDAR

Figura 2. Protocolo experimental



Línea de tiempo que muestra la secuencia de procedimientos experimentales a los que fueron sometidos los sujetos.

4.2. Sujetos experimentales

Se emplearon ratas macho y hembra, cepa Wistar, alojados en el bioterio experimental de la Universidad Nacional de Colombia. Todos los animales estuvieron sometidos a condiciones de temperatura (22 ±2 ºC), humedad relativa (40 - 60%) y ciclo invertido de luz/oscuridad (12/12). Se controlaron estímulos ambientales olfativos y auditivos. Todos los animales tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*.

Para la fase preexperimental, se emplearon 8 ratas hembra Wistar, sometidas al protocolo de estandarización de la técnica de citología vaginal. 10 hembras restantes, sin previa experiencia sexual o de preñez se emplearon para la estandarización del biomodelo exposición prenatal a VPA. Durante la fase experimental, se emplearon 20 parejas, sometidas a un periodo de adaptación de dos semanas, hasta alcanzar el peso adecuado para proceder con el apareamiento (250-275 gramos para hembras y 300-350 gramos para machos). El apareamiento fue realizado bajo un sistema monogámico. Aleatoriamente las

hembras preñadas fueron clasificadas como parte del grupo control o del grupo experimental. La progenie resultante de cada grupo de gestantes se empleó para la caracterización morfológica y comportamental.

4.2.1. Fase pre – experimental

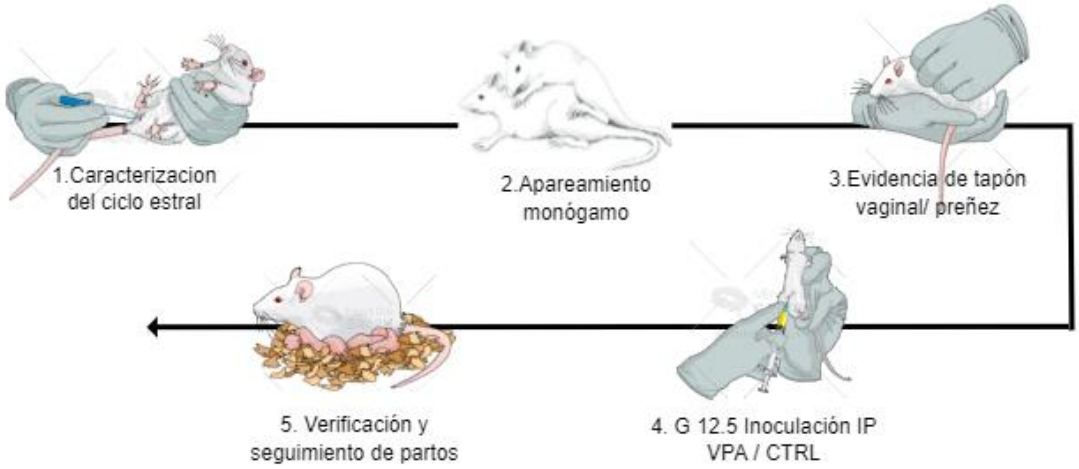
4.2.2. Estandarización del protocolo para técnica de citología vaginal

Con el fin de estandarizar el protocolo de citología vaginal y adiestrar al investigador en la técnica, se emplearon 10 hembras adultas de descarte y se recolectaron muestras de citología vaginal durante 8 días consecutivos. La recolección de las muestras se puede realizar mediante lavado vaginal o frotis, para este caso se probaron diversas técnicas de toma de muestra para determinar cuál de los métodos generaba menor molestia a los sujetos. Se determinó el lavado vaginal como la técnica menos invasiva y más útil. Dicho procedimiento se consigna como documento anexo A (Protocolo De Determinación De Las Fases Del Ciclo Estral En Ratas Wistar) y estuvo sujeto a revisión y aprobación del CICUAL de la Universidad De los Andes y por la doctora Zulma Dueñas y el personal del cuidado animal en el bioterio de la Universidad Nacional.

4.2.3. Estandarización del biomodelo para Inducción de autismo por exposición prenatal a VPA

Para el establecimiento del protocolo de autismo por exposición prenatal a VPA, se solicitó al bioterio de la Universidad Nacional, el suministro de los sujetos experimentales. Se recibieron 20 hembras y 10 machos entre la séptima y la octava semana de vida, las cuales se emplearon para la realización de dos pruebas piloto en las que se evaluó la teratogenicidad de dos de las dosis más comúnmente reportadas en la literatura (500 mg/kg o 600 mg/kg). El protocolo para todos los grupos se organizó en cuatro etapas a continuación descritas (Figura 2):

Figura 3. Protocolo para la Inducción de autismo por exposición prenatal a VPA.



1. Caracterización del ciclo estral: De acuerdo con el protocolo previamente estandarizado (Ver anexo), se recolectan muestras de citología vaginal en todas las hembras durante al menos 3 días consecutivos.

2. Formación de grupos de apareamiento: Una vez se tenía certeza del día del ciclo estral y el peso exacto de cada espécimen, las hembras proestro fueron transferidas a la caja de apareamiento en la que previamente se había alojado a un único macho (Apareamiento monógamo).

3. Evidencia de tapón mucoso vaginal y aislamiento: Los apareamientos se realizaron en la mañana y, discretamente se observó durante algunas horas la iniciación de comportamientos de cortejo y/o copula. Se permitió interacción de la pareja durante toda la noche. El día posterior, trascurridas aproximadamente ocho horas de contacto nocturno con el macho, se verificó la presencia de tapón mucoso en el introito vaginal. La evidencia de tapón vaginal se consideró como parámetro decisivo de apareamiento exitoso. Si el tapón era fácilmente visible por el experimentador la hembra era separada y

alojada con otras hembras que estuviesen en condiciones similares. Independientemente de la presencia o no de tapón vaginal, la hembra fue retira y los machos extraídos del protocolo experimental. La preñez fue designada con la presencia de tapón vaginal o bien una noche de monta y se asignó como día embrionario 1 (E1).

4. Confirmación de preñez e inoculación de VPA: Para la reconfirmación de preñez se tuvieron en cuenta cambios comportamentales característicos de preñez como la "nidación" y cambios físicos como abultamientos laterales en la región abdominal, palpación fetal y aumento considerable de peso.

Para determinar cuál de las dos dosis resultaba más efectiva y con menor impacto en el tamaño de la camada, durante la fase pre – experimental, tres grupos fueron conformados. En el día 12,5 de gestación (E12,5), todas las hembras fueron inoculadas con una única dosis de VPA, Sigma-Aldrich o solución salina, vía intraperitoneal. El primer grupo recibió una dosis de 600 mg/kg de VPA, el segundo grupo recibió una dosis 500 mg/Kg y el grupo control recibió una dosis única de solución salina. Las hembras fueron simultáneamente pesadas en el E5, E 12,5 (Día de inoculación) y, E20.

5. Verificación y seguimiento de partos: Alrededor del día E18 – E19 las hembras fueron trasferidas individualmente a una caja de levantamiento. Ante la evidencia de alumbramientos, se verificó cuidadosamente el número total de crías nacidas. A todas las hembras se les permitió criar sus propias camadas hasta el destete en el día postnatal 23 (DPN 23).

4.3. Fase experimental

4.3.1. inducción de autismo por exposición *in útero* a VPA

Posterior a la estandarización del modelo de inducción de autismo por exposición *in útero al* VPA (Anexo B "Protocolo De Inducción De Un Biomodelo De Autismo Por Exposición *In Útero* A Vpa En Ratas

Wistar”) y, al perfeccionamiento de la técnica de ciclaje y reproducción, se determinó la dosis de 500 mg/kg, i.p, como la dosis más efectiva y con menor repercusión en el tamaño y calidad de las camadas. Para la fase experimental todas las hembras fueron cicladas a través de citología vaginal y preñadas de acuerdo con los protocolos previamente descritos. La gestación fue determinada con la presencia de tapón vaginal en el día embrionario 1 (E1). En el día E12,5 las hembras recibieron una única dosis de 500 mg/kg de VPA (Valproato de Sodio, Valcote® I.V, Abbott, equivalente a 100 mg/ml) o bien al equivalente en volumen a la misma dosis de solución salina. Las hembras progenitoras fueron alojadas individualmente y se les permitió criar sus propias camadas hasta el destete en el día DPN 25 para ambos grupos. Tanto la progenie masculina como la femenina se incluyó en el estudio. Las crías se alojaron en grupos de 3–4 animales por jaula, agrupadas de acuerdo con el sexo y al tratamiento. Se emplearon jaulas de laboratorio de plástico estándar con cama y acceso ad libitum a alimento y agua, limpiados una vez por semana.

4.3.2. Caracterización morfológica de la progenie expuesta in útero a VPA

Se documentó cualquier tipo de malformación física importante en la descendencia de las hembras tratadas con 500 mg/kg de VPA o solución salina, presente en cualquier momento durante la vida del animal. La morfología y longitud de la cola, el tamaño y numero de falanges y la presencia cromodacriorrea fue documentada a través de registro fotográfico.

4.3.3. Caracterización comportamental de la progenie expuesta in útero a VPA

Todos los sujetos, hembras y machos se sometieron a dos pruebas comportamentales, en el DPN 45. Una prueba por día y un día intermedio entre prueba y prueba. Las pruebas se llevaron a cabo en las salas de experimentación del Bioterio Central de la Universidad Nacional de Colombia, lo sujetos fueron trasportados y alojados en la sala durante un periodo de habituación de 45 minutos, trascurrido este

tiempo se inició la prueba. Para evitar el contacto del sujeto evaluado con el investigador una cámara de video registró por completo la prueba para su posterior análisis

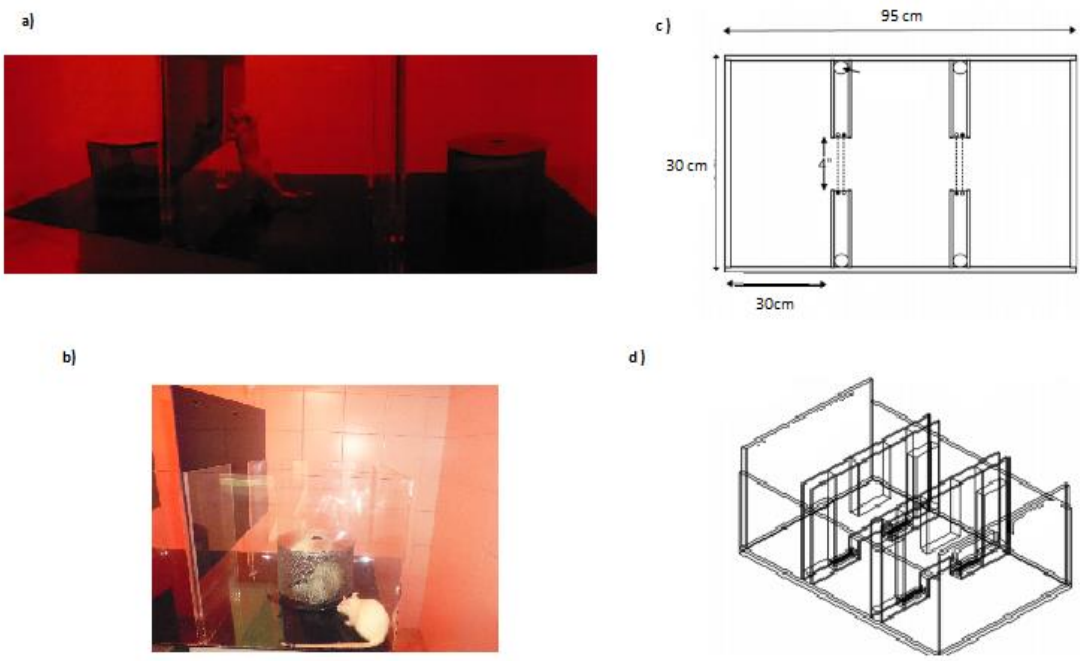
4.3.3.1. Prueba de sociabilidad de tres cámaras

Como se ilustra en la Figura 3, el aparato para la prueba de interacción social de tres cámaras consistió en una caja de policarbonato con paredes removibles que separan la caja en tres compartimientos de dimensiones iguales (31cmX43cmX30cm), las particiones tienen aberturas que permiten al animal moverse libremente de una cámara a otra (figura 2c), dentro de las dos cámaras laterales se ubicó una jaula cilíndrica de acero inoxidable con un radio 8 cm y 13 cm de altura (figura 2b), el aparato se ubicó en el centro del cuarto de experimentación para minimizar gradientes de luz, temperatura, sonido y otras condiciones ambientales que podrían producir una preferencia posicional. Para evitar el contacto del sujeto evaluado con el investigador una cámara de video registró por completo la prueba para su posterior análisis. La elevación de las compuertas que separa cada compartimiento se realizó desde el exterior a través de un sistema de poleas. Una vez iniciada la prueba, los sujetos no tuvieron interacción alguna con el investigador, hasta cuando trascurriera por completo el tiempo de prueba (15 minutos).

Una vez ubicado el animal en el compartimiento central y con los divisores cerrados, se dio inicio de prueba. Durante cinco minutos se permitió explorar libremente el compartimiento central (Periodo de habituación), después de este período los divisores se elevaron permitiendo al sujeto de prueba moverse libremente a través de los tres compartimientos del aparato durante una sesión de 10 minutos (Periodo de prueba). Aleatoriamente en alguno de los compartimientos laterales, se ubicó en la jaula de acero inoxidable al sujeto extraño, mientras en el compartimiento opuesto se ubicó la jaula vacía. Los sujetos extraños provenían de una caja de alojamiento diferente a la del animal evaluado, y conservaron características similares respecto al de sexo, edad y peso. La estructura de la jaula de acero inoxidable

permitió el contacto nasal entre los sujetos e impidió al sujeto desconocido iniciar cualquier contacto social y limitó la posibilidad de interacciones agresivas (Figura 2 b). Así, la iniciación del contacto social es atribuible solamente al sujeto de la prueba, la ubicación del extraño y la jaula de vacía se alternaron entre derecha e izquierda en sesiones consecutivas. Para el análisis la prueba, las medidas de tiempo y número de entradas a cada compartimiento durante 10 minutos se registraron y cuantificaron. Para información adicional de la prueba revisar Anexo C. "Protocolo Para La Prueba De Interacción Social De Tres Cámaras En Ratas Wistar"

Figura 4. Aparato para prueba de interacción social.



a) Fotografía de cámara de policarbonato con paredes removibles. b) fotografía de compartimiento lateral y jaula acero. c) Vista superior que muestra dimensiones y compuertas. d) Vista angular esquemática

4.3.3.2. Prueba de auto acicalamiento

Para esta prueba cada sujeto experimental se ubicó en una jaula de plástico vacía y limpia durante un período inicial de habituación de 5 minutos, culminado este periodo, se contabilizo durante 10 minutos el tiempo empleado por cada sujeto realizándose auto grooming, comportamiento definido como: Acción de acariciar, rascar o lamer la cabeza y el resto de las partes del cuerpo con cualquiera de los miembros anteriores. No se usó material de camada para evitar la excavación, un comportamiento de repetición potencialmente competitivo. Entre cada período de prueba, la jaula se limpió con una toalla de papel limpio y etanol al 70%, y se dejó secar completamente antes de iniciar otra prueba. Para el análisis esta prueba, las medidas del tiempo y numero de repeticiones del comportamiento evaluado se registraron y cuantificaron durante 10 minutos. Ver Anexo D. “Protocolo Para La Prueba De Auto – Acicalamiento En Ratas Wistar”.

4.3.4. Caracterización del perfil molecular de la subunidad NR2B

El punto final de los animales se llevó a cabo bajo el seguimiento del protocolo de eutanasia por decapitación. Anexo D. Dos estadios del neurodesarrollo se tuvieron en cuenta para la extracción de tejidos (DPN 45 - Adolescencia y DPN 90 Adultez tardía). Una vez se completó el procedimiento de eutanasia, sobre hielo seco se realizó la extracción del cerebro y la segmentación de estructura, Anexo F. “Protocolo de extracción de tejido para ensayos moleculares”. Tres estructuras cerebrales se procesaron independientemente durante este experimento: corteza prefrontal, hipocampo y amígdala (Ver Anexo F “Protocolo de extracción de tejido para ensayos moleculares”). Una vez completado el procedimiento de extracción, las muestras fueron debidamente rotuladas y almacenadas a - 70° C. La homogenización de tejidos se realizó bajo el protocolo de homogenización de tejidos RIPA BUFFER (Alfa aesar) (Ver Anexo F “Protocolo de extracción de tejido para ensayos

moleculares". Se realizó la cuantificación de proteína total de cada muestra según protocolo de cuantificación de Pierce (Anexo H), se obtuvieron curvas de calibración y se corroboró la presencia de proteína en las diferentes muestras procesadas.

Para efectos de este experimento y teniendo en cuenta el tamaño de la proteína blanco, se realizaron algunas modificaciones importantes descritas a continuación: los lisados ligeramente descongelados se conservaron sobre hielo picado y se llevaron las muestras a diferentes concentraciones de proteína equivalentes a 30 µg, 60 µg y 80 µg para obtener un volumen final de máximo 25 µl, el cual se completó con buffer de carga. Posteriormente, la desnaturalización de proteína se realizó en tubos Eppendorf para PCR en el termociclador durante un ciclo único de 10 minutos a 95 °C. La muestra se centrifugo adicionalmente durante 15 segundos, y los tubos fueron retornados a la cubeta con hielo para posteriormente ser sembrados en los geles previamente preparados. Para la elaboración de los geles, se redujo el porcentaje de acrilamida al 8%, se realizaron ensayos con geles del de 10 y 8 %. El sembrado se realizó con marcador de peso molecular (200 – 6,5kDa) en el primer carril. El montaje en la cámara de electroforesis se realiza con buffer de corrida 1X. Las muestras se corrieron inicialmente en el gel de concentración durante 45 minutos, elevando gradualmente el voltaje hasta alcanzar 100 voltios, una vez se evidenciaron los carriles alineados, se aumentó el voltaje hasta 150 voltios para correr en gel de separación durante 90 minutos y completar aproximadamente 2 horas de electroforesis. Una vez finalizada la electroforesis se desmontaron los geles de la cámara, se descartó el gel de concentración, mientras el gel de separación junto con las membranas de nitrocelulosa, las esponjas y papel filtro se equilibraron en buffer de transferencia 1X durante 30 min. La transferencia se realiza a 100 voltios, 300 Ma durante 90 min. Dentro de la cámara se colocó un bloque de hielo y un agitador magnético para mantener frío el sistema y asegurar la recirculación del buffer de transferencia 1X.

Para la electroforesis y electro trasferencia a la membrana de nitrocelulosa, los blots se incubaron con los anticuerpos primarios para la subunidad NR2B, de acuerdo con los protocolos experimentales de (Jensen et al., 2009; Rinaldi et al., 2007). Todos los procedimientos moleculares se realizaron de acuerdo con los protocolos del laboratorio de Neurobiología y Comportamiento de la Universidad Nacional de Colombia a cargo de la Doctora Zulma Dueñas (Ver Anexo I).

4.4. Consideraciones éticas

Todos los procedimientos llevados a cabo durante la realización de esta investigación estuvieron acordes con las normas éticas y legales exigidas para la investigación con animales de laboratorio en Colombia (Ley 84 de 1989 y Resolución No. 8430 de 1993 del Ministerio de Salud). De igual forma se tuvieron en cuenta las recomendaciones para el manejo y cuidado de animales de laboratorio propuestos por la normatividad de la Unión Europea (8616091EU) y del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de América (National Research Council, 1996), con el fin de garantizar el bienestar animal y evitar el sufrimiento de los animales, tanto en las condiciones de crianza y mantenimiento, como en el momento de ser sacrificados. El diseño implicó la consideración de utilizar el mínimo número posible de animales que garantizaran la confiabilidad de los resultados. Se siguieron las indicaciones del Comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo J).

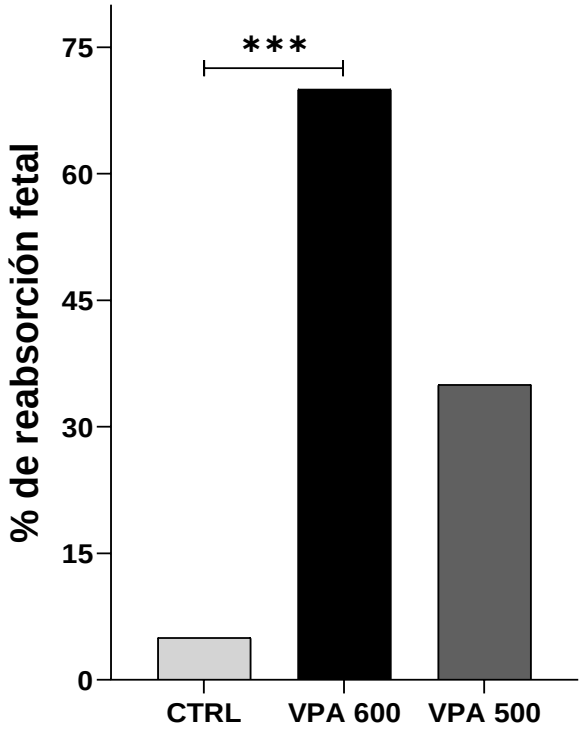
5. RESULTADOS

5.1. Impacto De La Exposición Intrauterina Al Ácido Valproico En La Preñez Y Natalidad

La exposición intrauterina a VPA produce un efecto lesivo en la gestación, bajo una relación de dosis/efecto directamente proporcional

Se comparó la toxicidad de dos dosis diferentes de exposición al VPA en el mismo periodo de tiempo. La tasa de reabsorción fetal (aborto espontáneo), se definió como el porcentaje de hembras a las que se detectó tapón vaginal y/o tuvieron un aumento considerable de peso antes del día de la inoculación y no dieron a luz una sola cría. Las tasas de reabsorción fetal fueron significativamente altas para ambas dosis VPA 500 mg/kg (35%, 7/20), y VPA 600 mg/kg (70%, 14/20) en comparación con el grupo control (5%, 1/20), (figura 5). La dosis de 500 mg/kg se definió como la dosis potencialmente más efectiva y con menor impacto en el tamaño y supervivencia de las camadas (Figura 6). Todos los experimentos posteriores se llevaron a cabo con la dosis de tratamiento VPA de 500 mg/kg.

Figura 5. Efecto en la reabsorción fetal de hembras expuestas a una dosis de 500 mg/kg y 600 mg/kg.

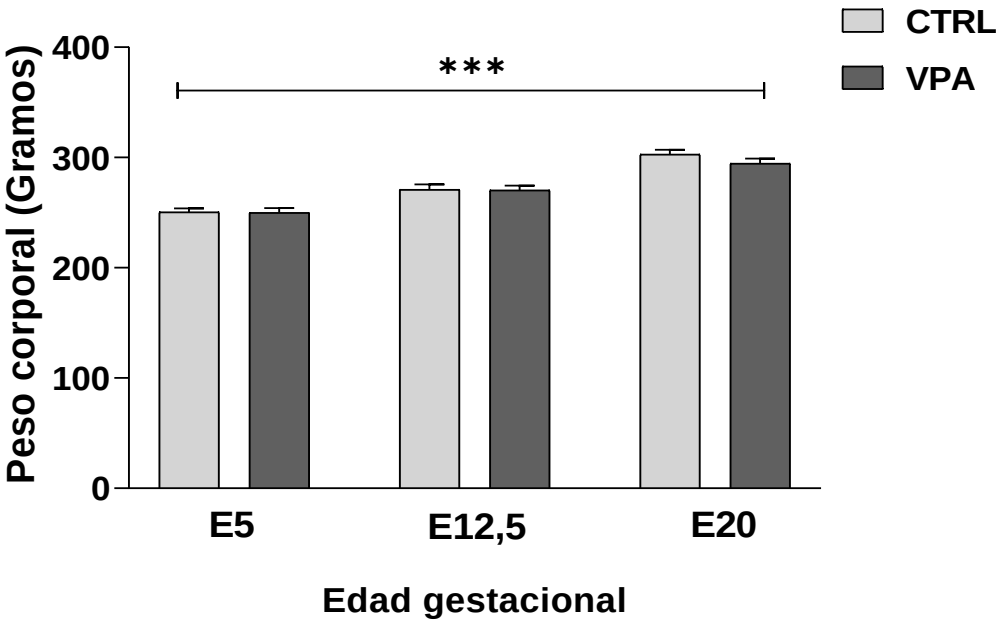


Las comparaciones post hoc Bonferroni–Dunn**,** indicaron una tasa de reabsorción fetal significativamente mayor para VPA 600 mg/kg en comparación con el grupo CTRL (p <0,001) ***, pero no para el grupo VPA 500 mg/kg (p >0,001) respecto al grupo CTRL.

La exposición al VPA no muestra efectos en la ganancia de peso de las hembras gestantes, ni en sus condiciones generales de salud; en comparación con las hembras gestantes tratadas con solución salina.

Se midió la ganancia de peso en hembras gestantes antes y después de la exposición al VPA (500 mg/kg) (CTRL n=16, VPA n=16)**.** Todas las hembras inoculadas fueron evaluadas días posteriores a la exposición al VPA y durante el periodo posparto. Se observaron condiciones generales de salud como consumo de alimento y agua, composición corporal, apariencia del pelo, piel y extremidades, signos de padecimiento y/o enfermedad y actividad locomotriz. En general la condición de todas las hembras antes y después del parto se conservó en completa normalidad para ambos grupos. Los resultados indicaron una ganancia de peso significativa para los dos grupos (CTRL y VPA 500) respecto al día de pesaje (E5, E 12,5 Y E20); sin embargo, no se encontró una interacción estadísticamente significativa entre el tratamiento y la ganancia de peso.

Figura 6. Efecto de la exposición a VPA (500 mg/kg) en la ganancia de peso corporal de hembras gestantes respecto al grupo control.

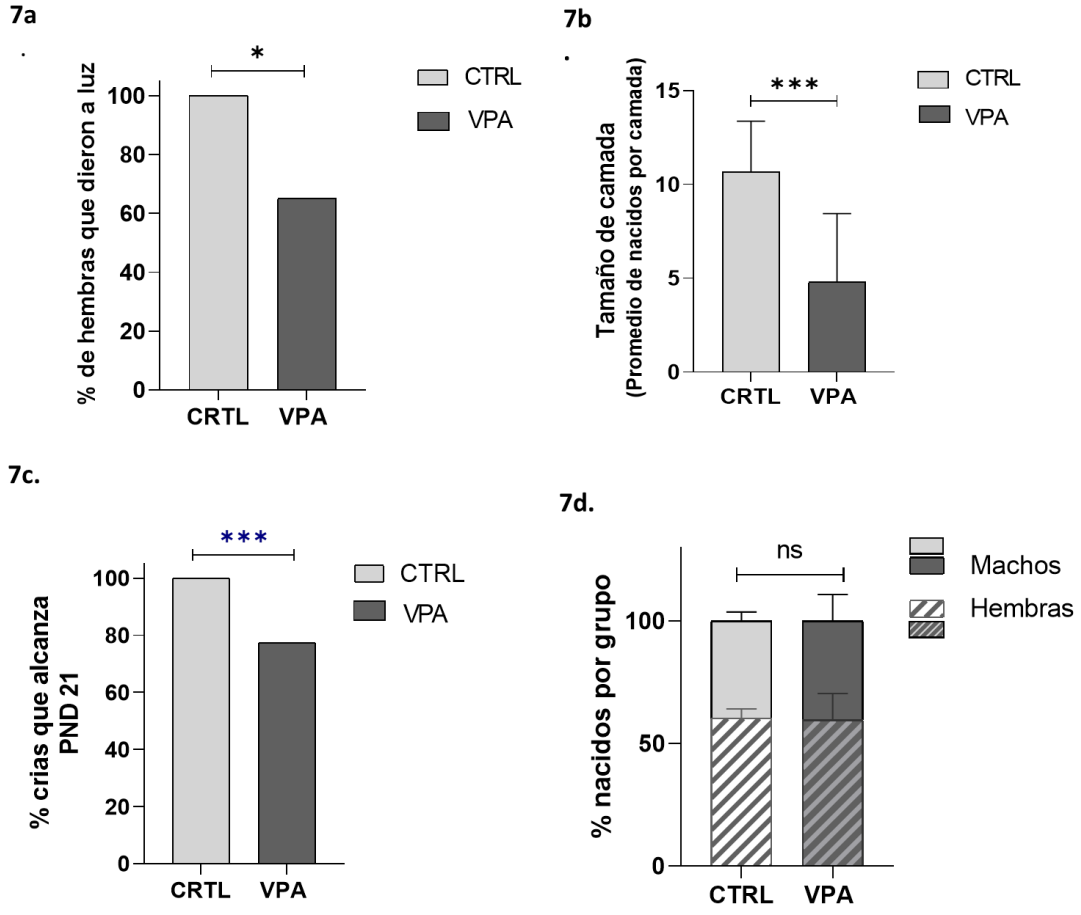


La prueba Anova de Friedman reveló una ganancia de peso significativa para los dos grupos (CTRL y VPA 500) respecto al día al de día pesaje (F = 75,46, p<0,0001**) ***.** Sin embargo, las comparaciones post hoc Bonferroni–Dunn no mostraron una interacción entre el tratamiento y la ganancia de peso (E5 (r = 2,000, P >0,9999), E12,5 (r = 0, 196, P >0,9999) y E20 (r= 28,385, P >0,9999).

La exposición VPA muestra un efecto teratógeno en el tamaño y la supervivencia de las camadas de hembras tratadas y no hay diferencias entre machos/hembras por camada

El porcentaje de hembras gestantes expuestas a VPA que dieron a luz fue significativamente menor (65%, 13/20) respecto al grupo control (95%, 19/20), (Figura 7a). Adicionalmente, se observó una reducción significativa en el número de crías nacidas vivas por camada para el grupo experimental (VPA= M, 4,8), en comparación con el grupo control (CTRL = M, 10,25) (Figura 7b). En cuanto a la supervivencia de la progenie expuesta a VPA después de los primeros 21 días de vida, nuestros resultados indican que la exposición prenatal a VPA redujo significativamente el porcentaje de sujetos que alcanzan el DPN 21 (VPA = M, 67%) en comparación con el grupo control (CTRL=M,100%). Finalmente, se exploró la incidencia de la exposición a VPA en la razón machos/hembras por camada. No se evidencio interacción alguna el tratamiento y la razón de sexo para ninguno de los grupos. (VPA= 56% Machos, 4,8% Hembras) (CTRL = 10,65% Machos, 67% Hembras) (Figura 7c).

Figura 7. Efecto de la exposición intrauterina al VPA (500mg/kg) en la gestación y natalidad.



3a. El porcentaje de hembras gestantes expuestas a VPA que dieron a luz (u= 140, p <0,05, prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney) *****. **3b.** Número de crías nacidas vivas por camada para el grupo experimental (VPA= M, 4,8), en comparación con el grupo control (CTRL = M, 10,25) (u=16,50, p<0,0001, prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney) *******. **3c.** Porcentaje de sujetos que alcanzan el DPN 21 en comparación con el grupo control (u=11, p <0,0001, prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney) ******* **3d.** Incidencia de la exposición a VPA en la razón machos/hembras por camada (r = 0,3077, p > 0,9999, comparaciones post hoc Bonferroni–Dunn).

5.2. Impacto De La Exposición Intrauterina Al Ácido Valproico En La y Morfología De Las Crías De Hembras Gestantes Tratadas.

La exposición intrauterina a VPA aumentó la probabilidad de ocurrencia de malformaciones físicas

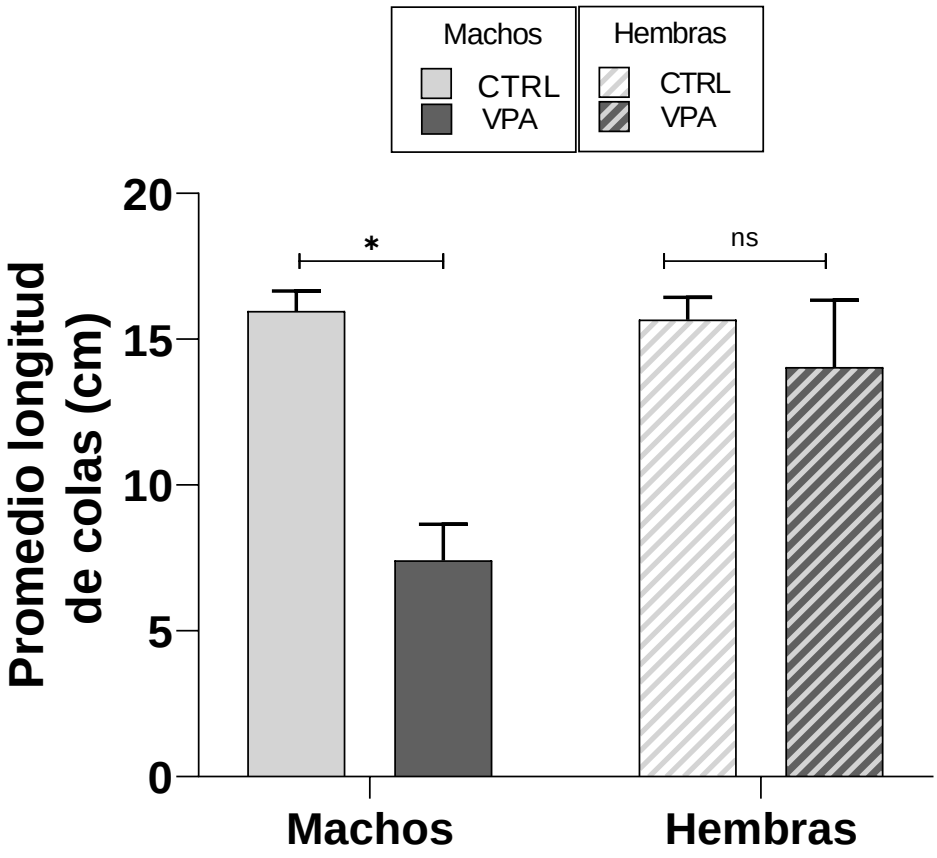
Una vez se realizaron los destetos en el DPN 23, se registró cualquier malformación física importante en progenie de hembras inoculadas con 500 mg/kg de VPA o solución salina. Las crías del grupo control expuesto a 500 mg/Kg de solución salina exhibieron buenas condiciones de salud, mientras, las crías expuestas a VPA presentaron malformaciones congénitas externas como anomalías en la forma y tamaño de las colas (Torsión, enrollamiento y/o perdida de longitud), malformaciones en falanges (sindactilia y formación incompleta de falanges) y maloclusión dental. Del total de los animales expuestos a VPA, el 25% presento algún tipo de malformación en la cola, el 18% presento mmalformaciones considerables en el tamaño y forma de las falanges y el 20% de los sujetos presento episodios de cromodacriorrea en algún momento de su vida; en comparación al grupo control (0% para todas las condiciones en cualquier sexo) (Tabla 1). Cuantitativamente, nuestros resultados indican que la exposición intrauterina al VPA reduce significativamente la longitud de las colas de la progenie de hembras gestantes expuestas a VPA, respecto al grupo control (Figura 8). El promedio de la longitud de la cola en los machos

VPA (VPA= M, 7,40) fue significativamente menor respecto al grupo control (CTRL = M, 15,96). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre promedio de la longitud de la cola de las hembras VPA (VPA= M, 14,4) y las hembras control (CTRL = M, 15,66) (Figura 8).

Tabla 1. Observaciones morfológicas después de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg).

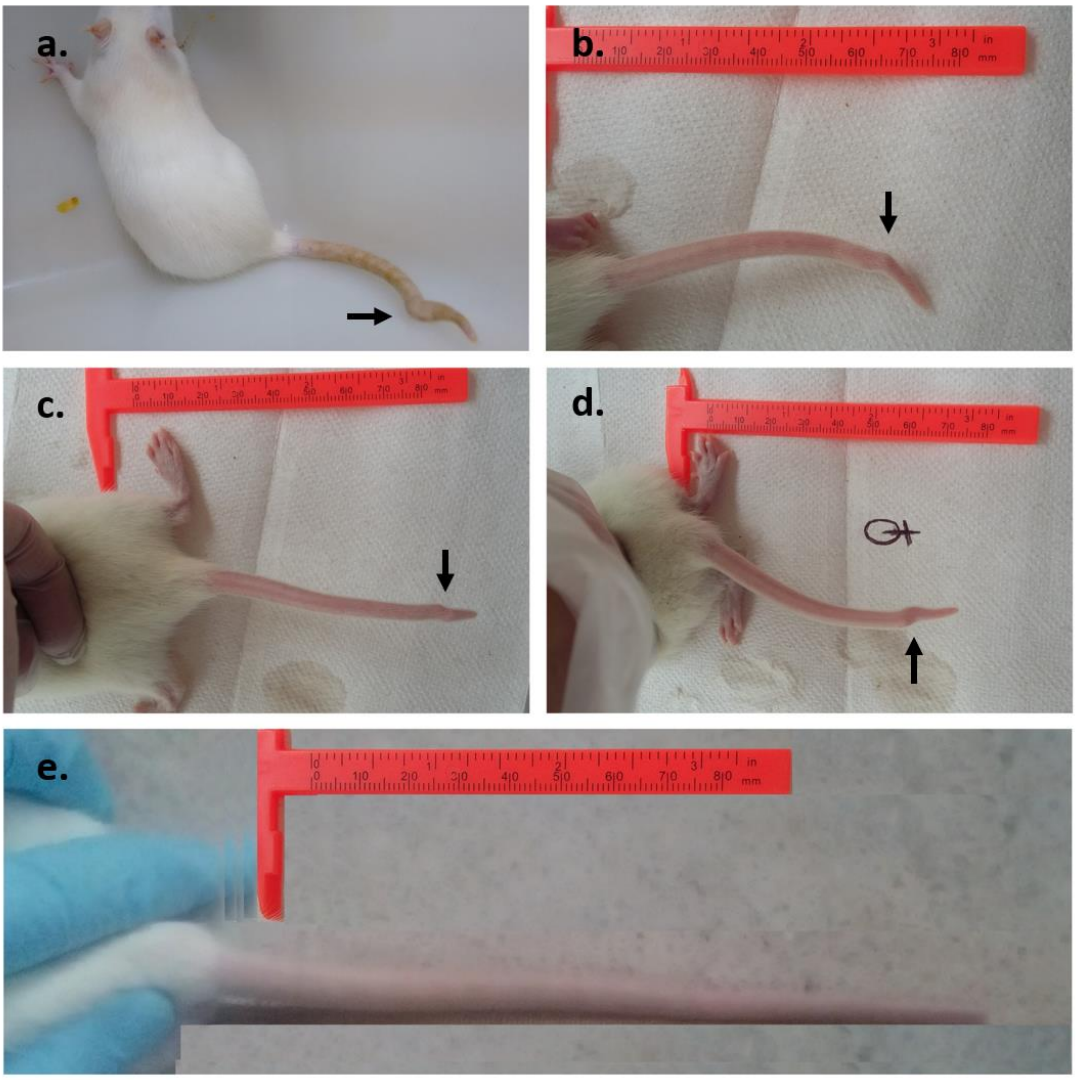
		Malformaciones en cola	**Malformaciones en número y forma de falanges**	**Cromodacriorrea**
Machos	**% de Ocurrencia**	**36,6**	**26,6**	**20**
	Ocurrencia (Conteo)	11	8	6
Hembras	**% de Ocurrencia**	**13,3**	**10**	**20**
	Ocurrencia (Conteo)	4	3	6

Figura 8. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la morfología de las colas.



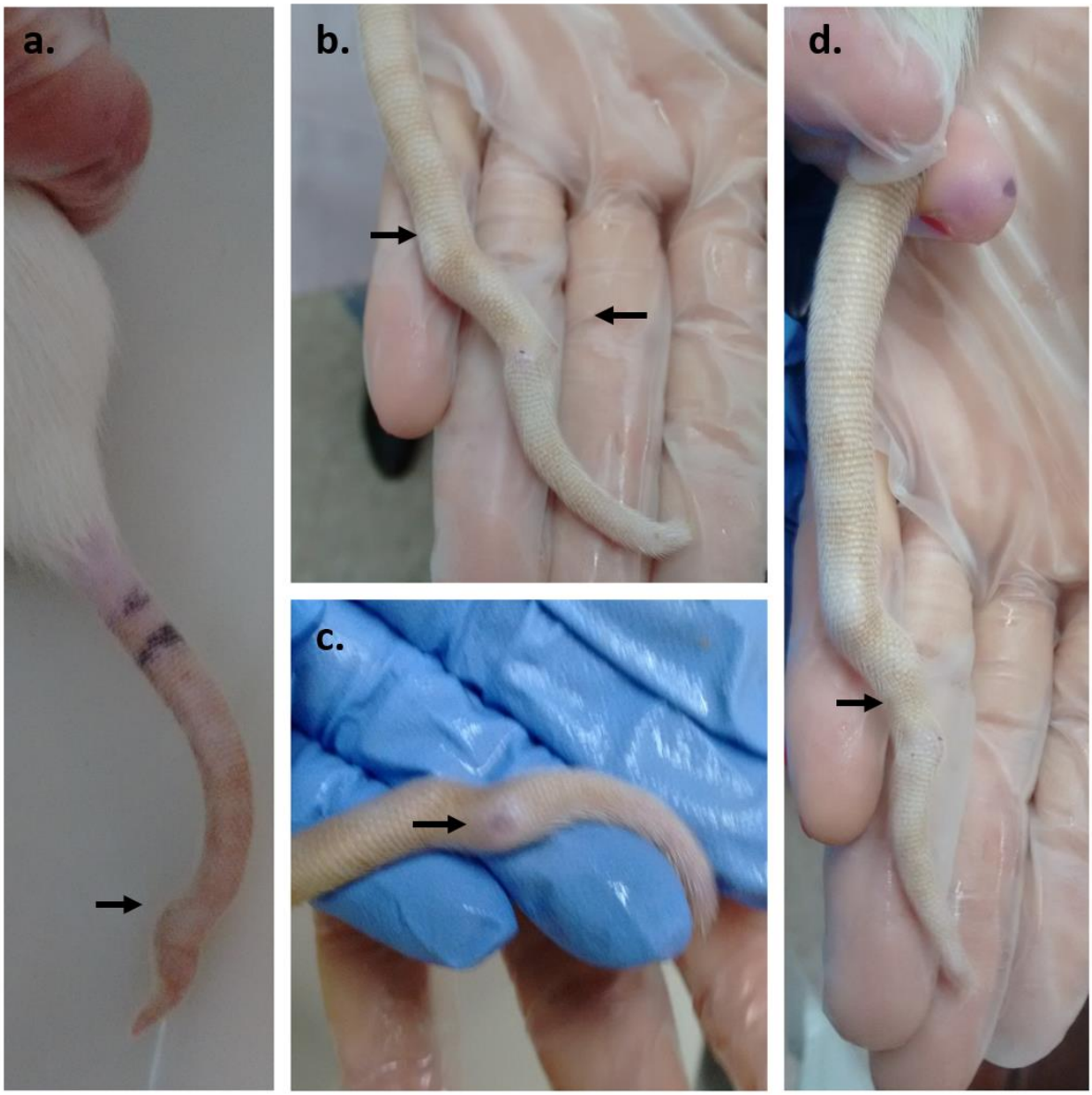
Longitud de las colas de la progenie de hembras gestantes expuestas a VPA, respecto al grupo control (H (2) = 76,50, P <0,0001, prueba Kruskal–Wallis)

Imagen 1. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la morfología de las colas de sujetos experimentales.



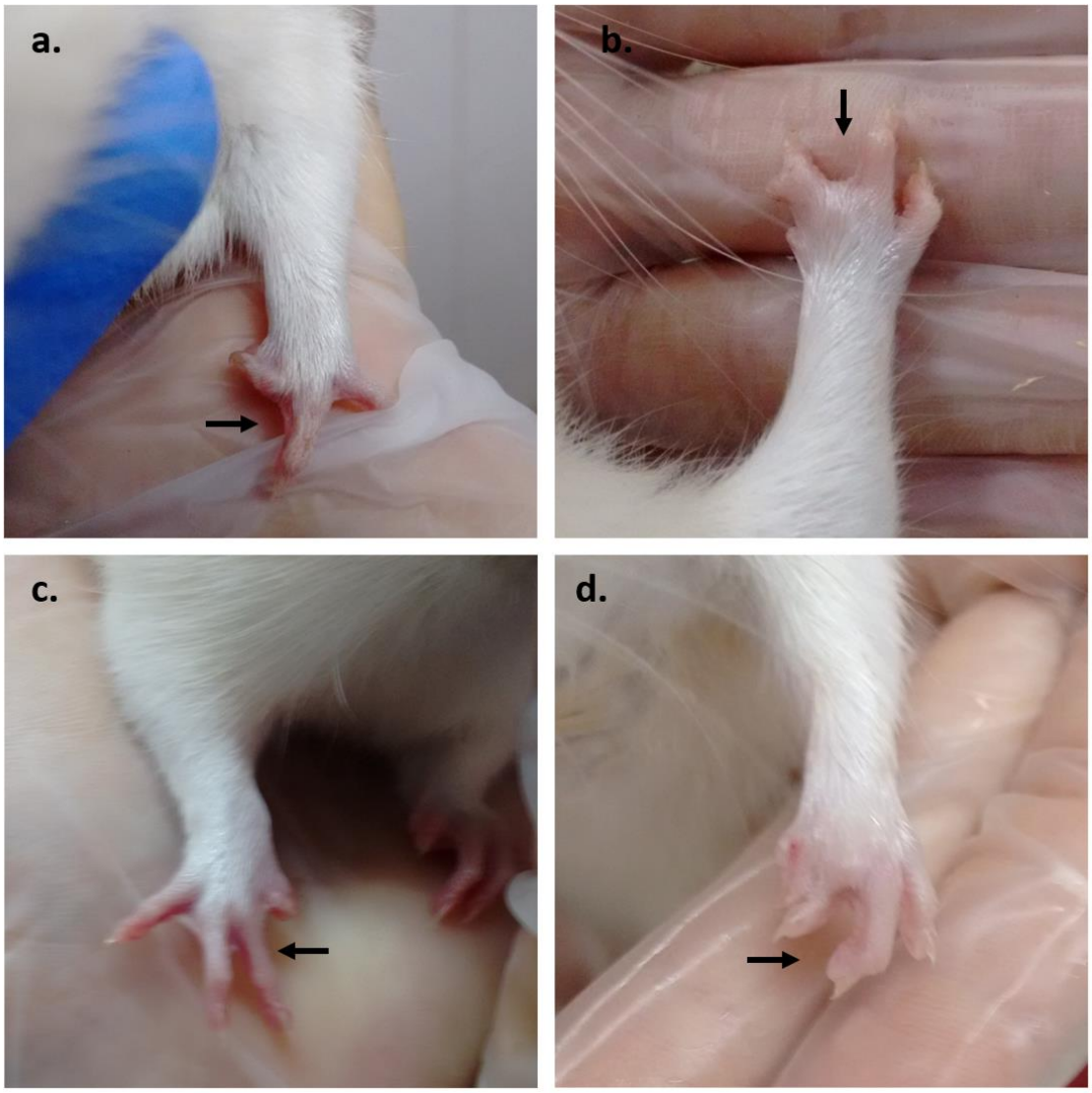
Imágenes representativas que corresponden a fotografías tomadas en el marco de la fase experimental de esta tesis, y previo a las pruebas experimentales. **a**. Lesión distal de torsión en cola de macho VPA, DPN 21. **b y c.** Lesión en punta de cola y acortamiento severo en macho VPA, DPN 21. **d.** Lesión leve en punta de cola, hembra VPA, DPN 21. **e.** Fenotipo de morfología de cola macho control, DPN 21.

Imagen 2. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la morfología de las colas de sujetos experimentales



a. Lesión distal de torsión y acortamiento severo en cola de macho VPA, DPN 21. **b, c y d.** Mismo sujeto, acortamiento y torción del tercio distal de cola y punta de cola en macho VPA, DPN 21.

Imagen 3. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la morfología de falanges de sujetos



experimentales.

a. Formación incompleta la primer falange y agenesia de la segunda y tercera **b.** Sindactilia en la segunda y tercera falange **c.** Agenesia de la primera y segunda falange. **d.** Sindactilia de la primera y segunda falange.

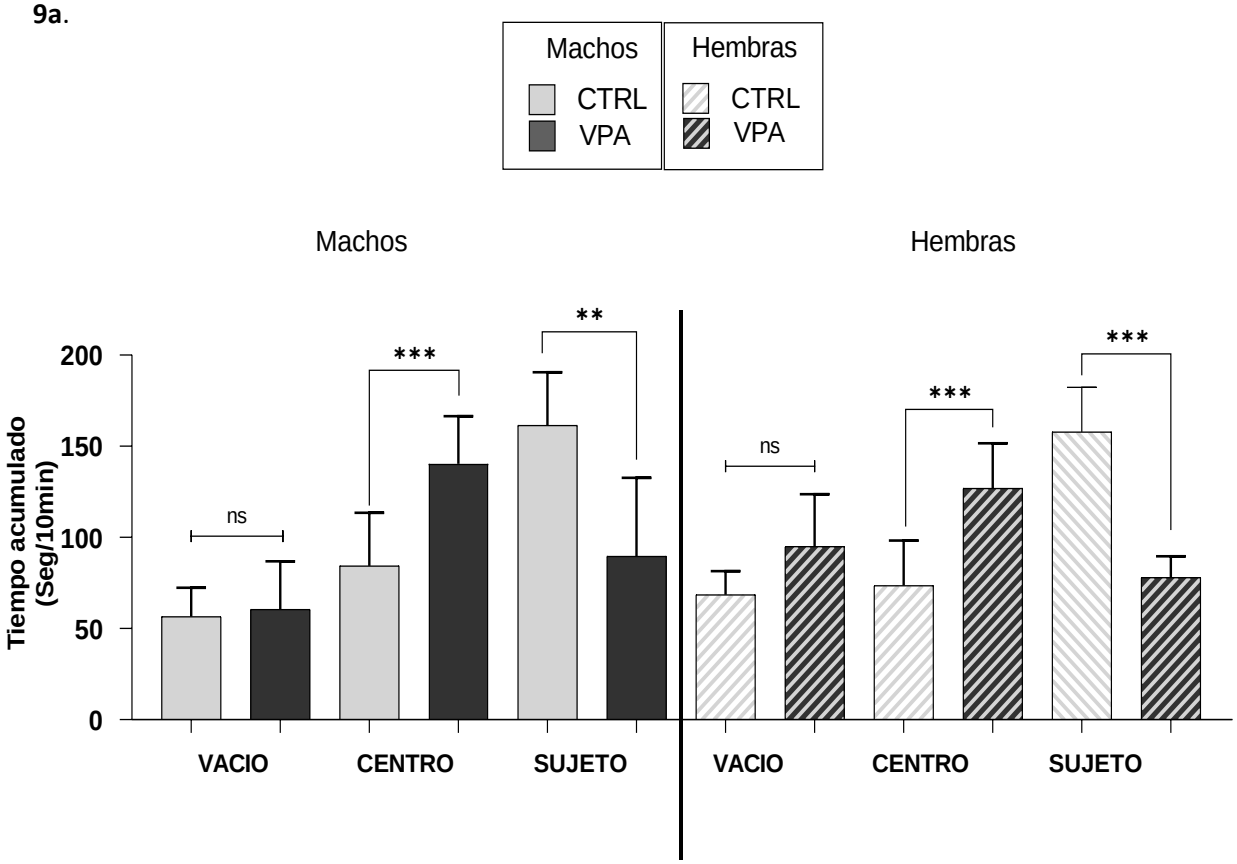
5.3. Impacto De La Exposición Intrauterina Al Ácido Valproico En La Sociabilidad

La exposición intrauterina a VPA reduce los comportamientos de interacción social, compatibles con el fenotipo autista esperado.

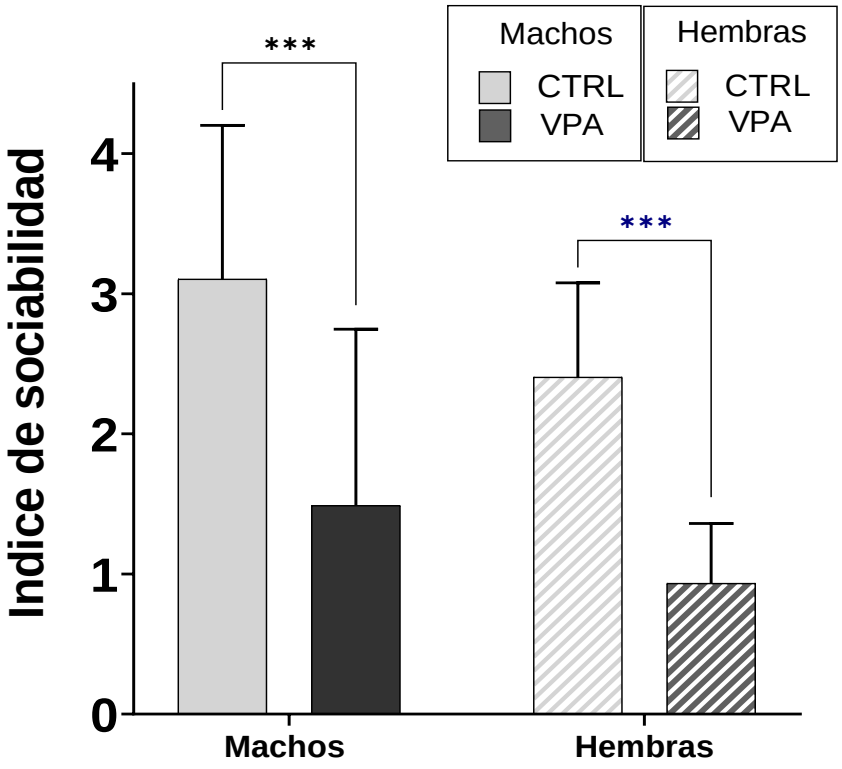
Para determinar si el VPA tenía un efecto real en el fenotipo comportamental esperado para un biomodelo de autismo, se aplicó una batería comportamental con dos de las pruebas típicamente empleabas para la validación del modelo de autismo en roedores. La sociabilidad fue evaluada a través de la prueba de sociabilidad de tres cámaras, nuestros resultados indican que la exposición intrauterina al VPA reduce significativamente los comportamientos de interacción social, respecto al grupo control tratado con solución salina. La exposición al VPA redujo significativamente el tiempo de exploración del compartimiento que contenía al animal extraño, tanto en machos (Machos VPA = M, 89,63) ** como en hembras (Hembras VPA = M, 78), respecto al grupo control (Machos CTRL = M, 161,5, Hembras CTRL = M, 157,80, p <0,0001) (Figura 9a). Adicionalmente se calculó el índice de sociabilidad (IS), definido a partir de la relación entre la duración en el compartimiento con el sujeto extraño y el compartimiento vacío. Nuestros resultados indican que la exposición intrauterina al VPA reduce significativamente el índice de sociabilidad tanto en machos (Machos VPA = M, 1,48), como hembras (Hembras VPA = M, 0,94) respeto al grupo control (Machos CTRL = M, 3,11, Hembras CTRL = M,2,41) (Figura 9b).

Figura 9. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en la sociabilidad.

9a.



9b.



9a. La exposición intrauterina al VPA reduce significativamente el tiempo de exploración del compartimiento con el animal extraño, respecto al grupo control tratado con solución salina La prueba ANOVA de dos vías (F (2,827, 53,71) = 80,72, p <0.001), pero no se ve afectado por el sexo (F (1,000, 19,00) = 0,1219 p = 0,7308). Las comparaciones post hoc indicaron que la exposición al VPA redujo significativamente el tiempo de exploración del compartimiento con el animal extraño tanto en machos ** como en hembras, respecto al grupo control***. La exposición intrauterina al VPA incrementó significativamente el tiempo de exploración del compartimiento central respecto al grupo control (F (1, 19) = 75,02 p <0,0001). Pero no se ve afectado por el sexo (F (1, 19) = 4,370). La exposición al VPA aumenta el tiempo de permanencia en el compartimiento central tanto en machos (Machos VPA = M, 140,39) como en hembras (Hembras VPA = M, 126.95), respecto al grupo control (Machos CTRL = M, 84,40,

Hembras CTRL = M, 73,55, p <0,0001) ***. El tiempo de permanencia en el compartimiento vacío no se vio afectado ni por la exposición al VPA (F (1,000, 19,00) = 0,1219, p = 0.646], ni por el género (F (3,045, 55,42) = 5,514, p = 0.078).

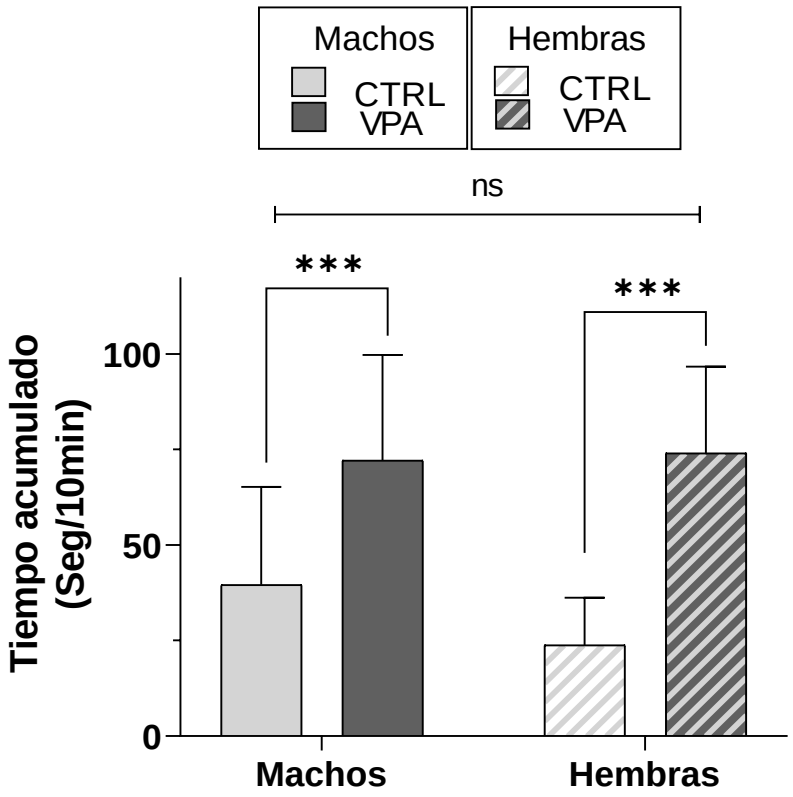
8b. La exposición intrauterina al VPA redujo significativamente el índice de sociabilidad respecto al grupo control (F (1, 19) = 54,16, p < 0.0001), pero no se ve afectado por el sexo (F (1, 19) = 9,404, p = 0,0063). Las comparaciones post hoc indicaron que la exposición al VPA reduce el índice de sociabilidad tanto en machos *** (Machos VPA = M, 1,48), como hembras ***(Hembras VPA = M, 0,94) respeto al grupo control (Machos CTRL = M, 3,11, Hembras CTRL = M,2,41) (p <0,0001).

5.4. Impacto De La Exposición Intrauterina Al Ácido Valproico En El Aumento De Comportamientos Repetitivos Y Estereotipados

La exposición intrauterina a VPA incrementa los comportamientos repetitivos y estereotipados, compatibles con el fenotipo autista esperado.

El grooming repetitivo se midió durante un periodo 10 minutos consecutivos, nuestros resultados demostraron que la exposición intrauterina al VPA aumenta significativamente tiempo acumulado de grooming tanto en machos (Machos VPA = M, 72,21), como hembras (Hembras VPA = M, 74,05) respeto al grupo control (Machos CTRL = M, 39,65, Hembras CTRL = M, 23,84). No se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras.

Figura 10. Efecto de la exposición intrauterina a VPA (500mg/kg) en el aumento de comportamientos repetitivos y estereotipados



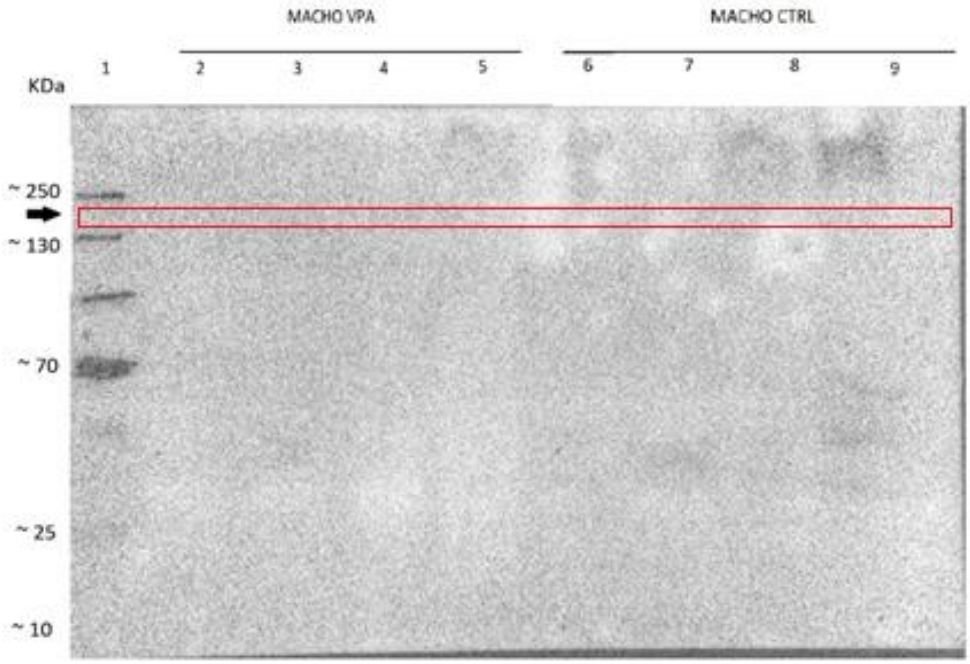
La exposición intrauterina al VPA aumenta significativamente el tiempo acumulado de grooming respecto al grupo control, ANOVA de dos vías **(**F (1, 19) = 38,50, p <0,0001) *** sin embargo, no existe una interacción estadísticamente significativa entre el sexo y la exposición prenatal al VPA (F (1, 19) = 5,872**,** p = 0,0255). No se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras (>0,9999).

5.5. Nivel de expresión de la subunidad NR2B en cerebro ratas expuestas prenatalmente a VPA

Los niveles de expresión proteica para la subunidad NR2B del receptor de NMDA se midieron a través de la técnica de western blot en extractos de cerebelos de ratas expuestas prenatalmente al VPA o a solución salina para el grupo control. Tres estructuras cerebrales (corteza prefrontal, hipocampo y amígdala), fueron procesadas en dos estadios diferentes de neurodesarrollo (DPN 45 - Adolescencia y DPN 90 Adultez tardía).

Se siguieron los protocolos de (Jensen et al., 2009; Rinaldi et al., 2007). Bajo las condiciones estándar del laboratorio no se obtuvo una apropiada marcación de proteínas como se esperaba hallar. Se tuvieron en cuenta las características de la proteína a detectar y se ajustaron las condiciones iniciales del protocolo. Los ajustes realizados mejoraron la técnica electroforesis y el adecuado corrido de las muestras, se observó una migración más lenta y completa hacia los extremos del gel. Sin embargo, durante los ensayos en los cuales se completó la trasferencia no se pudieron identificar con claridad bandas que correspondieran el peso de la proteína blanco.

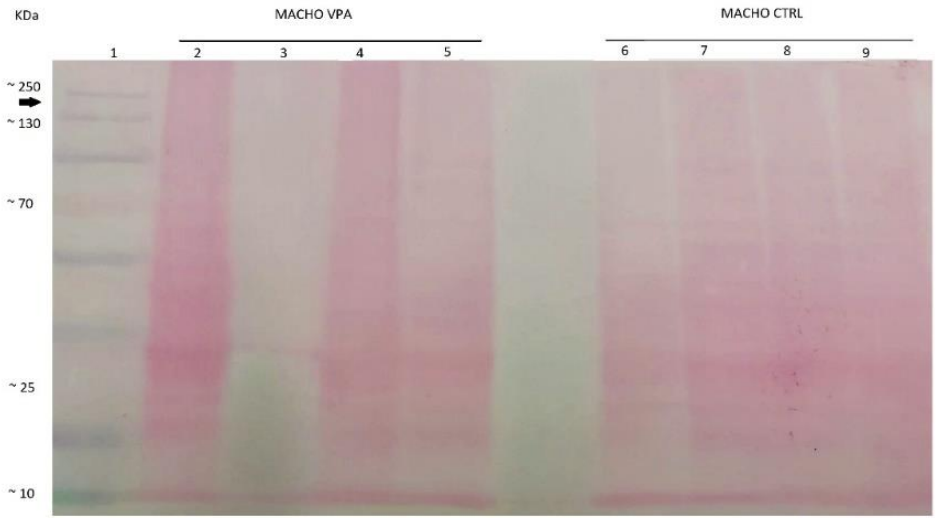
Figura 11. Revelado de membrana de Western Blot, para la subunidad NR2B del NMDAR.



Las bandas esperadas para la subunidad NR2B, corresponden con el peso molecular de 190- KDa (Recuadro rojo, resaltado con flecha negra). Se muestran 4 réplicas técnicas de una misma unidad experimental para ambos grupos. No se evidencian bandas específicas que aporten una diferencia estadísticamente significativa.

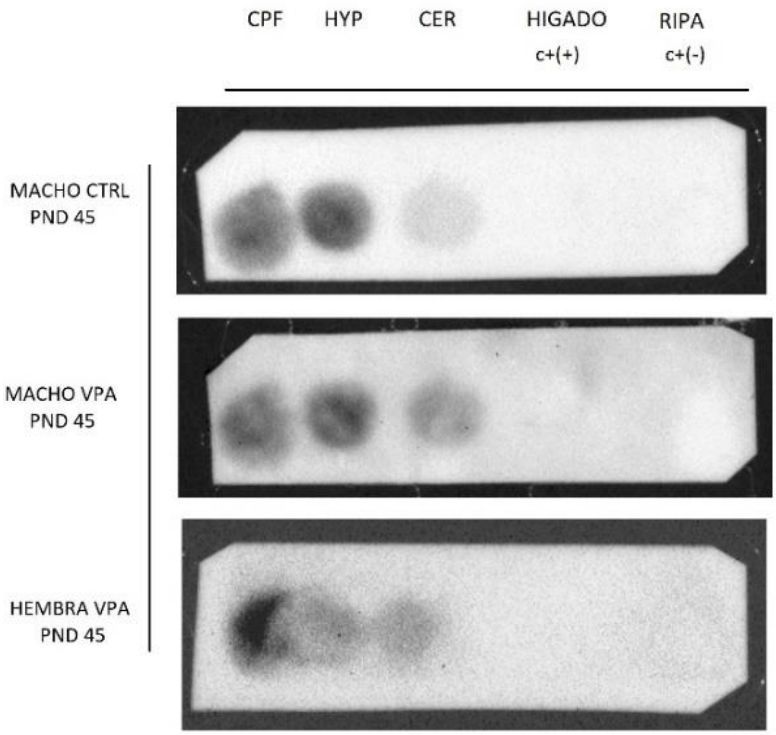
Dentro de los experimentos realizados, se tiño una membrana con rojo de Ponceau para comprobar la eficacia en la trasferencia, se encontró escasa muestra de proteína trasferida hacia la membrana, lo que sugiere fallas en la fase final del experimento que corresponde a la trasferencia. Los experimentos se replicaron teniendo en cuenta los hallazgos y posibles errores durante el procedimiento sin embargo no se obtuvieron revelados que puedan representar un valor significativo.

Figura 12. Membrana posterior al protocolo de transferencia, teñida con rojo Ponceau.



Nótese la baja tinción de proteína en los pesos moleculares correspondientes a banda que se esperaba hallar (Flecha negra).

Figura 13. Revelado de membrana sometida a protocolo de Dot Blot, para la subunidad NR2B del NMDAR.



Para finalizar, aleatoriamente tres muestras diferentes de tejido se sometieron a protocolo de Dot – Blot con el objetivo de verificar los hallazgos, comprobar la calidad de los extractos y de los anticuerpos. Como se observa, se confirmó la presencia de la proteína a identificar en los sustratos y la calidad de los anticuerpos.

Los ensayos se suspenden, a causa de la poca disponibilidad de reactivos para mejorar las condiciones de trasferencia y debido a las condiciones actuales de salud mundial a causa de la pandemia de SARS coV – 2.

6. DISCUSIÓN

Esta investigación empleo un modelo de inducción de autismo por exposición prenatal al VPA en un esfuerzo por explorar aspectos fisiológicos y comportamentales asociados al TEA en humanos. El periodo temprano del neurodesarrollo, específicamente el periodo prenatal, se define como un momento crítico, en el cual el cerebro es particularmente sensible a lesiones por factores ambientales. Aunque el modelo animal inducido por VPA no emula por completo el trastorno humano, esta investigación nos permitió explorar ciertos mecanismos biológicos relevantes y caracterizar el perfil morfológico y comportamental de la progenie expuesta. Durante este estudio nos centramos en aspectos comportamentales específicos que validan el modelo desde el perfil conductual esperado y adicionalmente recolectamos muestras de tejido cerebral que pueden ser potencialmente empleadas para futuras investigaciones.

En cuanto al mecanismo teratogénico del ácido valproico (VPA) y su incidencia en el cerebro en desarrollo, es importante resaltar que el VPA actualmente, se define como un inhibidor de las histonas deacetilasas clase I y clase IIb. Las histonas deacetilasas (HDAC) regulan el estado de actividad de la cromatina y reprimen la expresión génica mediante la eliminación de grupos acetilo en los residuos de lisina de las histonas. Estudios previos han demostrado que los inhibidores deacetilasas (HDACi) clase I, como el VPA, forman una especie de “interruptor” del neurodesarrollo que controla la maduración y función sináptica a través de la inhibición de HDAC1 y HDAC2 en neuronas inmaduras (Sailer et al., 2019). Recientemente, otros hallazgos han observado que el VPA tiene un efecto proapoptótico sobre las células progenitoras neurales (NPC) derivadas de células madre embrionarias de las neuronas glutamatérgicas. Estos datos en conjunto sugieren que el VPA induce la apoptosis de NPC que están destinadas a diferenciarse en neuronas glutamatérgicas y su efecto durante la gestación aumenta significativamente

el riesgo de desarrollar fenotipos asociados con el TEA tanto en humanos como en animales (Fujiki et al., 2013). Los resultados reportados durante esta investigación sustentan el probable vínculo biológico de la exposición prenatal al VPA y el desarrollo de características fenotípicas del TEA en ratas expuestas, y es congruente con los hallazgos previamente reportados.

Si bien el modelo de autismo por exposición VPA es ampliamente reportado, en la actualidad no se ha registrado un umbral de dosis específico para una mayor incidencia de comportamientos similares al del autismo, lo que limita considerablemente la replicabilidad de este biomodelo. La dosis de exposición, la ventana de tiempo y la vía de administración son factores ampliamente variables de acuerdo con la cepa animal estudiada y las características del protocolo de cada experimentador. Estudios previos demuestran que todas las dosis probadas entre 350 - 800 mg/kg de VPA alrededor de E11-12.5, perturban el desarrollo neurológico y su efecto es robusto y ampliamente variable, tanto en ratas como en ratones (Ingram et al., 2000; K. C. Kim, Kim, Go, Choi, Park, Kim, Jeon, dela Pena, et al., 2013; Markram & Foster, 2013; Schneider et al., 2007; Schneider & Przewłocki, 2005; Sheng, M. & Kim, 2011; E. J. Yang et al., 2016).

Para efectos de esta investigación y en cumplimiento con los objetivos planteados, se tuvo en cuenta las dosis reportadas por la literatura y el trabajo desarrollado previamente por el grupo de Neurociencias y Comportamiento de la Universidad de los Andes; en el cual se demostró que una dosis de 400mg/kg vía subcutánea inoculada el día de gestación 12.5 en ratas Wistar no generó un fenotipo autista. Nosotros comparamos la toxicidad de dos dosis diferentes de exposición al VPA (500 y 600 mg/kg) en el mismo periodo de gestación (G 12,5) vía intraperitoneal e identificamos un efecto teratogénico de dosis superiores a 600 mg/kg que resulta ser altamente lesivo para la supervivencia de la progenie expuesta e incrementa significativamente la tasa de reabsorción fetal respecto el grupo CTRL expuesto a solución

salina. No obstante, experimentos adicionales indicaron que una única dosis de 500 mg/kg de VPA vía intraperitoneal a hembras gestantes en el día 12.5 de gestación, se define como la dosis potencialmente más efectiva en cuanto al perfil morfológico y comportamental esperado para un biomodelo de TEA y que genera un menor impacto en el tamaño y supervivencia de las camadas. Nuestros resultados indican que la dosis de exposición a VPA se correlaciona directamente con la gravedad del fenotipo y la posibilidad de supervivencia de las camadas.

Adicionalmente, se demostró que el efecto de la exposición prenatal al VPA esta potencialmente asociado con defectos en el cierre del tubo neural. Se identificó una mayor incidencia de malformaciones en la cola de las crías de ratas expuestas a 500mg/kg de VPA en comparación con el grupo control. Estos resultados sugieren que las malformaciones en cola, incluidas las colas torcidas, no formadas o muy cortas, podrían ser la forma más leve de defectos en el cierre del tubo neural. Estas observaciones, son congruentes con las malformaciones congénitas observadas en humanos expuestos a VPA en el útero, donde el patrón de características dismórficas es indicativo de toxicidad durante la embriogénesis, alrededor del tiempo de cierre del tubo neural (Arndt et al., 2005; Rodier, 2002; Tashiro et al., 2011).

Embriológicamente, la cola en roedores se desarrolla a partir de diferentes estructuras axiales como la cola del tubo neural y la notocorda. Durante la neurulación secundaria, una población de células multipotenciales se organiza en la parte dorsal del brote de la cola, mientras el proceso de canalización (neuroepitelio que rodea la cavidad central) da lugar a un tubo neural sacrocaudal cuya luz es continua con la luz del tubo neural primario más rostralmente. La notocorda de rata se desarrolla entre los días 12 y 13 de gestación, a partir de una masa condensada de células mesenquimales ubicada ventralmente en el tubo neural secundario. Las deformidades morfológicas observadas en el modelo VPA de autismo

puedan deberse al efecto teratogénico sobre la diferenciación y el desarrollo de la notocorda justo los días más críticos de la embriogénesis (Ruhela et al., 2017).

Los resultados de este estudio demostraron que las crías expuestas a VPA además de las malformaciones en el tamaño y forma de las colas, exhibieron con mayor frecuencia dimorfismos en el tamaño y forma de falanges y maloclusión dental. Es importante destacar que la progenie de ratas expuesta a VPA presenta un espectro de fenotipos que van desde una pérdida casi completa de las extremidades hasta malformaciones menores de las falanges y colas. Observamos que la incidencia teratogénica del VPA durante la embriogénesis contribuye notablemente a los defectos observados en las colas y las extremidades de los animales expuestos.

En congruencia con nuestros hallazgos, estudios previos in vitro han explorado el vínculo biológico entre la exposición prenatal al VPA y el aumento en las anomalías morfológicas de las extremidades de animales expuestos. Según estas investigaciones, el VPA inhibe el desarrollo normal de las extremidades in vitro y provoca una disminución significativa en la formación del cartílago, que se correlaciona con el efecto inhibidor de las HDAC. La modificación epigenética causada por hiperacetilación de histonas a consecuencia de la exposición al VPA, inhibe la expresión de marcadores como Sox9 y Runx2, reguladores clave tanto de la condrogénesis como la osteogénesis (Paradis & Hales, 2012). Sin embargo, estos supuestos mecanismos biológicos que subyacen a este efecto deben ser cuidadosamente estudiados en futuras investigaciones.

Además de los defectos morfológicos observados en las colas y las falanges de los animales, también observamos casos esporádicos de mal oclusión dental. Un caso en particular tuvo compromisos severos en el crecimiento anormal de los incisivos, lo que limitó la supervivencia del animal. El crecimiento excesivo de los incisivos dentales puede ser causante de úlceras en las mejillas, la lengua o el paladar y

evitar que los animales se alimenten. En roedores la oclusión óptima de los incisivos es necesaria para lograr un equilibrio entre su rápido crecimiento extrusivo y el desgaste normal, los incisivos de roedores crecen continuamente a lo largo de su vida y se renuevan por completo cada 40 a 50 días. La reducción continua en el tamaño de los incisivos de estos animales depende necesariamente del acto de roer. El desgaste insuficiente da como resultado un patrón de desgaste oclusal anormal y un rápido alargamiento de los dientes.

La temprana aparición de este fenómeno, si bien puede deberse a malformaciones congénitas en la mandíbula, una alta probabilidad de asociación entre la incidencia de malformación en las extremidades y el crecimiento excesivo de los incisivos dentales debe ser contemplada. Nuestros resultados sugieren que estas características, son consecuencia de los defectos morfológicos en las extremidades de la progenie expuesta a VPA y las limitaciones funcionales que conlleva dicho dimorfismo. El efecto de VPA en la morfología de las falanges limita funcionalmente a los animales en actividades básicas como el agarre, lo que probablemente tenga implicaciones directas en la capacidad de atrapar los pellets de alimento y consecuentemente el acto mismo de roer.

La asociación entre el dimorfismo de las extremidades y la mal oclusión dental, también es compatible con la acumulación de porfirinas perioculares, fenómeno conocido como cromodacriorrea. Esta acumulación excesiva se debe a sobreproducción de las glándulas de Harder en el ojo, normalmente, asociada con estrés y/o dolor (Harkness & Ridgway, 1980). Según nuestras observaciones alrededor del 20% de la progenie expuesta a VPA presenta cromadacrriorea, este 20 % corresponde a los sujetos cuyos casos representan los extremos más relevantes de dimorfismo en las extremidades y cola, lo que eventualmente podría indicar una fuerte asociación entre la presencia de malformismos en las extremidades, la oclusión dental y el desarrollo de cromadacriorrea. Sin embargo, es importante resaltar

que las limitaciones estadísticas durante esta investigación asociadas con el tamaño de la muestra y el reducido número de eventos no capturen un efecto real de VPA. Para futuras investigaciones se sugiere observar estas características morfológicas en etapas prematuras del desarrollo, para verificar si estos defectos poseen un perfil congénito real o por el contrario resultan siendo indicativos de endofenotipos variables, dichos estudios aportaran un gran valor traslacional para el modelo de autismo por VPA.

En cuanto al dominio comportamental explorado durante la validación de este biomodelo, es importante resaltar que el autismo es diagnosticado principalmente por dos criterios comportamentales específicos: a) déficit persistente en la comunicación e interacción social y b) patrones de comportamiento, intereses o actividades restringidos y repetitivos. Dado que el deterioro en la interacción social es una característica ampliamente reconocida como definitoria del TEA, se espera que un modelo animal riguroso, muestre déficit en este dominio. Los roedores, son por excelencia especies sociales que se involucran en patrones complejos de comportamiento, como la crianza y el juego (Vanderschuren et al., 2016). Gracias a estas características, el modelo de roedor resulta ser un buen candidato para la aplicación de las baterías que validan el modelo animal de TEA. Estudios previos han establecido varios métodos para medir la sociabilidad de los roedores de formas simples y directas, entre las que incluyen pruebas de interacción social recíproca, juego social juvenil y pruebas de sociabilidad de tres cámaras.

El uso de la prueba de sociabilidad de tres cámaras, o cualquier otro tipo de prueba social, como única herramienta de medición para concluir que un determinado modelo está socialmente afectado o no, podría dar lugar a errores y falsos positivos. Algunos estudios recomiendan, realizar más de una prueba de comportamiento, que especialmente evalué otros dominios característicos del TEA. Cabe señalar que nuestra metodología, además de medir el deterioro social, evaluó la presencia de

comportamientos repetitivos y estereotipados como un probable paradigma de medición complementario para este tipo de modelo.

Durante esta investigación empleamos la prueba automatizada de enfoque social de tres cámaras. La sociabilidad en esta prueba es definida por la preferencia del sujeto para permanecer mayor tiempo en la cámara que contiene a un ratón extraño, que en aquella que contiene un objeto inanimado. (McFarlane et al., 2008; Moy et al., 2007; Silverman et al., 2010; M. Yang et al., 2011). Nuestros resultados demostraron que la exposición prenatal al VPA causa déficit significativo en el dominio social de la progenie expuesta. Estos resultados son congruentes con los presentados por (Baronio, Castro, Gonchoroski, de Melo, Nunes. GD, et al., 2015; Kumar & Sharma, 2016). Otros estudios como el de Kim y colaboradores (2013) previamente compararon el dominio de interacción social entre ratas hembra y machos tratados con VPA. Estos estudios demostraron que las interacciones sociales no fueron significativamente diferentes entre ratas macho y hembra para el grupo control. Sin embargo, la descendencia masculina expuesta al VPA mostró una interacción social significativamente deteriorada mientras la progenie femenina mostró solo déficits marginales (K. C. Kim, Kim, Go, Choi, Park, Kim, Jeon, Pena, et al., 2013). A diferencia de estos resultados, los patrones de comportamiento descritos en nuestros experimentos evidenciaron un déficit significativo en el dominio social de la progenie expuesta tanto en machos como hembras. La diferencia entre los resultados de Kim y colaboradores y los nuestros en cuanto a la interacción social, podrían explicarse por diferentes razones: 1) La discordancia en el método utilizado para evaluar el dominio social. Kim y colaboradores emplearon una prueba de preferencia social, con la exposición del sujeto evaluado a un animal familiar versus un animal novedoso o desconocido, en lugar de la prueba de las tres cámaras empleada en nuestros experimentos); 2) Las diferencias entre las especies de roedores (Kim y colaboradores emplearon ratas Sprague-Dawley, en lugar de ratas Wistar), 3) divergencia entre los mecanismos fisiológicos subyacentes a los déficits de

discriminación de novedad social en estos dos modelos. En futuras investigaciones se sugiere explorar pruebas de sociabilidad complementarias y comparar meticulosamente el comportamiento social entre machos y hembras y sus discrepancias a lo largo de la vida del animal.

Adicional a las pruebas de interacción social, se exploró la presencia de conductas estereotipadas y repetitivas en los animales expuestos prenatalmente a VPA. Para el cumplimiento de este objetivo nosotros evaluamos un patrón de comportamiento denominando grooming o auto acicalamiento. En roedores, el grooming o auto acicalamiento se define en términos generales como un conjunto de movimientos controlados y secuenciales dirigidos a la limpieza y autocuidado de la superficie externa del cuerpo. Este patrón de conducta refleja un comportamiento repetitivo de afrontamiento al estrés y una interacción compleja con la ansiedad y la actividad motora en roedores. La mayoría de los animales dedican un tiempo considerable a la realización de esta actividad, esta universalidad sugiere que este comportamiento cumple una función esencial para los animales. Aunque en la mayoría de los casos la función principal del acicalamiento es mantener una superficie corporal limpia, las formas específicas de cada especie cumplen roles en diversas funciones como la termorregulación, la comunicación y las relaciones sociales (D. G. Kim et al., 2019).

Los resultados de esta investigación confirmaron que la exposición prenatal al VPA conduce al aumento en la frecuencia de las conductas estereotipadas y repetitivas en roedores tanto en machos como hembras. Estos resultados son congruentes con los datos reportados por otros estudios en modelos de autismo en machos y validan esta prueba como un buen predictor del perfil conductual esperado para el modelo. Sin embargo, es importante resaltar que nuestros resultados a diferencia de los reportados por el grupo de Schneider y colaboradores (2018) no muestran una interacción especifica entre el sexo y la exposición al VPA. Los resultados del grupo de investigación de Schneider revelaron un mayor número

y duración de movimientos repetitivos/estereotipados en ratas hembra VPA en comparación con ambos grupos (CTRL y VPA) de machos, pero no muestran una correlación significativa entre el sexo y otras pruebas específicas de ansiedad como el laberinto elevado en cruz (Schneider et al., 2008). Es probable que estas diferencias pueden deberse a un sesgo especifico en la prueba y no a un efecto real entre el sexo y la exposición al VPA. En la actualidad no se conocen otros reportes que comparen los perfiles comportamentales de esta prueba entre machos y hembras, es necesario ampliar la exploración de este paradigma comportamental y su probable dimorfismo sexual, en diferentes estadios del neurodesarrollo como la adolescencia y la adultez temprana.

En relación con nuestros resultados, estudios previos han reportado una relación importante entre la ansiedad y las conductas restringidas/repetitivas en la población con TEA (Gandhi & Lee, 2020). Las estimaciones de prevalencia de ansiedad en personas diagnosticadas con TEA varían ampliamente entre el 22 y 84% (Nimmo-Smith et al., 2020; Vasa & Mazurek, 2015). En el autismo humano, las conductas repetitivas abarcan un rango variable de estereotipias motoras, conductas autolesivas, ocupación persistente con partes de objetos, patrones de interés restringidos y adherencia inflexible a rutinas/rituales no funcionales (Richler et al., 2007). Por su parte, los comportamientos repetitivos observados en los modelos de autismo en roedores son complejos y diversos, además de incluir patrones de auto acicalamiento también se incluyen patrones de salto, giros repetitivos, enterrar canicas, colgarse y levantarse (Whitehouse & Lewis, 2015; Yu et al., 2020). Se espera que en futuras investigaciones la exploración de cualquiera de los patrones anteriormente mencionados y los probables mecanismos neuronales que subyacen a los mismos impulse la investigación traslacional y proporcione información valiosa sobre los tratamientos potenciales para este tipo de comportamientos observados en los TEA.

Para finalizar, esta investigación pretendía explorar en el modelo de autismo por exposición prenatal al VPA cambios moleculares y sinápticos relacionados con la transmisión glutamatérgica postsináptica y la plasticidad sináptica. Otros investigadores previamente han sugerido anomalías en las vías de señalización glutamatérgica estrechamente correlacionadas con la fisiopatología del autismo. Nosotros evaluamos los niveles de expresión de proteínas clave, que se sabe que están ampliamente involucradas con el desarrollo cortical y la plasticidad sináptica.

Entre las diversas alteraciones neuronales detectadas en el TEA un punto de convergencia es la desregulación en la expresión y actividad de proteínas sinápticas específicas, lo que conduce a una señalización intracelular alterada durante la neurotransmisión. La función del glutamato en el SNC está vinculada no solo a las interacciones neuronales sinápticas, sino también a otras funciones, incluidas la maduración cerebral y la organización cortical (Gandhi & Lee, 2020). Los receptores de glutamato (GluRs) se concentran principalmente en regiones que han sido implicadas frecuentemente con la fisiopatología de TEA, incluido el cerebelo e hipocampo (Ozawa et al., 1998). La señalización excitatoria del glutamato a través de los GluRs juega un papel esencial en el desarrollo cortical (Manent y Represa, 2007), lo que también sustenta su participación en la patogénesis de los TEA (Choudhury et al., 2012).

Los NMDAR son tetrámeros compuestos por dos subunidades GluN1 obligatorias, acoplados con dos subunidades reguladoras de tipo GluN2 y tipo GluN3, expresadas en varias isoformas diferentes (GluN2A-D y GluN3A-B), en diferentes regiones del cerebro y en diferentes períodos de desarrollo. De acuerdo con la teoría del cambio del neurodesarrollo, GluN2B / GluN2D y GluN3A / GluN3B son más abundantes en las primeras etapas del desarrollo, mientras que GluN2A / GluN2C se expresan con mayor frecuencia durante la madurez. La composición de las subunidades NMDAR está estrictamente regulada durante el desarrollo y por la plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Wu et al., 2005) Además,

se ha demostrado que la supresión farmacológica de la función NMDAR, mejora significativamente los déficits sociales evidenciados en el modelo de autismo por VPA rescued enhanced self-grooming and jumping in VPA mice, linking elevated NMDAR function in VPA mice with repetitive behaviors.(J.-W. Kim et al., 2014; Wu et al., 2005) (Kim et al., 2014g). Estos resultados en conjunto establecen una asociación entre la hiperfunción los NMDAR y el fenotipo característico del modelo de autismo por exposición prenatal a VPA. En base con estos hallazgos, esta investigación se concentró en evaluar la expresión proteica de las subunidades GluN1 y GluN2A del NMDAR, en tres estructuras cerebrales estrechamente relacionadas con el TEA y en dos diferentes periodos del neurodesarrollo.

Si bien nuestros resultados no fueron concluyentes, esperábamos replicar los experimentos de (Rinaldi et al., 2007), en los cuales una única dosis de VPA prenatal, aumentó considerablemente las corrientes sinápticas mediadas por el NMDAR y una forma de plasticidad sináptica muy amplificada en las neuronas piramidales neocorticales. Esperábamos encontrar una sobreexpresión selectiva de las subunidades NR2B del NMDAR lo que probablemente podría dar luz de los fenómenos fisiológicos que subyacen a las características electrofisiológicas observadas en el cerebro autista. La sobreexpresión selectiva de las subunidades del NMDAR se traduce en corrientes postsinápticas potenciadas y en una forma amplificada de plasticidad. La diversificación en la composición estructural le confiere al NMDAR propiedades electrofisiológicas específicas. Por ejemplo, una sobreexpresión de la subunidad GluN2A conduce una alta probabilidad de apertura, conductancia en los canales iónicos y mayor predisposición a la desensibilización, pero una recuperación más rápida, haciendo de estos receptores moduladores versátiles de la actividad sináptica (Tang et al., 2019).

6.1. Recomendaciones y propuestas futuras

- Si bien nuestros resultados son coherentes con un el fenotipo morfológico y comportamental esperado, se sugieren explorar los mecanismos biológicos que subyacen al efecto de la exposición prenatal al VPA en futuras investigaciones.
- De acuerdo con nuestros resultados, consideramos observar cuidadosamente las características del perfil morfológico en etapas más prematuras del neuro desarrollo y los probables mecanismos biológicos que explican dicho fenómeno.
- Se sugiere explorar baterías comportamentales complementarias, incluidas pruebas de memoria y aprendizaje. Adicionalmente es imperativo comparar el comportamiento social entre machos y hembras y sus discrepancias a lo largo de la vida del animal.
- En futuras investigaciones se sugiere mejorar las condiciones para estandarizar el protocolo de Western blot y explorar los mecanismos moleculares que regulan la composición de las subunidades NMDAR en las sinapsis de cerebros autistas. Estos eventos fisiológicos representan un desafío farmacológico para el establecimiento de nuevas estrategias terapéuticas de los trastornos neurológicos en los que los NMDAR desempeñan un papel fundamental.
- Se espera que en futuras investigaciones la exploración del fenotipo descrito en este modelo y los mecanismos neurobiológicos que subyacen a los mismos impulse la investigación traslacional y proporcione información valiosa sobre los potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento del TEA.

7. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación sustentan el uso experimental del biomodelo de autismo por exposición prenatal al VPA y demuestran la validez aparente y de constructo de este. Nuestros resultados indican que la exposición prenatal al VPA conduce al desarrollo de características fenotípicas del TEA en ratas expuestas y sustenta el vínculo biológico entre la exposición teratogénica y la enfermedad. El efecto teratógeno del VPA trasciende niveles que van desde lo morfológico, comportamental y neurobiológico. Los hallazgos en relación con la subunidad NR2B del NMDAR podrían ser fuente de aspectos relevantes para fisiopatología del TEA, se requieren futuras investigaciones que aborden las características conformacionales y electrofisiológicas del receptor. La potencial utilidad del este modelo para futuras líneas de investigación que profundicen aspectos clave para la compresión de la neurobiología de la enfermedad podría contribuir ampliamente con el hallazgo de blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad.

7.1. Impacto alcanzado

- **ACADÉMICO:** La realización de este proyecto contribuyo a la estandarización de un biomodelo del TEA como aporte a la consolidación de una línea de investigación relacionada con los trastornos del neurodesarrollo. Los resultados obtenidos en esta investigación aportaron a la producción científica, fueron presentados y discutidos en congreso internacional de neurociencias, congreso nacional de las neurociencias COLNE, escenarios académicos que permitieron la divulgación y enriquecimiento del debate en torno a la comprensión de la fisiopatología de la enfermedad. Los resultados presentados en el congreso nacional de las

neurociencias COLNE, fueron meritorios del premio al segundo lugar en el concurso de carteles. Adicionalmente, los resultados parciales de esta tesis fueron presentados en el congreso mundial de Neurociencias, (SfN Neuroscience,2018) que tuvo lugar en San Diego, CA.

- **SALUD Y SALUD OCUPACIONAL:** La fisiopatología de trastornos como el autismo, a pesar de la alta prevalencia mundial sigue siendo poco abordada desde las ciencias básicas; la caracterización fisiopatológica y farmacológica requiere con urgencia perspectivas de interpretación que amplíen el campo clínico, patológico y en un futuro potencien la terapéutica. La apertura de esta línea de investigación y la estandarización de este biomodelo deja un precedente claro respecto a la investigación de trastornos del neurodesarrollo desde las ciencias básicas.
- **SOCIAL, POLÍTICO Y AMBIENTAL:** El TEA conocido por su creciente prevalencia a nivel mundial, se instaura como una problemática de salud Pública que penetra e involucra diferentes escalas sociales y genera un alto costo para el sistema. Esta investigación, pretende dar apertura al debate científico y la divulgación, promoviendo iniciativas para la formulación de futuros proyectos de investigación en ciencias básicas y en salud pública de carácter preventivo que contribuyan al ahorro y eficiencia en los mecanismos de atención y abordaje del TEA.
- **CIENTÍFICO, TECNOLÓGICO Y ECONÓMICO:** El conocimiento de los mecanismos que subyacen a la fisiopatología del TEA permitirá proponer estrategias adecuadas para ampliar la comprensión de la enfermedad y de nuevas estrategias terapéuticas, tanto Farmacológicos, como de neurorrehabilitación, que a su vez depuraran los sesgos de atención en salud y mejorara las condiciones de bienestar y calidad de vida de los individuos y su familia.

8. ANEXOS

Anexo A. Protocolo Determinación De Las Fases Del Ciclo Estral En Ratas Wistar

Materiales

1. Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro.
2. Micropipetas de 10ml desechables
3. Para el lavado vaginal estéril, utilice agua bidestilada de autoclave (ddH2O) y almacene en un recipiente herméticamente cerrado a temperatura ambiente hasta que sea necesario.
4. Para la evaluación citológica, agregue 0.1 g de polvo de cristal violeta a 100 ml de ddH2O. Mezclar bien. La tinción de cristal violeta (0.1%) se puede almacenar en un recipiente herméticamente cerrado a temperatura ambiente hasta que se necesite.
5. Parafromaldehído al 4%
6. Portaobjetos
7. Cubreobjetos

A continuación, se describe un protocolo simple y no invasivo que puede usarse para determinar la etapa del ciclo estral de una rata hembra sin alterar su ciclo reproductivo.

1. Coloque el extremo de una pipeta estéril en el recipiente con ddH2O y extraiga aproximadamente 1ml de ddH2O estéril utilizando las graduaciones en la punta como guía de volumen.
2. Tomar la rata por la cola con la mano no dominante, apoyar la palma de la misma mano sobre el dorso del animal inmovilizándolo contra una superficie rígida o debajo del brazo

(entre el brazo y la parte lateral del tórax del investigador y levantar la cola para exponer la zona perineal de la hembra.

3. Reconocer orificio anal, orificio vaginal y la uretra.
4. Sujete firmemente la cola y eleve la parte trasera. En este punto, el animal puede orinar. De ser así espere hasta que pare la micción, si queda orina en la entrada del canal vaginal, puede enjuagar la abertura con ddH2O usando una pipeta diferente (es decir, no su pipeta de recolección de muestra).
5. Con la mano dominante tome la pipeta, que deberá contener el ddH2O, coloque el extremo de la punta en la apertura del canal vaginal teniendo cuidado de no penetrar en el orificio vaginal ya que la estimulación puede inducir un estado de pseudogestación en ratas (Adler., et. Al., (1970)). Informes más recientes sugieren que los ratones son menos susceptibles a este efecto, (Yang., et. Al); sin embargo, se debe tener cuidado para reducir al mínimo el grado de invasión en análisis repetidos.
6. Presione suavemente el bulbo para vaciar el contenido e inmediatamente succionarlo muy sutilmente para no lastimar al animal.
7. Para obtener un número suficiente de células en una sola muestra, repetir el paso anterior de 4 a 5 veces. El fluido succionado deberá tener una apariencia lechosa.
8. Coloque el líquido obtenido sobre el portaobjetos de vidrio y permita que la mancha se seque por completo a temperatura ambiente. Una vez secos, estos lavados pueden teñirse inmediatamente o almacenarse.
9. Para teñir agregar una gota de cristal violeta o azul de toluidina y cubrir con un cubreobjetos. También se puede agregar una gota de paraformaldehido al 4% durante 5 minutos, para fijar las células.

10. Examinar la muestra al microscopio para determinar los tipos de células presentes. El examen microscópico se debe hacer inmediatamente después de la tinción. Podrá observar células epiteliales cornificadas, leucocitos y / o células epiteliales nucleadas. La proporción de células presentes le permitirá determinar la fase del ciclo, en el momento de la recolección de las muestras (resultados representativos (Tabla 1).

FASE DEL CICLO	DURACIÓN (HORAS)	COMPORTAMIENTO	MORFOLOGÍA DEL FROTIS VAGINAL
Proestro	12	Puede ocurrir calor sexual – Puede haber aceptación del macho.	Gran cantidad de células epiteliales nucleadas, no hay invasión de leucocitos.
Estro	**12**	**Calor sexual – Lordosis Receptividad máxima. Copulación- Máxima probabilidad de fertilización**	**Gran cantidad de células epiteliales queratinizadas (placas o escamas cornificadas sin núcleo visible) y unas muy pocas células nucleadas. Pueden formar masas blancas e irregulares.**
Metaestro	21	No hay calor sexual - No hay receptividad	Invasión de leucocitos de tamaño pequeño y núcleo irregular, células cornificadas anucleadas
Diestro	57	No hay calor sexual - No hay receptividad	Los leucocitos invaden el epitelio vaginal, empiezan a aparecer células nucleadas epiteliales, cuanto más abundantes más avanzado sea el diestro.

Tabla 1. Hallazgos y características adicionales de cada fase, representada en horas de duración, caracterización comportamental y morfología celular obtenida del frotis.

Anexo B. Protocolo Para La Inducción De Un Biomodelo De Autismo Por Exposición Prenatal Al Ácido Valproico En Ratas Wistar

Materiales

1. Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro.

2. Pesa digital calibrada y limpia
3. Jeringas y agujas desechables (Preferiblemente jeringas de para aplicación de insulina 1ml)
4. VPA (Valproato de Sodio, Valcote® I.V, Abbott (Equivalente a 100 mg/ml)
5. Cajas limpias de aislamiento y recuperación
6. Solución salina estéril y jeringas de 3 ml
7. Cojín térmico estéril

Descripción del procedimiento

Apareamiento

1. Este biomodelo requiere de un estricto protocolo de apareamiento e inducción. Una vez se tenga certeza del día exacto del ciclo estral y el peso de cada espécimen (Ver Anexo "Determinación de las fases del ciclo estral en ratas wistar"), las hembras proestro deberán ser transferidas a la caja de apareamiento en la que previamente se debe alojar a un único macho (Apareamiento monógamo). Machos y hembras deben cumplir con los parámetros de peso y edad sugeridos para el apareamiento.

2. Los apareamientos se realizarán preferiblemente en la tarde y discretamente se deben observan comportamientos de cortejo y/o copula. Se permitirá la interacción de la pareja durante toda la noche. El día posterior, trascurridas las horas de contacto nocturno con el macho, se verificará la presencia de tapón mucoso en el introito vaginal. La evidencia de tapón vaginal se considera como parámetro decisivo de apareamiento exitoso. Si el tapón es fácilmente visible por el experimentador la hembra debe ser separada y alojada con otras hembras que estuviesen en condiciones similares. La preñez será designada con la presencia de tapón vaginal o bien una noche de monta, y se asignará como día embrionario 1 (E1).

Confirmación de preñez e inoculación de VPA

3. Para la reconfirmación de preñez se deben avaluar cambios comportamentales característicos de preñez como la “nidación” y cambios físicos como abultamientos laterales en la región abdominal, palpación fetal y aumento considerable de peso.

4. La manipulación de hembras gestantes debe ser rápida y cuidadosa para reducir al minino estrés en los animales. En el día 12,5 de gestación (E12,5) las hembras gestantes, luego de ser pesadas y observadas, serán inoculadas con una única dosis de 500mg/kg de NaVPA, Sigma-Aldrich, vía intraperitoneal. Es indispensable tener una técnica de inoculación adiestrada por el investigador, cualquier error en la manipulación y procedimiento puedo inducir estrés en el animal y enseguida fenómenos de reabsorción fetal prematura no asociada a la exposición al VPA.

5. Las hembras gestantes sometidas al procedimiento de inoculación probablemente desarrollaran efectos secundarios, asociados a la aplicación del medicamento. Perdida de temperatura, inapetencia e inmovilidad, micción y defecación no controladas, perdida de la coordinación motora e inhibición del reflejo de enderezamiento serán algunos de los eventos anormales observados en los animales. Teniendo en cuenta que son sujetos experimentales gestantes es muy importante estabilizarlos con rapidez, se sugiere el uso de cojín térmico y vigilancia continua del animal. Transcurridas aproximadamente 8 horas el animal recupera completamente su condición normal.

Partos y crianza

6. Una vez las superado el día de inoculación cada hembra podrá ser alojada con otra madre en las mismas condiciones experimentales o se alojará individualmente hasta el día del parto según las condiciones del requeridas para el experimento en curso.

7. Idealmente a cada hembra progenitora se le permitirá criar sus propias camadas hasta el destete en el día postnatal 21 – 25 (P 21 - 25). Se espera que la progenie expuesta in útero al VPA, tenga bajo peso al nacer y características morfológicas y comportamentales específicas, que reducirán su tasa de supervivencia al ser destetadas prematuramente. Se sugiere prolongar un par días el destete, o facilitar las condiciones de las cajas de alojamiento respecto a la altura de las botellas de agua y/o acceso al alimento.

Anexo C. Protocolo Para La Prueba De Interacción Social De Tres Cámaras En Ratas Wistar

Materiales

- Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro.
- Sala de experimentación con las mínimas claves visuales, auditivas y somatosensoriales para el sujeto evaluado.
- Aparato para la prueba de interacción social de tres cámaras (Figura 1). El aparato consiste en una caja de policarbonato con paredes removibles que dividen la caja en tres compartimientos de dimensiones iguales (31cmX43cmX30cm) (figura 1a) y una jaula cilíndrica de alambre de 8cm de radio y 13cm de altura (Crawley, 2004) (figura 1b)
- Sujetos para evaluar, ratas adultas entre la octava semana y los seis meses de edad (Yang et al., 2011)
- Animal extraño (sujeto novedoso). Ratas adultas alojadas independientemente, sin interacción alguna con el sujeto evaluado, preferiblemente de la misma edad, sexo y peso corporal. Si la prueba evalúa a varios animales consecutivamente, es indispensable contar con más de un animal extraño para reducir condiciones de estrés y sufrimiento animal. Se

sugiere habituar al sujeto novedoso al alojamiento en jaulas de alambre de prueba, durante sesiones de cinco minutos diarios varios días antes de la primera prueba.

- Alcohol etílico al 70¬¬¬% en botella rociadora rotulado y toallas de papel desechables para ¬uso en la limpieza del aparato cada vez que se termina una prueba.
- Cámara de video para filmación y registro.

Descripción del procedimiento

1. Configure el entorno de la sala para minimizar las señales visuales, olfativas y auditivas. Es fundamental realizar la prueba de tres cámaras en una sala de experimentación completamente neutral.
2. Ubique aparato en el centro de la habitación, sobre una mesa estable. Todo lo que ve el sujeto cuando está en el aparato debe ser el techo y la superficie.
3. Antes de probar el primer sujeto cada día, limpie las paredes inferiores y laterales del aparato como lo haría entre pruebas con diferentes animales, primero con toallas de papel humedecidas con etanol al 70% y agua, y luego con toallas de papel humedecidas con agua del grifo. Secar con toallas de papel y dejar secar al aire durante 5 minutos antes de la prueba. Este procedimiento asegura que los olores en el aparato sean los mismos en todas pruebas. El aparato siempre debe lavarse a fondo con agua y jabón al final de la prueba del día y debe mantenerse limpio y seco cuando no está en uso.

4. Configure el dispositivo de grabación de video. La grabación de video de la sesión experimental permitirá un posterior análisis, sin intervenir directamente durante la prueba.

Preparación de animales para el experimento.

5. Transporte a los animales en sus jaulas domésticas desde la sala de alojamiento hasta la sala de experimentación al mínimo durante 30 minutos previos a la prueba. Es importante que los animales se recuperen del estrés leve inducido por el transporte. Mantenga los sujetos en una habitación tranquila y cercana durante el tiempo que sea necesario para terminar todos los experimentos del día. Marque previamente a todos los sujetos para su identificación durante la prueba, utilizando marcas de bolígrafo oscuro en la cola o el pelaje, tatuajes de patas, punzones en las orejas o identificadores subcutáneos.
6. Aleatoriamente en algunos de los compartimientos laterales, ubique en la jaula de alambre al sujeto extraño, mientras en el compartimiento opuesto se ubique la jaula vacía.

Fase I: Habituación de los sujetos al compartimiento central

7. Ubique el animal de prueba en el compartimiento central, con los divisores laterales cerrados. Este será el inicio de la prueba y deberá ser registrado desde el mismo momento en el que se introduzca al animal dentro del aparato. Esta fase tendrá una

duración de cinco minutos, en los cuales se le permitirá al animal explorar libremente el compartimiento central.

Fase II: Periodo de prueba

8. Transcurridos los cinco minutos del periodo de habitación remueva automáticamente las compuertas que separan los tres compartimentos del aparato. Una vez removidas las compuertas se permitirá al sujeto de prueba moverse libremente a través de los tres compartimientos del aparato durante una sesión de 10 minutos (Periodo de prueba). La estructura de la jaula de alambre permitirá la interacción visual y olfativa entre los sujetos e impedirá al sujeto desconocido dar inicio al contacto social y limitará la posibilidad de interacciones agresivas (Figura 2 b). Así, la iniciación del contacto social será atribuible al sujeto de la prueba, la ubicación del extraño y la jaula de vacía se alternaron entre derecha e izquierda en sesiones consecutivas.
9. Una vez culminado el tiempo de prueba cuidadosamente extraiga al animal de prueba y traspórtelo hasta su respectiva caja alojamiento. Tenga en cuenta que el sujeto extraño debe ser remplazado una vez culminada cada prueba.
10. Para el análisis la prueba, el investigador debe cuantificar las medidas de tiempo y número de entradas a cada compartimiento durante los 10 minutos del periodo de prueba.

Limpieza posterior a la prueba

11. Las señales olfativas en roedores son claves para identificar a otros animales. Para evaluar con precisión la sociabilidad en la prueba de tres cámaras, es fundamental limpiar a fondo el aparato entre sujetos y lávelo al final del día. Este es un punto que no se puede dejar de enfatizar.
12. Elimine los depósitos fecales y urinarios visibles utilizando pañuelos faciales suaves para recoger los depósitos visibles. Elimine los olores persistentes rociando un pedazo de papel toalla de uso pesado con Etanol al 70% hasta que se humedezca y utilizándolo para limpiar la parte inferior de las paredes laterales.

Anexo D. Protocolo Para La Prueba De Auto – Acicalamiento En Ratas Wistar

Materiales

- Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro.
- Sala de experimentación con las mínimas claves visuales, auditivas y somatosensoriales para el sujeto evaluado.
- Aparato para la prueba de auto acicalamiento. El aparato consiste en una caja de policarbonato (31cmX43cmX30cm) (Crawley, 2004).
- Evite el uso de material de camada para evitar la excavación, un comportamiento de repetición potencialmente competitivo.
- Sujetos para evaluar, ratas adultas entre la octava semana y los seis meses de edad (Yang et al., 2011)

- Alcohol etílico al 70% en botella rociadora rotulado y toallas de papel desechables para uso en la limpieza del aparato cada vez que se termina una prueba.
- Cámara de video para filmación y registro.

Descripción del procedimiento

1. Configure el entorno de la sala para minimizar las señales visuales, olfativas y auditivas. Es fundamental realizar la prueba en una sala de experimentación completamente neutral. Las señales salientes de la habitación, la iluminación desigual y los olores persistentes pueden perturbar el comportamiento habitual del animal.
2. Ubique aparato en el centro de la habitación, sobre una mesa estable. Todo lo que ve el sujeto cuando está en el aparato debe ser el techo y la superficie.
3. Antes de probar el primer sujeto cada día, limpie las paredes inferiores y laterales del aparato como lo haría entre pruebas con diferentes animales, primero con toallas de papel humedecidas con etanol al 70% y agua, y luego con toallas de papel humedecidas con agua del grifo. Secar con toallas de papel y dejar secar al aire durante 5 minutos antes de la prueba. Este procedimiento asegura que los olores en el aparato sean los mismos en todas pruebas. El aparato siempre debe lavarse a fondo con agua y jabón al final de la prueba del día y debe mantenerse limpio y seco cuando no está en uso.
4. Configure el dispositivo de grabación de video. La grabación de video de la sesión experimental es una buena manera de permitir un posterior análisis, sin intervenir directamente durante la prueba.

Preparación de animales para el experimento.

1. Transporte a los animales en sus jaulas domésticas desde la sala de alojamiento hasta la sala de experimentación al mínimo durante 30 minutos previos a la prueba. Es importante que los animales se recuperen del estrés leve inducido por el transporte. Mantenga los sujetos en una habitación tranquila y cercana durante el tiempo que sea necesario para terminar todos los experimentos del día. Marque previamente a todos los sujetos para su identificación durante la prueba, utilizando marcas de bolígrafo oscuro en la cola o el pelaje, tatuajes de patas, punzones en las orejas o identificadores subcutáneos.

Fase I: Habituación

2. Ubique el animal de prueba en el centro del aparato de prueba. Esta fase tendrá una duración de cinco minutos, en los cuales se le permitirá al animal explorar libremente el aparato.

Fase II: Periodo de prueba

3. Transcurridos los cinco minutos del periodo de habitación, se le permitirá al animal realizar libremente comportamientos repetitivos de auto acicalamiento.

4. culminado el tiempo de prueba cuidadosamente extraiga al animal de al aparato y traspórtelo hasta su respectiva caja alojamiento.

5. Para el análisis posterior de la prueba, se cuantifico el tiempo empleado y la frecuencia con la que el sujeto evaluado realizó comportamientos repetitivos de auto acicalamiento durante los 10 minutos del periodo de prueba.

Limpieza posterior a la prueba

6. Elimine los depósitos fecales y urinarios visibles utilizando pañuelos faciales suaves para recoger los depósitos visibles.

Anexo E. Protocolo Para Eutanasia Por Decapitación

Materiales

- Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro.
- Guillotina de eutanasia previamente esterilizada y afilada

El uso de este método sin una previa sedación requiere de una justificación científica que demuestre que esta es esencial para el experimento a realizar. Debe ser realizada siempre por una persona técnicamente competente y con experiencia, asegurando el uso de una guillotina adecuada y en buen estado.

Descripción del procedimiento

1. Sujetar el animal de una forma segura e introducir la cabeza hasta exponer

la región cervical a la zona de corte de la guillotina.

2. Bajar firmemente la palanca de la guillotina con cuidado de no exponer los dedos.

Anexo F. Protocolo de extracción de tejido para ensayos moleculares

Materiales

- Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro.
- Instrumental de disección
- Gel refrigerante
- Papel aluminio
- Cámara de CO2 5

- Tubos eppendorf 1,5mL
- Cooler

Descripción del procedimiento

Para evitar la degradación de proteínas del tejido una vez se da inicio al procedimiento se debe emplear el menor tiempo posible. La disección no debe tardar más de 5 minutos a partir de la confirmación de ausencia de signos vitales del animal.

1. Cortar la piel y exponer el cráneo del ratón. Hacer una incisión en la base del cráneo y cortar a lo largo de la cisura longitudinal hasta el extremo occipital. Exponer el cerebro y extraer.
2. Una vez extraído el cerebro completo llevarlo sobre la lámina de aluminio apoyada sobre el gel congelado. Este será el lugar de trabajo.
3. Apoyar el cerebro sobre la región dorsal, con la región ventral hacia arriba, retirar el tallo cerebral y materia blanca para despejar el cerebelo y estructuras requeridas.
4. Dependiendo de la técnica de procesamiento molecular, el tejido deberá ser almacenado. El tejido dispuesto para la técnica de western blot debe introducirse inmediatamente en tubo eppendorf previamente enfriado en el cooler; a menos que el cooler se encuentre en nevera. La muestra del tejido Se debe trasladar de inmediato a -70°C.

Anexo G. Protocolo de homogenización de tejidos RIPA BUFFER (Alfa aesar)

Materiales

- Elementos de protección personal: guantes de látex, tapabocas, gorro.
- Tubos eppendorf 1,5mL y 0.6 ml
- Homogeneizadores
- Centrífuga

- Micropipetas y puntas

Descripción del procedimiento

1. Adicionar 150 ul de buffer de lisis al tejido dentro del homogeneizador.
2. Adicionar 20ul del coctel de inhibidores de proteasas 1 (Tubo café)
3. Adicionar 20ul de inhibidor de proteasas SDS 2(Tubo transparente) *opcionales inhibidores de proteasa: 1 ul Halt Protease and Phosphatases inhibitor
4. Colocar el tejido dentro del homogeneizador de vidrio o para poca cantidad de tejido con homogeneizador de motor pistón azul
5. Macerar los tejidos hasta que se observe exclusivamente el líquido rosa pálido espeso. EVITAR BURBUJAS (en dado caso centrifugar en centrifuga pequeña 5 segundos)
6. Adición de 50 ul más de buffer, homogenizar y verter el homogenizado en tubos eppendorf de 1.5 ml
7. Sonicar el líquido rosa pálido durante 3 segundos a una amplitud de onda del 69%
8. Centrifugar a 4500 revoluciones por minuto durante 20 minutos.
9. Marcar 5 tubos eppendorf de 0.6ml
10. Con una micropipeta de 200ul tomar cuidadosamente volúmenes de 50 ul del sobrenadante en cada tubito de 0.6 ml (líquido claro que queda en la parte superior después de la centrifugación)
11. Almacenar a -20 grados centígrados.

Anexo H. Protocolo Cuantificación Proteínas Pierce 66º nm Microplacas 96 pozos

1. Preparar estándares de Albumina (BSA); los estándares de albumina se deben diluir en agua destilada o des-ionizada. Usar estándares diluidos para obtener las siguientes concentraciones de BSA.

POZO	CONCENTRACIÓN BSA ug/ml
A	2000
B	1500
C	1000
D	750
E	500
F	250
G	125
H	50

SERIADA

Fila	BSA (ul)	Agua (ul)
A	Madre 1: 130 ul vial	0
B	**Madre 2: 97.5 ul vial**	**32.5**
C	70 ul A	70
D	**70 B**	**70**
E	70 C	70
F	70 E	70
G	70 F	70
H	28 G	42

INDEPENDIENTE

Fila	BSA (ul) vial	Agua (ul)
A	10	0
B	75	25
C	50	50
D	37.5	62.5
E	25	75
F	12.5	87.5
G	62.5	937.5
H	25	975

2. Pipetear 10 ul de cada estándar de BSA y hasta completar réplicas (3) de cada muestra en los pozos respectivos para realización de curva y vortexiar.

3. Hacer prueba de color a “ojímetro” : diluir una de las muestras 1 en 50 y 1 en 100. En un tubo de eppendorf tomar 10ul y agregar 150ul Protein Assay Regent
4. Observar prueba de color y comparar con la curva de estándares de albúmina (BSA) para determinar a ojímetro si el color está en el rango de color de la curva de albúmina.
5. **De acuerdo con el color seleccionar la dilución de trabajo para todas las muestras.**

   Pipetear de cada muestra 3 réplicas de 10 ul y 3 réplicas de 20ul en los pozos respectivos
6. Adicionar 150 ul de Protein Assay Regent a cada pozo.
7. Cubrir la placa con papel aluminio y agitas suavente a velocidad media por 1 minuto.
8. Usar un lector de microplacas para medir la absorbancia, medir absorbancia para una longitud de onda de 655 nm. (VER PROTOCOLO LECTOR DE PLACAS ULTRAMARK LABORATORIO EQUIPOS COMUNES)

9. Realizar curva de estándares y con ella calcular la concentración de proteína total de cada una de las muestras. Tener en cuenta el promedio y la desviación estándar de las lecturas.

ANÁLISIS (excel)

1. Se realiza la curva de estándares BSA con los valores de absorbancia obtenidos en el lector de placas Ultramark. Para obtener el valor de la absorbancia se promedian los valores obtenidos para cada concentración de BSA. Importante si uno de los tres valores de las réplicas está fuera del rango NO SE CONSIDERA PARA EL PROMEDIO.
2. Se realiza gráfica de dispersión concentración Vs. Absorbancia, en el eje X y Y respectivamente.
3. Se realiza curva de tendencia tipo logarítmico y se obtiene la fórmula respectiva.
4. Promediar los valores de absorbancia de las muestras y reemplazarlos en la fórmula obtenida en el punto 3 para hallar la concentración de proteínas de cada muestra.

5. Verificar los datos de concentración obtenidos con la curva de estándares BSA y graficar curva concentración vs absorbancia para las muestras
6. Evaluando la calidad de los datos de concentración de las muestras, escoja las réplicas más consistentes de cada muestra y con eso obtenga la cantidad de proteína en 1 ul.

Anexo I. Protocolo de western blot para la subunidad NR2B del RMNDA

El protocolo para la detección del NR2B se llevó a cabo usando el Mini Trans-Blot® (BioRad) donde se realizó tanto la SDS-PAGE como la transferencia en húmedo. El revelado de las membranas se llevó a cabo usando el Chemidoc™ MP Imaging System (BioRad).

REACTIVOS

1. Acrilamida/Bis (30% T, 2,7% C) Bio-Rad (ref. 1610158)
2. TRIS HCl 1.5M pH 8,8: Diluir 59,1 g de Tris-base en 200 mL de agua destilada y desionizada (dd H2O). Después ajustar pH a 8,8 con HCl (6N). Finalmente, llevar a volumen hasta 250mL con dd H2O.
3. TRIS-HCl 0,5M pH 6.8 en 90 ml y aforar a 100 ml después de ajustar pH Diluir 19,7g de Tris-base en 200 mL dd H2O. Después ajustar pH a 8,8 con HCl (6N). Finalmente, llevar a volumen hasta 250mL con dd H2O. Nota: es esencial preparar estos buffers TRIS con TRIS-BASE. Después de disolverlo se ajusta su pH con HC
4. SDS al 10% (10 g llevar a 100 mL con dd H2O)
5. Persulfato de amonio: Para 500µL de solución al 10% p/v se pesan 50mg de persulfato de amonio en un vial de 1,5mL y se le adicionan 500µL de agua destilada (esta solución se debe preparar en el momento de su uso. Se debe mantener protegida de la luz y a 4°C).

6. TEMED (Tetramethylethylenediamine)
7. Buffer de Laemmli (Buffer de carga) (2X)
   - Agua destilada (dd H2O)→ 3,55mL
   - TRIS-HCl 0,5M pH 6,8 → 1,25mL
   - Glicerol → 2,5Ml
   - SDS 10% (%p/v) → 2mL
   - 2-β-mercaptoetanol 5% →0,8mL(*)
   - Azul de bromofenol 0,5%(%p/v) → 0,2mL

   Nota: mezclar todos los reactivos a excepción del 2-β-mercaptoetanol (el cual es muy volátil) y almacenar a temperatura ambiente. Para el uso, tomar una alícuota de 950 µL y adicionar 50 µL de 2-β-mercaptoetanol INMEDIATAMENTE ANTES DE USAR.
8. Buffer de corrida 10X
   - TRIS base 188mM: 30,3g
   - Glicina 188mM: 144g
   - SDS 0,1% (p/v) 10g

   Diluir los reactivos en 800mL de dd H2O y llevar a 1L. Agitar suavemente evitando la formación de espuma.
9. Buffer de corrida 1X
   - 100ml de buffer 10x
   - 900ml de dd H2O

   Mezclar con agitación antes de usar

Descripción del procedimiento

1. Armar el aparato para la elaboración de geles. Poner el vidrio pequeño sobre el vidrio espaciador (verificando que coincidan). Después, deslizar sobre el soporte, el cual debe estar sobre una base firme y plana (180°).
2. Preparar en un tubo falcon (15 o 50mL) la solución para el gel separador (gel inferior). Nota: tener siempre en cuenta el volumen total de la preparación, el cual debe estar de acuerdo con el volumen propuesto para el grosor del gel. Se debe preparar un poco más de lo dispuesto para el gel con el fin de dejar un testigo para saber si la reacción de polimerización sucedió o no.
3. Añadir isopropanol con micropipeta Pasteur para nivelar el gel. Llenar hasta el nivel superior
4. Dejar que polimerice (aprox. 30min) verificar el testigo para saber el momento de la gelificación. Lavar con agua para eliminar el isopropanol y quitar el exceso de agua con papel filtro sin tocar el gel.
5. Preparar en un tubo falcon (15 o 50mL) la solución para el gel concentrador (gel superior).
6. Añadir el gel concentrador hasta el tope del vidrio pequeño con una micropipeta de Pasteur por una esquina. Adicionar más cada vez que se baje el nivel del gel concentrador (en caso de que ocurra).
7. Colocar el peine y esperar a que polimerice para marcar los pozos. Nota: adicionar a ambos lados de los peines un poco de la solución del gel para evitar que se retraiga al momento de solidificarse
8. Sacar los vidrios del soporte y pasarlos al soporte que tiene los electrodos. Nota: vidrio pequeño debe quedar hacia la cámara interior. Asegurar los 2 geles.
9. Colocar todo el soporte en la cubeta del buffer de tal manera que coincida el color de los electrodos con los del buffer (rojo-rojo y negro-negro)
10. Llenar la cámara interna con el buffer de corrida 1X y sacar los peines.

11. Colocar 2-4 µL de marcador de peso molecular, preferiblemente en el pozo 1 o 10 Nota: seguir las indicaciones del proveedor del marcador de peso molecular
12. Con una micropunta delgada agregar cuidadosamente 20-25 µL de muestra en cada pozo y anotar muy bien la ubicación de cada muestra Nota: se debe agregar lo equivalente a la cantidad de proteína calculada dependiendo de la estandarización (usualmente 20-30 µg de proteína) a cada pozo, por tanto, es necesario hacer ese cálculo antes de iniciar el experimento.
13. Vaciar el resto del buffer por fuera de la cámara hasta llenar todo el recipiente. Luego poner la tapa con los electrodos. Nota: en caso de no disponer de suficiente cantidad de buffer de corrida, cerciorarse que se llena hasta la marca de "2 gels" de la cubeta.
14. Conectar a la fuente de poder y oprimir el botón "RUN". Observar periódicamente para asegurarse que el marcador y la muestra no se salgan del gel y que el buffer de la cámara interna no se seque; en tal caso detener la electroforesis y adicionar más buffer de corrida. Nota: iniciar la electroforesis fijando 80V por 20min. Esta condición permite que se apilen las proteínas hasta que llega a la interfaz entre ambos geles. Al momento de ver el frente de corrida en el gel separador subir el voltaje a 100V por 1hora 30 min (aprox.). NO detener o pausar la electroforesis hasta que se lleve a término, para modificar el voltaje hacerlo de forma graduada mientras está corriendo la electroforesis.
15. Una vez llegue el frente de corrida al fondo del gel detener la electroforesis.

CONTINUAR CON EL PROTOCOLO DE TRANSFERENCIA

1. Antes de la finalización de la electroforesis se deben equilibrar los elementos del sándwich en buffer de transferencia 1X.
2. Empapar los elementos del sándwich con el buffer de transferencia 1X durante 30 min

3. Activar la membrana de PVDF. Sumergir la membrana en metanol por 1min. Lavar con dd H2O por 5min. Después, equilibrar en buffer de transferencia por 10min o hasta el momento de ensamblaje del sándwich. Nota: Cortar previamente la membrana teniendo en cuenta el tamaño del gel transferir.
4. Ensamblar el cassette dejando en el centro el gel y la membrana de PVDF, luego los dos papeles de filtro y en los extremos las dos esponjas.
5. Poner el cassette en el tanque y llenar el tanque con buffer de transferencia 1X. Poner bloque refrigerante en la cámara para evitar sobrecalentamiento. Poner una pastilla magnética y mantener en agitación para favorecer la redistribución del buffer y la temperatura en todo el tanque
6. Encender la fuente de energía y transferir por 1 hora 30 minutos a 100V (350mA). Nota: al momento de encender el dispositivo esperar a que salgan burbujas para saber si funciona
7. Retirar la membrana y llevarla a una caja de western blot

INMUNODETECCIÓN

1. Incubar en solución de bloqueo por 1 hora
2. Lavar 3 veces con buffer de lavado 1X TBST
3. Preparar la solución del anticuerpo primario.
4. Incubar con anticuerpo primario.
5. Lavar 3 veces con TBST 1X 6.
6. Incubar con anticuerpo secundario por 2 horas
7. Lavar 3 veces con TBST 1X
8. Lavar por 1min en dd H2O

9. Preparar solución de revelado. El kit de revelado ECL chemiluminiscence cuenta con el reactivo A y reactivo B. Mezclar ambos reactivos en proporción 1:1. Se recomienda mezclar 1mL de A y 1mL de B. Adicionar en toda el área de la membrana esta solución

10. Introducir al equipo fotodocumentador y revelar por 10min

11. En caso de querer conservar la membrana para próximas pruebas, almacenar a 4°C en TTBS 1X.

Anexo J. Acta de aprobación comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia

Comité de Ética
Facultad de Medicina
Sede Bogotá

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 010-158-18
Fecha: 25 de mayo de 2018

Nombre completo del proyecto: **"APROXIMACIÓN COMPORTAMENTAL Y GLUTAMATÉRGICA DE UN MODELO DE ROEDOR DEL TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA POR EXPOSICIÓN PRENATAL A ÁCIDO VALPRÓICO".**

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Johana Andrea Moreno Avendaño

Dirigido por: los profesores Zulma Janeth Dueñas Gómez y Luis Fernando Cárdenas

Presentado por: el profesor Humberto Arboleda Granados, Coordinador Académico

Departamento o Sección: Maestría en Neurociencias de la Facultad de Ciencias

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 25 de mayo de 2018

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996) actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre do 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Medica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, titulo 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo).
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto.
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica).

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

1	Amador Luis Roberto	Departamento de Patología
2	Artega Díaz Clara Eugenia	Pensionada Dpto. de Morfología
3	Díaz Cruz Luz Amparo	Departamento de Obstetricia y Ginecología
4	Duarte Gutiérrez Liz Marcela	Asesora Jurídica Facultad de Medicina
5	Duarte Torres Silvia Cristina1	Departamento de Ocupación Humana
6	Guerrero Fonseca Carlos Arturo	Presidente Comité de Ética / Dpto. de Ciencias Fisiológicas
7	Parra Pineda Mario Orlando	Departamento de Obstetricia y Ginecología

SESQUICENTENARIO UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

[Página 1/1]
Elaboró Jeannette Pineda A.

Carrera 30 N°. 45-03
FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 - 1 piso, Of.136
Conmutador: (57) (1) 316 5000 ext. 15167
Bogotá, Colombia
eticasalud_fmbog@unal.edu.co

Patrimonio de todos los colombianos

Comité de Ética
Facultad de
Medicina

Sede Bogotá

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

El Comité consideró que el presente estudio:

a. Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.

b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA ha generado a este respecto.
d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:
El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio.**

Nombre: **CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA**
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana
Cargo: Presidente Comité de Ética

Carrera 30 N°. 45-03
FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471- 1 piso, Of. 136
Conmutador: (57) (1) 316 5000 ext. 15167
Bogotá, Colombia
eticasalud_fmbog@unal.edu.co

Patrimonio
de todos
los colombianos

SESQUICENTENARIO
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

9. REFERENCIAS

Arndt, T. L., Stodgell, C. J., & Rodier, P. M. (2005). The teratology of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *23*(2–3), 189–199. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.11.001

Artigas-Pallares, J., & Paula, I. (2012). El autismo 70 años después de Leo Kanner y Hans Asperger. *Revista de La Asociación Española de Neuropsiquiatría*, *32*(115), 567–587. https://doi.org/10.4321/S0211-57352012000300008

Autism Society. (2016).

Banerjee, A., Garcia-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L., Hall, S., & Kilgard, M. (2013a). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *Int J Neuropsychopharmacol*, *16*, 1309–18.

Banerjee, A., Garcia-Oscos, F., Roychowdhury, S., Galindo, L., Hall, S., & Kilgard, M. (2013b). Impairment of cortical GABAergic synaptic transmission in an environmental rat model of autism. *Int J Neuropsychopharmacol*, *16*, 1309–18.

Baronio, D., Castro, K., Gonchoroski, T., de Melo, G. M., Nunes, G. D. F., Bambini-Junior, V., Gottfried, C., & Riesgo, R. (2015). Effects of an H3R Antagonist on the Animal Model of Autism Induced by Prenatal Exposure to Valproic Acid. *PLOS ONE*, *10*(1), e0116363. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116363

Baronio, D., Castro, K., Gonchoroski, T., de Melo, G., Nunes. GD, Bambini-Junior, V., Gottfried, C., & Riesgo, R. (2015). Effects of an H3R antagonist on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *PloS One*, *10*(1). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0116363

Belzung, C., Leman, S., Vourc'h, P., & Andres, C. (2005). Rodent models for autism: A critical review. *Drug Discovery Today: Disease Models*, *2*(2), 93–101. https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2005.05.004

Bennett, G., Wlodarczyk, B., Calvin, J., Craig, J., & Finnell, R. (2000). Valproic acid induced alterations in growth and neurotrophic factor. *Reprod Toxicol*, *14*, 1–11.

Burrows, E. L., Laskaris, L., Koyama, L., Churilov, L., Bornstein, J. C., Hill-yardin, E. L., & Hannan, A. J. (2015). A neuroligin-3 mutation implicated in autism causes abnormal aggression and increases repetitive behavior in mice. *Molecular Autism*, *6*, 1–11. https://doi.org/10.1186/s13229-015-0055-7

Center for Diesease Control and Prevention. (2015).

Cheaha, D., Bumrungsri, S., Chatpun, S., & Kumarnsit, E. (2015). Characterization of in utero valproic acid mouse model of autism by local field potential in the hippocampus and the olfactory bulb. *Neuroscience Research*, *98*, 28–34. https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.04.006

Choudhury, P. R., Lahiri, S., & Rajamma, U. (2012). Glutamate mediated signaling in the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *100*(4), 841–849. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.06.023

DiLiberti, J., Farndon, P., Dennis, N., & Curry, C. (1984). The fetal valproate syndrome. *DiLiberti JH, Farndon PA, Dennis NR, Curry CJR.*, *19*, 437–481.

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

Famitafreshi, H., & Karimian, M. (2018). Overview of the Recent Advances in Pathophysiology and Treatment for Autism. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *17*(8), 590–594. https://doi.org/10.2174/1871527317666180706141654

Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., Rooney, R. J., Patel, D. H., & Thuras, P. D. (2010). mRNA and Protein levels for GABAA alpha 4, Alpha 5, Beta 1 and GABABR 1 receptors are altered in brains from subjects with autism. *J. Autism Dev.Disord*, *40*, 743–750. https://doi.org/doi: 10.1007/s10803-009-0924-z

Favre, M. R., Barkat, T. R., Lamendola, D., Khazen, G., Markram, H., & Markram, K. (2013). General developmental health in the VPA-rat model of autism. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*, 88. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00088

Fujiki, R., Sato, A., Fujitani, M., & Yamashita, T. (2013). A proapoptotic effect of valproic acid on progenitors of embryonic stem cell-derived glutamatergic neurons. *Cell Death and Disease*, *4*. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.205

Fuller, L. C., Cornelius, S. K., Murphy, C. W., & Wiens, D. J. (2002). Neural crest cell motility in valproic acid. *Reproductive Toxicology*, *16*(May), 825–839.

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

Gandhi, T., & Lee, C. C. (2020). Neural Mechanisms Underlying Repetitive Behaviors in Rodent Models of Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*. https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.592710

Go, H. S., Seo, J. E., Kim, K. C., Han, S. M., Kim, P., Kang, Y. S., Han, S. H., Shin, C. Y., & Ko, K. H. (2011). Valproic acid inhibits neural progenitor cell death by activation of NF-κB signaling pathway and up-regulation of Bcl-XL. *J Biomed Sci*, *18*(1), 48. https://doi.org/1423-0127-18-48 [pii] 10.1186/1423-0127-18-48

Greer, P., Hanayama, R., Bloodgood, B., Mardinly, A., Lipton, D., Flavell, S., Kim, T., Griffith, E., Waldon, Z., & Maehr R, et al. (2010). The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell*, *140*, 704–716.

Grzadzinski, R., Huerta, M., & Lord, C. (2013). DSM-5 and autism spectrum disorders (ASDs): an opportunity for identifying ASD subtypes. *Mol. Autism*, *4*.

Harkness, J., & Ridgway, M. (1980). Chromodacryorrhea in laboratory rats (Rattus norvegicus): etiologic considerations. . *Lab Anim Sci.*, *30*(5), 841–844.

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

Jensen, V., Rinholm, J. E., Johansen, T. J., Medin, T., Storm-Mathisen, J., Sagvolden, T., Hvalby, & Bergersen, L. H. (2009). N-methyl-d-aspartate receptor subunit dysfunction at hippocampal glutamatergic synapses in an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Neuroscience*, *158*(1), 353–364. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.016

Kanner, L. (1944). Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child*, *2*, 217–250.

Kim, D. G., Gonzales, E. L., Kim, S., Kim, Y., Adil, K. J., Jeon, S. J., Cho, K. S., Kwon, K. J., & Shin, and C. Y. (2019). Social Interaction Test in Home Cage as a Novel and Ethological Measure of Social Behavior in Mice. *Experimental Neurobiology*, *28*(2), 247–260. https://doi.org/10.5607/EN.2019.28.2.247

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), e104927. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0104927

Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Park, J. H., Kim, H. J., Jeon, S. J., Dela Pena, I. C., Han, S. H., Cheong, J. H., Ryu, J. H., & Shin, C. Y. (2013). Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Journal of Neurochemistry*, *124*(6), 832–843. https://doi.org/10.1111/jnc.12147

Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Park, J. H., Kim, H. J., Jeon, S. J., dela Pena, I. C., Han, S. H., Cheong, J. H., Ryu, J. H., & Shin, C. Y. (2013). Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Journal of Neurochemistry*, *124*(6), 832–843. https://doi.org/10.1111/jnc.12147

Kim, K. C., Kim, P., Go, H. S., Choi, C. S., Park, J. H., Kim, H. J., Jeon, S. J., Pena, I. C. dela, Han, S.-H., Cheong, J. H., Ryu, J. H., & Shin, C. Y. (2013). Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in pre-natal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. *Journal of Neurochemistry*, *124*(6), 832–843. https://doi.org/10.1111/JNC.12147

Kumar, H., & Sharma, B. (2016). 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

Lee, E.-J., Choi, S. Y., & Kim, E. (2015). NMDA receptor dysfunction in autism spectrum disorders. *Current Opinion in Pharmacology*, *20*(JANUARY 2015), 8–13. https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.10.007

Löscher, W. (1999). Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanisms of action. *Progress in Neurobiology*, *58*(1), 31–59. https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00075-6

Markram, K., & Foster, J. A. (2013). *General developmental health in the VPA-rat model of autism*. *7*(July), 1–11. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00088

Markram, K., Rinaldi, T., Mendola, D. La, Sandi, C., & Markram, H. (2008). Abnormal Fear Conditioning and Amygdala Processing in an Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*, *33*(4), 901–912. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301453

McFarlane, H., Kusek. GK, Yang, M., Phoenix, J., Bolivar, V., & Crawley, J. (2008). Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes, Brain, and Behavior*, *7*(2), 152–163. https://doi.org/10.1111/J.1601-183X.2007.00330.X

Mehta, M. V., Gandal, M. J., & Siegel, S. J. (2011). mGluR5-Antagonist Mediated Reversal of Elevated Stereotyped, Repetitive Behaviors in the VPA Model of Autism. *PLoS ONE*, *6*(10), e26077. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026077

Min de salud de Colombia. (2015). *PROTOCOLO CLÍNICO PARA EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y RUTA DE ATENCIÓN INTEGRAL DE NIÑOS Y NIÑAS CON TRASTORNOS DEL ESPECTRO AUTISTA*.

Modi, M. E., & Young, L. J. (2012). The oxytocin system in drug discovery for autism: animal models and novel therapeutic strategies. *Horm. Behav*, *61*, 340–350. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.12.010

Moore, S. J. (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

Moy, S. 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. (2007). Mouse Behavioral Tasks Relevant to Autism: Phenotypes of Ten Inbred Strains. *Behavioural Brain Research*, *176*(1), 4. https://doi.org/10.1016/J.BBR.2006.07.030

Nanson, J. (1992). Autism in fetal alcohol syndrome: a report of six cases. *Alcohol Clin Exp Res*, *16*, 558–565.

Nazeer, A., & Ghaziuddin, M. (2012). Autism spectrum disorders: clinical features and diagnosis. *Pediatr. Clin. North Am.*, *59*(1), 19–25.

Nimmo-Smith, V., Heuvelman, H., Dalman, C., Lundberg, M., Idring, S., Carpenter. P, Magnusson. C, & Rai. D. (2020). Anxiety Disorders in Adults with Autism Spectrum Disorder: A Population-Based Study.

Journal of Autism and Developmental Disorders, *50*(1), 308–318. https://doi.org/10.1007/S10803-019-04234-3

Palermo, M. T., & Curatolo, P. (2004). Pharmacologic treatment of autism. *J. Child Neurol*, *19*, 155–164.

Paradis, F.-H., & Hales, B. F. (2012). *Exposure to Valproic Acid Inhibits Chondrogenesis and Osteogenesis in Mid-Organogenesis Mouse Limbs*. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs292

Richler, J., Bishop, S., Kleinke. JR, & Lord, C. (2007). Restricted and repetitive behaviors in young children with autism spectrum disorders. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *37*(1), 73–85. https://doi.org/10.1007/S10803-006-0332-6

Rinaldi. (2008). Hyper-connectivity and hyper-plasticity in the medial prefrontal cortex in the valproic acid animal model of autism. *Frontiers in Neural Circuits*, *2*. https://doi.org/10.3389/neuro.04.004.2008

Rinaldi, T., Kulangara, K., Antoniello, K., & Markram, H. (2007). Elevated NMDA receptor levels and enhanced postsynaptic long-term potentiation induced by prenatal exposure to valproic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(33), 13501–13506. https://doi.org/10.1073/pnas.0704391104

Rodier, P. M. (2002). Converging evidence for brain stem injury in autism. *Development and Psychopathology*, *14*(03). https://doi.org/10.1017/S0954579402003085

Rodier, P. M., Ingram, J. L., Tisdale, B., Nelson, S., & Romano, J. (1996). Embryological Origin for Autism : Developmental Anomalies of the Cranial Nerve Motor Nuclei. *The Journal of Comparative Neurology*, *370*, 2447–261.

Ronesi, J., Collins, K., Hays, S., Tsai, N., Guo, W., & Birnbaum, S. (2012). Disrupted Homer scaffolds mediate abnormal mGluR5 function in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat Neurosci*, *15*, 431–40.

Roullet, F. I., Lai, J. K. Y., & Foster, J. A. (2013). In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*, *36*, 47–56. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2013.01.004

Ruhela, R., Sarma, P., Soni, S., Prakash, A., & Medhi, B. (2017). Congenital malformation and autism spectrum disorder: Insight from a rat model of autism spectrum disorder. *Indian Journal of Pharmacology*, *49*(3). https://doi.org/10.4103/ijp.IJP_183_17

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

Schneider, T., & Przewłocki, R. (2005). Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed 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., & Przewłocki, 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., Ziòłkowska, 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

Sheng, M. & Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb. Perspect.*, *3*(a005678).

Silverman, J. L., Tolu, S. S., Barkan, C. L., & Crawley, J. N. (2010). Repetitive Self-Grooming Behavior in the BTBR Mouse Model of Autism is Blocked by the mGluR5 Antagonist MPEP. *Neuropsychopharmacology*, *35*(4), 976. https://doi.org/10.1038/NPP.2009.201

Spooren, W., Lindemann, L., Ghosh, A., & Santarelli, L. (2012). Synapse dysfunction in autism : a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, *33*(12), 669–684. https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.004

Stromland, K., Nordin, V., Miller, M., Akerstrom, B., & Gillberg, C. (1994). Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *36*, 351–356.

Tang, S., Terzic, B., Wang, I.-T. J., Sarmiento, N., Sizov, K., Cui, Y., Takano, H., Marsh, E. D., Zhou, Z., & Coulter, D. A. (2019). Altered NMDAR signaling underlies autistic-like features in mouse models of CDKL5 deficiency disorder. *Nature Communications*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/S41467-019-10689-W

Tashiro, Y., Oyabu, A., Imura, Y., Uchida, A., Narita, N., & Narita, M. (2011). Morphological abnormalities of embryonic cranial nerves after in utero exposure to valproic acid: implications for the pathogenesis of autism with multiple developmental anomalies. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *29*(4), 359–364. https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.03.008

Vanderschuren, L. J. M. J., Achterberg, E. J. M., & Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *70*. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.025

Vasa, R., & Mazurek, M. (2015). An update on anxiety in youth with autism spectrum disorders. *Current Opinion in Psychiatry*, *28*(2), 83–90. https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000133

Vorstman, J. A. S., Parr, J. R., Moreno-De-Luca, D., Anney, R. J. L., Nurnberger, J. I., & Hallmayer, J. F. (2017). Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. *Nature Reviews. Genetics*, *18*(6), 362–376. https://doi.org/10.1038/NRG.2017.4

Whitehouse, C. M., & Lewis, M. H. (2015). Repetitive Behavior in Neurodevelopmental Disorders: Clinical and Translational Findings. *The Behavior Analyst*, *38*(2), 163. https://doi.org/10.1007/S40614-015-0029-2

Williams, P., & Hersh, J. (1997). A male with fetal valproate syndrome and autism. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *39*, 632–634.

Wu, L. J., Toyoda, H., Zhao, M. G., Lee, Y. S., Tang, J., Ko, S. W., Yong, H. J., Shum, F. W. F., Zerbinatti, C. v., Bu, G., Wei, F., Xu, T. le, Muglia, L. J., Chen, Z. F., Auberson, Y. P., Kaang, B. K., & Zhuo, M. (2005). Upregulation of forebrain NMDA NR2B receptors contributes to behavioral sensitization after inflammation. *Journal of Neuroscience*, *25*(48), 11107–11116. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1678-05.2005

Xu, J. Y., Xia, Q. Q., & Xia, J. (2012). A review on the current neuroligin mouse models. *Sheng Li Xue Bao*, *64*, 550–562.

Yang, E. J., Ahn, S., Lee, K., Mahmood, U., & Kim, H. S. (2016). Early behavioral abnormalities and perinatal alterations of PTEN/AKT pathway in valproic acid autism model mice. *PLoS ONE*, *11*(4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153298

Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social approach task for mice. *Current Protocols in Neuroscience*, *SUPPL. 56*. https://doi.org/10.1002/0471142301.NS0826S56

Yu, Y., Chaulagain, A., Pedersen, S., Lydersen, S., Leventhal, B., Szatmari, P., Aleksic, B., Ozaki, N., & Skokauskas, N. (2020). Pharmacotherapy of restricted/repetitive behavior in autism spectrum disorder:a systematic review and meta-analysis. *BMC Psychiatry*, *20*(1). https://doi.org/10.1186/S12888-020-2477-9

Zoghbi, H., & Bear, M. (2012). Synaptic Dysfunction in Neurodevelopmental Intellectual Disabilities. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, *4*(3), 1–22. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009886