

Conductas autistas en un modelo inducido con ácido valproico en pez cebra. Una revisión sistemática

Autistic behaviors in a valproic acid-induced zebrafish model. A systematic review

Flores-Prieto Bernardo¹, Manzo-Denes Jorge², Hernández-Aguilar María Elena², Herrera-Covarrubias Deissy², Chi-Castañeda Donají², Pérez-Estudillo César², Roldán-Anzures-Esveidy¹, Toledo-Cárdenas María Rebeca^{2*}

¹Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Veracruz, México. ²Instituto de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.

Recibido: 01 de julio de 2022

Aceptado: 30 de septiembre de 2022

Puedes encontrar este artículo en: <https://eneurobiologia.uv.mx/index.php/eneurobiologia/article/view/2616/4513>

Resumen

El trastorno del espectro autista (TEA) es un desorden del neurodesarrollo de alta prevalencia, con manifestaciones significativas en las áreas socioafectiva y comportamental, cuyas causas aún permanecen indeterminadas. La investigación de sus posibles causas y tratamientos se apoya en modelos animales manipulados genéticamente y los no genéticos con el uso de teratógenos o factores ambientales. Uno de los modelos no genéticos es la administración de ácido valproico (AVP) durante el desarrollo embrionario, que ha sido ampliamente utilizado en ratas y ratones, permitiendo así la evaluación de distintos comportamientos relacionados al TEA. El modelo también existe en la especie de pez cebra, aunque los estudios aún son escasos. En esta revisión sistematizada con la metodología PRISMA, se sintetiza la información disponible sobre evaluaciones conductuales en experimentos con un modelo de pez cebra tratado con AVP en etapas embrionarias. Se realizó una búsqueda con este propósito, en dos bases de datos con las palabras clave: autism, autism spectrum disorder*, zebrafish, behavior y valproic acid y se analizaron sus resultados conductuales en relación con la sintomatología del TEA. De acuerdo con la información revisada este modelo cumple con las características conductuales suficientes para establecer homologías con las observadas en humanos TEA, por lo que su uso parece garantizar una apropiada tarea traslacional en esta área del conocimiento.

Palabras clave: Autismo, modelos animales, AVP, pez cebra, conducta.

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a highly prevalent neurodevelopmental disorder, with significant manifestations in the socio-affective and behavioral areas, whose causes remain undetermined. The investigation of its possible causes and treatments is supported by genetically manipulated animal models and non-genetic ones with the use of teratogens or environmental factors. One of the non-genetic models is the administration of valproic acid (VPA) during embryonic development, which has been widely used in rats and mice, thus allowing the evaluation of different behaviors related to ASD. Although studies are still scarce, the model also exists in the zebrafish species. In this systematized review with the PRISMA methodology, the available information on behavioral evaluations in experiments with a zebrafish model treated with AVP in embryonic stages is synthesized. A search was carried out for this purpose, in two databases with the keywords: autism, autism spectrum disorder*, zebrafish, behavior, and valproic acid, and their behavioral results were analyzed in relation to ASD symptoms. According to the information reviewed, this model meets sufficient behavioral characteristics to establish homologies with those observed in ASD humans, so its use seems to guarantee an appropriate translational task in this area of knowledge.

Keywords: Autism, animal models, VPA, zebrafish, behavior.

*Correspondencia: Toledo-Cárdenas María Rebeca. Instituto de Investigaciones Cerebrales. Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver. México. C.P. 91010, Tel: 52 (228) 8 418900 ext. 13064. E-mail: rtoledo@uv.mx

Este es un artículo de libre acceso distribuido bajo los términos de la licencia de Creative Commons, (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en algún medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.



1. Introducción

En el campo de las ciencias biomédicas son indispensables los modelos animales para la investigación del funcionamiento, etiología y posibles tratamientos a enfermedades o padecimientos humanos. Por lo que es relevante establecer modelos animales apropiados que presenten fenotipos característicos de la patología a estudiar, así como homologías en sus procesos biológicos, los cuales permitan extrapolar el conocimiento obtenido al campo del tratamiento en humanos. Uno de los trastornos del neurodesarrollo que requiere el uso de modelos animales es el trastorno del espectro autista (TEA), debido a su etiología indeterminada y la ausencia de tratamientos efectivos, así como por motivos bioéticos. Este trastorno se caracteriza por presentar deficiencias en la interacción social, así como patrones restrictivos y repetitivos del comportamiento, al igual que un alto grado de alteración en el sistema nervioso central (SNC).¹

En el caso del TEA, los modelos animales utilizados tradicionalmente han sido roedores, como la rata y el ratón, aunque recientemente se ha incrementado el uso de pez cebra (*Danio rerio*) en la investigación de este trastorno. Entre las razones de uso de este teleosteo se encuentran su alta sociabilidad, fenotipos conductuales definidos y su susceptibilidad ante agentes teratógenos, así como su alta homología genética con el humano (70%).^{2,3} Entre los modelos no genéticos de TEA en pez cebra, se destaca el uso de ácido valproico (AVP). Este es un fármaco antiepiléptico y modulador del estado de ánimo que ha mostrado tener efectos teratógenicos por exposición durante el desarrollo embrionario en humanos y otras especies.⁴⁻⁶

Por lo tanto, es pertinente analizar la información disponible, sobre el conjunto de modificaciones comportamentales provocadas por el AVP hacia los diferentes sistemas que se desarrollan en la etapa

embrionaria, para poder establecer comparaciones, homologías y analogías entre otras especies tratadas con este fármaco. El propósito es realizar una revisión bibliográfica para integrar un entendimiento más completo del fenómeno patológico y sus manifestaciones conductuales, con el objetivo de estimular investigaciones futuras sobre posibles tratamientos que mejoren la calidad de vida de los individuos con TEA.

Con base en ello, se realizó una revisión sistemática de las investigaciones que utilizaron el modelo de pez cebra AVP, analizando las conductas consideradas relevantes para el estudio del TEA, con referencia específica a tres alteraciones asociadas: a) comportamiento social, b) hiperactividad y c) ansiedad. En este sentido, se reportan los resultados relevantes de la evaluación del comportamiento y en algunos casos, las particularidades de las técnicas y paradigmas experimentales, sin embargo, para una revisión pormenorizada se recomienda la lectura de las metodologías individuales, así como la revisión especializada sobre la conducta social realizada por Ogi y colaboradores.⁷

2. Métodos

2.1. Diseño del estudio

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica sistemática bajo la metodología PRISMA⁸ de los últimos 10 años sobre el efecto del ácido valproico (AVP) en el fenotipo conductual homólogo a las conductas TEA en peces cebra.

2.2. Estrategia de búsqueda de la literatura

Se utilizaron dos bases de datos electrónicas, PubMed y ScienceDirect. Como palabras clave para la búsqueda se emplearon combinaciones utilizando "OR" o "AND" de las palabras, autism, autism spectrum disorder, zebrafish, behavior y valproic acid. Se utilizó un rango temporal de publicación de diez años (2012-2022).

2.3. Criterios de selección de la literatura

Para la selección de la literatura, se consideraron artículos que utilicen AVP para modelar comportamientos homólogos a los observados en el TEA como: 1) deficiencia en la interacción social, 2) patrones conductuales repetitivos y restrictivos y 3) conductas de ansiedad. Como criterios de inclusión se consideraron: (1) evaluación de conductas fundamentales del TEA, (2) experimentos que utilicen pez cebra de cualquier edad, (3) administración embrionaria de AVP y (4)

artículos originales de investigación. Como criterio de exclusión se consideró: (1) administración post eclosión de AVP.

2.4. Extracción y síntesis de información

La extracción de los datos se categorizó en, cepa, tamaño de la muestra, edad, dosificación (administración, concentración, duración, frecuencia), edad evaluada, tipo de evaluación conductual, criterios de evaluación y resultados comparados con los grupos control.

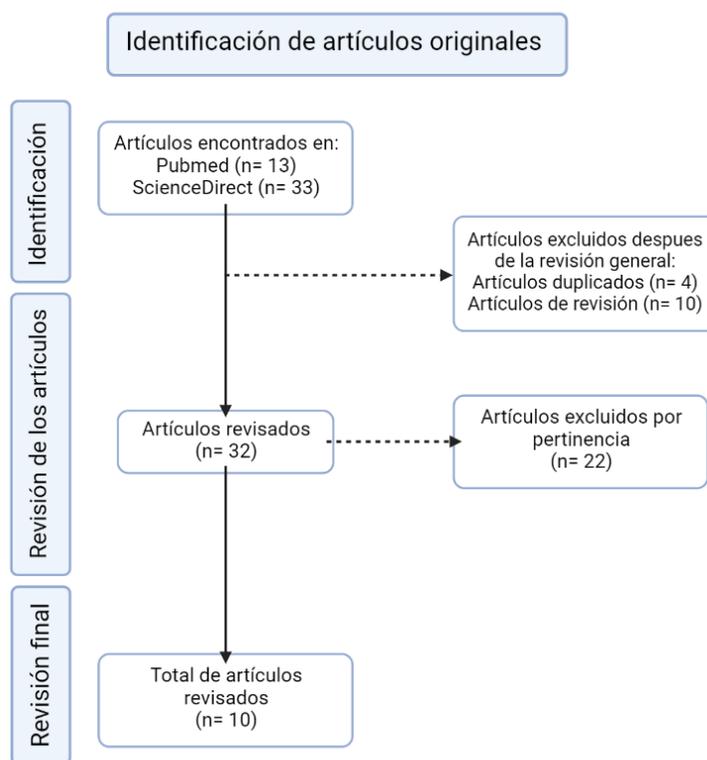


Figura 1.- Diagrama de flujo PRISMA. Se muestran los números de estudio utilizados en las pautas de elementos de informe preferidos para revisiones sistemáticas y metaanálisis (PRISMA) utilizadas para este estudio.

3. Resultados

La inflamación del SNC, denominada Los resultados de búsqueda con los criterios antes descritos arrojaron un total de 46 artículos. PubMed= 13, ScienceDirect= 33. Se eliminaron los resultados repetidos (n= 4), así como los artículos de revisión (n=10). Se revisaron los artículos restantes a nivel del título y resumen para excluir artículos por su

pertinencia a la revisión (n= 10). Estos artículos se excluyeron, por ejemplo, por utilizar otros modelos de TEA, por utilizar otro fármaco distinto al AVP o por utilizar AVP a partir de etapas post-eclosión. Esto resultó en una inclusión final de 10 artículos originales que utilizaron AVP en etapas tempranas de desarrollo en un modelo de pez cebra y que evaluaron alguna conducta relacionada con el TEA.

4. El AVP induce déficits en la interacción social en peces cebra

En 7 de los estudios revisados, los peces cebra fueron tratados con AVP durante el desarrollo temprano, se evaluó el comportamiento social bajo distintas metodologías y se reportaron déficits en la conducta social. En todas las pruebas se consideraron alguno de los siguientes datos: a) tiempo en zonas de socialización, b) número de acercamientos o c) cercanía con otros peces.

En un estudio con peces de 70 y 120 días post fertilización (dpf), tratados con AVP (48 μ M) de 0 a 48 horas post fertilización (hpf), se evaluó el tiempo que pasaron cerca de sus conspecíficos y se encontró una disminución significativa a los 70 dpf y 120 dpf en el tiempo total de interacción social, en peces tratados con AVP en comparación a los de desarrollo típico.⁹ En otro estudio con peces de 180 dpf tratados con AVP (25 μ M) de 10 hpf a 24 hpf, la administración de AVP resultó en un decremento significativo en el tiempo cerca de sus conspecíficos bajo este mismo paradigma.¹⁰

Estos resultados fueron similares en peces tratados con AVP de 0 a 24, 48 y 72 hpf, en este caso se observó que el decremento en la conducta social estaba directamente relacionado con el tiempo de exposición al AVP. Los grupos con tratamientos más prolongados pasaron menor tiempo cerca a sus conspecíficos en comparación a los tratados menor tiempo.¹¹ Resultados análogos se obtuvieron en larvas tratadas con distintas concentraciones de AVP (5, 50 y 500 μ M) en un periodo de 8 hpf a 4.5 dpf, aunque en este caso, la disminución en el tiempo total cerca de sus conspecíficos solo fue significativa en la menor concentración (5 μ M).¹² En un estudio con el mismo período de exposición al AVP con una concentración de 75 μ M en peces de 21 dpf también se reportó un decremento significativo en el tiempo total

cerca de los peces estímulo en comparación con los peces de desarrollo típico.¹³

Por otra parte, en otro paradigma experimental, evaluaron la preferencia social en cardúmenes de larvas de pez cebra tratadas con diferentes concentraciones de AVP (5, 50 y 500 μ M) en un periodo de 8 hpf – 4.5 dpf mediante mediciones de la distancia respecto a su vecino más próximo y la distancia interindividual. Los resultados del análisis conductual indican un incremento significativo en la distancia de su vecino más próximo, así como en la distancia interindividual en todos los grupos AVP, lo que se interpreta como una disminución en la conducta social. En este estudio evaluaron, adicionalmente, el contacto social definido como: distancia entre dos larvas \leq a 1 cuerpo de longitud y la duración del contacto a los 13 dpf. La dosis menor de AVP resultó en una disminución en la frecuencia y tiempo total del contacto social, mientras que la dosificación de 50 μ M de AVP solo impactó significativamente reduciendo la frecuencia de contactos.¹² Sin embargo, en una investigación bajo el mismo paradigma, larvas de 13 dpf tratadas con AVP 10 μ M presentaron un decremento significativo en el número de contactos, pero no se encontraron diferencias significativas en larvas tratadas con AVP 5 μ M.¹⁴

Estos resultados son similares con paradigmas que utilizaron estimulación social de carácter virtual, esto es, mediante videograbaciones de cardúmenes de peces cebra presentados en monitores contiguos a la pecera de prueba y se contabilizó el tiempo total cerca del estímulo. Con esta metodología, demostraron que la administración de AVP (5 μ M) de 4 hpf a 5 dpf provocó una disminución significativa en el tiempo cerca del monitor donde se presentaba el cardumen.¹⁵ De igual forma, en peces adultos de 90-120 dpf el tratamiento con AVP (10 μ M) de 4.5 hpf a 5 dpf provocó un decremento en el tiempo total cerca de los peces estímulo.¹⁴

En resumen, el tratamiento con AVP durante etapas tempranas de desarrollo provoca alteraciones en el comportamiento social, que pueden variar en intensidad con relación a la concentración y el tiempo de exposición al fármaco. Además, es posible evaluar estas conductas mediante diferentes modelos experimentales en los cuales se consideran distintos parámetros para evaluar la sociabilización, no obstante, todos estos parámetros están relacionados con la preferencia de permanecer cerca de sus congéneres.

5. El AVP induce alteraciones en la locomoción en peces cebra

En 7 de los estudios revisados, los peces cebra que fueron tratados con AVP durante el desarrollo temprano, reportaron alteraciones en la actividad locomotora, entendido como hipo/hiperactividad. La evaluación de este comportamiento se realizó bajo distintas metodologías, como paradigma de campo abierto y respuesta ante estímulos ambientales. Las pruebas evaluaron alguno de los siguientes parámetros: a) velocidad promedio de nado, b) distancia total de nado y c) respuesta ante estímulos lumínicos. Es pertinente señalar que, en estos estudios, los animales tratados con AVP no presentaban alteraciones en la macro-anatomía que pudieran influir en la actividad locomotora, sin embargo, esto no es conclusivo.^{9,10,13,16}

En un estudio, realizado con larvas de 5 dpf tratadas con AVP (25 μ M) de 10 a 25 hpf, se analizó la actividad de locomoción en respuesta a cambios de luz ambiental (luz/oscuridad). Los resultados indicaron que la dosificación de AVP provocó un decremento de la actividad locomotora bajo luz normal en comparación con los animales sin tratamiento. Sin embargo, bajo condiciones de oscuridad las larvas AVP mostraron un incremento significativo en esta actividad.¹⁰ En otro estudio se utilizó este mismo procedimiento donde se evaluó la conducta de larvas de 5 dpf tratadas con concentraciones distintas de AVP (5 y 10 μ

M) y los resultados fueron diferentes ya que se encontró un incremento en la velocidad de nado promedio tanto en condiciones de luz como de oscuridad, al igual que un incremento en la distancia total de nado para los dos grupos tratados con AVP.¹⁴ En contraste, un estudio relacionado reportó que la dosificación iniciada a las 4 hpf hasta 5 dpf con AVP 50 μ M o 30 μ M, indujo una reducción en la actividad locomotora en larvas de 6dpf durante la fase de oscuridad para ambos grupos AVP.¹⁵ Estos resultados son congruentes a los reportados en otro estudio donde se evaluó el efecto de distintas concentraciones de AVP en la locomoción de larvas (6 dpf) tratadas desde 4.5 hpf hasta 5 dpf. Así, peces expuestos al AVP a concentración de 4 μ M no presentaron alteración locomotora, mientras que, a concentraciones de 20, 40 y 60 μ M se produjo hiperactividad en el periodo de oscuridad. No obstante, las concentraciones más altas (80 y 100 μ M) provocaron hipoactividad durante el periodo de oscuridad.¹⁶ De igual forma, en larvas tratadas de 0 a 48 hpf mostraron diferencias dependiendo de las concentraciones. Por ejemplo, se observó un decremento significativo en la distancia total, así como la actividad locomotora en comparación con animales intactos. En contraste, la dosificación con 25 μ M, no alcanzó significancia.¹⁷

En este sentido, otro paradigma de análisis se realizó mediante la evaluación de la distancia, la velocidad promedio y el tiempo de actividad locomotora durante 24 horas en larvas de 6dpf tratadas con AVP 48 μ M. La dosificación se llevó a cabo a distintos tiempos (0-24, 0-48 y 0-72 hpf) y el resultado fue que la dosificación durante 72 horas se relacionó con un incremento en la actividad locomotora, aumento en la velocidad promedio y en la distancia total durante el día y la noche, con mayor diferencia durante el periodo nocturno en comparación con el grupo intacto. Por otro lado, la dosificación durante 48 horas de AVP dio como resultado un decremento significativo en la actividad locomotora y la velocidad promedio en

comparación con el grupo control. Mientras que las larvas tratadas con AVP durante 24 horas, no presentaron diferencias significativas en la velocidad, distancia o actividad promedio.¹¹

Al realizar la comparación de los resultados de distintos paradigmas conductuales, dosificaciones y concentraciones de AVP, se muestra que ejercen distintos efectos en la actividad locomotora. En resumen, el AVP provoca cambios en la actividad locomotora al administrarse en periodos de desarrollo temprano, sin embargo, los resultados fueron de carácter heterogéneo.

6. El AVP incrementa las conductas de ansiedad en peces cebra

En el caso de las conductas de ansiedad, se revisaron 4 estudios que consideraron como indicadores de ansiedad: a) número de entradas en otras áreas de la pecera, b) tiempo en la zona superior o inferior de la pecera y c) duración y frecuencia de episodios de congelamiento. Por ejemplo, en una prueba de tanque novedoso en la que se evalúa el número de entradas en distintas zonas de la pecera, la administración de AVP con una concentración de 48 μ M de 0 a 48 hpf generó un incremento en el número de entradas de peces con edades de 30 y 70 dpf. En contraste, peces AVP en estas condiciones no presentaron diferencias significativas en la evaluación del número de entradas a los 120dpf.⁹

En esta prueba de tanque novedoso, se han considerado también como indicadores de ansiedad, otros parámetros de evaluación como el tiempo en la zona superior e inferior de la pecera en comparación con el tiempo en el área media de la pecera. Esto se llevó a cabo en un estudio con peces de entre 90-120 dpf tratados con AVP 10 μ M de 8 hpf a 5 dpf y que permanecieron menor tiempo en la zona superior en comparación con los grupos intactos.¹⁴ De forma similar, la dosificación con AVP (30 μ M) de 4 hpf a 5 dpf resultó en

un incremento del tiempo total en el fondo de la pecera en larvas de 7 dpf.¹⁵ Otra característica conductual importante para determinar ansiedad es evaluar el tiempo y frecuencia de la conducta de tigmotaxis (entendida como: el comportamiento de contacto con las paredes de la pecera). Por ejemplo, en peces de 7 dpf tratados con AVP 75 μ M de 4 hpf a 5 dpf, se reporta un incremento en el tiempo total y número de episodios de tigmotaxis, lo cual se consideró como un indicador característico de ansiedad.¹³

En cuanto a las características de locomoción, el pez cebra utiliza los impulsos ejercidos por la cola para su desplazamiento. Un tipo de movimiento denominado de “coletazo” no se considera como un componente de locomoción, pero se registra como un indicador de ansiedad. Es así como un tipo de análisis evalúa el número de coletazos espontáneos durante 24 h. En este caso, embriones de 24 hpf tratados con distintas dosificaciones de AVP 5 y 50 μ M, de 0 a 24 hpf, presentaron un aumento significativo en el número de coletazos en ambas concentraciones.¹²

Por otra parte, el número y latencia de episodios de congelamiento (freezing) entendido como el cese completo de movimiento por parte del pez mientras está en el fondo del tanque, también pueden proporcionar datos sobre la ansiedad. Por ejemplo, durante la prueba de tanque novedoso, el tratamiento con AVP al 30 μ M de 4 hpf a 5 dpf provocó un incremento en el número de congelamientos y su duración en comparación a los animales intactos.¹⁴

En conjunto, estos resultados indican que el AVP administrado en periodos tempranos de desarrollo, provoca un incremento en las conductas de ansiedad en peces cebra. En adición, las alteraciones conductuales se presentan a través de distintos paradigmas experimentales y los resultados reportados son congruentes con la modelación de conductas similares al TEA observadas en

otros modelos animales, así como en humanos.

7. Discusión

La evidencia acumulada de los experimentos analizados en esta revisión sistemática sustenta la propuesta de que el pez cebra tratado con AVP puede ser utilizado como un modelo biológico plausible para el estudio de conductas autistas, como son déficits en la interacción social, hiperactividad y ansiedad. Los cambios a nivel conductual provocados por el AVP pueden observarse desde etapas embrionarias, persistiendo hasta la etapa adulta y son similares a los evaluados en modelos animales como rata y ratón tratados con este fármaco.¹⁸

Uno de los criterios principales para el diagnóstico de TEA son los déficits en la interacción social.¹⁹ La tendencia natural del pez cebra por formar cardúmenes y mantener estrecha relación con otros miembros de su misma especie desde etapas tempranas (8 dpf) son algunas de las ventajas de este modelo para estudiar la conducta social. En esta especie se pueden modelar déficits en esta conducta mediante la dosificación embrionaria de AVP, manifestándose como disminución en el tiempo, número y frecuencia de interacciones con sus conspecíficos. Resultados similares se han observado en otras especies como roedores, en las que la administración intraperitoneal de AVP en ratas embarazadas en el día 12.5 provoca un decremento significativo en la conducta social de las crías.^{20,21}

Particularmente en pez cebra, y de acuerdo con los trabajos revisados, la dosificación de AVP en un rango de concentración de 30 μ M a 50 μ M y administrado durante las primeras 48 hpf, parece modelar con una mayor homogeneidad déficits en la conducta social homólogos a los observados en humanos TEA, sin que aparentemente se provoquen cambios morfológicos externos.^{9,10,13,15} Sin embargo, es recomendable que este

parámetro sea evaluado de forma más específica y concluyente, ya que en ratas AVP se ha mostrado que se presentan algunas alteraciones características externas como, por ejemplo, polidactilia y deformación de la cola.⁶

Por otra parte, la hiperactividad y movimientos repetitivos sin un fin determinado son manifestaciones conductuales con una alta incidencia en humanos con TEA y es posible provocar características similares con la dosificación de AVP durante el desarrollo en peces cebra.²² A nivel conductual, el efecto de este fármaco puede manifestarse como hipoactividad o hiperactividad durante el desarrollo dependiendo de su dosificación, exposición y administración. Estos resultados son comparables a los obtenidos en pruebas de locomoción en modelos AVP en rata Wistar.^{18,23} Sin embargo, es importante ahondar en los resultados de la actividad locomotora alterada producida por AVP en peces debido a que los resultados no presentan una distribución homogénea.

En cuanto a las conductas de ansiedad, el análisis de la bibliografía refuerza la hipótesis de la pertinencia del modelo de pez cebra AVP para estudiar este tipo de conductas que se consideran homólogas a las observadas en humanos TEA y ratas valproicas.^{2,24,25} Las manifestaciones de comportamientos de ansiedad en peces pueden presentarse como aumento en la conducta de exploración, número de coletazos espontáneos, tigmotaxis, así como número, frecuencia y duración de los episodios de congelamiento.²⁵ Este fenotipo conductual fue consistente en todos los estudios donde se evaluó la ansiedad en esta especie y los resultados son similares a los observados en otras especies tratadas con AVP.²⁶⁻²⁸

Respecto a la dosificación, concentración y periodo de exposición al AVP, parece existir una relación directa en el grado de déficit social, lo cual es metodológicamente relevante y debe considerarse. Aunado a esto,

es bien sabido que la dosificación de AVP durante el neurodesarrollo aumenta las probabilidades de desarrollar TEA en distintas especies, ya que su acción teratógena en el SNC se debe a la ventana de vulnerabilidad durante el desarrollo temprano que existe en todos los vertebrados debido al proceso del cierre del tubo neural.^{17,24,29,30} En este sentido, es importante tomar en cuenta las características de desarrollo embrionario de la especie, así como la realización de curvas de dosis respuesta para determinar el efecto deseado.

8. Conclusión

Esta revisión sistemática analizó los efectos del AVP en conductas análogas a las del TEA en un modelo de pez cebra. El análisis de la evidencia sintetizada de la literatura muestra un panorama general del tipo y grado de alteraciones producidas a nivel conductual por un insulto con AVP en esta especie, en referencia directa con las conductas características de individuos humanos con TEA y otras especies.

9. Conflicto de intereses

Los autores de este artículo de revisión han apoyado en su contenido y en la elaboración del formato de este escrito. Todos los autores declaran que no tienen conflicto de interés alguno.

10. Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) de México por el apoyo otorgado a través del Programa de Becas Nacionales (No. CVU: 1101287). Al Doctorado de Investigaciones Cerebrales (No. 003236) y al Instituto de Investigaciones Cerebrales (IICE). Coveycidet a JM: 091238/2021.

11. Referencias

1. American Psychiatric Association. American Psychiatric Association DSM-5. Manual

Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-5®. Editorial Médica Panamericana. 2014. 310

2. Rea, V, van Raay, TJ. Using Zebrafish to Model Autism Spectrum Disorder: A Comparison of ASD Risk Genes Between Zebrafish and Their Mammalian Counterparts. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2020. 13, 207.
3. Howe K, Clark MD, Stemple DL. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*.2013. 496, 498.
4. Gottfried C, Bambino-Junior V, Baronio D, Zanatta G, Silverstrin RB, Vaccaro T, Riesgo R. Valproic Acid in Autism Spectrum Disorder: From an Environmental Risk Factor to a Reliable Animal Model. *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I*. 2013.
5. Chateauvieux, S, Morceau F, Diederich M. Valproic Acid. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*. 2021. 905–8
6. Saft P, Toledo-Cardenas R, Coria-Avila GA, Perez-Pouchulen M, Brug B, Hernandez ME, Manzo J. Characterization of four types of tail abnormalities in rats treated prenatally with valproic acid. *Revista Eneurobiología*. 2014. 5(9).
7. Ogi, A, Licitra R, Naef V, Marchese M, Fronte B, Gazzano A, Santorelli FM. Social Preference Tests in Zebrafish: A Systematic Review. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021. 7, 1239.
8. Page MJ, McKenzie JW, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tezlaff JM, Moher D. Updating guidance for reporting systematic reviews: development of the PRISMA 2020 statement. *Journal of clinical epidemiology*. 2021. 134, 103–12.
9. Zimmermann FF, Gaspary KV, Leite CE, de Paula Cognato G, Bonan CD. Embryological exposure to valproic acid induces social

- interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*): A developmental behavior analysis. *Neurotoxicology and teratology*. 2015. 52, 36–41.
10. Baronio D, Puttonen HAJ, Sundvik M, Semenova S, Lehtonen E, Panula P. Embryonic exposure to valproic acid affects the histaminergic system and the social behaviour of adult zebrafish (*Danio rerio*). *British Journal of Pharmacology*. 2018. 175, 797–809.
 11. Robea MA, Ciobica A, Curpan AS, Plavan G, Strungru S, Lefter R, Nicoara M. Preliminary Results Regarding Sleep in a Zebrafish Model of Autism Spectrum Disorder. *Brain Sciences* 2021. Vol. 11, Page 556. 11, 556.
 12. Chen J, Lei L, Tian L, Hou F, Roper C, Ge X, Zhao Y, Chen Y, Dong Q, Tanguay RL, Huang C. Developmental and behavioral alterations in zebrafish embryonically exposed to valproic acid (VPA): An aquatic model for autism. *Neurotoxicology and teratology*. 2018. 66, 8–16.
 13. Dwivedi S, Medishetti R, Rani R, Sevilimedu A, Kulkarni P, Yogeewari P. Larval zebrafish model for studying the effects of valproic acid on neurodevelopment: An approach towards modeling autism. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2019. 95, 56–65.
 14. Joseph TP, Zhou F, Sai LY, Chen H, Lin SL, Schachner M. Duloxetine ameliorates valproic acid-induced hyperactivity, anxiety-like behavior, and social interaction deficits in zebrafish. *Autism research: official journal of the International Society for Autism Research*. 2021. 15, 27–41.
 15. Bailey JM, Oliveri AN, Karbahri N, Brooks RAJ, De La Rocha AJ, Janardhan S, Levin ED. Persistent behavioral effects following early life exposure to retinoic acid or valproic acid in zebrafish. *Neurotoxicology*. 2016. 52, 23–33.
 16. Cowden J, Padnos B, Hunter D, MacPhail R, Jensen K, Padilla S. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retino-tectal projection area in zebrafish embryos. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*. 2012. 33, 165–73.
 17. Lee S, Chun HS, Lee J, Park HJ, Kim KT, Yoon S, Kim WK. Plausibility of the zebrafish embryos/larvae as an alternative animal model for autism: A comparison study of transcriptome changes. *PloS one*. 2013. 13.
 18. Chaliha D, Albrecht M, Vaccarezza M, Takechi R, Lam V, Al-Salami H, Mamo J. A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism. *Developmental Neuroscience*. 2020. 42, 12–48.
 19. Ergaz Z, Weinstein-Fudim, L, Ornoy A. Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reproductive Toxicology*. 2016. 64, 116–40.
 20. Wu J, Dai YC, Lan XY, Zhang HF, Bai SZ, Hu Y, Han SP, Han JS, Zhang R. Postnatal AVP treatments prevent social deficit in adolescence of valproic acid-induced rat autism model. *Peptides*. 2021. 137.
 21. Schneider T, Turczak JI, Przewłocki R. Environmental enrichment reverses behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: issues for a therapeutic approach in autism. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2006. 31, 36–46.
 22. Bougeard C, Picarel-Blanchot F, Schmid R, Campbell R, Buitelaar J. Prevalence of Autism Spectrum Disorder and Co-morbidities in Children and Adolescents: A Systematic Literature Review. *Frontiers in Psychiatry*. 2021. 12, 744709.
 23. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology* 2005. 2004. 30:1. 30, 80–89.

24. de Abreu MS, Genario R, Giacomini ACVV, Demin KA, Lakstygala AM, Amstislavskaya TG, Fontana BD, Parker MO, Kalluef AV. Zebrafish as a Model of Neurodevelopmental Disorders. *Neuroscience*. 2020. 445, 3–11.
25. Kalueff A, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, Craddock C, Kyzar EJ, Roth A, Landsman S, Gaikwad S, Robinson K, Baatrup E, Tierney K, Shamchuk A, Norton W, Miller N, Nicolson T, Braubach O, Gilman GP, Pittman J, Rosemberg DB, Gerlai R, Echeverria D, Lamb E, Neuhauss SCF, Weng W, Bally. Cuif L, Schneider H.. Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. *Zebrafish*. 2013. 10, 70.
26. Shafaghi A, Vakili S, Amizadeh A, Heidari MR, Meymandi S, Bashiri H. The effect of early handling on anxiety-like behaviors of rats exposed to valproic acid pre-and post-natally. *Neurotoxicology and Teratology*. 2021. 89, 107050.
27. Banerjee A, Engineer CT, Sauls BL, Morales AA, Kilgard MP, Ploski JE. Abnormal emotional learning in a rat model of autism exposed to valproic acid in utero. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2014. 0, 387.
28. Lal H, Sherman GT, Fielding S, Dunn R, Kruse H, Theurer K. Effect of valproic acid on anxiety-related behaviors in the rat. *Brain Research Bulletin*. 1980. 5, 575–77.
29. Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN, Engeszer RE. Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*. 2009 238, 2975–3015.
30. Cui K, Wang Y, Zhu Y, Tao T, Yin F, Guo Y, Liu H, Li F, Wang P, Chen Y, Qin J. Neurodevelopmental impairment induced by prenatal valproic acid exposure shown with the human cortical organoid-on-a-chip model. *Microsystems & Nanoengineering* 2020. 6:1. 6, 1–14.