



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE SAN LUIS POTOSÍ**

FACULTAD DE MEDICINA



**Centro de Investigación en Ciencias de la
Salud y Biomedicina (CICSaB)**



**ANÁLISIS CRONOBIOLOGICO Y CONDUCTUAL DE
RATAS CON SÍNTOMAS DEL TRASTORNO DEL
ESPECTRO AUTISTA TRATADAS PRE Y
POSTNATALMENTE CON MELATONINA**

TESIS QUE PRESENTA

I.B. LUIS JAVIER HERNÁNDEZ SIERRA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

CO- DIRECTORES DE TESIS

DR. ROBERTO CARLOS SALGADO DELGADO

DRA. NADIA SADERI

Enero 2022

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Esta tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Ritmos Biológicos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de San Luís Potosí, bajo la dirección del Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado y la Dra. Nadia Saderi. Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con numero 745791 a Luis Javier Hernández Sierra. Para la realización de este trabajo se utilizaron los recursos otorgados por el proyecto “Alteraciones circadianas: un factor de riesgo para la salud” otorgado por Conacyt.

Tesis que presenta:

I.B. LUIS JAVIER HERNÁNDEZ SIERRA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS BÁSICAS**

CO- DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Roberto Carlos Salgado Delgado

Dra. Nadia Saderi

ASESORES:

Dr. Osvaldo Ibáñez Sandoval

Dr. Mauricio Comas García

JURADO:

Dra. María Esther Jiménez Cataño

Dr. Osvaldo Ibáñez Sandoval

Dr. Mauricio Comas García

Dr. Christian Alberto García Sepúlveda

Enero 2022

RESUMEN

El trastorno del espectro autista (TEA) es una condición que afecta el desarrollo neuronal y que está caracterizado principalmente por alteraciones en la sociabilidad e intereses o actividades repetitivas. Este trastorno tiene una incidencia 4 veces mayor en el sexo masculino que en el femenino. Una de las características que presenta este fenotipo, es la disminución en la concentración de la melatonina. Diversos estudios realizados en modelos animales del TEA, como en personas autistas, muestran neuroinflamación, así como también un número reducido de células de Purkinje. Por lo que el objetivo principal de este trabajo consiste en evaluar el efecto que tiene la administración de melatonina durante el desarrollo embrionario, hasta el destete de las crías tanto de animales control como de animales expuestos prenatalmente al ácido valproico (VPA), como modelo del TEA.

Ratas preñadas de la cepa Sprague-Dawley fueron inyectadas intraperitonealmente con VPA (500 mg/kg) en el día gestacional 12.5. Las ratas fueron aleatorizadas para determinar si recibirían melatonina o solamente vehículo durante la gestación y hasta el destete. Las crías (hembras y machos) fueron evaluadas con pruebas de coordinación motora (*grid walking* y *negative geotaxis*), pruebas conductuales (interacción social y campo abierto), así como análisis de ritmos circadianos. Los resultados muestran que el VPA afecta de distinta manera dependiendo del sexo: los machos presentan principalmente alteraciones en coordinación motora, sociabilidad, actividad locomotora, un mayor estrés, así como número reducido de células de Purkinje en el cerebelo; mientras que las hembras presentan principalmente una mayor neuroinflamación. A pesar de estas diferencias entre sexos, la administración de melatonina en las ratas madres (durante la gestación y la lactancia), evita los cambios observados en las ratas macho expuestas al VPA.

Tomando en cuenta todos los resultados, y que pese a que se ha empleado a la melatonina en el tratamiento del autismo, el presente estudio sugiere la implementación de nuevos tratamientos donde se incluya a la melatonina en etapas tempranas del desarrollo y la lactancia para reducir algunas características del TEA.

ABSTRACT

Autism spectrum disorder (ASD) is a condition that affects neurodevelopment and is characterized mainly by alterations in sociability and repetitive interests or activities. This disorder has an incidence 4 times higher in males than in females. One of the characteristics of this phenotype is the decrease in melatonin concentration. Several studies performed in animal models of ASD, as in autistic individuals, show neuroinflammation, as well as a reduced number of Purkinje cells. Therefore, the main objective of this work is to evaluate the effect of melatonin administration during embryonic development until weaning of the offspring of both control animals and animals prenatally exposed to valproic acid (VPA), as a model of ASD.

Pregnant Sprague-Dawley rats were injected intraperitoneally with VPA (500 mg/kg) on a gestational day 12.5. Rats were randomized to determine whether they would receive melatonin or vehicle during gestation and until weaning. The offspring (females and males) were evaluated with motor coordination tests (*grid walking* and *negative geotaxis*), behavioral tests (social interaction and open field), and circadian rhythm analysis. The results show that VPA affects differently depending on the sex: males present mainly alterations in motor coordination, sociability, locomotor activity, higher stress, and reduced number of Purkinje cells in the cerebellum; while females present mainly higher neuroinflammation. Despite these sex differences, the administration of melatonin in mother rats (during gestation and lactation) prevents the changes observed in male rats exposed to VPA.

Considering all the results, and despite the fact that melatonin has been used in the treatment of autism, the present study suggests the implementation of new treatments where melatonin is included in early stages of development and lactation to reduce some characteristics of ASD.

Índice General

RESUMEN	0
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	4
Trastorno del espectro autista.....	4
Comorbilidades asociadas al TEA	5
Epidemiología, incidencia y etiología.....	8
Ritmos Biológicos	10
Control neural de los ritmos circadianos	11
Núcleo supraquiasmático (NSQ)	11
Glándula pineal	12
Melatonina	13
Modelo de autismo de ácido valproico (VPA)	15
ANTECEDENTES	17
Modelo de VPA.....	17
Administración de melatonina.....	20
Baja concentración de melatonina y TEA	21
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	23
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL	23
Objetivos específicos.....	23
PROTOCOLO.....	24
Toma de muestras	25
METODOLOGÍA.....	26
Toma de sangre y análisis sérico de melatonina mediante ELISA	26
Pruebas de coordinación motora, conductuales y análisis de ritmos circadianos	27
Pruebas de coordinación motora	28
<i>Grid walking</i>	28
<i>Negative geotaxis</i>	29

Pruebas conductuales	30
Interacción social (cámara de 3 compartimientos)	30
Campo abierto (<i>Open Field</i>)	31
Análisis de ritmos circadianos	32
Análisis de temperatura	32
Análisis de actividad locomotora.....	33
Sacrificio y toma de muestras.....	33
Inmunohistoquímica	34
Tinción de Nissl.....	35
Toma de fotografías y conteo celular.....	36
Análisis morfológico de la microglía	36
Protocolo para descartar el efecto sincronizador de la manzana como vehículo...37	
Análisis estadístico	37
REFERENCIAS	39

INTRODUCCIÓN

Trastorno del espectro autista

El trastorno del espectro autista (TEA) se refiere a una condición relacionada con el desarrollo cerebral que impacta en la percepción y la socialización con otras personas, causando problemas en la comunicación e interacción social. El TEA tiene una etiología multifactorial compleja y las características son evidentes a edades tempranas (Braam et al., 2018; American Psychiatric Association, 2013). Esta condición se caracteriza por 2 síntomas principales, observables antes de los 3 años (Olde Loohuis et al., 2017; Gagnon & Godbout, 2018; Mabunga et al., 2015; American Psychiatric Association, 2013; World Health Organization, 2019), los cuales son:

- (1) Déficit persistentes en la comunicación e interacción social en múltiples contextos:
 - a. Déficit en la reciprocidad socioemocional.
 - b. Déficit en los comportamientos comunicativos no verbales utilizados para la interacción social.
 - c. Déficit en el desarrollo, mantenimiento y comprensión de las relaciones.
- (2) Patrones de comportamiento, intereses o actividades restringidos y repetitivos:
 - a. Movimientos motores, uso de objetos o habla estereotipados o repetitivos.
 - b. Insistencia en la igualdad, adherencia inflexible a las rutinas.
 - c. Intereses fijos y altamente restringidos que son anormales en intensidad o enfoque.
 - d. Hiperreactividad o hiporreactividad a la entrada sensorial (vista, gusto, tacto, olfato, oído, propiocepción y/o sentido vestibular/equilibrio) o intereses inusuales en los aspectos sensoriales del entorno.

Según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (5a edición) (DSM-V por sus siglas en inglés) (American Psychiatric Association, 2013), existen 3 niveles de necesidad dentro del TEA:

- Nivel I: Personas que necesitan ayuda (sujetos que son capaces de hablar en oraciones completas y se comunica, pero cuya conversación de un lado a otra falla, y cuyos intentos de socializar son extraños y generalmente no tienen éxito).
- Nivel II: Personas que necesitan ayuda notable (sujetos que hablan oraciones simples, cuya interacción se limita a intereses especiales estrechos, y tienen una comunicación no verbal notablemente extraña).
- Nivel III: Personas que necesitan ayuda muy notable (sujetos con pocas palabras de lenguaje inteligible que rara vez inicia la interacción y solamente lo hacen para satisfacer sus propias necesidades y responde solo a enfoques sociales muy directos).

La terapia suele ser individualizada y ajustada a las necesidades que precisa cubrir el sujeto, consiguiendo mejor pronóstico cuanto más pronto sea su inicio.

El tratamiento del autismo en este sentido suele incluir:

- Intervenciones conductuales educativas: se realizan tanto en el paciente diagnosticado/a de autismo, como en su ambiente familiar cercano.
- Intervenciones emocionales y psicológicas: tienen como objetivo la adquisición y desarrollo de habilidades emocionales de expresión y reconocimiento de sentimientos, desarrollo de la empatía.

Comorbilidades asociadas al TEA

Existen distintas comorbilidades asociadas con el TEA, tales como: trastornos de sueño, depresión, ansiedad, trastornos gastrointestinales, desórdenes del estado de

ánimo, epilepsia, hiperactividad, déficit de atención, neuroinflamación, cambios morfológicos del sistema nervioso central (SNC), trastornos inmunológicos, alteraciones en la coordinación motora, entre otros (Figura 1) (Frye & Rossignol, 2016; Mabunga et al., 2015; Gesundheit et al., 2013).



Figura 1. Comorbilidades asociadas al TEA. Existen una gran cantidad de comorbilidades presentes en personas con autismo; sin embargo, las más comunes son: trastornos gastrointestinales, epilepsia, desórdenes del estado de ánimo, neuroinflamación y trastornos del sueño. Elaboración propia.

En materia de neuroinflamación se sabe que las personas diagnosticadas con TEA presentan problemas inmunológicos (Gesundheit et al., 2013; Rosales et al., 2015), como por ejemplo un aumento en las citocinas proinflamatorias y una reducción en las antiinflamatorias. Todo esto llevando a un estado de neuroinflamación creciente (Li et al., 2009; Saghazadeh et al., 2019), en áreas cerebrales relacionadas con conducta social, como la corteza prefrontal y el hipocampo, ya que el daño en esta área cerebral genera estragos en cuestión de memoria, creatividad, establecimiento y mantenimiento de vínculos sociales, la empatía, el discurso social, etc. (Rubin et al., 2014).

La neuroinflamación se da principalmente por la activación de la microglía. La microglía son las células fagocíticas mononucleares residentes en el SNC que

comprenden 5-20% del total de la población glial las cuales son importantes en la mediación de respuestas inmunitarias dentro del cerebro en presencia de alguna lesión, enfermedad o infección (Purves et al., 2017, p. 9; Kandel et al., 2013, p. 20).

En reposo, la microglía adopta una morfología ramificada, la cual es la encargada de la homeostasis del SNC al registrar mediante ciertos receptores de membrana (Toll, Nod, etc.) el espacio extracelular u otras células en presencia de daño. Al encontrar daño o la presencia de algún estímulo patogénico, la microglía se activa. Dentro de la activación existen diferentes estadios (Graciarena et al., 2010; Kazlauskas et al., 2016; Kazlauskas et al., 2019). Por ejemplo Graciarena et al. (2010) clasifican a la microglía en 4 estadios: en la etapa 1 las células están altamente ramificadas y se definen como células en reposo (célula ramificada); en la etapa 2 la microglía tiene cuerpos celulares alargados con terminaciones largas y gruesas; en la etapa 3 las células adoptan una morfología redondeada y tienen ramificaciones pequeñas y delgadas (célula hipertrófica); en la etapa 4, este tipo celular adopta una forma ameboide sin ramificaciones, la cual se encarga principalmente de fagocitar el daño que generó su cambio morfológico. Además, la microglía activada tiene 2 estados: un estado proinflamatorio (M1) en donde responde al daño mediante la producción de citocinas proinflamatorias (IFN γ , IL-1, IL-6 y TNF α) con el fin de combatir el daño, así como un estado antiinflamatorio (M2) en donde se produce la secreción de citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β) esto con el fin de promover la cicatrización o la regeneración de tejido (Martínez-Tapia et al., 2018). Sin embargo, en las personas diagnosticadas con TEA existe una disminución de la producción de IL-10 y un aumento en la producción de TNF α , demostrando así que estos sujetos sufren de un proceso inflamatorio constante en diferentes regiones cerebrales locales (e.g. corteza prefrontal e hipocampo), involucrando la activación de la microglía, por lo que se puede inferir que esta neuroinflamación generada por la microglía es parte de la patología del autismo (Holt & Monaco, 2011).

En materia de alteraciones morfológicas del SNC se han encontrado que en pacientes con autismo existen ciertas alteraciones en el encéfalo, principalmente en el cerebelo (Palmen et al., 2004). Este órgano está encargado de la coordinación y planificación del movimiento, esto al tener una proyección a las neuronas motoras superiores de la corteza cerebral (a través del tálamo), así como para el aprendizaje de las tareas motoras y el almacenamiento de esta información (Purves et al., 2017, p. 19). La corteza cerebelar se diferencia en 3 capas: capa molecular, la cual contiene axones de las células granulosas; capa granular, en donde se encuentran un gran número de células pequeñas denominadas granulares; capa de células de Purkinje, en donde se encuentran los somas de este tipo de células. Estas células son de suma importancia debido a que son las únicas células que representan una salida de la corteza cerebelosa ya que están involucradas en la coordinación motora y la exploración mental (Courchesne et al., 1994). En autopsias de sujetos diagnosticadas con TEA se ha encontrado una reducción en el número de células de Purkinje en ciertos lóbulos del cerebelo (Fatemi et al., 2002; Ritvo et al., 1986). Esta reducción se debe a que existen anomalías morfológicas en estos pacientes, específicamente en la parte media sagital del vermis cerebelar (lóbulos VI-X) (Webb et al., 2009). Algunos autores atribuyen las alteraciones en la coordinación motora como resultado de la pérdida de este tipo de células en el cerebelo (Sudarov, 2013), esto debido a que el axón proveniente de cada una de las células se comunica directamente con el núcleo vestibular mediante una señalización del neurotransmisor GABA (ácido γ -aminobutírico) controlando su funcionamiento principal el cual es el mantenimiento del equilibrio (Ito, 1972; Ruigrok et al., 2015).

Epidemiología, incidencia y etiología

En materia epidemiológica el número de pacientes que han sido diagnosticados con TEA ha incrementado durante los últimos años (pasando de una prevalencia de 6.7% cada 1000 niños en el 2014, al 23% para el año 2018). A nivel mundial, 1 de cada 160

niños es diagnosticado con este trastorno, mientras que en EUA 1 de cada 44 niños pueden tener TEA (Baio, 2014; Maenner et al., 2021). En México no existen datos actuales sobre la incidencia del autismo; sin embargo, se estima que alrededor de 6 mil 200 niños nacen al año con autismo (1 de cada 115 niños), teniendo un aproximado de 400,000 infantes con esta condición (Discapacidad, 2019). Además, este trastorno es más común en el sexo masculino que en el femenino, encontrándose una relación 4:1 con respecto a su diagnóstico (Loomes et al., 2017). Actualmente es materia de debate el porqué de esta relación; no obstante, diversos grupos de investigación han propuesto que esta proporción se debe a genes alterados presentes en los cromosomas sexuales (MeCP2, FMR1, NLGN3-4X) o a una exposición anormal a hormonas sexuales durante la gestación (Schaafsma & Pfaff, 2014).

Distintos autores se han enfocado en encontrar las causas probables del desencadenamiento del TEA, coincidiendo en la existencia de modificaciones epigenéticas que podría causar su aparición (Butler et al., 2015; Li et al., 2012). Se han encontrado alrededor de ochocientas variaciones genéticas causales potenciales (Butler et al., 2015). Esto significa que el proceso genético subyacente en TEA es complejo y multifactorial. Además, existen factores exógenos que pueden incrementar el riesgo de padecer TEA. Algunos de estos son: edad avanzada de los padres, diabetes gestacional, hemorragia materna, malformaciones congénitas, contaminantes ambientales, drogas, medicamentos, entre otros (Braam et al., 2018).

Un hallazgo relevante para el presente trabajo es el descrito por Bourgeron (2007), en donde describe que una de las variaciones genéticas encontradas en pacientes con TEA incluyen una mutación encontrada en el gen reloj CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput). Este gen codifica una proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos. Además, se ha encontrado que el 60-75% de los individuos diagnosticados con TEA tienen menos de la mitad de los valores promedio de melatonina: hormona que, dentro de sus múltiples funciones, ayuda a la regulación

de los ritmos circadianos, incluidos los patrones de sueño (Gagnon & Godbout, 2018; Tordjman et al., 2012). En conjunto, esto demuestra que los pacientes con TEA presentan alteraciones en los ritmos circadianos.

Ritmos Biológicos

Los ritmos biológicos son fenómenos biológicos recurrentes en intervalos de tiempo definidos como respuesta adaptativa a las variaciones cíclicas ambientales, cuyas características están determinadas genéticamente. Esta organización temporal se manifiesta a través de cambios cíclicos en los eventos fisiológicos y conductuales (Pittendrigh, 1993). Estos ritmos son necesarios para su supervivencia ya que permiten preparar y anticipar cambios en el medio ambiente. Dichas respuestas se han documentado tanto en taxones procariotas como eucariotas desde niveles moleculares, celulares, sistémicos, hasta el organismo e incluso poblaciones (Aschoff, 1981).

Los ritmos biológicos se clasifican en tres grupos de acuerdo con la frecuencia de su oscilación. Los *ritmos ultradianos*, son ritmos de alta frecuencia y se presentan más de una vez en un día; los *ritmos circadianos* tienen una frecuencia cercana a las 24 horas; y los *ritmos infradianos*, son de baja frecuencia, es decir, se presentan menos de una vez en 24 h (Golombek, 2002; Valdez Ramírez et al., 2015).

Los ritmos circadianos, unos de los ritmos biológicos más importantes, están compuestos por una red compleja y jerárquica de relojes biológicos, que organizan temporalmente diversas variables de un organismo con una duración aproximada de 24 h (*circa diem* que significa "aproximadamente un día"). Estos ritmos facilitan respuestas efectivas y adaptativas del organismo a los cambios diarios en el entorno externo, alineando esencialmente la fisiología, el metabolismo y los comportamientos con las condiciones ambientales esperadas (Sorensen et al., 2020). Los ritmos circadianos se ajustan al período de 24 horas a través de *zeitgebers* (sincronizadores).

El *zeitgeber* más potente es la luz ambiental (ciclo luz/oscuridad (L/D)), teniendo una clara influencia sobre el sueño, la vigilia, así como en una gran variedad de procesos fisiológicos y conductuales (Duffy & Czeisler, 2009).

Control neural de los ritmos circadianos

Núcleo supraquiasmático (NSQ)

El NSQ es considerado como el reloj maestro que controla los ritmos circadianos de los mamíferos. Se encuentra en la porción anterior del hipotálamo inmediatamente superior al quiasma óptico y lateral al tercer ventrículo. Está compuesto por una densa masa de neuronas parvocelulares (Moore, 1991). El tercer ventrículo divide al NSQ en una estructura par, además se divide en dos regiones, una dorsomedial y una ventrolateral. La región dorsomedial es la principal zona de eferencias, mientras que la región ventrolateral es la principal zona retinorrecipiente de las aferencias del tracto retino hipotalámico (RHT) (Markus & Cristiane, 2002; Moore & Leak, 2001; Van den Pol, 1991) donde el neurotransmisor más importante es el glutamato (Hannibal, 2002). El NSQ se sincroniza a los estímulos fóticos a través de las proyecciones del RHT, de este modo las lesiones de estas proyecciones demuestran un impedimento al NSQ para sincronizarse a los ciclos de L/D. Dicha vía de comunicación es independiente de las vías clásicas que participan en la percepción visual (Guadarrama-Ortiz et al., 2014).

En mamíferos, el NSQ tiene control sobre la producción de melatonina por la glándula pineal, a través de una de las vías neurales eferentes del NSQ (Tecemariam-Mesbah et al., 1999). La mayoría de las eferencias del NSQ corren dorsal y caudalmente hasta la superficie ventral del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo. Por ejemplo, una de las proyecciones de salida mejor conocidas es la vía multisináptica que llega a la glándula pineal, responsable de la síntesis de melatonina: el NSQ envía algunas conexiones al PVN mediante el neurotransmisor GABA. Las fibras simpáticas

colinérgicas de dicho núcleo proyectan hacia la médula espinal, desde donde, tras pasar por el ganglio cervical superior (SCG) (T2-T3 de la médula espinal), alcanzan la glándula pineal. La noradrenalina (norepinefrina) se libera en las terminaciones del ganglio cervical superior e interacciona con los receptores β -adrenérgicos de la membrana del pinealocito, desencadenando una cascada intracelular que aumenta la actividad de enzimas encargadas de la síntesis de melatonina (Figura 2) (Borjigin et al., 2012; Markus & Cristiane, 2002; Poza et al., 2018).

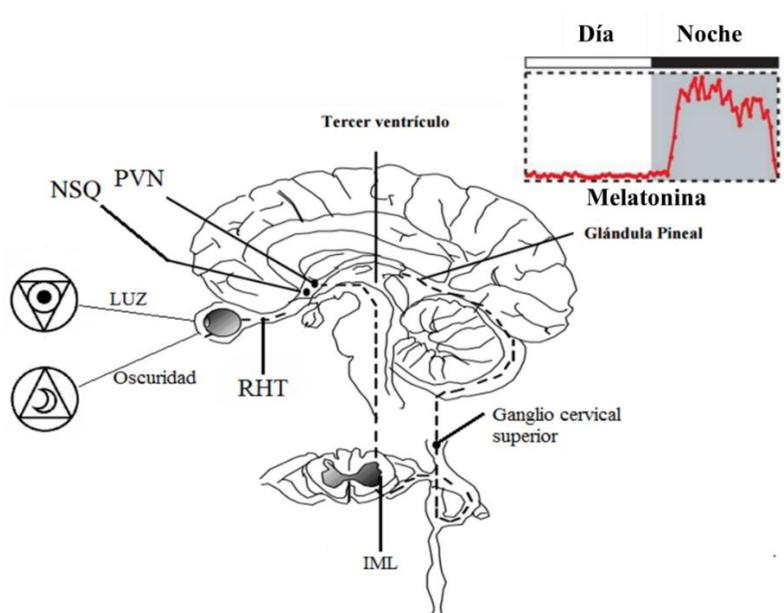


Figura 2. Eferencias del núcleo supraquiasmático (NSQ) hacia la glándula pineal y ritmo de liberación de la melatonina. La información fótica es transmitida de la retina al NSQ a través del tracto retino hipotalámico (RHT) mediante GABA, donde la luz estimula la vía. En oscuridad se inhiben el RHT y NSQ, lo que activa la comunicación del núcleo paraventricular (PVN) y el ganglio cervical superior (CSG) a los pinealocitos de la glándula pineal mediante noradrenalina, donde se produce y libera melatonina. Modificado de Borjigin et al. (2012).

Glándula pineal

La glándula pineal, también denominada epífisis, es un órgano que se desarrolla a partir de una evaginación de la pared dorsal del diencéfalo. Se trata de una estructura endócrina de origen neural considerada como un órgano circunventricular. Está compuesta por una población homogénea de pinealocitos los cuales funcionan como un oscilador biológico controlado principalmente por el NSQ. Esta glándula produce

melatonina, una indolamina derivada del triptófano, y su liberación guarda una buena relación de fase con el ciclo de luz ambiental, aumentando su concentración plasmática en los momentos de oscuridad, tanto en humanos como en animales murinos (e.g. rata) (González-González & Alvarez-Uria, 1984).

Los pinealocitos responden a las señales asociadas al fotoperiodo ambiental producidas por el NSQ, el cual genera proyecciones que tienen relevancia en los núcleos de la vía neural simpática previamente descrita que culmina en la liberación de noradrenalina. Por medio de receptores β -adrenérgicos se genera una cascada de señalización intracelular en el pinealocito la cual promueve la síntesis de melatonina durante la fase de oscuridad (Karasek & Winczyk, 2006; Markus & Cristiane, 2002).

Melatonina

La melatonina es una hormona indolamina lipofílica sintetizada principalmente en la glándula pineal a partir del triptófano, siendo la serotonina el sustrato intermediario (Figura 3) Esta hormona tiene blanco tanto en estructuras del sistema nervioso central como en órganos y tejidos de la periferia, por lo cual funciona tanto como un asa de retroalimentación hacia el NSQ y la retina, así como una señal de la condición circadiana hacia la periferia (Pévet et al., 2006).

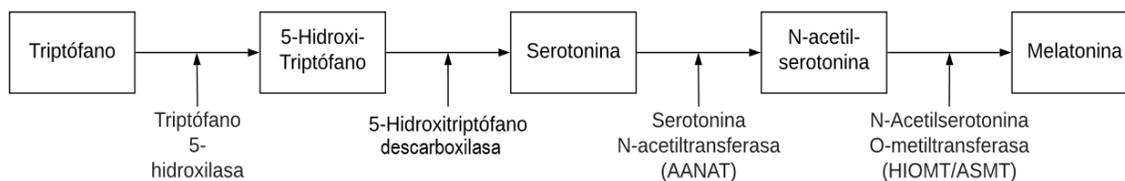


Figura 3. Biosíntesis de melatonina. La hormona se sintetiza mediante 4 reacciones a partir del aminoácido esencial triptófano. Elaboración propia

Como anteriormente se describió, alrededor del 60-75% de los pacientes diagnosticados con TEA tienen valores bajos de melatonina, medidos por uno de sus metabolitos, el 6-sulfatoximelatonina (6-SM). Este déficit en la melatonina se refiere a los niveles diurnos (melatonina periférica) y nocturnos, lo que sugiere un déficit

global en la producción de melatonina en el autismo (Tordjman et al., 2012). La melatonina, o N-acetil-5-metoxitriptamina fue descubierta en 1958 por Aaron Lerner (1958). Se han encontrado fuentes extrapineales de melatonina ,tanto en humanos como en animales murinos, tales como: retina, células de la médula ósea, plaquetas, piel, linfocitos, cerebelo y en el tracto gastrointestinal (Bubenik, 2002; Carrillo-Vico et al., 2004; Champier et al., 1997; Gagnon & Godbout, 2018; Sanchez-Hidalgo et al., 2009).

La melatonina es sintetizada principalmente por los pinealocitos a partir del aminoácido triptófano, que se hidroxila en 5 hidroxitriptófano, luego se descarboxila en serotonina. Posteriormente, mediante dos pasos controlados por enzimas (Serotonina N-acetiltransferasa [AANAT] y N-Acetilserotonina O-metiltransferasa [ASMT o HIOMT]), la serotonina se transforma en melatonina (Figura 3) (Simonneaux & Ribelayga, 2003). Una vez sintetizada, la melatonina se libera rápidamente en la circulación sistémica para alcanzar los tejidos diana centrales y periféricos (Tordjman et al., 2017). La síntesis y secreción de melatonina aumenta en la fase de oscuridad y es inhibida por la luz. La información luminosa se transmite desde la retina a la glándula pineal a través del NSQ. En los humanos, su secreción comienza poco después del anochecer, y alcanza un pico en medio de la noche (entre las 2 y las 4 de la mañana), disminuyendo gradualmente durante la segunda mitad de la noche. Alrededor del 80% de la melatonina se sintetiza por la noche, con concentraciones séricas que varían entre 80 y 120 pg/ml, mientras que, durante el día, oscilan entre 10-20 pg/ml (principalmente siendo melatonina periférica) (Karasek & Winczyk, 2006).

La melatonina actúa como antioxidante ya que es altamente efectiva para reducir los efectos del estrés oxidativo en todo el cuerpo mediante la eliminación de los radicales libres procedentes del oxígeno y del nitrógeno, además de que regula la expresión génica y la actividad de varias proteínas antioxidantes (glutación peroxidasa (GPx),

glutación reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) mediante la transducción de señales a través de los receptores de melatonina (Abadi et al., 2018). De igual forma, protege contra el daño del ADN provocado por las especies reactivas del oxígeno (ROS), esto debido a que también (Bejarano et al., 2014). Se ha visto que la melatonina tiene un papel inmunoestimulador debido a que estimula la actividad de células CD4+ e inhibe las actividad de células CD8+ (Srinivasan et al., 2005).

Un papel de suma importancia de la melatonina está relacionada con el desarrollo embrionario; esto debido a que la glándula pineal se desarrolla hasta los 3 meses de edad en humanos y a los 15 días posnatales en modelos murinos (Calvo & Boya, 1981; Voiculescu et al., 2019); por lo tanto, durante el desarrollo embrionario, el feto depende de la melatonina materna suministrada por la placenta durante la gestación y por la leche materna durante los primeros meses de vida del infante o de la cría de ratas (Y. Jin et al., 2018; Molad et al., 2019; Rowe & Kennaway, 2002). Este suministro de melatonina por parte de las madres tiene distintos papeles como, por ejemplo: disminución del estrés oxidativo, lo que conlleva a una disminución de la vulnerabilidad del sistema nervioso central (SNC) aumentando la neuroprotección, tanto en humanos como en ratas (Baydas et al., 2002); así como también ayudando en la sincronización circadiana, normalización de esta forma los patrones de sueño y ayudando en el correcto desarrollo neuronal (Y. Jin et al., 2018).

Modelo de autismo de ácido valproico (VPA)

Debido a la fisiopatología compleja del TEA en humanos, y aunado a la dificultad para poder acceder a cerebros de personas autistas, el uso de modelos animales para estudiar esta patología ha sido fundamental en el entendimiento de esta patología. Existen distintos tipos de modelos de TEA en animales (Belzung et al., 2005); sin embargo, el modelo de VPA en animales murinos ha sido uno de los que ha ganado

más popularidad en los últimos años (Kim et al., 2011, 2013; Moldrich et al., 2013; Schneider & Przewłocki, 2005).

El VPA es un fármaco utilizado terapéuticamente en el tratamiento de la epilepsia y el trastorno bipolar, debido a que ayuda a la correcta síntesis de GABA. Además, tiene influencia sobre los canales de potasio dependientes de voltaje, siendo ambos relevantes en estas enfermedades (Baumgartner & Elger, 2020; Guidotti et al., 2011; Petroff et al., 1999). Diferentes grupos de investigación han encontrado que el VPA tiene propiedades teratogénicas, generando anomalías en el corazón, así como también en el sistema nervioso central (desórdenes cognitivos) en la progenie (Menegola et al., 1996; Nicolini & Fahnstock, 2018; Ornoy, 2009; Rajesh et al., 2020).

Distintas entidades internacionales, como es el caso de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), han prohibido el uso del VPA en mujeres con capacidades de gestación, debido a los trastornos en el neurodesarrollo a largo plazo en niños nacidos de las mujeres tratadas ((AEMPS), 2018). Además de los efectos teratogénicos, distintos estudios demuestran que el uso de VPA en modelos murinos inducen un comportamiento similar a las personas autistas, lo cual es de suma importancia en el estudio fisiopatológico de esta condición. Mabunga et al. (2015) han hecho una validación completa acerca de este modelo para inducir TEA. Dicha validación consta de 3 apartados:

- Validación constructiva: detalla el grado de similitud entre los mecanismos subyacentes al modelo animal y la enfermedad humana; *i.e.* estrés oxidativo, inhibición de la histona deacetilasa, imbalance excitación/inhibición, etc.;
- Validación del método: insiste en la recapitulación de los endofenotipos de enfermedades que se modelarán en animales, *i.e.* los síntomas. Los síntomas conductuales, la neuropatología, el funcionamiento neurofisiológico y las

alteraciones neuroquímicas son ejemplos de endofenotipos o marcadores dados que los animales pueden modelar;

- Validación predictiva: indica la extrapolación del comportamiento humano a través del comportamiento animal manipulado en laboratorio.

A pesar de que es imposible que el modelo de VPA pueda cumplir con todas las características del TEA, si puede recapitular la mayoría de los síntomas vistos en humanos utilizando la validación previamente descrita, demostrando así que dicho modelo es apto para estudios de esta condición.

ANTECEDENTES

Modelo de VPA

El primer reporte asociando el VPA con TEA fue dado a conocer por Christanson, Chesler & Kromberg (1994) al observar signos de autismo en hijos de madres las cuales estaban en tratamiento con el fármaco. A partir de este reporte, Rodier, Ingram, Tisdale, Nelson & Romano (1996) crearon el modelo de VPA al inyectar de forma intraperitoneal (i.p.), en los días de gestación 11.5,12 o 12.5, una dosis de 350 mg/kg de este fármaco antiepiléptico a ratas madres gestantes de la cepa Long Evans. A pesar de encontrar una reducción en el número de neuronas motoras en las crías expuestas, no observaron ninguna alteración en el desarrollo cerebral de las mismas; no mostraban malformaciones y eran saludables. Sin embargo, el VPA para inducir TEA ha sido ampliamente usado por diferentes grupos de trabajo con el fin de entender de mejor forma la etiología de este comportamiento, así también como la vía molecular mediante la cual el fármaco genera TEA. En la Tabla 1 (Nicolini & Fahnestock, 2018) se exponen algunos de los trabajos realizados en este ámbito, mostrando, entre otras cosas, el día de administración del VPA, el modelo animal utilizado, así como su sintomatología.

Tabla 1. Déficits de comportamiento similares al autista inducidos por la exposición materna a VPA. Modificado de Nicolini & Fahnestock (2018, Table 1) (i.p.=intraperitoneal; s.c.=subcutánea)

Especie /Cepa	Dosis de VPA/ Administración	Tiempo de exposición	Resultados	Referencias
Ratas Wistar	600 mg/kg; inyección i.p.	E12.5	Incremento en actividad locomotora, comportamientos repetitivos; disminución de exploraciones sociales, actividad exploratoria; entre otros	(Schneider et al., 2008; Schneider & Przewlocki, 2005)
Ratas Wistar	500 mg/kg; inyección i.p.	E12.5	Aumento de ansiedad, comportamiento repetitivo, generalización de miedo; disminución en comportamiento de juego, exploración social; entre otros	(Markram et al., 2008)
Ratas Sprague-Dawley	400 mg/kg; inyección i.p.	E12	Disminución en sociabilidad	(Kim et al., 2011, 2013)
Ratones C57BL/6 J	600 mg/kg; inyección i.p.	E12.5	Disminución en sociabilidad, interacciones sociales; aumento en comportamientos repetitivos	(Moldrich et al., 2013)
Ratones C57BL/6 Hsd	600 mg/kg; inyección s.c.	E13	Disminución en preferencia social; aumento en comportamientos repetitivos y ansiedad	(Mehta et al., 2011)

Ratas Sprague-Dawley	500 mg/kg; inyección i.p.	E12.5		(Ibañez-Sandoval, 2016)
Ratas Wistar	600 mg/kg; inyección i.p.	E12.5	Disminución en preferencia social	(Dai et al., 2018)

Por ejemplo, Dai et al. (2018), utilizan la prueba de 3 compartimentos (interacción social) para demostrar que ratas de la cepa Wistar expuestas prenatalmente a VPA tiene problemas en materia de sociabilidad (Figura 4). Se mide el tiempo que pasa en cada una de las cámaras, en donde en una está un objeto nuevo y en la otra un sujeto desconocido o extraño (que tiene que ser de la misma cepa y de la misma edad). Debido a que las ratas son animales sumamente sociables, el grupo control pasa la mayoría del tiempo en el lado o en el compartimiento de la rata extraña. En contraste, las ratas expuestas a VPA no tienen preferencia por ninguna de las cámaras de estudio (la de los extremos), demostrando así que el modelo de VPA tiene alteraciones similares en la sociabilidad como se observa en los humanos diagnosticados con TEA.

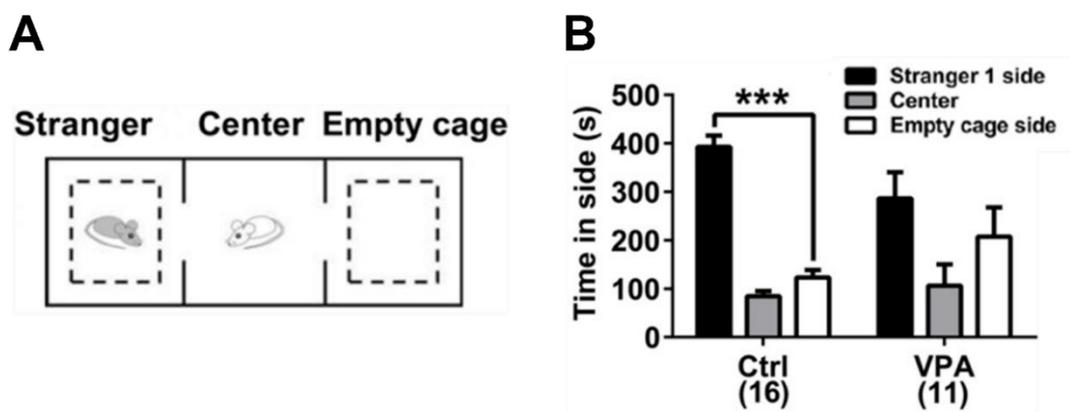


Figura 4. Existen problemas en la sociabilidad en ratas expuestas a VPA. Esquema de la realización de la prueba de interacción social (A). Alteraciones en la sociabilidad de las ratas expuestas prenatalmente al VPA al existir una reducción en el tiempo pasado en la cámara del extraño en comparación con el control, así como una nula preferencia por algunas de las cámaras de los extremos (B). Modificado de Dai et al. (2018).

Además, para corroborar que las ratas expuestas a VPA tienen alteraciones de coordinación motora, Ruhela et al. (2019) analizaron la coordinación motora (utilizando la prueba de *grid walking*) de crías control y de crías expuestas a VPA durante la gestación. Como se puede observar en la Figura 5, las ratas tratadas con VPA tienen un mayor número de caídas durante la realización de la prueba en comparación con el grupo control. Estas mismas alteraciones pueden observarse en personas diagnosticadas con TEA (Ozonoff et al., 2008; Page & Boucher, 1998), por lo que ayuda en la correcta validación de este modelo para inducir TEA en modelos murinos.

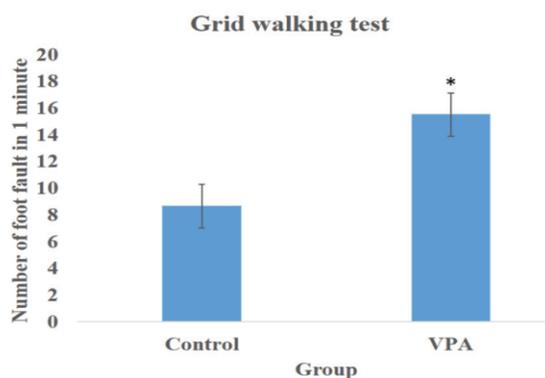


Figura 5. Alteraciones en coordinación motora de ratas expuestas a VPA. Aumento estadísticamente significativo en el número de caídas durante la realización de la prueba de grid walking en las ratas expuestas a VPA de manera prenatal en comparación con el grupo control. Tomado de Ruhela et al. (2019).

Administración de melatonina

Existe una gran cantidad de trabajos de investigación en modelos murinos enfocados en analizar los efectos benéficos de la melatonina. Por ejemplo, Pan et al. (2006) determinan que una concentración de 5 y 10 mg/kg de melatonina reduce el daño hepático en ratas que se alimentan con una dieta alta en grasas; además de aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx en el hígado. Por otro lado, Tian et al. (2014) observaron que la melatonina a una concentración de 5 mg/kg, recuperó significativamente la disminución inducida por el VPA en la fosforilación de CaMKII (Thr286), NMDAR1 (Ser896) y PKA (Thr197) en el hipocampo,

proteínas involucradas en la cascada de señalización de la potenciación a largo plazo (LTP), mejorando significativamente el déficit del comportamiento social presente en las ratas con TEA.

Baja concentración de melatonina y TEA

Tal como se abordó anteriormente, la melatonina tiene un efecto neuroprotector, además de tener un papel importante en la regulación de la plasticidad neuronal y los ritmos circadianos (El-Sherif et al., 2003; Von Gall et al., 2002). De igual forma, las personas con TEA tienen concentraciones anormalmente bajas de melatonina. Diversos estudios han encontrado que esta reducción de melatonina da lugar a efectos negativos en el comportamiento humano, como lo es el TEA, ligándolo principalmente a una reducción en la actividad de las enzimas precursoras de la melatonina, como lo es la N-Acetilserotonina O-metiltransferasa (ASMT o HIOMT) y la Serotonina N-acetiltransferasa (AANAT) (Braam et al., 2018; Melke et al., 2008; Pagan et al., 2017).

Por ejemplo, Melke et al. (2008) analizaron los niveles séricos de melatonina en padres de hijos que no tienen TEA (control), en padres que tienen un hijo diagnosticado con TEA (padres TEA), así como los mismos niños con el trastorno. Ellos encontraron que, tanto en los padres TEA como los niños diagnosticados con TEA, tienen niveles más bajos de esta hormona comparados con los padres control. Además, analizaron la actividad de ASMT en plaquetas en estos mismos grupos. En este análisis se encontró que existe una baja actividad de esta enzima en los niños con TEA, así como en sus padres en comparación con el grupo control reflejándose en altos niveles de serotonina. Este estudio concluye que una deficiencia en la actividad de ASMT, así como bajos niveles de melatonina en padres podría ser un factor de susceptibilidad para TEA (Figura 6 A, B y C).

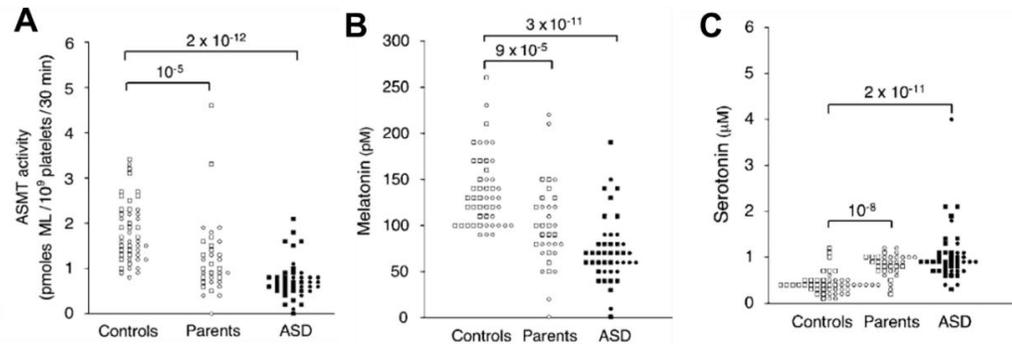


Figura 6. Actividad de ASMT, niveles de melatonina y serotonina en sujetos con TEA, padres y controles. Disminución en la actividad de ASMT en personas con TEA (ASD), así como también en sus padres (Parents), en comparación con el grupo control (A). Reducción en los niveles plasmáticos de melatonina (B) y aumento en los niveles de serotonina (C) en sujetos con TEA y en sus padres en comparación con los grupos control dados principalmente por la actividad disminuida de ASMT. Tomado de Melke et al. (2008).

Pagan et al. (2017), analizaron la actividad de las enzimas ANAAT y ASMT en plaquetas de sujetos control, niños con TEA, padres de hijos con TEA y hermanos de niños con TEA, y encontraron que existe una baja actividad de ambas enzimas en los niños con TEA y en sus familiares (padres y hermanos). Ellos concluyeron que individuos con TEA y sus familiares (principalmente progenitores), tienen una baja actividad de AANAT y ASMT comparando con personas control (Figura 7 A y B).

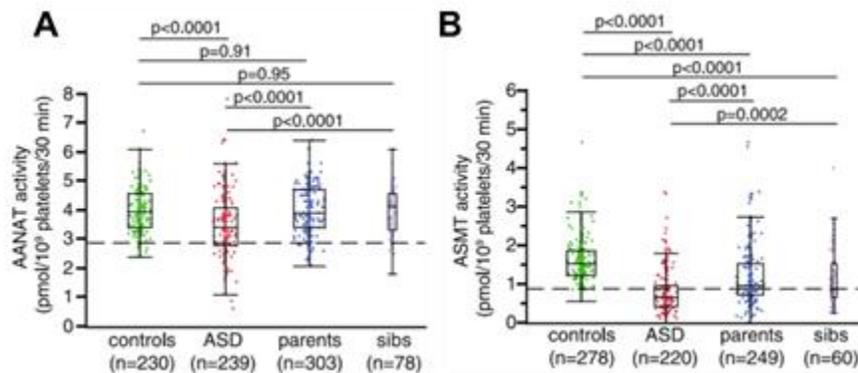


Figura 7. Actividad de enzimas de la síntesis de melatonina en sujetos con TEA, familiares y controles. Reducción en la actividad de las enzimas AANAT (A) y ASMT (B) en sujetos diagnosticados con TEA (ASD). Esta reducción es significativa en los padres (parents) y en los hermanos (sibs) de los sujetos con TEA solamente en la actividad de la enzima ASMT. Tomado de Pagan et al. (2017).

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿La administración de melatonina pre y postnatalmente en madres tratadas con VPA podrá prevenir los síntomas de desincronización circadiana, alteraciones conductuales y cambios morfofuncionales centrales (NSQ, hipocampo y cerebelo) presentes en las crías con TEA?

¿Existirán diferencias en las características de TEA entre las crías hembras y machos expuestas al VPA durante la gestación?

HIPÓTESIS

La administración de melatonina de manera prenatal y durante la lactancia de las crías de ratas expuestas al VPA podrán prevenir las alteraciones en la actividad locomotora y la temperatura corporal, así como los cambios morfológicos centrales (NSQ, hipocampo y cerebelo) presentes en el TEA, con notables diferencias entre sexos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto que tiene la administración de melatonina durante el neurodesarrollo y hasta el destete en las crías de ratas expuestas a VPA de manera prenatal.

Objetivos específicos

- Evaluar si el tratamiento con melatonina mejora los síntomas conductuales, circadianos y morfológicos de ratas expuestas a VPA de manera prenatal.
- Caracterizar los probables efectos diferenciales de la exposición a VPA de manera prenatal en machos y hembras.

PROTOCOLO

Se utilizaron un total de 12 ratas hembra de aproximadamente 90-100 días de edad, provenientes del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla, de la cepa Sprague-Dawley, las cuales se aparearon con machos de la misma cepa previo a 1 semana de aclimatación y al alcanzar el peso adecuado (310 ± 10 g). Las ratas se mantuvieron en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) en donde las parejas se alojaron en cajas de acrílico con camas de aserrín estéril en un cuarto aislado bajo condiciones estándar de bioterio (temperatura de 22° C y humedad constante), un ciclo L/D de 12 horas (siendo ZT0 o 7:00 h la hora en que se prende la luz y ZT12 o 19:00 h la hora en que se apaga), así como agua y alimento (Lab-chow 5001, Purina) *ad libitum*.

Durante el apareamiento se monitoreó la presencia de tapón vaginal para determinar si existió coito; de ser así, se determinó como el día gestacional 0 (E0). Después de 14 días, el macho se retiró de la hembra, la cual siguió con su proceso de gestación natural y se les permitirá criar a sus camadas. Previo al apareamiento, las madres se dividieron aleatoriamente en 4 grupos:

- Grupo control (Grupo 1): se le administra 0.5 ml de solución salina de manera i.p. en el día gestacional 12.5 (E12.5).
- Grupo VPA (Grupo 2): se administra de forma i.p. el VPA (500 mg/kg) en el día gestacional 12.5 (E12.5)
- Grupo VPA + melatonina (Grupo 3): se siguen el mismo protocolo que el grupo anterior, además de una administración de melatonina (5 mg/kg) por vía oral (utilizando como vehículo 3 g de manzana), desde el día E13 hasta el día posnatal 23 (PN23) (aproximadamente 4 semanas), donde ocurre el destete de las crías.

- Grupo VPA + vehículo (Grupo 4): además de la inyección i.p. de VPA en el día E12.5, se le administra vehículo (manzana) desde el día E13 hasta el día PN23 (4 semanas).

Toma de muestras

Al nacer las crías, estas se seleccionan mediante aleatorización para obtener un mínimo de 10 ratas cría (5 hembras y 5 machos) por grupo, las cuales, una vez realizado el destete, se mantuvieron bajo las mismas condiciones que los progenitores hasta el día del sacrificio. Para validar el modelo de VPA, se analizó el comportamiento de las crías con pruebas de coordinación motora (*grid walking y negative geotaxis*), pruebas conductuales (campo abierto e interacción social), así como análisis de ritmos circadianos (temperatura y actividad locomotora), como se indica más abajo. Cabe resaltar que las pruebas de coordinación motora y conductuales fueron realizadas en un horario de 9:00 h (ZT2) a 12:00 h (ZT5) en un cuarto de conducta de la Facultad de Medicina de la UASLP utilizando un foco regulador, en donde su iluminancia es de 32 luxes para la prueba de campo abierto y de 115 luxes para *grid walking, negative geotaxis* e interacción social. Al finalizar con las pruebas, las crías se sacrificaron y se tomaron tejidos cerebrales y cerebelares para su posterior análisis. La Figura 8 muestra la línea de tiempo del protocolo experimental resaltando cada uno de los pasos del protocolo.

Este trabajo se llevó a cabo bajo los lineamientos que marca la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

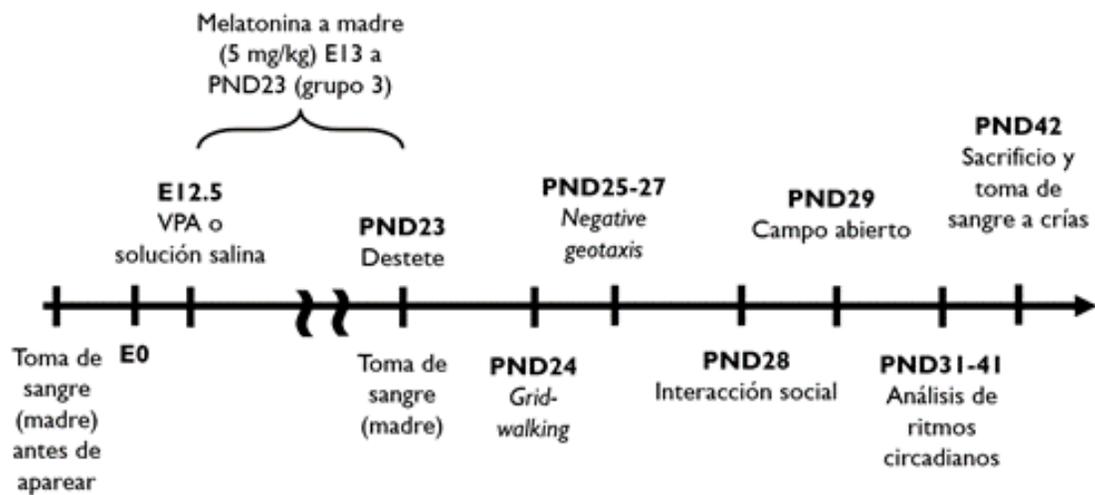


Figura 8. Línea del tiempo del protocolo experimental.

METODOLOGÍA

Toma de sangre y análisis sérico de melatonina mediante ELISA

La toma de sangre se realizó con el fin de determinar los valores séricos de melatonina. Para ello, se utiliza una fuente de luz roja con el fin de evitar cualquier tipo de luz azul y así alterar los niveles de la hormona en sangre. La rata se inmoviliza y se le hace un lavado a la cola con alcohol para eliminar resto de heces u orines y se aplica lidocaína con el fin de adormecer el área. Posteriormente se hace un pequeño corte en el extremo distal de la cola para recolectar aproximadamente 500 μ l de sangre proveniente de la arteria caudal. Dicha recolección se realizó en la fase de oscuridad (ZT16; 23:00 h), seguido de un periodo de 10 minutos de centrifugación a 4500 revoluciones por minuto (rpm) para obtener el suero para posteriormente almacenarlo en 3 alícuotas a -80°C para su posterior análisis. En el caso de la sangre de las crías, la toma se realizó al momento del sacrificio (ZT6 o 13:00 h). La sangre fue tomada directamente de la aorta torácica utilizando una jeringa. Posterior a la toma se siguió el mismo protocolo que el caso de las madres.

El objetivo de la recolección de suero fue el determinar la concentración sérica de melatonina en las ratas mediante la utilización de la técnica ELISA utilizando 20 µl de suero, donde cada medición se hizo por duplicado utilizando un kit comercial (rat melatonin ELISA kit; ab213978, Abcam, Cambridge, Reino Unido).

Pruebas de coordinación motora, conductuales y análisis de ritmos circadianos

Estas pruebas fueron realizadas en las crías hembras y machos (n=5-9) de los 4 grupos a la edad de 24-29 días de nacidas (PND). Las pruebas de coordinación motora utilizadas fueron: *grid walking* y *negative geotaxis*, las cuales evalúan la coordinación motora y el equilibrio, respectivamente. Las pruebas conductuales fueron: interacción social y campo abierto, esto con el fin de evaluar los niveles de sociabilidad y niveles de ansiedad, respectivamente. Por otro lado, en el caso de los análisis de ritmos circadianos, las variables analizadas fueron temperatura y actividad locomotora. Todos estos análisis fueron con la finalidad de validar el modelo de autismo y explorar cada una de estas variables en el mismo. Las pruebas conductuales y de coordinación motora fueron realizadas en el cuarto de conducta perteneciente al Bioterio de la Facultad de Medicina de la UASLP y registradas utilizando una video grabadora para su posterior análisis. Previo a la realización de cada una de las pruebas, las estructuras deben limpiarse utilizando CleanLab (una solución a base de amonio al 0.5%, multilimpiador desinfectante (Pinol) y etanol al 100%). En el caso de análisis de ritmos circadianos, estos se llevaron a cabo en el Bioterio 1 perteneciente a la Facultad de Ciencias de la misma casa de estudios.

Pruebas de coordinación motora

Grid walking

Esta prueba consiste en una estructura elevada de acero inoxidable de medidas: 50 cm x 50 cm x 50 cm, con una malla con una cuadrícula de 1.2 cm x 1.2 cm (Figura 9A y B).

En el día posnatal 24 (PN24) las crías se colocan en el centro de la estructura por 1 minuto, en donde su comportamiento se grabó utilizando un par de cámaras montadas en tripiés: una localizada debajo de la estructura y la otra localizada sobre la misma (Figura 9C). La utilización de dos cámaras es para cotejar la información obtenida por cada una de ellas.

Esta prueba permite analizar la coordinación motora contabilizando el número de errores al caminar (*i.e.* número de veces en las cuales las extremidades se resbalaron y cayeron en la cuadrícula de la malla).

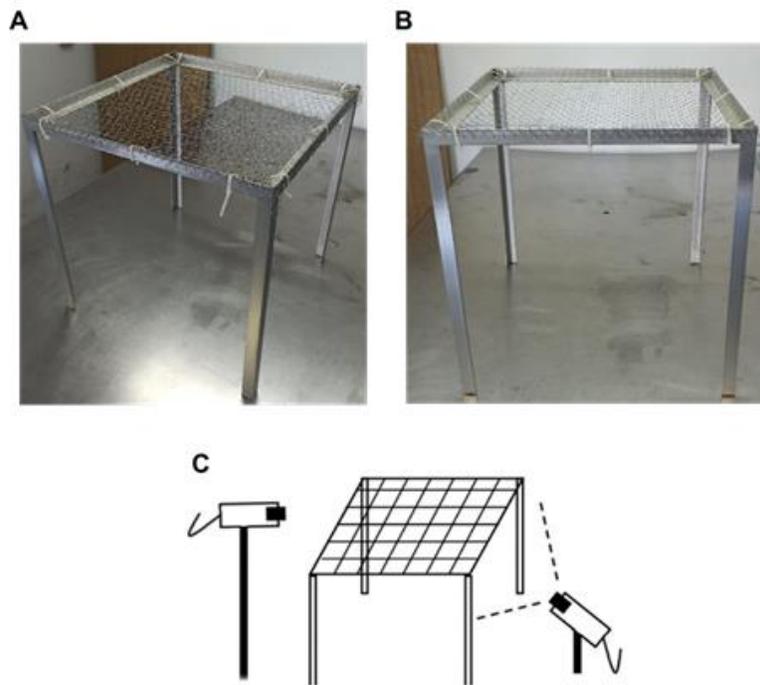


Figura 9. Estructura para la prueba de grid walking (A y B) y localización de las cámaras durante la prueba (C).

Negative geotaxis

Esta prueba consta de una superficie cuadrada (50 cm x 50 cm) con una malla de cuadrícula 1.2 cm x 1.2 cm, la cual se inclina 45° con respecto a la horizontal (Figura 10). La superficie debe localizarse en un cuarto aislado de ruido exterior y con luz controlada.

Esta prueba se realizó en 3 días consecutivos (PN25-27) en donde las crías se colocan en la base de la superficie inclinada con su cabeza hacia abajo. El término de la prueba se considera cuando el roedor rote 180° (*i.e.* termine con la cabeza hacia arriba) y escale la superficie. El tiempo límite para que el roedor gire los 180° es de 1 minuto; de caso contrario, el test se considera negativo. Esta prueba permite evaluar la actividad, la función vestibular y la coordinación motora.



Figura 10. Estructura para la prueba de negative geotaxis. La malla tiene una inclinación de 45° sobre la horizontal.

Pruebas conductuales

Interacción social (cámara de 3 compartimientos)

La prueba se realiza en una caja de dimensiones 150x50x50 cm, la cual está dividida en 3 compartimientos de iguales dimensiones (Figura 11). La caja debe localizarse en un cuarto aislado del ruido exterior y con luz controlada.

En el día PN28 las crías se habitúan en la caja durante 5 minutos. Para esto, los compartimientos de los extremos se mantienen abiertos y así la rata puede desplazarse por toda la superficie de la caja. Una vez realizada la habituación, en uno de los extremos se coloca una rata de la misma cepa y edad, con la cual nunca haya tenido contacto; se colocará en un recipiente con aberturas. En el otro compartimento se coloca un recipiente con aberturas. Posteriormente, la actividad de la rata experimental se grabó durante 10 minutos. Esta prueba permite evaluar la sociabilidad debido a que se analiza:

- El tiempo que permanece en una de las cámaras.
- El número de veces que la rata interactúa con el animal extraño.
- El tiempo que tarda en interactuar por primera vez la rata experimental con el extraño (latencia).
- Índice de interacción (es el tiempo que pasa en la cámara del extraño, dividido por el tiempo que pasa en cámara vacía).

El análisis de esta prueba fue realizado mediante el software *Activity test counter* (v0.5.1) (Velázquez, 2020) el cual arroja las variables medidas en la prueba (tiempo en milésimas de segundo y número de eventos).



Figura 11. Estructura para la realización de la prueba de interacción social.

Campo abierto (*Open Field*)

Esta prueba utiliza una caja de acrílico transparente rugoso, con medidas 50X50X40 cm, la cual esta cuadriculada para obtener 9 sectores (Figura 12). La caja debe localizarse en un cuarto aislado del ruido externo y con luz controlada.

En el día PND29 las crías se colocaron en el centro de la caja y se grabó su actividad durante 20 minutos. Este test permite analizar la actividad locomotora general, los niveles de ansiedad y comportamientos repetitivos. Esto se debe a que se analizan los siguientes parámetros:

- La distancia total recorrida
- El número de defecaciones
- El número de veces que realiza grooming

El análisis de esta prueba fue realizado utilizando el software Path recorder (v0.1-alpha) (Velázquez, 2019) el cual permite trazar el recorrido realizado por la rata además de calcular la distancia recorrida por la misma.



Figura 12. Estructura en donde se realiza la prueba de campo abierto.

Análisis de ritmos circadianos

Análisis de temperatura

Una vez terminadas las pruebas de coordinación motora y conductuales, las crías fueron anestesiadas con una combinación de ketamina y xilacina (2:1) (87 y 13 mg/kg) para colocarles un sensor de temperatura en la zona intraperitoneal izquierda (iButton Sensor-Temperature Logger; Maxim Integrated Products) (Figura 13). Este sensor se programó para que registrara la temperatura corporal cada 15 minutos. Para reducir el dolor y prevenir infecciones a todos los animales se les administró ketorolaco (3.5 mg/kg; Comercializadora farmacéutica de Chiapas, CDMX, México) y enrofloxacina (10 mg / kg; Lovet, CDMX, México) por vía intramuscular. Después de la cirugía se les dejó descansar durante 3 días y el análisis de esta variable circadiana se llevó a cabo durante 7 días, empezando el registro a las 7 am. Los sensores se recuperaron después del sacrificio y los datos se extrajeron con el software OneWireViewer (versión 3.15.49 2001-2010, Maxim Integrated Products).



Figura 13. Sensores de temperatura utilizados para el análisis circadiano.

Análisis de actividad locomotora

Una vez colocados los sensores de temperatura, las ratas se alojaron en un sistema de monitoreo automático para el registro de actividad general (OMnialva), el cual consta de sensores de presión (colocados debajo de las cajas de las ratas), así como sensores infrarrojos (colocados sobre las cajas) que registran la actividad de la rata durante todo el día. Esta variable circadiana se analizó durante 7 días posteriores a la implantación del sensor. Los datos provenientes del sistema se recuperaron y analizaron con el software SPAD 9 Análisis (Omnialva) el cual permite observar de manera gráfica el perfil de actividad de cada una de las ratas colocadas en el sistema de monitoreo mediante un actograma de doble gráfica (doble plot). Este es un método de análisis de los ritmos biológicos que permite un análisis visual de los datos de actividad motora con gran precisión. Además, el software permite la creación de un periodograma de Sokolove-Bushell (Chi^2 o χ^2), el cual consiste en la determinación matemática del periodo que presenta un ritmo (Noguera, 2002).

Sacrificio y toma de muestras.

Una vez terminadas las pruebas conductuales, motoras y el análisis de ritmos circadianos se les administró a las ratas una sobredosis de pentobarbital sódico intraperitonealmente (65 mg/ml; Sedalparma, Pet's Pharma, México) y se perfundieron transcardialmente utilizando solución salina al 0.9% para posteriormente utilizar paraformaldehído al 4% diluido en PBS. El cerebro y cerebelo

se extrajeron y se colocaron en paraformaldehído por 72 horas (teniendo cambios cada 24 horas) almacenados en refrigeración ($\sim 4^{\circ}\text{C}$), seguido de un almacenamiento en sacarosa al 30%, NaN_3 al 0.04% y PBS para crioprotección.

Inmunohistoquímica

Los cerebros se cortaron en secciones coronales de 40 μm de espesor y los cerebelos en secciones sagitales del mismo grosor utilizando un criostato a -20°C .

Se seleccionaron los cortes del cerebro que contenían las áreas de interés para nuestro proyecto (NSQ, hipocampo y lóbulos cerebelares) a niveles anterior, medial y posterior (Figura 14) de acuerdo con las coordenadas estereotáxicas con base en el atlas de Paxinos & Watson (2007). Los anticuerpos utilizados se diluyeron en solución salina tamponada con Tris gelatina al 0,25% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA). Los cortes seleccionados se incubaron con anticuerpo primario de conejo anti-c-Fos (1:2500; ab190289, Abcam, Cambridge, Reino Unido) o con anticuerpo primario de conejo anti-Iba1 (1:500; PA5-27436, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) durante 48 horas. Después, los tejidos se lavaron utilizando PBS para posteriormente incubarlos en el anticuerpo biotinilado de cabra anti-conejo (1:200; 711-065-152, Jackson Immuno research, West Grove, PA, USA) por 2 horas seguido de otros lavados con PBS y la incubación del complejo Avidina-Biotina durante 2 horas más (1:500, 1:1; Vectastain Elite ABC-peroxidasa kit; PK-6100, Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Finalmente, para poder observar el marcaje, se utilizó diaminobencidina (DAB) al 0.025% con peróxido de hidrógeno al 0.01% y NiNH_4SO_4 al 0.1% diluido en TBS. Para poder observar los cortes bajo el microscopio Carl Zeiss AX10 se montaron en portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol (70, 95 y 100%), se aclararon con xileno (Golden Bell, Zapopan, JAL,

México) y por último se cubrieron con Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

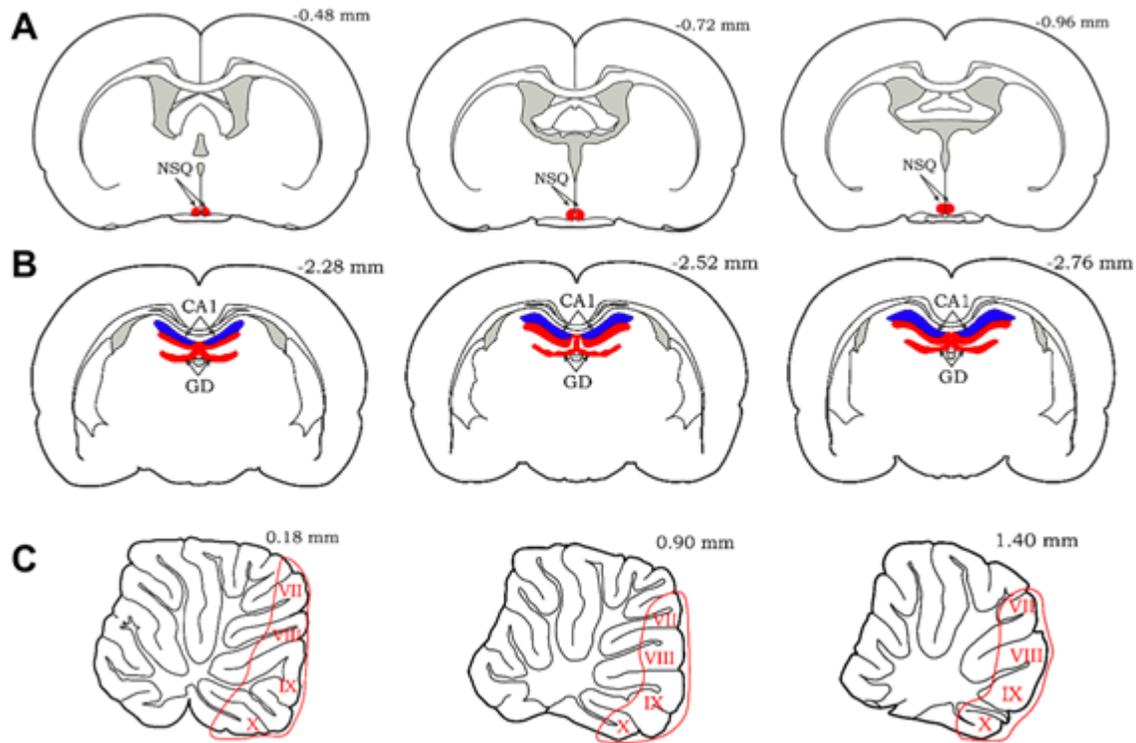


Figura 14. Imágenes representativas de las áreas evaluadas por inmunohistoquímica y tinción de Nissl. Se observan las coordenadas estereotáxicas del NSQ (A), del hipocampo (B) y del cerebelo (C) de acuerdo con el atlas de Paxinos & Watson (2007).

Tinción de Nissl

Los cortes cerebelares se montaron en portaobjetos gelatinizados para posteriormente realizar un lavado con agua destilada de los tejidos, sumergirlos en solución de violeta de cresilo durante 10 minutos, seguido de un tren de deshidratación con soluciones de etanol de concentración creciente (95 y 100%), se aclaran con xileno (Golden Bell, Zapopan, JAL, México) y se cubrieron con Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) para la visualización y toma de fotografías utilizando el microscopio Leica DM500.

Toma de fotografías y conteo celular

Para cada una de las secciones cerebrales analizadas se examinaron y capturaron bilateralmente utilizando un microscopio óptico (acoplado a una cámara) con un aumento de 20x utilizando el software ZEN 3.3 (blue edition) con exposición y luz automática para todas las secciones. Las células inmunorreactivas (exclusivamente de c-Fos) se contaron bilateralmente de las imágenes obtenidas del microscopio utilizando el proceso de conteo automático del software ImageJ v1.53e posterior a la delimitación del área adecuada utilizando plantillas tomadas del atlas de Paxinos & Watson (2007) .

En el caso de los cerebelos se utilizó un microscopio óptico (acoplado con una cámara) con un aumento de 10X utilizando el software LAS EZ (Leica) con exposición y luz automática para todas las secciones. Se hizo el conteo de las células de Purkinje de manera visual en cada uno de los lóbulos analizados (VII a X) mediante la herramienta multipunto del software ImageJ v1.53e.

Análisis morfológico de la microglía

Para el análisis morfológico de la microglía se realizó inmunohistoquímica para Iba1 y se consideraron las siguientes características:

- Ramificado: células en forma de bastón con procesos largos y delgados
- Hipertrófica: células ovoides con procesos cortos y gruesos
- Ameboide / Redondo: células redondas de tipo macrófago

Una vez clasificada la microglía del área de interés (región CA1 y giro dentado (GD) del hipocampo) se hizo un conteo de cada una de las clases para poder establecer el nivel de neuroinflamación de cada uno de los cerebros analizados.

Protocolo para descartar el efecto sincronizador de la manzana como vehículo

Para comprobar que el usar la manzana como vehículo no sincroniza a las ratas, se realizó un protocolo adicional en 6 ratas. Este consistió en analizar la actividad locomotora de los animales los cuales, después de un periodo basal, fueron puestas en un ciclo D/D (oscuridad durante las 24 horas del día) con el fin de evitar el principal sincronizador: la luz. Aleatoriamente se seleccionaron 2 grupos dentro de este protocolo:

- Grupo melatonina (3 ratas): Se les administró melatonina (5 mg/kg) utilizando como vehículo 3 g de manzana a las 19:00 h (ZT12, 19:00 h o inicio de oscuridad aparente dentro de un ciclo L/D normal). Posterior a 12 días de la administración, las ratas de este grupo dejaron de recibir el estímulo.
- Grupo vehículo (3 ratas): Se les administró 3 g de manzana como vehículo en el mismo punto temporal que el grupo anterior. Posterior a 12 días de administración, las ratas de este grupo dejaron de recibir la manzana.

El protocolo tuvo una duración de aproximadamente un mes para poder observar el comportamiento de las ratas. Los datos obtenidos fueron tratados de igual manera que en el subapartado [Análisis de actividad locomotora](#) previamente descrito.

Análisis estadístico

Todos los datos se representan como media \pm error estándar de la media (S.E.M.). Para cada uno de los datos se analiza la normalidad utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad con la prueba de Bartlett/Brown-Forsythe. Para la prueba de *grid walking* y campo abierto se utilizó un ANOVA de 2 vías para analizar entre sexo y tratamiento. Para la prueba de *negative geotaxis*, los datos de las hembras sufrieron una transformación logarítmica con el fin de superar las pruebas

de normalidad y homocedasticidad. Una vez realizadas las transformaciones, se realizó un MANOVA por sexo. En el caso de interacción social se realizó un ANOVA de 2 vías para observar las diferencias entre sexos y grupos. Para el análisis de la temperatura y de la actividad locomotora se hizo uso de un ANOVA de 3 factores para analizar diferencias entre grupos, sexo y fotoperiodo (día y noche). Para el conteo de las células de c-Fos en el NSQ y las células de Purkinje de los lóbulos del cerebelo se utilizó un ANOVA de 2 vías para discernir entre sexo y grupo. Para el análisis de la concentración sérica de melatonina en las crías se utilizó un ANOVA de 2 vías, mientras que en el caso de las madres fue un MANOVA. En todos los casos, el valor de α se estableció en 0.05. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism v8 y con SAS JMP Pro 14.3.

REFERENCIAS

- (AEMPS), A. E. de M. y P. S. (2018). *ÁCIDO VALPROICO: NUEVAS MEDIDAS PARA EVITAR LA EXPOSICIÓN DURANTE EL EMBARAZO*.
https://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosUsoHumano/seguridad/2018/docs/NI-MUH_FV_3-acido-valproico.pdf?x60265
- Abadi, S. H. M. H., Shirazi, A., Alizadeh, A. M., Changizi, V., Najafi, M., Khalighfard, S., & Nosrati, H. (2018). The Effect of Melatonin on Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Activity, and Malondialdehyde Levels in the Targeted and the Non-targeted Lung and Heart Tissues after Irradiation in Xenograft Mice Colon Cancer. *Current Molecular Pharmacology*, *11*(4), 326–335. <https://doi.org/10.2174/1874467211666180830150154>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5* (5°). American Psychiatric Association. <https://doi.org/https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Aschoff, J. (1981). A Survey on Biological Rhythms. In *Biological Rhythms* (pp. 3–10). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9_1
- Baio, J. (2014). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 Sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ*, *63*, 1–21.
- Baron-Cohen, S. (2002). The extreme male brain theory of autism. In *Trends in Cognitive Sciences* (Vol. 6, Issue 6, pp. 248–254). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1364-6613\(02\)01904-6](https://doi.org/10.1016/S1364-6613(02)01904-6)
- Baumgartner, T. R., & Elger, C. E. (2020). *Anti-Convulsant Agents: Valproic Acid*. 1–9.
- Baydas, G., Reiter, R. J., Nedzvetskii, V. S., Nerush, P. A., & Kirichenko, S. V.

- (2002). Altered glial fibrillary acidic protein content and its degradation in the hippocampus, cortex and cerebellum of rats exposed to constant light: reversal by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 33(3), 134–139. <https://doi.org/10.1034/J.1600-079X.2002.02110.X>
- Bejarano, I., Monllor, F., Marchena, A. M., Ortiz, A., Lozano, G., Jiménez, M. I., Gaspar, P., García, J. F., Pariente, J. A., Rodríguez, A. B., & Espino, J. (2014). Exogenous melatonin supplementation prevents oxidative stress-evoked DNA damage in human spermatozoa. *Journal of Pineal Research*, 57(3), 333–339. <https://doi.org/10.1111/jpi.12172>
- Belzung, C., Leman, S., Vourc'h, P., & Andres, C. (2005). Rodent models for autism: A critical review. In *Drug Discovery Today: Disease Models* (Vol. 2, Issue 2, pp. 93–101). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2005.05.004>
- Borjigin, J., Samantha Zhang, L., & Calinescu, A. A. (2012). Circadian regulation of pineal gland rhythmicity. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 349, Issue 1, pp. 13–19). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.009>
- Bourgeron, T. (2007). The possible interplay of synaptic and clock genes in autism spectrum disorders. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72, 645–654. <https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.020>
- Braam, W., Ehrhart, F., Maas, A. P. H. M., Smits, M. G., & Curfs, L. (2018). Low maternal melatonin level increases autism spectrum disorder risk in children. *Research in Developmental Disabilities*, 82(October 2017), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2018.02.017>
- Bubenik, G. A. (2002). Gastrointestinal melatonin: Localization, function, and clinical relevance. In *Digestive Diseases and Sciences* (Vol. 47, Issue 10, pp. 2336–2348). Dig Dis Sci. <https://doi.org/10.1023/A:1020107915919>

- Butler, M. G., Rafi, S. K., & Manzardo, A. M. (2015). High-resolution chromosome ideogram representation of currently recognized genes for autism spectrum disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(3), 6464–6495. <https://doi.org/10.3390/ijms16036464>
- Calvo, J., & Boya, J. (1981). Embryonic development of the rat pineal gland. *The Anatomical Record*, *200*(4), 491–500. <https://doi.org/10.1002/ar.1092000412>
- Carrillo-Vico, A., Calvo, J. R., Abreu, P., Lardone, P. J., García-Mauriño, S., Reiter, R. J., & Guerrero, J. M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *18*(3), 537–539. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0694fje>
- Champier, J., Claustrat, B., Besançon, R., Eymin, C., Killer, C., Jouvét, A., Chamba, G., & Fèvre-Montange, M. (1997). Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-o-methyl- transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sciences*, *60*(24), 2191–2197. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)00234-8)
- Christianson, A. L., Chester, N., & Kromberg, J. G. R. (1994). Fetal Valproate Syndrome: Clinical and Neuro-developmental Features in Two Sibling Pairs. *Developmental Medicine & Child Neurology*, *36*(4), 361–369. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.1994.tb11858.x>
- Courchesne, E., Chisum, H., & Townsend, J. (1994). Neural activity-dependent brain changes in development: Implications for psychopathology. *Development and Psychopathology*, *6*(4), 697–722. <https://doi.org/10.1017/S0954579400004740>
- Dai, Y. C., Zhang, H. F., Schön, M., Böckers, T. M., Han, S. P., Han, J. S., & Zhang, R. (2018). Neonatal oxytocin treatment ameliorates autistic-like behaviors and

- oxytocin deficiency in valproic acid-induced rat model of autism. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(October), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00355>
- Discapacidad, C. N. para el D. y la I. de las P. con. (2019). *Día Mundial de Concienciación sobre el Autismo.2019*.
<https://www.gob.mx/conadis/es/articulos/dia-mundial-de-concienciacion-sobre-el-autismo-2019?idiom=es>
- Dubocovich, M. L., Yun, K., Al-Ghoul, W. M., Benloucif, S., & Masana, M. I. (1998). Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *The FASEB Journal*, 12(12), 1211–1220.
<https://doi.org/10.1096/FASEBJ.12.12.1211>
- Duffy, J. F., & Czeisler, C. A. (2009). Effect of Light on Human Circadian Physiology. In *Sleep Medicine Clinics* (Vol. 4, Issue 2, pp. 165–177). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2009.01.004>
- El-Sherif, Y., Tesoriero, J., Hogan, M. V., & Wieraszko, A. (2003). Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 72(4), 454–460. <https://doi.org/10.1002/jnr.10605>
- Fatemi, S. H., Halt, A. R., Realmuto, G., Earle, J., Kist, D. A., Thuras, P., & Metz, A. (2002). Purkinje cell size is reduced in cerebellum of patients with autism. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22(2), 171–175.
<https://doi.org/10.1023/A:1019861721160>
- Frye, R. E., & Rossignol, D. A. (2016). Identification and Treatment of Pathophysiological Comorbidities of Autism Spectrum Disorder to Achieve Optimal Outcomes. *Clinical Medicine Insights: Pediatrics*, 10, CMPed.S38337.
<https://doi.org/10.4137/cmped.s38337>

- Gagnon, K., & Godbout, R. (2018). Melatonin and Comorbidities in Children with Autism Spectrum Disorder. *Current Developmental Disorders Reports*, 5(3), 197–206. <https://doi.org/10.1007/s40474-018-0147-0>
- Gesundheit, B., Rosenzweig, J. P., Naor, D., Lerer, B., Zachor, D. A., Procházka, V., Melamed, M., Kristt, D. A., Steinberg, A., Shulman, C., Hwang, P., Koren, G., Walfisch, A., Passweg, J. R., Snowden, J. A., Tamouza, R., Leboyer, M., Farge-Bancel, D., & Ashwood, P. (2013). Immunological and autoimmune considerations of Autism Spectrum Disorders. *Journal of Autoimmunity*, 44, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.05.005>
- Gockley, J., Willsey, A. J., Dong, S., Dougherty, J. D., Constantino, J. N., & Sanders, S. J. (2015). The female protective effect in autism spectrum disorder is not mediated by a single genetic locus. *Molecular Autism*, 6(25). <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0014-3>
- Golombek, D. (2002). Introducción: la máquina del tiempo. In D. Golombek (Ed.), *Cronobiología Humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad* (pp. 19–29). Universidad Nacional de Quilmes Ediciones.
- González-González, G., & Alvarez-Uria, M. (1984). *La glándula pineal de los mamíferos* (Primera). Universidad de Oviedo.
- Graciarena, M., Depino, A. M., & Pitossi, F. J. (2010). Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGF β 1 downregulation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(8), 1301–1309. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.06.005>
- Guadarrama-Ortiz, P., Ramírez-Aguilar, R., Madrid-Sánchez, A., Castillo-Rangel, C., Carrasco-Alcántara, D., & Aguilar-Roblero, R. (2014). Controladores del tiempo y el envejecimiento: Núcleo supraquiasmático y glándula pineal.

International Journal of Morphology, 32(2), 409–414.
<https://doi.org/10.4067/S0717-95022014000200004>

Guidotti, A., Auta, J., Chen, Y., Davis, J. M., Dong, E., Gavin, D. P., Grayson, D. R., Matrisciano, F., Pinna, G., Satta, R., Sharma, R. P., Tremolizzo, L., & Tueting, P. (2011). Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology*, 60(7–8), 1007–1016.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.10.021>

Hannibal, J. (2002). Neurotransmitters of the retino-hypothalamic tract. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 309, Issue 1, pp. 73–88). Springer.
<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0574-3>

Holt, R., & Monaco, A. P. (2011). Links between genetics and pathophysiology in the autism spectrum disorders. In *EMBO Molecular Medicine* (Vol. 3, Issue 8, pp. 438–450). EMBO Mol Med. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100157>

Ibañez-Sandoval, D. N. (2016). *Alteraciones en el sistema colinérgico del estriado en un modelo de autismo en rata*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).

Ito, M. (1972). Cerebellar Control of the Vestibular Neurones: Physiology and Pharmacology. *Progress in Brain Research*, 37(C), 377–390.
[https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)63914-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)63914-X)

Jin, X., von Gall, C., Pieschl, R. L., Gribkoff, V. K., Stehle, J. H., Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2003). Targeted Disruption of the Mouse Mel 1b Melatonin Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, 23(3), 1054–1060.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MCB.23.3.1054-1060.2003>

Jin, Y., Choi, J., Won, J., & Hong, Y. (2018). The relationship between autism spectrum disorder and melatonin during fetal development. *Molecules*, 23(1), 1–

9. <https://doi.org/10.3390/molecules23010198>

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2013). *Principles of neural science* (A. Sydor & H. Lebowitz (eds.); 5th ed.). McGraw-Hill.

Karasek, M., & Winczyk, K. (2006). Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol*, *57*(5), 19–39.

Kazlauskas, N., Campolongo, M., Lucchina, L., Zappala, C., & Depino, A. M. (2016). Postnatal behavioral and inflammatory alterations in female pups prenatally exposed to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, *72*, 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.06.001>

Kazlauskas, N., Seiffe, A., Campolongo, M., Zappala, C., & Depino, A. M. (2019). Sex-specific effects of prenatal valproic acid exposure on sociability and neuroinflammation: Relevance for susceptibility and resilience in autism. *Psychoneuroendocrinology*, *110*(September). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104441>

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., Yang, S. Il, Cheong, J. H., Shin, C. Y., & Ko, K. H. (2011). The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. *Toxicology Letters*, *201*(2), 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.018>

Lai, M. C., Baron-Cohen, S., & Buxbaum, J. D. (2015). Understanding autism in the light of sex/gender. *Molecular Autism*, *6*(24). <https://doi.org/10.1186/s13229->

- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. In *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 80, Issue 10, p. 2587). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ja01543a060>
- Li, X., Chauhan, A., Sheikh, A. M., Patil, S., Chauhan, V., Li, X. M., Ji, L., Brown, T., & Malik, M. (2009). Elevated immune response in the brain of autistic patients. *Journal of Neuroimmunology*, *207*(1–2), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.002>
- Li, X., Zou, H., & Brown, W. T. (2012). Genes associated with autism spectrum disorder. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 88, Issue 6, pp. 543–552). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.05.017>
- Loomes, R., Hull, L., & Mandy, W. P. L. (2017). What Is the Male-to-Female Ratio in Autism Spectrum Disorder? A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* (Vol. 56, Issue 6, pp. 466–474). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jaac.2017.03.013>
- Mabunga, D. F. N., Gonzales, E. L. T., Kim, J., Kim, K. C., & Shin, C. Y. (2015). Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. *Experimental Neurobiology*, *24*(4), 285–300. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
- Maenner, M. J., Shaw, K. A., Bakian, A. V., Bilder, D. A., Durkin, M. S., Esler, A., Furnier, S. M., Hallas, L., Hall-Lande, J., Hudson, A., Hughes, M. M., Patrick, M., Pierce, K., Poynter, J. N., Salinas, A., Shenouda, J., Vehorn, A., Warren, Z., Constantino, J. N., ... Cogswell, M. E. (2021). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018.

MMWR. Surveillance Summaries, 70(11), 1–16.
<https://doi.org/10.15585/MMWR.SS7011A1>

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>

Markus, R. M., & Cristiane, L. (2002). La glándula pineal y la melatonina. In D. Golombek (Ed.), *Cronobiología Humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad* (pp. 159–170). Universidad Nacional de Quilmes Ediciones.

Martínez-Tapia, R. J., Estrada-Rojo, F., Hernández-Chávez, A. A., Barajas-Martínez, A., Islas Escoto, S., Navarro, L., & Chavarría, A. (2018). Neuroinflamación: el ying-yang de la neuroinmunología. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 61(5), 44–53.

McCarthy, R., Jungheim, E. S., Fay, J. C., Bates, K., Herzog, E. D., & England, S. K. (2019). Riding the Rhythm of Melatonin Through Pregnancy to Deliver on Time. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 10, p. 616). Frontiers.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00616>

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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026077>

Melke, J., Goubran Botros, H., Chaste, P., Betancur, C., Nygren, G., Anckarsäter, H., Rastam, M., Ståhlberg, O., Gillberg, I. C., Delorme, R., Chabane, N., Mouren-Simeoni, M. C., Fauchereau, F., Durand, C. M., Chevalier, F., Drouot, X., Collet, C., Launay, J. M., Leboyer, M., ... Van Maldergem, L. (2008). Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Molecular*

Psychiatry, 13(1), 90–98. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4002016>

Menegola, E., Broccia, M. L., Nau, H., Prati, M., Ricolfi, R., & Giavini, E. (1996). Teratogenic effects of sodium valproate in mice and rats at midgestation and at term. *Teratog Carcinog Mutagen*, 16(2), 97–108. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6866\(1996\)16:2<97::AID-TCM4>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6866(1996)16:2<97::AID-TCM4>3.0.CO;2-A)

Molad, M., Ashkenazi, L., Gover, A., Lavie-Nevo, K., Zaltsberg-Barak, T., Shaked-Mishan, P., Soloveichik, M., Kessel, I., Rotschild, A., & Etzioni, T. (2019). Melatonin stability in human milk. *Breastfeeding Medicine*, 14(9), 680–682. <https://doi.org/10.1089/bfm.2019.0088>

Moldrich, R. X., Leanage, G., She, D., Dolan-Evans, E., Nelson, M., Reza, N., & Reutens, D. C. (2013). Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behavioural Brain Research*, 257, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.09.049>

Moore, R. Y. (1991). The suprachiasmatic nucleus and the circadian timing system. In D. C. Klein, R. Y. Moore, & S. M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock* (pp. 13–15). Oxford University Press.

Moore, R. Y., & Leak, R. K. (2001). Suprachiasmatic nucleus. In J. S. Takahashi, F. W. Turek, R. Y. Moore, & N. T. Adler (Eds.), *Handbook of Behavioral Neurobiology. Volume 12: Circadian Clocks* (First, pp. 141–171). Springer Science and Business Media New York.

Nicolini, C., & Fahnstock, M. (2018). The valproic acid-induced rodent model of autism. *Experimental Neurology*, 299, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017>

Noguera, A. D. (2002). Métodos de análisis de los ritmos biológicos. In D. Golombek

(Ed.), *Cronobiología Humana: Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad* (pp. 36–37). Universidad Nacional de Quilmes Ediciones.

Olde Loohuis, N. F. M., Martens, G. J. M., van Bokhoven, H., Kaplan, B. B., Homberg, J. R., & Aschrafi, A. (2017). Altered expression of circadian rhythm and extracellular matrix genes in the medial prefrontal cortex of a valproic acid rat model of autism. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *77*, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.009>

Olexová, L., Štefánik, P., & Kršková, L. (2016). Increased anxiety-like behaviour and altered GABAergic system in the amygdala and cerebellum of VPA rats — An animal model of autism. *Neuroscience Letters*, *629*, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.06.035>

Ornoy, A. (2009). Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? In *Reproductive Toxicology* (Vol. 28, Issue 1, pp. 1–10). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.014>

Ozonoff, S., Young, G. S., Goldring, S., Greiss-Hess, L., Herrera, A. M., Steele, J., Macari, S., Hepburn, S., & Rogers, S. J. (2008). Gross motor development, movement abnormalities, and early identification of autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *38*(4), 644–656. <https://doi.org/10.1007/s10803-007-0430-0>

Pagan, C., Goubran-Botros, H., Delorme, R., Benabou, M., Lemièrre, N., Murray, K., Amsellem, F., Callebort, J., Chaste, P., Jamain, S., Fauchereau, F., Huguet, G., Maronde, E., Leboyer, M., Launay, J. M., & Bourgeron, T. (2017). Disruption of melatonin synthesis is associated with impaired 14-3-3 and miR-451 levels in patients with autism spectrum disorders. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02152-x>

- Page, J., & Boucher, J. (1998). Motor impairments in children with autistic disorder. *Child Language Teaching and Therapy*, *14*(3), 233–259. <https://doi.org/10.1177/026565909801400301>
- Palmen, S. J. M. C., Van Engeland, H., Hof, P. R., & Schmitz, C. (2004). Neuropathological findings in autism. In *Brain* (Vol. 127, Issue 12, pp. 2572–2583). Brain. <https://doi.org/10.1093/brain/awh287>
- Pan, M., Song, Y. L., Xu, J. M., & Gan, H. Z. (2006). Melatonin ameliorates nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats. *Journal of Pineal Research*, *41*(1), 79–84. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2006.00346.X>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (Sixth). New York: Academic Press.
- Petroff, O. A. C., Rothman, D. L., Behar, K. L., Hyder, F., & Mattson, R. H. (1999). Effects of valproate and other antiepileptic drugs on brain glutamate, glutamine, and GABA in patients with refractory complex partial seizures. *Seizure*, *8*(2), 120–127. <https://doi.org/10.1053/seiz.1999.0267>
- Pévet, P., Agez, L., Bothorel, B., Saboureau, M., Gauer, F., Laurent, V., & Masson-Pévet, M. (2006). Melatonin in the multi-oscillatory mammalian circadian world. *Chronobiology International*, *23*(1–2), 39–51. <https://doi.org/10.1080/07420520500482074>
- Pfeffer, M., Rauch, A., Korf, H. W., & Von Gall, C. (2012). The endogenous melatonin (MT) signal facilitates reentrainment of the circadian system to light-induced phase advances by acting upon MT2 receptors. *Chronobiology International*, *29*(4), 415–429. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.667859>
- Pittendrigh, C. S. (1993). Temporal organization: Reflections of a Darwinian clock-watcher. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 55, pp. 17–54). Annual Reviews

4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA .
<https://doi.org/10.1146/annurev.ph.55.030193.000313>

- Poza, J. J., Pujol, M., Ortega-Albás, J. J., & Romero, O. (2018). Melatonin in sleep disorders. *Neurologia*. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.08.002>
- Puig-Lagunes, Á. A., Velazco-Cercas, E., Zamora-Bello, I., Beltrán-Parrazal, L., Morgado-Valle, C., Manzo, J., & López-Meraz, M. L. (2015). Neurociencia. *Revista Mexicana de Neurociencia*, *16*(6), 28–40.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., Mooney, R. D., Platt, M. L., & White, L. E. (2017). *Neuroscience* (6th ed.). Oxford University Press.
- Rajesh, V., Deepan, N., Anitha, V., Kalaiselvan, D., Jayaseelan, S., Sivakumar, P., & Ganesan, V. (2020). Heart malformation is an early response to valproic acid in developing zebrafish. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *393*(12), 2387–2409. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01949-4>
- Ritvo, E. R., Freeman, B. J., Scheibel, A. B., Duong, T., Robinson, H., & Guthrie, D. (1986). Lower Purkinje cell counts in the cerebella of four autistic subjects: Initial findings of the UCLA-NSAC autopsy research report. *American Journal of Psychiatry*, *143*(7), 862–866. <https://doi.org/10.1176/ajp.143.7.862>
- 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. *Journal of Comparative Neurology*, *370*(2), 247–261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19960624\)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960624)370:2<247::AID-CNE8>3.0.CO;2-2)
- Rosales, L. Y., Velasco, S. F., Ramírez, A. C., Sánchez, M. J., González, L. J., & Bitzer, O. K. (2015). Neuroinmunología del autismo. *Archivos de Neurociencias*,

20(1), 54–59.

- Rowe, S. A., & Kennaway, D. J. (2002). Melatonin in rat milk and the likelihood of its role in postnatal maternal entrainment of rhythms. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 282(3 51-3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1152/ajpregu.00228.2001>
- Rubin, R. D., Watson, P. D., Duff, M. C., & Cohen, N. J. (2014). The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Frontiers in Human Neuroscience*, 8(SEP), 742. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fnhum.2014.00742>
- Ruhela, R. K., Soni, S., Sarma, P., Prakash, A., & Medhi, B. (2019). Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism. *Annals of Neurosciences*, 26(1), 25–31. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.260106>
- Ruigrok, T. J. ., Sillitoe, R. V., & Voogd, J. (2015). Brainstem and Cerebellum. In G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System* (Fourth, pp. 137–139). Academic Press.
- Saghazadeh, A., Ataenia, B., Keynejad, K., Abdolalizadeh, A., Hirbod-Mobarakeh, A., & Rezaei, N. (2019). Anti-inflammatory cytokines in autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. In *Cytokine* (Vol. 123). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154740>
- Sanchez-Hidalgo, M., de la Lastra, C. A., Carrascosa-Salmoral, M. P., Naranjo, M. C., Gomez-Corvera, A., Caballero, B., & Guerrero, J. M. (2009). Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Experimental Gerontology*, 44(5), 328–334. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.002>
- Schaafsma, S. M., & Pfaff, D. W. (2014). Etiologies underlying sex differences in Autism Spectrum Disorders. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 35, Issue

3, pp. 255–271). Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.03.006>

Schneider, T., & Przewlocki, R. (2005). Behavioral alterations in rats prenatally to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology*, *30*(1), 80–89.
<https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>

Schneider, T., Roman, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Budziszewska, B., Schneider, K., & Przewlocki, R. (2008). Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(6), 728–740.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.02.011>

Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., Moriya, T., Shibata, S., Loros, J. J., Dunlap, J. C., & Okamura, H. (1997). Light-Induced Resetting of a Mammalian Circadian Clock Is Associated with Rapid Induction of the mPer1 Transcript. *Cell*, *91*(7), 1043–1053. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80494-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80494-8)

Simonneaux, V., & Ribelayga, C. (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: A review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 55, Issue 2, pp. 325–395). Pharmacol Rev.
<https://doi.org/10.1124/pr.55.2.2>

Sorensen, N. L., Maloney, S. K., Pillow, J. J., & Mark, P. J. (2020). Endocrine consequences of circadian rhythm disruption in early life. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, *11*, 65–71.
<https://doi.org/10.1016/j.coemr.2020.02.001>

Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D. P., Esquifino, A. I., Pandi Perumal,

- S. R., & Miller, S. C. (2005). Melatonin, immune function and aging. In *Immunity and Ageing* (Vol. 2, Issue 1, pp. 1–10). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-17>
- Sudarov, A. (2013). Defining the role of cerebellar purkinje cells in autism spectrum disorders. *Cerebellum*, *12*(6), 950–955. <https://doi.org/10.1007/s12311-013-0490-y>
- Teclerian-Mesbah, R., Ter Horst, G. J., Postema, F., Wortel, J., & Buijs, R. M. (1999). Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus - Pineal pathway. *Journal of Comparative Neurology*, *406*(2), 171–182. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990405\)406:2<171::AID-CNE3>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990405)406:2<171::AID-CNE3>3.0.CO;2-U)
- Tian, Y., Yabuki, Y., Moriguchi, S., Fukunaga, K., Mao, P. J., Hong, L. J., Lu, Y. M., Wang, R., Ahmed, M. M., Liao, M. H., Huang, J. Y., Zhang, R. T., Zhou, T. Y., Long, S., & Han, F. (2014). Melatonin reverses the decreases in hippocampal protein serine/threonine kinases observed in an animal model of autism. *Journal of Pineal Research*, *56*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/JPI.12081>
- Tordjman, S., Anderson, G. M., Bellissant, E., Botbol, M., Charbuy, H., Camus, F., Graignic, R., Kermarrec, S., Fougerou, C., Cohen, D., & Touitou, Y. (2012). Day and nighttime excretion of 6-sulphatoxymelatonin in adolescents and young adults with autistic disorder. *Psychoneuroendocrinology*, *37*(12), 1990–1997. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.04.013>
- Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., & Fougerou, C. (2017). Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*, *15*(3), 434–443. <https://doi.org/10.2174/1570159x14666161228122115>

- Tsujino, N., Nakatani, Y., Seki, Y., Nakasato, A., Nakamura, M., Sugawara, M., & Arita, H. (2007). Abnormality of circadian rhythm accompanied by an increase in frontal cortex serotonin in animal model of autism. *Neuroscience Research*, *57*(2), 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.10.018>
- Valdez Ramírez, P., Ramírez Tule, C., & García García, A. (2015). Introducción a la cronobiología. In M. Caba & P. Valdez (Eds.), *Ritmos Circadianos: de la célula al ser humano* (Primera, pp. 13–33). Universidad Veracruzana.
- Van den Pol, A. N. (1991). The Suprachiasmatic nucleus: morphological and cytochemical substrates for cellular interaction. In D. C. Klein, R. Y. Moore, & S. M. Reppert (Eds.), *Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock* (pp. 17–50). Oxford University Press.
- Velázquez, R. (2019). *Path recorder* (v0.1-alpha). <https://github.com/IncludePoetry/Lab-Coding/tree/master/Path-recorder>
- Velázquez, R. (2020). *Activity test counter* (v0.5.1). <https://github.com/rivelco/LC-Activity-test-counter>
- Voiculescu, S. E., Le Duc, D., Rosca, A. E., & Zagrean, A. M. (2019). The Pineal Gland Development and its Physiology in Fetus and Neonate. In *Maternal-Fetal and Neonatal Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management* (pp. 547–561). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814823-5.00031-3>
- Von Gall, C., Garabette, M. L., Kell, C. A., Frenzel, S., Dehghani, F., Schumm-Draeger, P. M., Weaver, D. R., Korf, H. W., Hastings, M. H., & Stehle, J. H. (2002). Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. *Nature Neuroscience*, *5*(3), 234–238. <https://doi.org/10.1038/nm806>

- Waly, N. E., & Hallworth, R. (2015). Circadian Pattern of Melatonin MT1 and MT2 Receptor Localization in the Rat Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Circadian Rhythms*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.5334/JCR.AB>
- Webb, S. J., Sparks, B. F., Friedman, S. D., Shaw, D. W. W., Giedd, J., Dawson, G., & Dager, S. R. (2009). Cerebellar vermal volumes and behavioral correlates in children with autism spectrum disorder. *Psychiatry Research - Neuroimaging*, 172(1), 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.psychresns.2008.06.001>
- World Health Organization. (2019). *International Classification of Diseases 11th Revision: ICD11*. <https://icd.who.int/en>
- Wu, Y. H., Ursinus, J., Zhou, J. N., Scheer, F. A. J. L., Ai-Min, B., Jockers, R., Van Heerikhuize, J., & Swaab, D. F. (2013). Alterations of melatonin receptors MT1 and MT2 in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus during depression. *Journal of Affective Disorders*, 148(2–3), 357–367. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2012.12.025>