



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE PSICOLOGÍA



Trabajo Fin De Grado En Psicología

Convocatoria Junio 2018

Ultrasonido en crías de ratas prenatalmente expuestas a ácido valproico y clorpirifós

Ultrasonic calls of rat pups prenatally exposed to acid valproic and chlorpyrifos

Ainhoa Sánchez Gil

Luis Fernando Sánchez Santed

Resumen

Los TEA se caracterizan por un déficit en la interacción social y la comunicación, así como por la ejecución de comportamientos repetitivos o estereotipados. Su heterogeneidad etiológica podría ser responsable de la heterogeneidad de la sintomatología dentro del espectro. Entre los factores medioambientales que aumentan el riesgo de desarrollar TEA se ha documentado la exposición prenatal a contaminantes. Los pesticidas organofosforados en general, y el CPF en particular, han sido fuertemente relacionados con el desarrollo del autismo, o al menos con la desregulación del comportamiento social. Con el objetivo de analizar este comportamiento en crías prenatalmente expuestas a CPF, se compararán los datos con un grupo control y un modelo animal TEA (AVP). Para ello, 25 hembras fueron expuestas durante el 12.5GD, y sus crías pasaron el procedimiento de inducción de USV mediante procedimiento de separación de la madre el día PND7. Al analizar los resultados se observó un efecto del tratamiento para los grupos CPF y AVP, que permiten aportar evidencias de una reducción de USV característica de sujetos con TEA. Dado que todos los grupos experimentales podían emitir todos los tipos de onda, dicha reducción no es debido al aparato fonador, sino mediada por causas motivacionales.

Abstract

ASD are characterized by deficits in social interaction and communication as well as repetitive behaviors or stereotypy. The etiological heterogeneity could be responsible for the symptomatology heterogeneity within the ASD spectrum. With the aim to characterize and compare the effects of CPF exposure, Among the environmental factors that increase the risk of developing ASD, prenatal exposure to contaminants has been documented. Organophosphorus pesticides in general, and CPF in particular, have been strongly related to the development of autism, or at least to the deregulation of social behavior. In order to analyze this behavior in pups prenatally exposed to CPF, the data will be compared with a control group and an animal model ASD (AVP). For this, 25 females were exposed during 12.5GD, and their offspring passed the isolated from dam protocol on PND7 day. When analyzing the results, a treatment effect was found for the CPF and AVP groups, which allows us to provide evidence of a reduction of USV characteristic of ASD. All experimental groups emit all types of wave, so the reduction is not due to the phonetic device, it can be mediated by motivational causes.

Palabras clave: Ultrasonido, USV, ratas, crías, vocalizaciones, ácido valproico, clorpirifós, prenatal, espectrograma, autismo, modelos animales.

Índice

Resumen.....	2
Introducción	4
Método	7
Muestra	7
Procedimiento	8
Análisis estadístico.....	11
Resultados	12
Discusión y conclusiones	17
Referencias.....	20

El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Desórdenes Mentales (DSM) en su última edición (DSM-V) (2013), caracteriza al autismo por sus deficiencias persistentes en la interacción social y la comunicación en diferentes contextos, y los patrones repetitivos o restrictivos del comportamiento. Estos síntomas se suelen acompañar por otros comórbidos tales como epilepsia, hiperactividad, déficit de atención, retraso mental, problemas de sueño, problemas gastrointestinales e hipo o hiper sensoriales, pudiendo a su vez variar el nivel de gravedad de estos síntomas (Landrigan, 2010; Mabunga, Gonzales, Kim, Kim & Shin, 2015). Debido a esta heterogeneidad sintomática, se ha propuesto el término Trastornos relacionados con el Espectro Autista (TEA) o Autism Spectrum Disorders (ASD) en inglés, donde quedan englobados algunos trastornos como el Asperger y los trastornos del desarrollo no especificados del DSM-IV-TR (2002) (Landrigan, 2010; Villegas & Sánchez, 2014).

En la actualidad es fácil encontrar numerosos estudios sobre el aumento en la prevalencia de este conjunto de trastornos (Federación Autismo Andalucía, s.f.; Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators & Centers for Disease Control and Prevention, 2014; Villegas & Sánchez, 2014; Mabunga et al., 2015; Canals, Hernández-Martínez, Morales-Hidalgo, Roigé-Castellví & Voltas, 2018), que hablan de un incremento global que ha llegado a multiplicarse por treinta desde los primeros estudios epidemiológicos siendo, en la Europa de aquel momento, de uno de cada 2.500 niños (Federación Autismo Andalucía, s.f.; Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators & CDC, 2014). Un estudio reciente con niños españoles afirma de una prevalencia de un 1.55% en preescolar y un 1% en niños con edad escolar (Canals et al., 2018). Aunque existen también quienes se plantean hasta dónde estos datos reflejan un aumento real en la prevalencia del espectro y no una mejor evaluación con respecto a la de los años sesenta-setenta (Federación Autismo Andalucía, s.f.; Gillberg & Wing, 1999; Canals et al., 2018).

Sin embargo, a pesar del incremento en la prevalencia y la reformulación del método evaluativo, los trastornos relacionados con el espectro autista siguen teniendo un origen poco conocido. Si bien es cierto que hay evidencias que apuntan a una influencia poligenética, esta no refleja la totalidad de los casos. Ciertos estudios con gemelos monocigóticos y dicigóticos afirman de una concordancia del 66%, y de hasta un 70% en gemelos monocigóticos, dejando el resto a posibles variables ambientales (Folstein & Rosen-Sheidley, 2001; Landrigan, 2010; De Felice, Scattoni, Ricceri, & Calamandrei, 2015; Mabunga et al., 2015). Entre los factores medioambientales que aumentan el riesgo de desarrollar TEA se han documentado las

infecciones víricas durante el embarazo, el nacer prematuro o la exposición prenatal a contaminantes (De Felice et al., 2015).

Dado que los TEA se definen como una enfermedad multifactorial con este estudio queremos comprobar si ante una situación en la que no se produzcan cambios genéticos, las variables medioambientales son suficientes como para producir o agravar el perfil autista del animal, puesto que desde hace aproximadamente una década, el número de datos que apoyan la evidencia de la neurotoxicidad de los pesticidas organofosforados (OP) ha ido en aumento, centrándose con especial atención en el clorpirifós (CPF), por ser uno de los más ampliamente utilizados en todo el mundo (Levin, Addy, Nakajima, Christopher, Seidler & Slotkin, 2001; Venerosi, Ricceri, Scattoni & Calamandrei, 2009; Rauh et al., 2012; Venerosi et al., 2015). Este es un pesticida no persistente (Venerosi et al., 2009) con una vida media de 3 días (Eaton et al., 2008), cuya toxicidad fue documentada tras intoxicaciones agudas en adultos (Venerosi et al., 2009) por el “síndrome colinérgico”, conformado por aumento de la sudoración y la salivación, broncoconstricción, miosis, aumento de la motilidad gastrointestinal, diarrea, temblores, espasmos musculares, así como diversos efectos sobre el sistema nervioso central (mareos, inhibición de los centros espiratorios centrales, convulsiones, coma...) (Holmstedt, 1959; Lotti, 2010; Costa, 2018), pudiendo causar la muerte como resultado de una falla respiratoria (Costa, 2018). Por todo esto, muchos de los usos no agrícolas (control residencial de plagas) han sido eliminados en EEUU en 2001 y en EU en 2005. Sin embargo, la exposición a CPF de mujeres embarazadas, bebés, niños y toda la población en general continua presente principalmente debido a la dieta (Venerosi et al., 2015). Hecho a considerar en una provincia como Almería, cuyo principal motor económico es la agricultura.

En la literatura podemos encontrar diversos estudios epidemiológicos que han hallado efectos en la maduración neurobiológica de los niños tras la exposición prolongada a pesticidas organofosforados (Rosas & Eskenazi, 2008), entre dichos efectos se encuentran el retraso en el desarrollo cognitivo y el psicomotor (Rauh et al., 2006). Otros estudios hablan de una asociación significativa entre la exposición prenatal y cambios estructurales en el cerebro humano (Rauh et al., 2012), así como una relación positiva entre el TEA y la proximidad prenatal a OP en general y CPF en particular (Shelton et al., 2014; Venerosi et al., 2015).

Además, estudios con animales de laboratorio demostraron que los animales jóvenes son más sensibles que los adultos a la toxicidad colinérgica del CPF, e incluso, la exposición repetida a dosis subclínicas de CPF (<1ml/kg/día), pese a proteger a las crías contra la inhibición de la colinesterasa, sigue afectando en el desarrollo temprano del sistema nervioso, el cual podría seguir siendo más sensible a CPF que el sistema nervioso de bebés y niños. La

exposición perinatal a CPF afecta también a los niveles de oxitocina neuropéptido-hipotalámico (OXT) y a la vasopresina. Los neuropéptidos hipotalámicos actúan como llaves reguladoras de la ansiedad, agresión, así como varios aspectos del comportamiento social en mamíferos. Todo esto convierte a las embarazadas en una subpoblación potencialmente susceptible (Eaton et al, 2008; Venerosi et al., 2015).

Para poder comparar los resultados de este OP en uno de los hándicaps centrales del espectro: la sociabilidad y comunicación, utilizaremos un modelo animal ya validado. Belzung y colaboradores en su revisión sobre modelos animales de autismo (2005) diferenciaron entre cuatro tipos de modelos animales: modelos con anormalidades en los neuropéptidos del organismo, modelos que imitan marcas epigenéticas que aumentan el riesgo de autismo en humanos, modelos con lesiones neonatales en áreas del cerebro afectadas en individuos con autismo y modelos de enfermedades genéticas humanas asociadas con el autismo. En la actualidad, uno de los modelos más utilizados para estudiar el autismo bajo condiciones de factor de riesgo medioambiental en etapas perinatales es el ácido valproico o valproato (AVP) (Belzung et al., 2005; De Felice et al., 2015; Mabunga et al., 2015). El AVP es un medicamento usado en casos de epilepsia y cambios de humor, con el que hay que tener extrema precaución, y con especial atención durante periodos críticos como los embarazos, dado que se han hallado niños con síndrome de valproato fetal que muestran déficit social y estereotipia (Mabunga et al., 2015). Asimismo, Schneider et al. (2008) observaron, en ratas expuestas a ácido valproico el día 12.5 GD, comportamientos repetitivos y disminución de la conducta social, entre otros efectos a largo plazo.

Existe la dificultad de que en la mayoría de los casos TEA los signos y síntomas iniciales son evidentes al inicio del desarrollo, no ocurriendo así con los déficits sociales y los patrones de comportamiento, los cuales pueden no ser reconocidos como síntomas de TEA hasta que el niño no pueda cumplir con ciertas demandas sociales y/o educativas (Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators & CDC, 2014). Este hecho hace de especial importancia encontrar un método a través del cual poder evaluar el comportamiento social en los primeros estadios, a modo de predictor temprano de la enfermedad. Dado que los animales no presentan un sistema de lenguaje organizado como el nuestro, ha sido todo un reto encontrar un modo de evaluar la comunicación. Curiosamente, los roedores son ampliamente utilizados en el laboratorio debido a sus altos niveles de interacción social y exploración (Kas et al., 2014; Mabunga et al., 2015), de modo que los investigadores pudieron identificar como los roedores emitían ciertas vocalizaciones ultrasónicas (USV) cuando trataban de comunicarse. Las frecuencias de estas

llamadas varían en función de la edad, estado emocional y factores ambientales (Portfors, 2007; Venerosi et al., 2009; Mabunga et al., 2015). Así pues, los USV se han convertido tanto en uno de los pocos marcadores tempranos del desarrollo neuroconductual, como un modo para evaluar las respuestas emocionales tempranas en la vida. Por este motivo, está siendo muy frecuente el uso de USV en la evaluación de la sociabilidad en roedores y otros animales, así como el establecimiento del vínculo madre-cría, ya que incitan la atención y cuidado de la madre, así como su alteración vía tratamiento (Venerosi et al., 2009; De Felice et al., 2015; Mabunga et al., 2015).

Ciertos estudios en los que se analizaban los USV han encontrado evidencias de que el CPF reduce considerablemente el estrés responsable de la separación de la madre y las habilidades motoras, además de alteraciones en características similares al llanto infantil (duración de la llamada, los picos de frecuencia y la latencia de la primera llamada), apoyando la idea de ser un marcador para estudios preclínicos y potencial predictor de los efectos emocionales y sociales a largo plazo del CPF también reportadas en la adultez (Venerosi et al., 2009).

Dados los datos aportados, este grupo de investigación se propone el objetivo de comparar los efectos del CPF en la conducta social con un grupo control y un modelo animal del espectro autista en vigor hasta la fecha (AVP), mediante un análisis de ultrasonidos obtenidos tras un procedimiento de separación de la madre; permitiéndonos así, delimitar los umbrales superior e inferior de esta conducta y poder situar los efectos del CPF en ausencia de inhibición de la AChE. Tras las evidencias que se han ido relatando, se espera que el repertorio conductual del grupo clorpirifós se encuentre más próximo del grupo valproato que del grupo control, hecho que lo confirmaría como posible factor de riesgo y posible desencadenante de TEA.

Método

Muestra

Para llevar a cabo el experimento se dispuso de 25 ratas wistar hembra embarazadas, que habían sido apareadas con machos de la misma especie, y alojadas en cajas de policarbonato con un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad (luz de 14:00h a 02:00h) a una temperatura constante de 24°C, con comida y agua ad libitum. Llegado el momento se distribuyó a las madres en tres grupos experimentales según el tratamiento al que iban a ser asociadas: un grupo control de 8 sujetos, un grupo clorpirifós de otros 8 sujetos y un grupo ácido valproico de 9 sujetos experimentales. Finalmente se obtuvieron 210 crías, de las cuales

54 fueron utilizadas para este experimento, donde el 50% de los sujetos experimentales de cada condición fueron hembras y el otro 50% machos.

Todos los procedimientos llevados aquí a cabo fueron realizados de acuerdo con el Real Decreto español 1201/2005 sobre la protección de animales de experimentación y las Comunidades Europeas Directiva del Consejo (86/609 / CEE).

Procedimiento

Las crías fueron prenatalmente expuestas a dosis subclínicas de clorpirifós (1ml/kg) con vehículo DMSO, ácido valproico (400ml/kg) con vehículo salino o DMSO (1ml/kg) para el grupo control, mediante una inyección subcutánea a las madres en función del grupo experimental al que pertenecían. Esta operación se llevó a cabo los días 12.5 GD, 13.5 GD, 14.5 GD y 15.5 GD, a excepción del grupo perteneciente al ácido valproico, al cual solo se le expuso a dicho ácido el día 12.5GD, mientras que el resto de los días se le inyectó salino. Puesto que tan solo era necesario una exposición al ácido valproico para producir los efectos.








El día del nacimiento se denominó PND 0 y las crías fueron sexadas. A los siete días de su nacimiento (PND7) para favorecer la producción de vocalizaciones ultrasónicas se les administró el protocolo básico de aislamiento de Brunelli, Hofer, y Shair (2001) con una serie de variaciones. Para poder trabajar sin la agresividad de la madre, se preparó una caja de policarbonato de características similares a la que habitaban normalmente y se introdujo a las crías. Dicha caja contaba con una manta térmica cubierta de algodón con el aroma de la madre y procedente del nido, así como el serrín y algunas cacas extraídas de la caja originaria para evitar que notaran la falta de la madre. Entonces, y de modo individual, se introdujo con cuidado a cada cría en una caja atenuadora de sonido de madera de contrachapado de 80x60x70 cm forrada en su interior con un panel de poliestireno y otro de espuma de insonorización negra. Dentro de la caja a unos 15-20 cm del suelo colgaba un micrófono ultrasónico (Dodotronic Ultramic 250K), escogido por su uso en una investigación similar (Blazevic, Merkler, Persic & Hranilovic, 2017) e incluso ha sido usado con otras especies (Brizio & Buzzetti, 2014). Se grabó el sonido por un periodo de 5 minutos usando el software de SeaWave versión 2.0 (CIMBRA) con una frecuencia de muestreo de 250 kHz, en un formato de 16 bit. Al finalizar cada tanda de grabación la caja fue desinfectada.

Se llevó a cabo un ensayo piloto de forma satisfactoria con crías que posteriormente quedaron descartadas para no contaminar el experimento. Se omitieron las tomas de temperatura de las crías sugeridas por el protocolo, dado que esta se mantenía constante a unos 25°C durante toda la prueba gracias a la manta y el algodón, así como también se omitió el

pesaje y las pruebas de locomoción dada la escasa movilidad que presentaban a dicha edad. No obstante, se grabó a las ratas durante los cinco minutos que duraba este procedimiento y el día PND10 pasaron la prueba de locomoción propiamente dicha.

A la hora de realizar el análisis de las grabaciones, estas no recibieron ningún tratamiento, ya que se analizaron directamente en el software con el que fueron recogidas (SeaWave 2.0). Dichas grabaciones fueron divididas en periodos de un minuto y se procedió a medir distintos parámetros: número de llamadas totales, número de llamadas durante el primer minuto, número de llamadas durante un segundo minuto seleccionado aleatoriamente y distinto del primero, análisis de la forma de los USV, duración, frecuencia y amplitud de la onda. Sin embargo, dado que en este estudio nos centramos en la cantidad y la forma de las vocalizaciones, estos tres últimos datos se reservaron para futuros análisis.

El conteo y el análisis de la forma de las vocalizaciones se realizó manualmente, tras un entrenamiento en una clasificación de creación propia basada en diferentes clasificaciones de la literatura (Miczek & Vivian, 1993; Brudzynski, Kehoe & Callahan, 1999; Scattoni, Gandhi, Ricceri & Crawley, 2008; Gourdon & Wright, 2010).

Spectrograms	Name
	Short
	Flat
	Downward
	Upward
	U
	Inverted U
	Complex









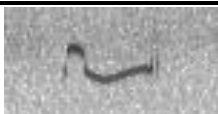





	Step up
	Step down
	Multi step
	Hyperbolic
	Exponential
	Logarithmic
	Elliptical
	N

Tabla 2: *Tipos de vocalizaciones propuestas por la literatura.*

New spectrograms	Name
	Cliff flat and pick (CFP)
	Tide and peak
	Halfpipe
	Peak
	Dune
	Omega


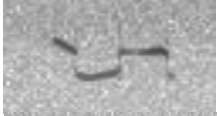






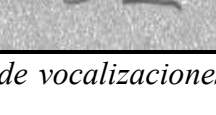
	Riverbed
	Zigzag
	Two steps
	Step flat up
	Seagull
	Snake
	Morse
	Seatower
	Frequency jumps

Tabla 2: *Tipos de vocalizaciones propuestas en este estudio para complementar a las de la tabla 1.*

Análisis estadístico

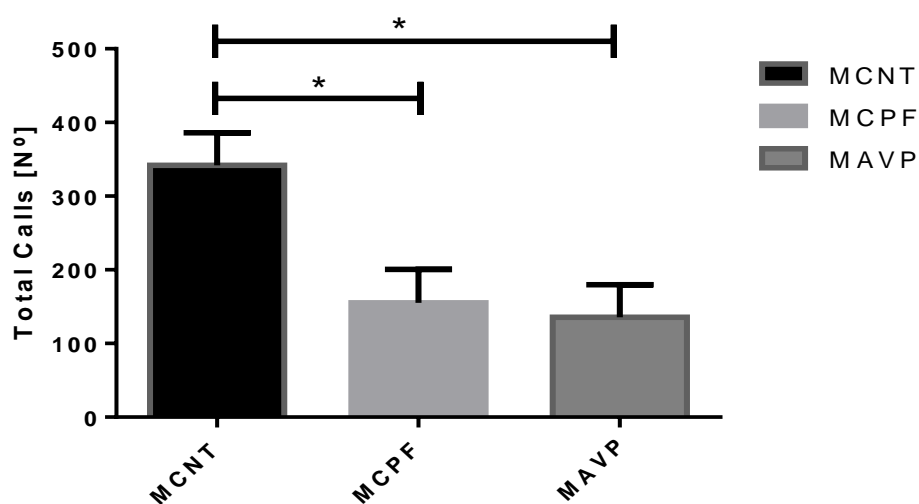
Para los análisis estadísticos se recurrió al software de IBM SPSS Statistics versión 24, a GRAPHPAD Prism versión 6.0 y a GRAPHPAD QuickCalcs.

Se procedió con un ANOVA de dos factores para las variables referidas a cantidades totales, tales como “número total de llamadas” o “número total de armónicos” en función del tratamiento y el sexo, y con un modelo ANOVA para medidas repetidas para todas aquellas variables referidas a los minutos, tales como “número de llamadas en el primer minuto” o “número de llamadas en el minuto aleatorio diferente del primero”, de nuevo en función del tratamiento y el sexo de los sujetos. Para analizar las pruebas post-hoc se recurrió tanto a la prueba significación de Tukey (HST) como a la de Bonferroni, siendo el nivel de significación establecido siempre 0.05.

Resultados

Realizamos una prueba de detección de outliers o valores atípicos gracias a GRAPHPAD QuickCalcs, encontrando y eliminando para la variable “Número total de llamadas” un outlier, para un nivel de significación estándar ($\alpha=0.05$) ($Z = 2.652$). Este paso se llevó a cabo para evitar que dicho valor alterase gravemente el estudio enmascarando los efectos del tratamiento, quedando finalmente una distribución tal de sujetos ($n=53$): 9 crías pertenecientes al grupo control, 8 crías pertenecientes al grupo clorpirifós y 9 crías pertenecientes al grupo del ácido valproico.

Para evaluar la capacidad de socialización y comunicación de las ratas, se realizó un conteo del número total de USV emitidos por cada cría durante los cinco minutos que duró el procedimiento. Para la variable número total de llamadas observamos un efecto significativo en relación al tratamiento $F(2, 47)=6.631$, $p=0.003$, pero no parecen encontrarse en relación al sexo $F(1,47)=1.253$, $p=0.269$ o a la interacción entre estas dos $F(2,47)=1.460$, $p=0.243$. Al realizar las pruebas post-hoc se encontró que las diferencias de tratamiento se hallaban entre los grupos control y clorpirifós (HSD Tukey $p=0.016$, Bonferroni $p=0.018$), así como entre los grupos control y ácido valproico (HSD Tukey $p=0.005$, Bonferroni $p=0.005$), encontrándonos para sendos casos un mayor número de llamadas en el grupo control. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos clorpirifós y ácido valproico (HSD Tukey $p=0.922$, Bonferroni $p=1$).



Gráfica 1: Número total de llamadas durante los cinco minutos del procedimiento. Existen diferencias significativas entre el grupo control y los grupos clorpirifós y valproato.

En las siguientes tablas (tabla 3, 4 y 5) se pueden observar otros datos significativos obtenidos en el análisis de datos de este estudio referentes a las variables totales, que por lo general vienen a corroborar la evidencia de una mayor producción de USV del grupo control con respecto a los otros dos, en este caso (tabla 3), aplicado a los distintos tipos de espectrogramas evaluados (detallados en las tablas 1 y 2).

	Control	Clorpirifós	Valproato
Flat	17.389 ± 2.860	7.556 ± 2.948	7.667 ± 2.860
Upward*	7.333 ± 1.292	2.632 ± 1.332	2.167 ± 1.292
N	1.056 ± 0.245	0.056 ± 0.252	0.389 ± 0.245
Halfpipe*	2 ± 0.432	0.583 ± 0.445	0.722 ± 0.432
Dune	5.389 ± 1.110	1.306 ± 1.114	3.500 ± 1.110
Seagull	1.778 ± 0.361	0.868 ± 0.372	0.000 ± 0.361
Seatower*	1 ± 0.289	3.469E-17 ± 0.298	0.056 ± 0.289

Tabla 3: *Otros datos significativos con respecto al tratamiento, obtenidos de las variables referidas al total de USV. Las variables señaladas con * no presentaron diferencias significativas en las pruebas post-hoc.*

Para las variables referidas a los tipos de onda “Flat”, “Halfpipe” y “Seatower”, se encontraron valores significativos: $F(2,47) 3.857, p=0.028$; $F(2,47) 3.231, p=0.048$ y $F(2,47) 3.725, p=0.032$, respectivamente. No obstante, al realizar las pruebas Post Hoc no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

En la tabla 4 las diferencias que podemos observar son referidas a como parecen ser los machos los que realizan más vocalizaciones.

	Machos	Hembras
Short	4.630 ± 0.844	2.042 ± 0.861
Inverted U	2.667 ± 0.522	0.898 ± 0.533

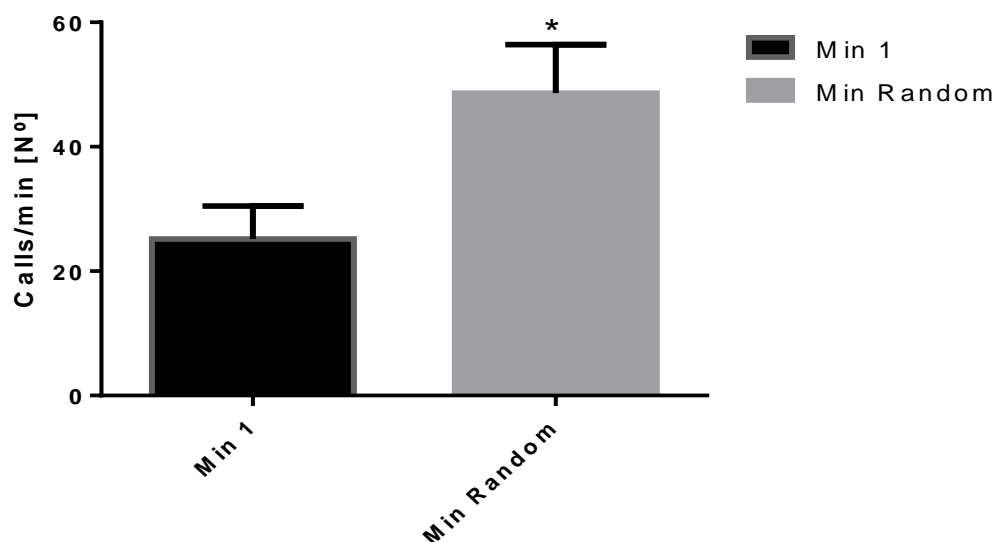
Tabla 4: *Otros datos significativos con respecto al sexo, obtenidos de las variables referidas al total de USV.*

En la tabla 5 se agrupan los datos de aquellas variables de las que se obtuvieron diferencias significativas en la interacción sexo-tratamiento. Dichas diferencias siguen en la línea de las evidencias anteriores, salvo en el caso de las ondas denominadas N por Brudzynski et al. (1999), en cuyo caso, las hembras del grupo control las que realizan significativamente un mayor número de USV ($p=0.005/p=0.006$).

		Control	Clorpirifós	Valproato
Downward	Machos	15.111 ± 4.792	20 ± 4.792	0.889 ± 4.792
	Hembras	13.111 ± 4.792	2.750 ± 5.083	10.778 ± 4.792
N	Machos	0.444 ± 0.346	0.111 ± 0.346	0.778 ± 0.346
	Hembras	1.667 ± 0.346	-1.110E-16 ± 0.367	1.110E-16 ± 0.346

Tabla 5: Otros datos significativos con respecto a la interacción sexo-tratamiento, obtenidos de las variables referidas al total de USV.

Para evaluar la latencia de la primera llamada se analizó para cada animal siempre el primer minuto en el procedimiento, así como un segundo minuto aleatorio diferente del primero, dentro de los 4 restantes de la grabación de la misma rata, encontrándose un efecto del tiempo. Existen diferencias significativas entre el primer minuto y el minuto aleatorio $F(1,47)=12.023$, $p=0.001$, siendo en este último donde más USV se hallaron ($p=0.001$).



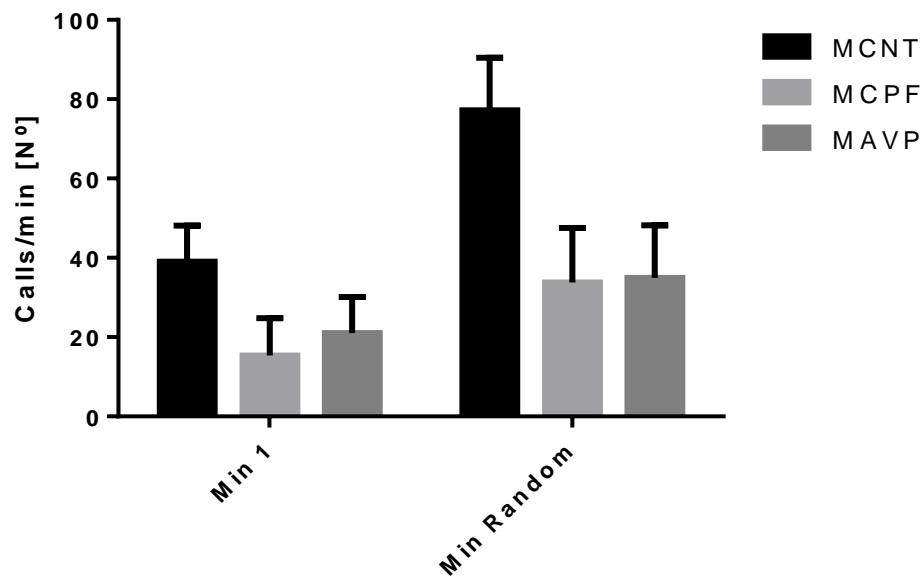
Gráfica 2: Número de llamadas realizadas a lo largo de los dos minutos durante los que se evaluaba el tipo de onda. Existen diferencias significativas entre el primer minuto con respecto del minuto aleatorio diferente del primero.

En la siguiente tabla (tabla 6) mostramos algunos datos significativos obtenidos en nuestros análisis, que apoyan la evidencia de que se producen mayor número de USV en el minuto aleatorio diferente del primero que en el primer minuto. En este caso, los datos se refieren a los tipos de ondas analizados (disponibles en las tablas 1 y 2).

	Minuto 1	Minuto Random
Flats	4.178 ± 1.030	6.711 ± 0.990
Upwards	0.861 ± 0.202	3.183 ± 0.624
U	0.595 ± 0.181	2.940 ± 0.696
Inverted U	0.558 ± 0.207	1.225 ± 0.276
Complex	1.449 ± 0.521	4.481 ± 0.936
Exponentials	0.354 ± 0.121	1.132 ± 0.273
Halfpipes	0.150 ± 0.057	0.951 ± 0.234
Dunes	1.204 ± 0.367	2.194 ± 0.425

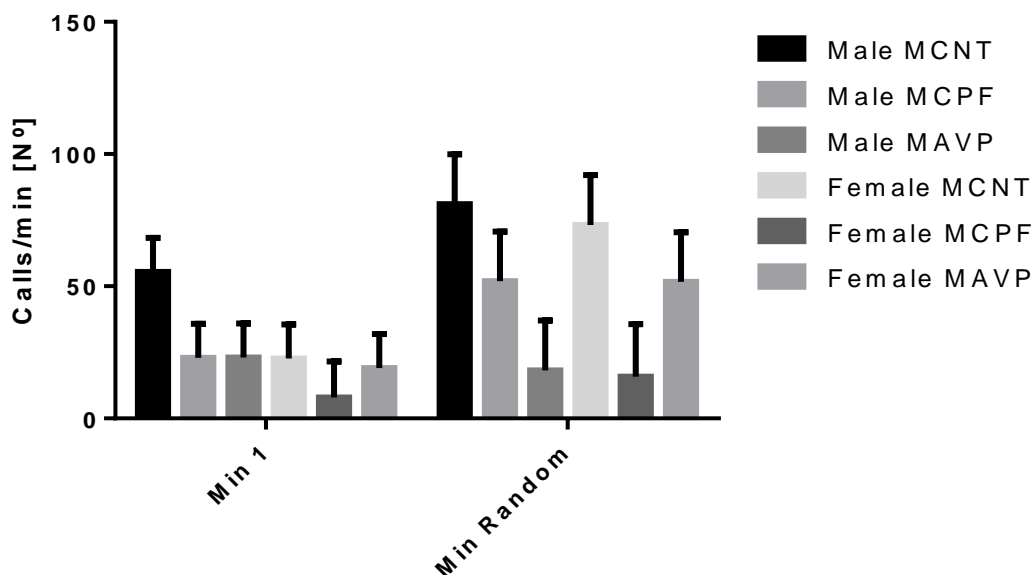
Tabla 6: *Algunos datos que aportan evidencias de que se producen mayor número de USV en el minuto aleatorio diferente del primero, que en el primero.*

No obstante, las diferencias entre estos dos minutos no se han encontrado en función de los distintos tratamientos ($F(2,47)=1.224$, $p=0.303$), como proclamaba la literatura (Venerosi, et al., 2009). Únicamente parece haberse encontrado efecto del tratamiento con relación al tiempo en el análisis de uno de los tipos de onda (Upward $F(1,47)=3.360$, $p=0.043$), donde el grupo control emitía un mayor porcentaje de USV en el minuto aleatorio que en el primer minuto, así como una mayor emisión de estos USV que el grupo ácido valproico durante su minuto aleatorio.



Gráfica 3: Número de llamadas de cada grupo a lo largo de los minutos evaluados. No se encontraron diferencias, pese a lo que parece indicar la gráfica.

Venerosi y colaboradores (2009) también afirmaban encontrar efectos diferentes al tratamiento en función del sexo del animal, evidencia que no hemos podido encontrar en ninguno de nuestros minutos ($F(2,47)=1.692$, $p=0.195$).



Gráfica 4: Número de llamadas a lo largo de los minutos evaluados, por cada grupo de tratamiento y sexo. No se encontraron diferencias, pese a lo que parece indicar la gráfica.

Algunas variables donde sí se han encontrado diferencias significativas en dicha interacción hacen referencia al tipo de onda encontrado durante los minutos analizados de la grabación: “Inverted U” $F(2,47)=4.695$, $p=0.014$, “Exponential” $F(2,47)=4.015$, $p=0.025$ y “Morse” $F(2,47)=4.186$, $p=0.021$.

Discusión y conclusiones

Los resultados del presente estudio nos indican que existe un efecto del tratamiento en cuanto al número total de USV. Dicho efecto puede observarse en la gráfica número 1, donde el grupo control ejerce de límite superior, con una media de 342 USV, y el grupo AVP de límite inferior, con una media de 136 USV. Mientras tanto, el grupo CPF, aunque se sitúa entre ambos, su media de 136 vocalizaciones hace que se sitúe muy próximo al grupo AVP, tanto que estadísticamente no existen diferencias entre estos. Este hecho, no solo nos permite cumplir nuestro objetivo de proporcionar unos valores característicos de las distintas poblaciones, sino que también nos permite confirmar la hipótesis propuesta a raíz de la literatura consultada.

No obstante, nuestro proyecto de investigación únicamente evalúa uno de los ámbitos deficitarios de los TEA, por lo que resulta muy ambicioso y arriesgado afirmar sin datos sobre otros dominios neurobiológicos que definen el espectro, que el CPF es un factor de riesgo y/o un modelo animal de autismo. Por lo que solo podemos hablar de que nuestros datos son un aporte de más evidencias de que la exposición prenatal a CPF produce un deterioro en la conducta social y capacidad comunicativa de las crías, de forma muy semejante al de otros modelos animales de autismo (AVP), un factor determinante en el TEA.

Resulta interesante que en la mayoría de los protocolos de emisión de USV por separación de la madre resaltan la importancia de la respuesta inicial a esta condición, siendo en ese momento en el que se toman las mediciones. Pese a ello, resulta el momento en el que menor número de USV hemos hallado. Mientras intentábamos comprobar si existían diferencias entre grupos en la latencia de respuesta mediante el número de vocalizaciones a través de los minutos analizados, todos realizaban un mayor número de USV en los minutos posteriores al primero. Al contrario de lo observado en otras investigaciones, donde el CPF parecía ser el grupo con mayor latencia (Venerosi et al., 2009), no hemos encontrado diferencias entre los grupos experimentales. Posiblemente encontremos datos más semejantes a otros estudios si refinamos o utilizamos el mismo proceso evaluativo a través del cual medir este componente.

El siguiente paso era comparar el número de vocalizaciones de cada grupo durante los minutos analizados, pero no se hallaron diferencias significativas. No obstante, parece existir

cierta tendencia que apoyaría la evidencia que sustenta nuestra hipótesis, es decir, que el CPF induce síntomas relacionados con un déficit de interacción social y comunicación, generalmente hallados en TEA. Que no se hayan encontrado diferencias, a pesar de la cantidad de datos en la literatura que afirma lo contrario, puede ser debido a dos variables no consideradas en un principio, y que finalmente han podido ensuciar los datos. La primera variable habría intervenido en el primer minuto y sería, la ya mencionada, latencia de la primera respuesta, séase, han existido tan pocas emisiones en todos los grupos al comienzo de la grabación que no es apreciable la posible reducción de este comportamiento en alguno de ellos. La segunda variable, habría intervenido en el segundo minuto analizado: el minuto aleatorio. Se decidió aleatorizar el segundo minuto que iba a ser analizado para asegurarnos de poder hacer una plantilla consistente, que contase con todos los tipos de onda intentando evitar problemas como que pasado cierto tiempo dejase de emitir cierto tipo de ondas o que según permanecía la rata en el habitáculo, evolucionara la propia onda. No obstante, y aquí es donde han interactuado ambas variables, muchos de esos minutos han podido quedar cerca del primero, es decir, ambos minutos en los que una determinada rata ha sido analizada, han podido estar expuestos al efecto de latencia, mientras que en otras crías no ha sucedido así.

En cuanto al tipo de onda, todas las condiciones emiten todas las categorías de llamadas propuestas en el método, por lo que la reducción en la cantidad de emisiones de USV no se debe a una imposibilidad de producción del aparato fonador, sino que posiblemente sea debido a las condiciones motivacionales o el valor de los distintos estresores para el roedor. Sea como fuere, es susceptible de ser evaluado en otros estudios.

Para futuras investigaciones sería interesante tener la oportunidad de ampliar el número de sujetos, de tal modo que pueda aportar una mayor fiabilidad a los datos obtenidos, así como incorporar nuevos análisis a este procedimiento que permitan comprobar si en las vocalizaciones de las crías de modelos autistas existe o no cierta estereotipia, pudiendo evaluar con una sola prueba los dos síntomas centrales de los trastornos relacionados con el espectro. En este sentido, podría ser una buena opción el reanalizar las grabaciones para comprobar el tiempo real que transcurre hasta la primera emisión de USV de la rata, o lo que es lo mismo, la latencia de la primera llamada. Puestos en volver a visionar las grabaciones, dado que ya se ha propuesto una plantilla que permita clasificar las distintas formas de las ondas, resultará más útil analizar siempre los mismos dos minutos (por ejemplo, primer y último minuto de la grabación), no obstante, no debe caer en el olvido la contabilización del número de llamadas por minuto en el tramo que quedaría sin evaluar, pues permitiría conocer la evolución de los USV y comprobar si existen diferencias entre estos grupos e, incluso, entre sexos.

Hablando de posibles intervenciones en estudios similares y de mejoras de esta investigación, debemos mencionar el análisis de los datos que, como habíamos comentado, hemos reservado para su posterior uso: la duración de cada USV, su frecuencia y la amplitud de la onda. Estos datos van a contribuir a establecer los parámetros medios de cada tipo de llamada propuestos en esta investigación según tratamiento y/o sexo, permitiéndonos profundizar más y conocer si existen diferencias entre estos que hasta ahora desconocíamos.

Referencias

- American Psychiatric Association (APA), (2002). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-IV-TR*. Barcelona: Masson
- American Psychiatric Association (APA), (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. American Psychiatric Association, Arlington, VA.
- Belzung C, Leman S, Vourch P, Andres C (2005) Rodent models for autism: a critical review. *x* 2:93-101.
- Blazevic, S., Merkler, M., Persic, D. & Hranilovic, D., (2017). Chornic postnatal monoamineoxidase inhibition affects affiliative behavior in rat pups. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 153, 50-58.
- Brizio, C. & Buzzetti, F.M., (2014). Ultrasound recordings of some Orthoptera from Sardinia (Italy). *Biodiversity Journal*, 5 (1):25-38.
- Brudzynski, S., Kehoe, P. & Callahan, M. (1999). Sonographic structure of isolation-induced ultrasonic calls of rat pups. *Developmental Psychobiology*.
- Brunelli, S.A., Hofer, M.A. & Shair, H.N., (2001). Ultrasonic vocalizations in rat and mouse pups. *Current protocols in neuroscience*, 8.14. 1-8.14.16.
- Canals, J., Hernández-Martínez, C., Morales-Hidalgo, P., Roigé-Castellví, J. & Voltas, N., (2018). Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among Spanish school-age children. *Journal of Autism and Developmental Disorders*. <https://doi.org/10.1007/s10803-018-3581-2>
- Costa, L.G., (2018). Organophosphorus Compounds at 80: Some Old and New Issues, *Toxicological Sciences*, Volume 162, Issue 1, 1 March 2018, Pages 24–35, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx266>
- De Felice, A., Scattoni, M.L., Ricceri, L. & Calamandrei, G., (2015) Prenatal Exposure to a Common Organophosphate Insecticide Delays Motor Development in a Mouse Model of Idiopathic Autism. *PLoS ONE* 10(3): e0121663. doi:10.1371/journal.pone.0121663
- Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (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.
- Eaton, D.L., Daroff, R.B., Autrup, H., Bridges, J., Buffer, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R. & Spencer, P.S., (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and

- neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*, 38:sup2, 1-125.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408440802272158>
- Federación Autismo Andalucía, (s.f.). Los TEA: Epidemiología. Federación Andaluza de Padres con Hijos con Trastornos del Espectro Autista. Recuperado el 29 de mayo de 2018, de <http://www.autismoandalucia.org/index.php/los-tea/epidemiologia>
- Folstein, S.E., Rosen-Sheidley, B., (2001). Genetics of autism: complex etiology for a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Genetic*; 2:943–955.
- Gillberg C, Wing L., (1999). Autism: not an extremely rare disorder. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 1999;99:399–406.
- Gourdon, J.C. & Wright, J.M., (2010a). Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology*, 211:1 13.
- Holmstedt, B. (1959). Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacology. Rev.* 11, 5676–5688.
- Kas MJ, Glennon JC, Buitelaar J, Ey E, Biemans B, Crawley J, Ring RH, Lajonchere C, Esclassan F, Talpos J, Noldus LP, Burbach JP & Steckler T (2014) Assessing behavioral and cognitive domains of autism spectrum disorders in rodents: current status and future perspectives. *Psychopharmacology (Berl)* 231:1125-1146.
- Landrigan, P. J. (2010). What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Current Opinion in Pediatrics*, 22(2), 219–225.
- Levin ED, Addy N, Nakajima A, Christopher, NC, Seidler, FJ & Slotkin, TA, (2001). Persistent behavioral consequences of neonatal chlorpyrifos exposures in rats. *Developmental Brain Research*; 130:83–89.
- Lotti, M. (2010). Clinical toxicology of anticholinesterases in humans. In *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (R. Krieger, Ed.), pp. 1543–1589. Academic Press, San Diego.
- Mabunga, DFN, Gonzales, ELT, Kim, J., Kim, KC, y Shin, CY (2015). Exploring the validity of valproic acid animal mode of autism. *Experimental Neurobiology*, 24 (4), 285-300.
<http://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.285>
- Miczek, K.A. & Vivian, J.A, (1993). Morphine attenuates ultrasonic vocalization during agonistic encounters in adult male rats.
- Portfors, C. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, Vol: 46 (1).
- Rauh V.A., Garfinkel R., Perera F.P., Andrews H.F., Hoepner L., Barr D.B., Whitehead, R., Tang, D. & Whyatt, R.W., (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on

- neurodevelopment in the first 3 years of life among innercity children. *Pediatrics*;118:e1845–59.
- Rauh V.A., Perera F.P., Horton M.K., Whyatt R.M., Bansal R., Hao X., Liu, J., Barr, D.B., Slotkin, T.A. & Peterson, B.S., (2012). Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*;109:7871–6.
- Rosas LG & Eskenazi B (2008). Pesticides and child neurodevelopment. *Current Opinion in Pediatrics*, 20(2):191–197
- Shelton JF, Geraghty EM, Tancredi DJ, Delwiche LD, Schmidt RJ, Ritz B., Hansen, R.L. & Hertz-Picciotto, I., (2014). Neurodevelopmental Disorders and Prenatal Residential Proximity to Agricultural Pesticides. *Environmental Health Perspective*, 122(10): 1103–1109, doi: [10.1289/ehp.1307044](https://doi.org/10.1289/ehp.1307044)
- Scattoni, M.L., Gandhi, S.U., Ricceri, L., Crawley, J.N. (2008). *Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism*. PLoS ONE, 3: e3067.
- Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K, Przewłocki R (2008) Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* 33:728-740.
- Venerosi, A. Ricceri, L. Scattoni, M.L. Calamandrei, G., (2009). Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behavior and ultrasonic vocalization in CD-1 mouse pups. *Environmental Health*, 30;8:12 doi:10.1186/1476-069X-8-12.
- Venerosi, A., Sabrina, T., Stecca, L., Chiarotti, F., De Felice, A., Cometa, M.F., Volpe, M.T., Calamandrei, G. & Ricceri, L., (2015). Effects of maternal chlorpyrifos diet on social investigation and brain neuroendocrine markers in the offspring- a mouse study. *Environmental Health*, 14:32, DOI 10.1186/s12940-015-0019-6.
- Villegas, L.F., & Sánchez, P.A. (2014). Trastornos del Espectro Autista: Tipología, prevalencia y escolarización en la provincia de Almería (España). *European Journal Of Child Development, Education And Psychopathology*, 2(2), 51-67. doi:10.30552/ejpad.v2i2.15