

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE PSICOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado en Psicología

Convocatoria Julio 2019

**Efecto del clorpirifós en las vocalizaciones ultrasónicas en crías de rata
expuestas prenatalmente**

**Effect of chlorpyrifos in ultrasonic vocalizations in rat pups prenatally
exposed**

Autor: Antonio Martínez Herrada

Tutor: Fernando Sánchez Santed

Cotutor: Cristian Pérez Fernández

Índice

Resumen/abstract.....	3
Introducción.....	4
Método.....	10
Animales y tratamiento.....	10
Procedimiento de aislamiento.....	11
Grabación y análisis de las vocalizaciones.....	11
Análisis de datos.....	11
Resultados.....	12
Discusión.....	15
Conclusión.....	17
Bibliografía.....	18

Resumen

El autismo está caracterizado por el deterioro de la comunicación y la interacción social. Aunque parte de su etiología es genética, diversos estudios relacionan algunos factores ambientales con su desarrollo, entre otros los plaguicidas organofosforados. El clorpirifós es uno de los más utilizados mundialmente. Algunos estudios lo relacionan con el deterioro de la conducta social innata y condicionada, además de deterioro motor en niños que fueron expuestos en la etapa gestacional. Una forma de estudiar sus efectos en modelos animales es a través de las vocalizaciones ultrasónicas que emiten las crías de rata en edades tempranas con el objetivo de ser recuperadas por la madre cuando se encuentran en situaciones de estrés. Para este estudio, se utilizaron un total de 14 (7 hembras), 14 (7 hembras) y 16 (8 hembras) crías de madres control (DMSO), expuestas a clorpirifós y ácido valproico, respectivamente. Todas ellas expuestas prenatalmente en los días gestacionales del 12,5 al 15,5. En los días postnatales 7 y 8, cada cría se separó de la madre para la grabación de las vocalizaciones. Se encontraron diferencias significativas en la latencia de emisión de la primera vocalización y el número de llamadas emitidas. No se encontraron diferencias de sexo. Se observa, por tanto, un deterioro en la reactividad al aislamiento de las crías. Se requiere de más investigación futura en este campo.

Abstract

Autism is known by the impairment of social communication and interaction. Although, genetics play an important part in its etiology, diverse studies link its development to environmental factors, such as organophosphorus pesticides. Chlorpyrifos is one of the most used globally. Some studies link the organophosphate to the impairment of innate and conditioned social behaviour, in addition to motor impairment in children that were prenatally exposed. A way of studying the effects in animal models is through the ultrasonic vocalizations that rat pups emit to be recovered in stress situations. For this study, a total of 14 (7 females), 14 (7 females) and 16 (8 females) pups from mothers exposed to dimethylsulfoxide, chlorpyrifos and valproic acid were used, respectively. All of them prenatally exposed during gestation days from 12,5 to 15,5. In postnatal days 7 and 8, each pup was isolated from the mother for the recording of vocalizations. Significant differences were found in the latency in the first vocalization emission and

in the number of calls emitted. There were no differences in terms of sex. It is shown an impairment in the reactivity to isolation in the pups examined. Further investigation is needed in this field of research.

El trastorno del espectro autista (TEA) hace de paraguas a una amplia variedad de síntomas, pero entre sus características diagnósticas generales se encuentran el deterioro persistente de la comunicación social recíproca y la interacción social, y los patrones de conducta, intereses o actividades restrictivos y repetitivos (American Psychiatric Association, 2013). En cuanto a la epidemiología del TEA, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos estima que 1 de cada 59 niños han sido diagnosticados con TEA, que este ocurre en todas las razas y estratos socioeconómicos y que afecta cuatro veces más a niños que a niñas (Centers for Disease Control and Prevention, 2019).

Esta variedad tan amplia de síntomas se atribuye a distintos factores etiológicos, desde una mutación en un solo gen hasta una compleja interacción entre factores genéticos y factores de riesgo no genéticos (Lai, Lombardo & Baron-Cohen, 2013). En relación a su etiología, el síndrome del X frágil (FXS) es la causa más extendida de herencia genética que deriva en el diagnóstico de este trastorno (Bradley & Mendelsohn, 2008). Este síndrome lo causa la deficiencia o ausencia de la proteína *fragile X mental retardation 1* (FMRP), una proteína de unión a ácido ribonucleico (ARN) que juega un papel importante en la regulación de un gran número de ARN mensajero (ARNm) en neuronas postsinápticas (Hagerman et al., 2017). El FXS está asociado con la expansión descontrolada del trinucleótido CGG en una región del gen *fragile mental retardation 1* (FMR1) que se encuentra en el cromosoma X (Oberle et al., 1991).

Aun siendo la carga genética un factor etiológico determinante, también se han de tener en cuenta los factores ambientales. Según un estudio con gemelos, estos factores tienen una carga del 55% en la etiología del autismo (Hallmayer et al., 2011). En otro estudio con gemelos, se estima la heredabilidad en un 50%, sugiriendo una carga igual de importante en factores ambientales (Sandin, Lichtenstein, Kuja-Halkola, Larsson, Hultman & Reichenberg, 2015).

Diversos factores ambientales se han relacionado empíricamente con el desarrollo de TEA. Entre los más importantes, se encuentran compuestos tan variados como algunos

fármacos (talidomida, misoprostol y el ácido valproico) (Landrigan, 2010) o plaguicidas (organofosforados y organoclorados) (Kalkbrenner, Schmidt & Penlesky, 2014).

Entre los fármacos más estudiados se encuentra el ácido valproico (AVP) que se usa normalmente para casos de epilepsia o para tratar episodios de manía en trastorno bipolar cuando el uso de litio está contraindicado (Wieck & Jones, 2018). Sin embargo, el tratamiento con este fármaco no se recomienda durante el embarazo, pues es una sustancia capaz de atravesar la placenta (Albani et al., 1984). La exposición del feto a valproato puede provocar severos efectos teratogénicos y empeoramiento de las funciones cognitivas (Meador, 2008).

En una revisión que recogía algunos estudios preclínicos en los que se administraba valproato se concluyó que los déficits encontrados se asemejaban a los síntomas que se suelen encontrar en el autismo. Se encontraron déficits en el neurodesarrollo y empeoramiento cognitivo y social de diferente gravedad según la dosis o el momento de la administración (Tartaglione, Schiavi, Calamandrei & Trezza, 2018). Teniendo en cuenta los síntomas que se manifiestan en roedores ante la exposición de valproato, se puede concluir que es un modelo animal válido para estudiar el TEA. Sin embargo, este modelo presenta ciertas limitaciones, pues el autismo, como la mayoría de patologías, abarca una gran variedad de síntomas que no puede cubrir por completo un solo modelo animal (Mabunga, Gonzales, Kim, Kim & Shin, 2015).

Como se mencionaba anteriormente, uno de los factores ambientales relacionados con la etiología y el desarrollo del autismo son los insecticidas organofosforados. Estos se usan con frecuencia a nivel global, siendo el CPF el más ampliamente usado desde hace décadas. Su uso se extiende desde la agricultura hasta entornos residenciales para controlar plagas de pulgas, mosquitos, termitas, etc. (Grand View Research, 2014). El CPF es un insecticida organofosforado cuyo principal mecanismo inductor de neurotoxicidad se basa en la inhibición de colinesterasas, grupo de enzimas que engloba las acetilcolinesterasas (AChE) y butirilcolinesterasas (BuChE), en el sistema nervioso central y periférico (Venerosi, Calamandrei & Ricceri, 2006). Las colinesterasas hidrolizan acetilcolina, un neurotransmisor que se ocupa de transmitir información a

través de los receptores muscarínicos y nicotínicos. Esta inhibición de las colinesterasas por parte del organofosforado resulta en una acumulación de acetilcolina en los receptores, lo que induce una sobreestimulación de estos (Eaton et al., 2008).

Teniendo en cuenta que, como sustancia hidrófoba, el CPF es capaz de atravesar la placenta, la exposición a este organofosforado durante el embarazo se convierte en un problema de gran importancia, pues puede afectar gravemente al neurodesarrollo del bebé (Abdel-Rahman, Blumenthal, Abou-Donia, Ali, Abdel-Monem & Abou-Donia, 2002). De esta forma, diferentes estudios de exposición gestacional observaron déficits en el desarrollo psicomotor y mental, y un aumento en trastornos de déficit de atención e hiperactividad y trastornos penetrantes del desarrollo en relación a los niveles de exposición a CPF (Sapbamrer & Hongsibsong, 2019). A pesar de estas observaciones, se ha de destacar que los estudios con humanos tienen ciertas limitaciones a la hora de controlar variables que puedan estar afectando a los resultados. Por este motivo, es necesario acudir a estudios con un control experimental más sólido como lo es la investigación animal. La exposición prenatal a CPF en modelos animales resulta, a nivel bioquímico, en una reducción de la actividad de la acetiltransferasa de colina y cambios en la función de la serotonina, ya sea aumentando o reduciendo sus receptores (Eaton et al., 2008). Además, en varios estudios se observa que a nivel comportamental resulta en el retraso del desarrollo motor y empeoramiento de la conducta social innata y condicionada (Lan, Kalimian, Amram & Kofman, 2017; Lan, Stein, Portillo, Toiber & Kofman, 2019; Ricceri et al., 2003). Examinando el efecto del CPF en las vocalizaciones de ratas nos encontramos con un estudio con exposición prenatal a una dosis de 6 mg/kg de CPF en el que se encontraron diferencias respecto al grupo control en la latencia de la primera vocalización emitida y en el número de llamadas, siendo evaluadas en el día postnatal 10. Se encontró una latencia mayor en ratas tratadas con CPF y menor número de llamadas emitidas en el mismo grupo (Venerosi, Ricceri, Scattoni & Calamandrei, 2009).

Los modelos animales son básicos para la investigación y el avance en el conocimiento y el tratamiento de los trastornos psicológicos. En los trastornos del neurodesarrollo con una carga importante de alteración en la conducta social suelen usar ratas y ratones para

su modelaje animal, ya que estos roedores manifiestan una amplia variedad de comportamientos sociales (Scattoni, Michetti & Ricceri, 2018). En concreto, para entender la etiología del autismo y poder desarrollar tratamientos más eficaces, suelen utilizarse, entre otros, modelos animales de ratas o ratones *Fmr1-KO*, es decir animales en los que el gen *FMR1* está inactivado (The Dutch-Belgian Fragile X Consortium, 1994). En este modelo animal se encuentran muchos de los síntomas conductuales del autismo, como son: déficits cognitivos (memoria espacial y *reversal learning*), ansiedad social, interacción social reducida, conductas repetitivas e hiperactividad (Melancia & Trezza, 2018).

Para evaluar la interacción social y la sociabilidad, es posible atender a varios aspectos de ella en los diversos modelos animales que presentan la sintomatología social relacionada con el autismo. En primer lugar, es posible evaluar la conducta de juego social midiendo la frecuencia y duración de los tipos de juego que se manifiestan (*pouncing*, *pinning* y *chasing*) (Trezza, Baarendse & Vanderschuren, 2010). En segundo lugar, nos encontramos la conducta de acercamiento social, para el que se suele utilizar el paradigma conductual del test de sociabilidad de Crawley, que consta de 3 fases: habituación, acercamiento a un extraño y preferencia por la novedad social (Silverman, Yang, Lord & Crawley, 2010). En tercer lugar, nos encontramos con la comunicación social, aspecto de la sociabilidad evaluable a través de las vocalizaciones ultrasónicas que producen los roedores durante todo su ciclo vital en diferentes contextos (Melancia & Trezza, 2018). Podemos encontrar vocalizaciones en relaciones madre-hijo, interacciones sociosexuales hembra-macho e interacciones sociales entre roedores del mismo sexo y en adolescentes (Portfors, 2007).

Las vocalizaciones en crías se observan cuando estas se encuentran separadas de la madre. Estas llamadas se encuentran en un rango de frecuencia desde 30 kHz a 60 kHz y elicitan en la madre una conducta de búsqueda y recuperación de la cría, por lo que suponen una importante herramienta de supervivencia en los roedores (Shair, 2018). Las características de estas llamadas dependen de la edad de los roedores. Se encuentran en las crías desde el primer día postnatal hasta las dos semanas de edad, aumentando el ritmo de llamadas en torno a los días postnatales 6-8 y disminuyendo hasta que dejan de emitir este tipo de

llamadas por completo. Este descenso del ritmo de las vocalizaciones emitidas es paralelo a la adquisición de la capacidad para termorregular su temperatura corporal, junto con su capacidad para moverse y la apertura de los ojos (Elwood & Keeling, 1982). La medición de vocalizaciones en las primeras etapas de desarrollo en ratas y ratones es de suma importancia teniendo en cuenta que los TEA son trastornos del neurodesarrollo que se manifiestan a edades tempranas (Bale et al, 2010).

Las vocalizaciones en ratas adolescentes y adultas pueden ser de dos tipos según su frecuencia, que depende de las demandas físicas y fisiológicas del contexto. Al primer tipo suele referirse como vocalizaciones de 22 kHz (con un rango entre 18 y 32 kHz) y se dan mayormente en situaciones aversivas para el roedor y ante estímulos que han sido condicionados a experiencias de este tipo. Las vocalizaciones de 22 kHz se dan ante la presencia de depredadores, por lo que pueden servir como un mecanismo de alerta para los conspecíficos. El segundo tipo son las vocalizaciones de 50 kHz (con un rango entre 32 y 96 kHz) y se dan en situaciones no aversivas, como puede ser durante la conducta sexual, conducta de juego y ante estimulación táctil de los experimentadores (Portfors, 2007).

El presente estudio consiste en el análisis de los efectos comportamentales que induce la exposición prenatal a dosis bajas de CPF en ratas, comparando su efecto con ratas expuestas a AVP, como modelo animal validado de autismo (Mabunga, Gonzales, Kim, Kim & Shin, 2015). Estos efectos se analizarán concretamente en la emisión de vocalizaciones en crías al ser sometidas a aislamiento de la madre.

El objetivo general de este estudio es comparar los efectos, en exposición gestacional, del CPF con los presentes en ratas tratadas con AVP. Los objetivos específicos son:

- Analizar la latencia de la primera vocalización en crías de rata sometidas a aislamiento.
- Analizar el número de llamadas emitidas por crías de rata sometidas a aislamiento.

Teniendo en cuenta los datos de la afectación en las llamadas de ratas y el deterioro de la conducta social en general ante la exposición a CPF que se han expuesto con anterioridad, se proponen las siguientes hipótesis:

- Las crías tratadas con CPF prenatalmente emitirán más tarde la primera vocalización, en comparación con el grupo control y de forma similar al grupo tratado con AVP.
- Las crías tratadas con CPF prenatalmente emitirán menos llamadas, en comparación con el grupo control y de forma similar al grupo tratado con AVP.

Método

Animales y tratamiento

Para este estudio se compraron 25 ratas Wistar hembra wild type embarazadas, de Janvier (Le Genest Saint Isle, Francia). Las ratas embarazadas se alojaron individualmente con comida y agua disponible ad libitum a temperatura ambiente, entre unos 20 y 21°C y una humedad de entre 42 y 44%.

Las ratas embarazadas se separaron aleatoriamente en tres grupos. Al primer grupo formado por 8 ratas se le administró 1 mg/kg de dimetilsulfóxido (DMSO), mediante inyección subcutánea, durante los días gestacionales del 12,5 al 15,5. Al segundo grupo formado por 8 ratas se le administró 1 mg/kg de CPF con DMSO como vehículo, mediante inyección subcutánea, entre los días gestacionales del 12,5 al 15,5. Al tercer grupo compuesto por 9 ratas se le administró 400 mg/kg de AVP con solución salina como vehículo, mediante inyección subcutánea, en el día gestacional 12,5, continuando con inyecciones de salino diariamente hasta el día gestacional 15,5. El día de nacimiento se estableció como día postnatal 0. Una vez identificadas, todas las crías se repartieron aleatoriamente entre distintas madres, 10 crías con cada una, equilibrando el número de crías provenientes de cada grupo experimental.

Para el presente estudio, se seleccionaron aleatoriamente un total de 14 (7 hembras), 14 (7 hembras) y 16 (8 hembras) crías de madres control (DMSO), expuestas a CPF y AVP,

respectivamente. Todos los procesos experimentales se desarrollaron respetando la normativa y requerimientos de bioética sobre animales de experimentación vigentes en el Real Decreto Español 53/2013 y la Directiva de la Comunidad Europea (2010/63/EU) y aprobado por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Almería.

Procedimiento de aislamiento

En los días postnatales 7 y 8, cada cría se separó de la madre y sus compañeros de camada y se colocó en una pequeña placa contenedora de plástico que se mantuvo a temperatura ambiente (20-21°C) durante toda la sesión de registro. El lecho de la placa consistía en una capa de pañuelo de papel. Posteriormente, se emplazó la placa con la cría en la cámara insonorizada. Esta cámara se mantuvo constante a temperatura ambiente durante toda la sesión. El orden de registro de las vocalizaciones de cada cría fue aleatorio, seleccionando a las crías de cada camada al azar, para evitar efectos relacionados con el momento de evaluación. El tiempo de registro fue de 5 minutos por cría.

Grabación y análisis de vocalizaciones

Las vocalizaciones de las crías se grabaron utilizando un micrófono ultrasónico (Ultramic 250k) suspendido a 8 cm de la base de la cámara insonorizada. El registro y análisis de las vocalizaciones se realizó mediante el software SeaWave (G.Pavan, CIBRA, University of Pavia). Los espectrogramas de las vocalizaciones se contabilizaron manualmente.

Análisis de datos

Todos los análisis realizados se ejecutaron utilizando el software SPSS Versión 24 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). En el análisis exploratorio se procedió a la detección de anomalías en los datos, buscando datos extremos que pudieran sesgar los coeficientes de correlación posteriores. Eliminados los datos extremos en cada análisis, se procedió a analizar la latencia y el número de llamadas totales de los 5 minutos de grabación mediante un ANOVA univariado, comparando los 3 niveles de la variable de tratamiento

y la variable sexo. Además, se realizó un análisis univariado de los 3 primeros minutos, cada uno por separado. Por último, se procedió al análisis univariado de las llamadas totales en los 2 primeros minutos de grabación. Para el análisis post hoc, siendo la prueba de Levene menor a 0,05 en todas las variables que resultaron con diferencias significativas, se asumieron varianzas distintas y se procedió a realizar las comparaciones por parejas mediante simulación de muestreo.

Resultados

En primer lugar, se analizó la evolución del peso, en el que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento.

Se observó que los animales expuestos tanto a CPF como a AVP durante la gestación aumentaron su latencia a la primera vocalización, siendo más evidente en el último grupo (ver figura 1). El ANOVA univariado mostró un efecto significativo en relación al factor tratamiento [$F(2, 77) = 7,174, p = 0,001$]. De forma más específica, se observaron diferencias significativas entre las medias de los grupos control y tratados con AVP ($p = 0,011$), entre el grupo control y el grupo tratado con CPF ($p = 0,017$) y entre los grupos tratados con CPF y AVP ($p = 0,037$). No se encontraron diferencias significativas en función de sexo [$F(1, 77) = 1,087, p = 0,300$] ni en la interacción sexo*tratamiento [$F(2, 77) = 1,026, p = 0,363$].

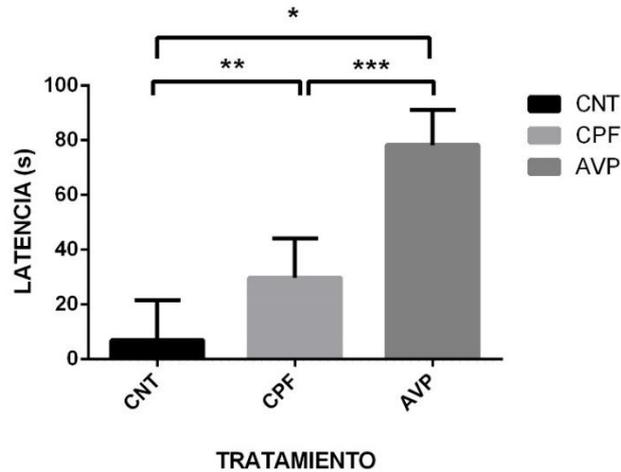


Figura 1. Latencia. Tiempo en segundos en emitir la primera vocalización. (*) Diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con AVP ($p < 0,05$). (**) Diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con CPF ($p < 0,05$). (***) Diferencias significativas entre el grupo tratado con CPF y el grupo tratado con AVP ($p < 0,05$).

No se encontraron diferencias significativas en función del tratamiento en el número de llamadas emitidas en los 5 minutos de grabación [$F(2, 81) = 2,189, p = 0,119$] (ver figura 2). Tampoco se encontraron diferencias significativas en función del sexo [$F(1, 81) = 0,919, p = 0,341$], ni en la interacción sexo*tratamiento [$F(2, 81) = 0,552, p = 0,578$].

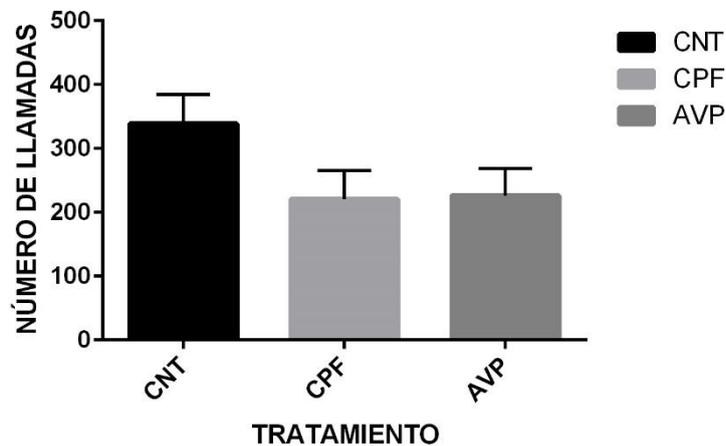


Figura 2. Total de llamadas en los 5 minutos de grabación. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Teniendo en cuenta, la diferencia en latencia, se pasaron a analizar los tres primeros minutos individualmente.

En el primer minuto de grabación se encontraron diferencias significativas en la interacción sexo*tratamiento [$F(2, 76) = 4,752, p = 0,011$]. Las ratas macho control realizaron, de forma significativa, más llamadas que las ratas macho tratadas con AVP ($p = 0,005$). Las ratas macho tratadas con CPF realizaron más llamadas que las ratas tratadas con AVP ($p = 0,023$). Las ratas hembra del grupo control realizaron más llamadas, de forma significativa, que el grupo de hembras tratadas con CPF ($p = 0,007$). Por último, las ratas hembras del grupo tratado con CPF realizaron menos llamadas que las ratas del mismo sexo del grupo tratado con AVP ($p = 0,029$). No se encontraron diferencias en función de sexo [$F(1, 76) = 0,051, p = 0,822$] o en función de tratamiento [$F(1, 76) = 2,075, p = 0,133$].

En el segundo minuto de grabación se encontraron diferencias significativas en la interacción sexo*tratamiento [$F(2, 78) = 4,089, p = 0,020$]. Las ratas macho del grupo control emitieron más llamadas, de forma significativa, que el grupo tratado con AVP ($p = 0,008$). Las ratas hembra del grupo control emitieron más llamadas que las ratas del mismo sexo del grupo tratado con CPF ($p = 0,001$). Las ratas hembra tratadas con CPF emitieron menos llamadas que las ratas del mismo sexo del grupo tratado con AVP ($p = 0,023$). Además, se encontraron diferencias significativas en función de tratamiento [$F(2, 78) = 4,883, p = 0,010$], donde se encuentra que, en general, el grupo control emite más llamadas que el grupo tratado con CPF ($p = 0,013$). No se encontraron diferencias en función del sexo [$F(1, 78) = 0,040, p = 0,842$].

En el tercer minuto de grabación no se encontraron diferencias significativas en la interacción sexo*tratamiento [$F(2, 80) = 1,302, p = 0,278$], ni en función de sexo [$F(2, 81) = 1,211, p = 0,274$]. Aunque se encontró una tendencia en función de tratamiento [$F(2, 80) = 3,060, p = 0,052$].

Teniendo en cuenta estos datos, se pasó a analizar el total de llamadas en los dos primeros minutos de grabación.

Se observó que los animales expuestos tanto a CPF como a AVP durante la gestación disminuyeron en la emisión de llamadas en los dos primeros minutos (ver figura 3). El ANOVA univariado mostró un efecto significativo en relación al factor tratamiento [$F(2,$

77)= 4,476, $p= 0,014$]. En concreto, el grupo control el que emitió mayor número de llamadas con diferencias significativas respecto al grupo tratado con CPF ($p = 0,010$) y el grupo tratado con AVP ($p = 0,028$), seguido, en número de llamadas, por los grupos tratados con CPF y AVP que tuvieron medias similares, sin diferencias significativas entre sí ($p = 0,547$). Además, se encontraron diferencias en la interacción sexo*tratamiento [$F(2, 77)= 4,822, p= 0,011$]. No se encontraron diferencias significativas en función de sexo [$F(1, 77)= 0,054, p= 0,816$].

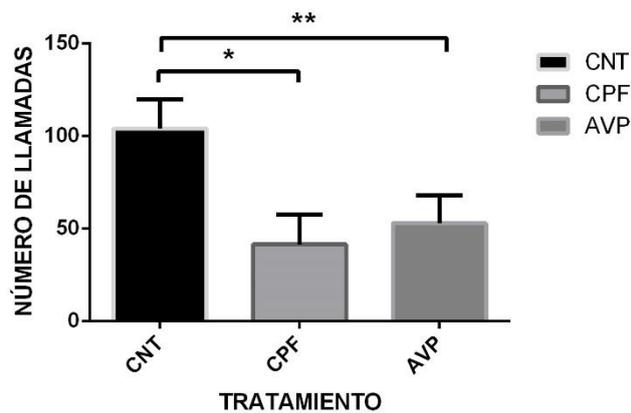


Figura 3. Total de llamadas a los 2 minutos de grabación. (*) Diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con CPF ($p<0,05$). (**) Diferencias significativas entre el grupo control y el grupo tratado con AVP ($p<0,05$).

Discusión

En general, los resultados obtenidos reflejan un deterioro de la emisión de llamadas en las crías de rata tratadas con CPF mediante exposición gestacional en los días del 12,5 al 15,5. El deterioro se observa en la emisión tardía de la primera vocalización, resultando en una reactividad al aislamiento reducida (Venerosi, Ricceri, Scattoni & Calamandrei, 2009). También se observa en el reducido número de llamadas realizadas en los primeros minutos. Estas observaciones concuerdan con el estudio anteriormente mencionado, el cual utiliza una dosis 6 veces mayor en días gestacionales posteriores (del 15 al 18) (Venerosi et al., 2009). Además, es coherente con otros estudios en los que se encontraron déficits en conducta social con exposición gestacional en días similares (del 12 al 15) (Lan et al., 2017; Lan et al., 2019).

Teniendo en cuenta que no se encontraron diferencias en los 5 minutos de grabación, pero sí a los 2 minutos, es posible que el deterioro encontrado se deba solamente a la capacidad de reacción al aislamiento de las crías de rata tratadas con CPF. Es notable que las vocalizaciones ultrasónicas que producen las crías tienen una función vital para su supervivencia, ya que estas se manifiestan durante la etapa en la que los roedores no son capaces de regular su temperatura corporal y estas llamadas elicitán en la madre la conducta de búsqueda y de recuperación de la cría (Shair, 2018). Es posible que este deterioro en la capacidad de reacción al aislamiento se deba a un deterioro en la capacidad para percibir inputs sensoriales, en este caso el cambio de temperatura. Lo cual concuerda con uno de los síntomas que se encuentra usualmente en el TEA en humanos, referido a la hiper o hiporreactividad a estímulos sensoriales como aparente indiferencia al dolor o la temperatura, respuesta aversiva a ciertos sonidos o texturas, etc. (American Psychiatric Association, 2013). Por supuesto, esto es solo una hipótesis y requiere de más investigación.

Por otro lado, no se encontraron diferencias de sexo en la reactividad al aislamiento (latencia de la primera vocalización) ni en el número de llamadas totales. En este aspecto, es complicado apoyar estos datos en literatura anterior, pues la mayoría de estudios relacionados con el TEA realizan sus investigaciones sin centrarse en la variable de sexo, siendo lo más común utilizar roedores macho (Lai, Sobala-Drozdowski, Zhou, Doering, Faure, & Foster, 2014). Esto es coherente con la proporción en la que afecta el TEA, que como se mencionaba anteriormente, se encuentra cuatro veces más en niños que en niñas (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Aun así, es posible encontrar algunos estudios que observen esta variable. En una investigación con tratamiento gestacional de CPF en los días del 14 al 17 se encontraron diferencias de sexo en la emisión de llamadas, siendo el efecto del tratamiento más marcado en los machos (De Felice, Scattoni, Ricceri & Calamandrei, 2015). En otro estudio se encontraron diferencias de sexo en un modelo de autismo *Fmr1-KO* en las llamadas emitidas, siendo las hembras las que emitían mayor número de llamadas y de mayor duración (Reynolds, Nolan, Jefferson, & Lugo, 2016). Además, suele encontrarse dimorfismo evaluando conducta social en general ante exposición similar a CPF (De Felice et al., 2014; Lan et al., 2019).

Por último, es destacable la comparación con el grupo tratado con AVP, encontrándose un efecto mayor que el encontrado en el grupo tratado con CPF tanto en latencia como en el número de llamadas emitidas.

Conclusión

En definitiva, los resultados mostraron que la exposición gestacional a dosis bajas de CPF provoca un efecto de deterioro en las vocalizaciones ultrasónicas de las crías de rata, tanto en la reactividad al aislamiento como en la emisión de llamadas en sí. Sin embargo, estos efectos requieren de mayor estudio y análisis, teniendo en cuenta la poca investigación que se encuentra sobre la latencia de la primera vocalización. Además, es destacable reseñar la falta de investigación en el dimorfismo sexual en este ámbito. Por último, es importante señalar el valor traslacional a humanos que tiene el estudio en vocalizaciones, teniendo en cuenta que los cambios que se producen en estas sugieren un cambio similar en el llanto en humanos, pudiendo ser una buena forma de evaluar el autismo de forma temprana.

Bibliografia

Abdel-Rahman, A., Blumenthal, G., Abou-Donia, S., Ali, F., Abdel-Monem, A. & Abou-Donia, M. (2002). Pharmacokinetic profile and placental transfer of a single intravenous injection of chlorpyrifos in pregnant rats. *Arch Toxicol*, 76, 452–459.

Albani, F., Riva, R., Contin, M., Baruzzi, A., Altomare, M., Merlini, G., & Perucca, E. (1984). Differential transplacental binding of valproic acid: influence of free fatty acids. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 17(6), 759–762.

American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.

Bale, T. L., Baram, T. Z., Brown, A. S., Goldstein, J. M., Insel, T. R., McCarthy, M. M., Nemeroff, C., Reyes, T., Simerly, R., Susser, E. & Nestler, E. (2010). Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biological Psychiatry*, 68(4), 314-319.

Bradley, G. & Mendelsohn, N. (2008). Genetics evaluation for the etiologic diagnosis of autism spectrum disorders. *Genet. Med.*, 10(1), 4–12.

Data and Statistics on Autism Spectrum Disorder. CDC. (2019). Retrieved from <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>.

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*.

De Felice, A., Venerosi, A., Ricceri, L., Sabbioni, M., Scattoni, M. L., Chiarotti, F., & Calamandrei, G. (2014). Sex-dimorphic effects of gestational exposure to the organophosphate insecticide chlorpyrifos on social investigation in mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 46, 32–39.

Eaton, D., Daroff, R., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W., Nadel, L., Neubert, D., Schulte-Hermann, R. & Spencer, P. (2008). Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology*, 38(2). 1-125.

Elwood, R. W., & Keeling, F. (1982). Temporal organization of ultrasonic vocalizations in infant mice. *Developmental Psychobiology*, 15(3). 221–227.

Grand View Research. Chlorpyrifos market analysis, market size, application analysis, regional outlook, competitive strategies, and forecasts, 2015 to 2022. 2014. [http:// www.grandviewresearch.com/industry-analysis/chlorpyrifos-market](http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/chlorpyrifos-market) [accessed on May 2, 2019]

Hagerman, R., Berry-Kravis, E., Hazlett, H., Bailey, D., Moine, H., Kooy, R., Tassone, F., Gantois, I., Sonenberg, N., Mandel J. & Hagerman, P. (2017). Fragile X syndrome. *Disease Primers*, 3. 1-19.

Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., Lotspeich, L., Croen, L., Ozonoff, S., Lajonchere, C., Grether, J. & Risch, N. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Archives of general psychiatry*, 68(11), 1095-1102.

Kalkbrenner, A. E., Schmidt, R. J., & Penlesky, A. C. (2014). Environmental Chemical Exposures and Autism Spectrum Disorders: A Review of the Epidemiological Evidence. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 44(10). 277–318.

Lai, J. K. Y., Sobala-Drozowski, M., Zhou, L., Doering, L. C., Faure, P. A., & Foster, J. A. (2014). Temporal and spectral differences in the ultrasonic vocalizations of fragile X knock out mice during postnatal development. *Behavioural Brain Research*, 259. 119–130.

- Lai, M., Lombardo, M. & Baron-Cohen, S. (2013). Autism. *Lancet*. 1-15.
- Lan, A., Kalimian, M., Amram, B., & Kofman, O. (2017). Prenatal chlorpyrifos leads to autism-like deficits in C57Bl6/J mice. *Environmental Health*. 1-10.
- Lan, A., Stein, D., Portillo, M., Toiber, D. & Kofman, O. (2019). Impaired innate and conditioned social behavior in adult C57Bl6/J mice prenatally exposed to chlorpyrifos. *Behav Brain Funct*, 15(2). 1-9.
- Landrigan, P. (2010). What causes autism? Exploring the environmental contribution. *Current Opinion in Pediatrics*, 22. 219–225.
- 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.
- Meador, K. J. (2008). Effects of in Utero Antiepileptic Drug Exposure. *Epilepsy Currents*, 8(6), 143–147.
- Melancia, F. & Trezza, V. (2018). Modelling fragile X syndrome in the laboratory setting: A behavioral perspective. *Behavioural Brain Research*, 350, 149-163.
- Oberle, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boue, J., Bertheas, M.F. & Mandel, J.L. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*, 252(5009). 1097–1102.
- Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.*, 46. 28-34.
- Reynolds, C. D., Nolan, S. O., Jefferson, T., & Lugo, J. N. (2016). Sex-specific and genotype-specific differences in vocalization development in FMR1 knockout mice. *NeuroReport*, 27(18), 1331–1335.

Ricceri, L., Markina, N., Valanzano, A., Fortuna, S., Cometa, M., Meneguz, A. & Calamandrei, G. (2003). Developmental exposure to chlorpyrifos alters reactivity to environmental and social cues in adolescent mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 191(3). 189–201.

Sandin, S., Lichtenstein, P., Kuja-Halkola, R., Larsson, H., Hultman, C. M., & Reichenberg, A. (2014). The familial risk of autism. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 311(17), 1770–1777.

Sapbamrer, R. & Hongsibsong, S. (2019). Effects of prenatal and postnatal exposure to organophosphate pesticides on child neurodevelopment in different age groups: a systematic review. *Environmental Science and Pollution Research*.

Shair, H. (2018). Infantile Vocalizations in Rats. *Handbook of Ultrasonic Vocalization*. 129-137.

Silverman, J., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J. (2010). Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nature*, 11. 490-502.

Scattoni, M., Michetti, C. & Ricceri, L. (2018). Rodent Vocalization Studies in Animal Models of the Autism Spectrum Disorder. *Handbook of Ultrasonic Vocalization*. 445-456.

Tartaglione, A. M., Schiavi, S., Calamandrei, G., & Trezza, V. (2019). Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*. 1-15.

The Dutch-Belgian Fragile X Consortium (1994). Fmrl Knockout Mice: A Model to Study Fragile X Mental Retardation. *Cell Press*, 78. 23-33.

Trezza, V., Baarendse, P.J., & Vanderschuren, L.J. (2010) The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31. 463-469.

Venerosi, A., Calamandrei, G., & Ricceri, L. (2006). A social recognition test for female mice reveals behavioral effects of developmental chlorpyrifos exposure. *Neurotoxicology and Teratology*, 28(4), 466–471.

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: A Global Access Science Source*, 8(1).

Wieck, A. & Jones, S. (2018). Dangers of valproate in pregnancy. *BMJ*. 1-2.