



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA
Facultad de Psicología

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



FACULTAD DE PSICOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado en Psicología Convocatoria Junio 2019

Elaboración y validación de un protocolo para el Test de Crawley

Elaboration and validation of a protocol to Crawley's Test

Cristina Espinosa del Cerro

Luis Fernando Sánchez Santed

Miguel Morales Navas

Resumen

El autismo es una de las enfermedades del neurodesarrollo más estudiadas y a su vez, más difíciles de comprender debido a su alta variabilidad fenotípica y etiológica. Dos sustancias muy relacionadas con la etiología de esta enfermedad son el insecticida Clorpirifos y el antiepiléptico Ácido Valproico. Son numerosos los estudios que confirman la relación entre la exposición a estas sustancias y la manifestación de comportamientos autistas, entre otros, la disminución o ausencia de la sociabilidad.

En este estudio, se ha comprobado esta relación en ratas Wistar cuando el Clorpirifos y el Ácido Valproico son administrados de forma subcutánea durante el periodo gestacional a dosis de 1mg/Kg y 400mg/Kg, respectivamente.

Para su estudio se ha elaborado un protocolo de la prueba de Crawley o Three-Chamber Test, el cual consiste en enfrentar a las ratas experimentales a ratas totalmente desconocidas para ellas, y comprobar si existen o no comportamientos sociales o propios del Síndrome del Espectro Autista.

Abstract

Autism is one of the most studied neurodevelopmental diseases and at the same time, one of the most difficult disease to understand due to its high phenotypic and etiological variability. Two substances very related with the ethology of this disease are the insecticide Chlorpyrifos and the antiepileptic Valproic Acid. There are numerous studies that confirm a relationship between the exposure to these substances and the manifestation of autistic-like behaviour, like the decrease or lack of sociability.

In this study, we have verified this relationship in Wistar rats when Chlorpyrifos and Valproic Acid are administered subcutaneously during the gestational period at doses of 1mg/Kg and 400mg/Kg, respectively.

For this study has been developed a protocol of a Crawley's Test or Three Chamber Test, which consists of confront the experimental rats with a totally unknown rats to them to know if there are or not social or autistic-like behaviours.

Índice

Resumen	2
Introducción	4
Materiales	7
Animales	7
Químicos y reactivos	7
Aparato	8
Método	9
Resultados	12
Datos brutos	12
Validación del aparato	12
Control locomotor	13
Tiempo en cada compartimiento	15
Índice de Sociabilidad (SI) e	
Índice de Preferencia Social Novedosa (SNI)	16
Control de la maduración	18
Discusión	20
Conclusión	22
Referencias	23
Anexos	26

Introducción

Desde el proyecto multidisciplinar coordinado por el laboratorio de psicobiología de la Universidad de Almería denominado “Correlatos neuro-biológicos de los desórdenes del neurodesarrollo inducidos por factores genéticos y ambientales”, se analiza, más específicamente, los efectos neurocognitivos producidos por el insecticida organofosforado Clorpirifos (CPF) y el antiepiléptico Ácido Valproico o Valproato (AVP) cuando se administran durante el periodo de gestación en ratas, y en paralelo con los resultados de las mismas pruebas en ratas knock-out para el gen FMR1. Para su estudio, se realizan pruebas de diversos parámetros bioquímicos, mediciones electrofisiológicas y pruebas conductuales, entre las que se encuentran: el registro de vocalizaciones en neonatos (USV) y el test de sociabilidad o test de Crawley.

El término autismo, como tal, fue descrito por primera vez en 1943 por Leo Kanner en su artículo “*Autistic disturbances of affective contact*”. Desde entonces su significado y su criterio diagnóstico se ha ido modificando hasta consolidarse el Trastorno del Espectro Autista, tal y como se conoce en la actualidad.

El Autismo es un trastorno del neurodesarrollo, caracterizado por una deficiente interacción social, capacidad del lenguaje no verbal alterado y alta frecuencia de conductas estereotipadas, entre otras cosas. Debido a su alta comorbilidad con otros trastornos, tiene una gran variabilidad de manifestaciones fenotípicas, de ahí que se hable de Espectro del autismo.

La prevalencia del autismo ha ido incrementándose en los últimos años, siendo positivo en 1 de cada 100 nacimientos (Elsabbagh, Divan, Koh et al. 2012, Martínez-Morga et al. 2019), y con mayor riesgo en hombres que en mujeres, en una relación de 4 a 1 (Arberas y Ruggieri, 2019).

La etiología del Autismo conocida hasta la fecha puede clasificarse, de manera resumida, en factores genéticos y factores ambientales. Esta variabilidad etiológica es también causante de la diversidad de síntomas encontrados en las personas con Autismo.

En cuanto a los factores genéticos, cada vez más estudios a nivel molecular constatan la influencia de ciertos genes en el desarrollo de este trastorno. Entre los más de cien genes hallados, se encuentra el gen FMR1 (Arberas y Ruggieri, 2019), causante también

del Síndrome de X Frágil, el cual tiene una alta comorbilidad con el Autismo (Díaz-Anzaldúa y Díaz-Martínez, 2013).

Respecto a los factores ambientales influyentes en el Autismo, se han descrito diversas sustancias cuya exposición, principalmente durante la etapa gestacional, puede causar este síndrome. Entre todas estas sustancias, se encuentran el Clorpirifos y el Ácido Valproico utilizados en este trabajo.

A modo de resumen, el Clorpirifos (O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato) es uno de los insecticidas más utilizados mundialmente y, por consiguiente, también uno de los más estudiados e investigados respecto a las repercusiones que tiene su exposición tanto a dosis preclínicas, como a dosis más elevadas, ya sea en modelos animales -ratones y ratas, principalmente- (Ricceri et al. 2003; Icenogle et al. 2004), como en humanos (Rauh et al. 2006).

La mayor parte de la toxicidad de esta sustancia viene cuando ésta se bio-transforma, oxidándose en su forma oxon - clorpirifos-oxon -, metabolito que ha sido descrito como el principal causante de la inhibición de la actividad de las colinesterasas en el cerebro (Eaton et al., 2008), ya que tal y como afirmó Chambers en 1992, el Clorpirifos per se, no tiene la capacidad de inhibir de manera significativa la actividad de las colinesterasas. Más específicamente, el Clorpirifos, al igual que la mayoría de los insecticidas organofosforados, inhibe la actividad de la Acetilcolinesterasa (AChE), enzima determinante en la correcta función de la Acetilcolina.

Son numerosos los estudios que constatan que su exposición da lugar tanto a corto como a largo plazo, a patrones de conducta -entre otras cosas- deficientes, tales como hiperactividad, agresividad, problemas de memoria o locomotores (Lan et al. 2019; Levin et al. 2002; Ricceri et al. 2006) o comportamiento social alterado, similar al que se puede encontrar en el Trastorno del Espectro Autista o en el Síndrome de X Frágil (FXS) (Hamilton et al. 2014).

En cuanto al Ácido Valproico (ácido 2-propilpentanoico), se trata de un fármaco antiepiléptico ampliamente utilizado para tratar las convulsiones y los ataques epilépticos. Sin embargo, se ha demostrado que este tratamiento tiene efectos adversos para la salud, principalmente cuando es administrado en periodos gestacionales. Estudios como los realizados por Kataoka et al. en 2013, demuestran que la exposición al Valproato en ratones en periodo gestacional causa una disminución del número de las neuronas de las

crías machos. Entre las secuelas conductuales, se encuentra la expresión de conductas propias de personas con Trastorno del Espectro Autista o incluso, en casos más extremos, la propia enfermedad (Chomiak et al. 2013, Dufour-Rainfray et al. 2011).

La medida conductual utilizada en este trabajo para evaluar comportamientos similares a los del Espectro Autista es el Test de Crawley. Este test, también conocido como test de sociabilidad o *three-chamber test*, es una prueba elaborada por Jacqueline N. Crawley en 2004, descrita en su artículo “*Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors*”, que evalúa el comportamiento social en modelos animales cuando éstos se enfrentan a estímulos novedosos. Originalmente, Crawley propuso esta prueba para evaluar el comportamiento social en ratones en desarrollo con Trastorno del Espectro Autista, creando así una forma sencilla de comprobar la existencia de comportamientos propios de este trastorno en modelos animales.

Actualmente existen varias modalidades para llevar a cabo la prueba. En algunos estudios se utilizan un objeto inanimado novedoso frente a un animal extraño para el animal experimental (Hamilton et al. 2014), otros prefieren emplear dos objetos inanimados novedosos y por último hay quien opta por hacer uso de dos animales extraños para el animal experimental (Tian et al. 2017, McNaughton et al. 2008).

En el caso de este trabajo, el animal experimental, debe enfrentarse a dos ratas con las que nunca ha tenido ningún tipo de contacto.

La prueba se lleva a cabo en un aparato que consta de tres compartimentos denominados Zona 1, Zona Central y Zona 2. Tanto en la Zona 1 como en la Zona 2, se encuentra una jaula en la que se introducirán a las ratas extrañas.

Materiales

1. Animales

En este estudio se utilizaron un total de 126 ratas *Wistar*, nacidas en las instalaciones de la Universidad de Almería, a partir de 25 hembras *Wistar* procedentes de *Janvier Labs*.

Se utilizó la misma proporción de animales hembras y machos. De éstas, 60 fueron denominadas “extrañas” y 66 “experimentales”.

Las ratas extrañas y las ratas experimentales fueron divididas en cajas-hogares diferentes con ratas de su mismo sexo. En cada caja-hogar se delimitó un máximo de 4 ratas

Durante toda la estancia de los animales en el animalario, tanto las madres como las crías utilizadas en la prueba, estuvieron alimentadas con agua y comida *ad libitum* con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 7 p.m.) y temperatura de la sala de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad de $\approx 40\%$.

Todos los procedimientos realizados en este estudio son parte del proyecto PSI2017-86847-C2-1-R de la Universidad de Almería y estuvieron regulados por la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, por el Real Decreto Español 53/2013 por el que se regulan las normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos y aprobados por el Comité de Investigación Animal de la Universidad de Almería.

2. Reactivos y químicos

Durante todo el periodo de anterior, durante y posterior de la realización de la prueba, se utilizaron los siguientes materiales:

- Chlorpyrifos Pestanal® (CPF), 100 mg, *Sigma Aldrich*.
- Ácido 2-propilpentanoico (AVP), *Sigma Aldrich*.
- Suero salino con pH 7.3.
- Dimetilsulfuro (DMSO).
- Etanol al 70%

3. Aparato

Se trata de una caja de madera negra, de 102 x 100 cm, dividido en tres zonas exactamente iguales por dos paredes de plexiglás con una abertura a modo de puerta que comunica la Zona Central con las zonas 1 y 2, tal y como se muestra en la Figura 1.

Dentro de las zonas 1 y 2 se encuentra una jaula de barras de metal que permite a las ratas de dentro y fuera de la jaula tener contacto. Alrededor de cada una de las jaulas, se delimita un perímetro en el cual se considera que la rata experimental está interactuando con la rata extraña que se encuentra en la jaula. Este perímetro es lo que se ha denominado Zona de contacto 1 y Zona de contacto 2 en la Figura 1.

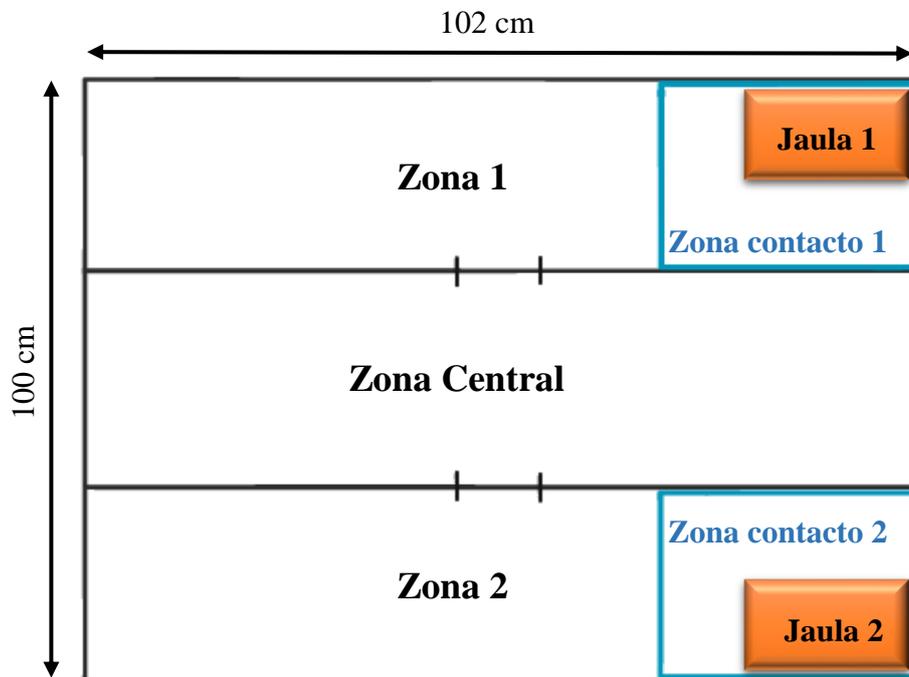


Figura 1. *Esquema del Aparato de Crawley*

Método

Para crear los diferentes grupos experimentales, se utilizó 25 hembras Wistar embarazadas procedentes de *Janvier Labs*.

Durante el periodo de gestación, se administró mediante punción subcutánea, una de las siguientes sustancias:

- 1 mg/kg de CPF durante los días gestacionales (GD) 12 al 15, disuelto en DMSO.
- 400 mg/kg de AVP en el GD 12.5, disuelto en salino (100mg/ml, pH 7.3).
- Durante los GD12-GD15, inyección de 1 mg/Kg de DMSO como grupo control.

Al grupo de ratas a las que se les administró el AVP, se les administró también durante los días siguientes (GD 13-15) una dosis de salino para equiparar la situación de estrés a la que el resto de los grupos experimentales estuvo expuesto en esos días.

La elección de la sustancia administrada para cada rata se hizo de forma aleatoria.

En el PND1, de cada parto se seleccionaron 10 crías de forma aleatoria y se dividieron en “ratas experimentales” y “ratas extrañas”. Todas las ratas extrañas, pertenecían al grupo control. Durante toda la estancia previa a la prueba en el animalario, aquellos roedores que fueron considerados experimentales (grupos control, CPF y AVP) permanecieron en cajas-hogar diferentes de aquellos que se utilizarían como extraños. El procedimiento más adecuado, habría sido mantener estas cajas-hogar en animalarios distintos, ya que, de esta forma, el investigador garantiza que las ratas extrañas son realmente desconocidas para los sujetos experimentales. Debido a la falta de espacio en el animalario, en este caso solo se separaron en cajas-hogar distintas, permaneciendo éstas en la misma sala.

Día 0. Habitación de los extraños.

Por cada rata que se utiliza como “extraño”, se debe realizar una habitación los días previos a la realización de la prueba (PND 31-36). Para ello, se deja en primer lugar al animal suelto por todo el aparato durante 10 minutos. A continuación, se mete en una de las jaulas, donde permanece durante 10 minutos. Por último, se mete en la otra jaula durante otros 10 minutos.

La habitación se realizó de forma que cada día durante el periodo descrito anteriormente, la ejecutase el grupo de extraños machos o de extraños hembras.

Alternando los días en los que cada grupo de extraños realizaba la habituación, en cada uno de los días realizó una de las fases de la habituación.

El aparato se limpió con alcohol al 70% cada vez que se cambiaba de animal durante el periodo de habituación.

Día 1. Ejecución de la prueba.

La realización de la prueba se llevó a cabo a lo largo de PND 37- PND 46. Esta consta de tres fases: (1) se introduce a la rata experimental en la Zona Central con las puertas hacia las zonas 1 y 2 cerradas, y se registra su movimiento durante 10 minutos. Esta fase se utiliza como habituación de la rata experimental en el aparato. (2) Se desbloquean las puertas para permitir el acceso a las zonas 1 y 2, se introduce a la primera rata extraña del mismo sexo que la rata experimental en la jaula de la Zona 1, y a continuación se coloca a la rata experimental de nuevo en la Zona Central. Se registra su movimiento durante 10 minutos. En esta fase se mide la sociabilidad de las ratas. (3) Sin sacar a la rata de la jaula de la Zona 1, se introduce a la segunda rata extraña del mismo sexo que la rata experimental en la jaula de la Zona 2, y de nuevo a la rata experimental en la Zona Central. Se registra su movimiento durante 10 minutos. La tercera fase mide la preferencia por un estímulo social novedoso.

Durante toda la ejecución de la prueba, se realizó un contrabalanceo de los animales que se usaron como extraños para cada rata experimental, de manera que no se utilizasen las mismas ratas en más de dos ensayos seguidos. Esto es relevante porque el hecho de estar en una jaula supone una situación de estrés para el animal, volviéndolas más nerviosas o agresivas. Este estado de estrés en las ratas puede, además, dar lugar a variaciones significativas en los resultados obtenidos.

También hay que tener en cuenta que al igual que en la fase de habituación, el aparato se limpió con alcohol al 70% cada vez que se cambiaba de rata experimental, para evitar que éste tenga olores, excrementos o pelos de las ratas anteriores, ya que esto podría interferir en la conducta de la rata durante la prueba.

Durante toda la ejecución de la prueba, la luz de la sala donde se llevó a cabo fue tenue y se procuró que no hubiese ruidos cerca que pudiesen distraer a los animales de su tarea.

El programa con el que se registraron los datos, Ethovision XT7, recoge gran variedad de parámetros que se pueden seleccionar dependiendo de las necesidades de la

investigación. En este caso se registraron las siguientes variables: frecuencia, duración total (s) y latencia (s) para cada una de las zonas del aparato, distancia recorrida (cm), velocidad (cm/s), velocidad angular (grado/s), duración de movimiento (s), movimiento (%), frecuencia de rearing, frecuencia de inmovilidad, duración de inmovilidad (s), frecuencia de movilidad, frecuencia de movimiento fuerte y duración de movimiento fuerte (s).

Análisis estadísticos

Se ha utilizado un ANOVA univariado para examinar las diferencias entre los datos de los distintos grupos en los Índices de Sociabilidad (SI) y el Índice de Preferencia Social Novedosa (SNI) correspondientes a las fases 2 y 3, respectivamente.

Los datos pertenecientes al control locomotor y el tiempo invertido en cada zona del aparato han sido expresados en media \pm error estándar de la media (S.E.M.) y han sido analizados mediante ANOVA univariado.

En todos los casos en los que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, se ha utilizado el test Post-Hoc de Bonferroni para comprobar las diferencias entre los grupos.

En todos los análisis se han eliminado los outliers para cada variable, se ha utilizado un valor de $\alpha = .05$ y se han realizado con el programa SPSS, Versión 24.

Resultados

1. Datos brutos

En el anexo 1 se encuentran los datos obtenidos durante el registro con Ethovision XT7. Las variables registradas son: frecuencia, duración total (s) y latencia (s) para cada una de las zonas del aparato, distancia recorrida (cm), velocidad (cm/s), velocidad angular (grado/s), duración de movimiento (s), movimiento (%), frecuencia de rearing, frecuencia de inmovilidad, duración de inmovilidad (s), frecuencia de movilidad, duración de movilidad (s), frecuencia de movimiento fuerte y duración de movimiento fuerte (s).

2. Validación del Aparato

En primer lugar, se ha realizado una validación del aparato de Crawley utilizado. Este primer análisis es fundamental para comprobar que el aparato funciona en ratas controles como debería según la literatura. Las siguientes gráficas muestran el resultado de dicho análisis sobre la duración de los grupos controles de cada sexo en las fases 2 y 3:

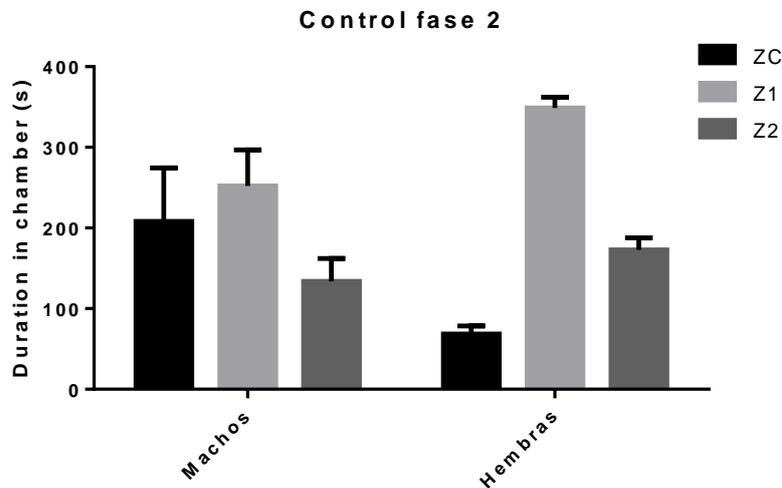


Gráfico 1. Duración en segundos en la fase 2 de los grupos controles en cada una de las zonas: Zona central (ZC), Zona 1 (Z1) y Zona 2 (Z2). Los datos han sido expresados como media \pm error estándar de la media (S.E.M.).

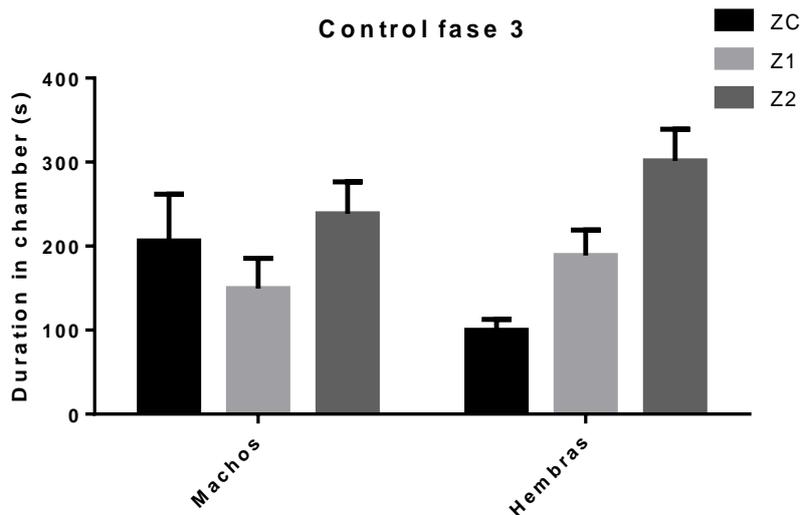


Gráfico 2. Duración en segundos en la fase 3 de los grupos controles en cada una de las zonas: Zona central (ZC), Zona 1 (Z1) y Zona 2 (Z2). Los datos han sido expresados como media \pm error estándar de la media (S.E.M.).

En ambos gráficos se muestra que tanto en machos como en hembras se sigue la distribución esperada en los grupos controles: en la fase 2 (Gráfico 1), las ratas pasan más tiempo en la zona en la que se encuentra el desconocido 1 (Z1), en comparación con el tiempo que pasan en la zona en la que la jaula está vacía (Z2). En la fase 3 (Gráfico 2), las ratas pasan más tiempo en la zona de la rata desconocida 2 (Z2) en comparación con el tiempo que pasan en la zona de la rata conocida (Z1).

3. Control locomotor

Se ha realizado un análisis del nivel motor de las ratas experimentales para comprobar que las posibles diferencias de los grupos experimentales no se deban a la falta de movimiento si no realmente porque hay o no sociabilidad o preferencia por el estímulo social novedoso.

Para ello se han comparado los resultados registrados en las variables distancia recorrida (cm), frecuencia de rearing y duración de movilidad (s) de los dos grupos experimentales con los resultados en las mismas variables para su respectivo grupo control.

Los datos de cada grupo se han expresado en media \pm S.E.M. y se han analizado mediante un ANOVA univariado ($\alpha=0.05$). Para comprobar las diferencias significativas intergrupos, se ha realizado la prueba Post-Hoc mediante el estadístico de Bonferroni.

Tabla 1.

Media \pm S.E.M. de las variables “distancia recorrida”, “rearing” y “movilidad (s)” para los tres grupos de ratas en cada una de las fases de la prueba.

FASE 1. HABITUACIÓN						
	Control	CPF	AVP	ANOVA *Tratamiento	ANOVA *Sexo	ANOVA Tratamiento*Sexo
DISTANCIA RECORRIDA	3782.5765 \pm 119.69058	3722,2067 \pm 229.06478	3939.4479 \pm 153.09478	F(2, 54)= 0.534, p=.589	F(1, 54)=4.268, p= .044*	F(2, 54)= 3.345, p= .043*
REARING	38.9444 \pm 3.42279	29.4286 \pm 3.36195	39.3000 \pm 4.40341	F(2, 53)=2.990, p= .059	F(1, 53)=10.351, p= .002*	F(2, 53)= 0.181, p= .835
MOVILIDAD (S)	382.3000 \pm 11.27132	355.333 \pm 13.07803	399.2500 \pm 13.97025	F(2, 55) = 3.366, p= .042*	F(1, 55)=4.707, p= .034*	F(2, 55)=0.649, p= .526
FASE 2. SOCIABILIDAD						
	Control	CPF	AVP	ANOVA *Tratamiento	ANOVA *Sexo	ANOVA Tratamiento*Sexo
DISTANCIA RECORRIDA	4494.2489 \pm 381.45751	4339.0295 \pm 217.45088	4856.6210 \pm 324.48632	F(2, 53)= 0.801, p= .454	F(1, 54)=2.527, p= .118	F(2, 53)=1.608, p= .210
REARING	80.6500 \pm 8.21593	60.9048 \pm 5.28966	79.3000 \pm 7.55126	F(2, 55)=2.929, p= .062	F(1, 55)=8.147, p= .006*	F(2, 55)=1.434, p= .247
MOVILIDAD (S)	418.9500 \pm 35.26684	402.8500 \pm 16.60743	451.2632 \pm 16.29639	F(2, 53)=1.212, p= .306	F(1, 53)=6.300, p= .015*	F(2, 53)=1.948, p= .153
FASE 3. PREFERENCIA SOCIAL						
	Control	CPF	AVP	ANOVA *Tratamiento	ANOVA *Sexo	ANOVA Tratamiento*Sexo
DISTANCIA RECORRIDA	3383.6040 \pm 310.15469	3340.3033 \pm 193.44723	3210.0745 \pm 257.24977	F(2, 55)=0.127, p= .881	F(1, 55)= 8.538, p= .005*	F(2, 55)=0.168, p= .846
REARING	58.7368 \pm 6.32356	43.5500 \pm 4.76582	50.8500 \pm 5.33177	F(2, 53)=3.198, p= .049*	F(1, 53)=18.375, p= .000*	F(2, 53)=0.764, p= .471
MOVILIDAD (S)	341.7500 \pm 28.73343	326.3810 \pm 21.39487	331.5263 \pm 19.31811	F(2, 54)=0.170, p= .844	F(1, 54)= 11.726, p= .001*	F(2, 54)=0.110, p= .896

*($\alpha=.05$)

En los diferentes grupos, el análisis con ANOVA univariado no ha relevado datos estadísticamente significativos en función del tratamiento (Tabla 1), salvo en la fase de habituación en la variable *movilidad (s)* [$F(2, 55) = 3.366, p = .042$] y en la variable *rearing* en la fase de preferencia por un estímulo social [$F(2, 53) = 3.198, p = .049$].

En el análisis Post-Hoc con Bonferroni para estas dos variables sólo se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Clorpirifos (CPF) y Valproato (AVP) para la variable *movilidad (s)* de la fase de habituación: CPF*AVP = .047.

4. Tiempo en cada compartimento

Se ha examinado el tiempo que ha invertido cada grupo experimental en los compartimentos del aparato en los que se encontraban las jaulas, tanto en la fase 2 (Test de Sociabilidad) como en la fase 3 (Test de Preferencia Social Novedosa).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

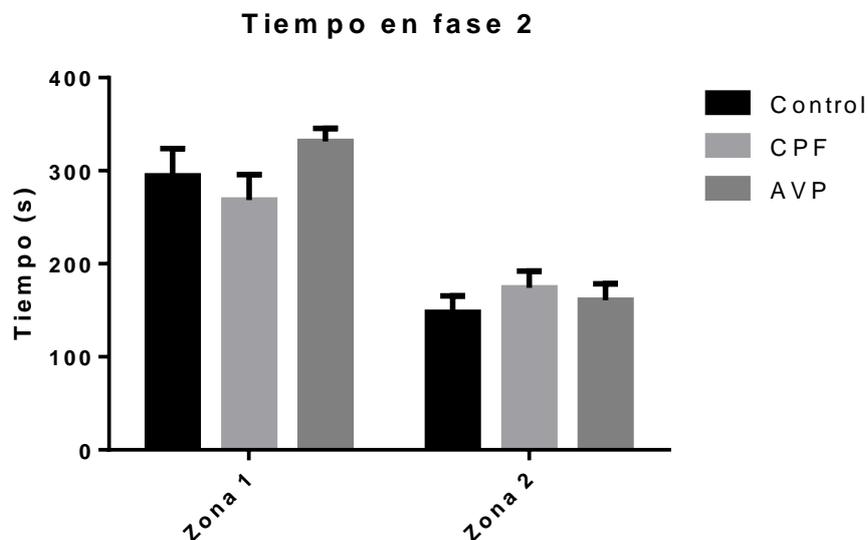


Gráfico 3. *Tiempo invertido en cada compartimento durante la fase 2 (Test de Sociabilidad) expresado en media \pm error estándar de la media (S.E.M.).*

En el gráfico 3 se observa una clara preferencia de los tres grupos experimentales por la zona del aparato en el cual se encuentra la rata desconocida 1 (Zona 1) en comparación con el tiempo que pasan en la zona donde la jaula está vacía (Zona 2).

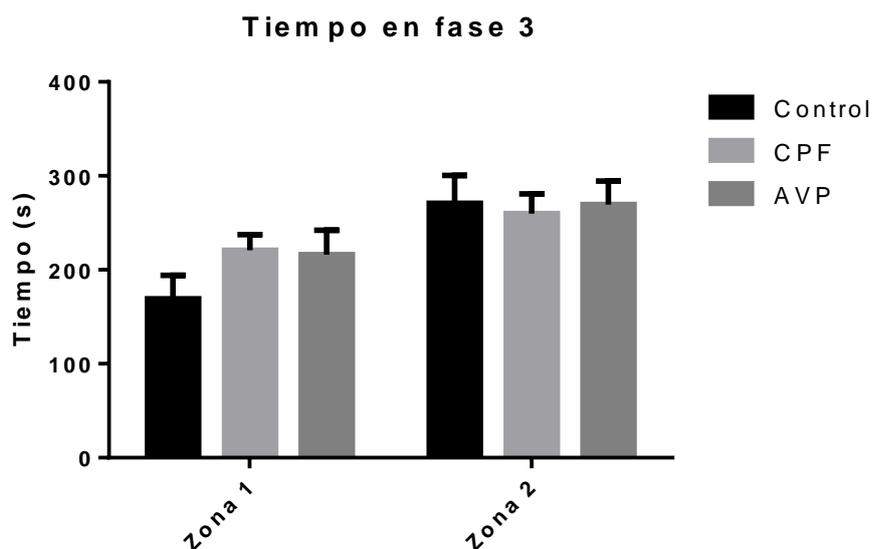


Gráfico 4. *Tiempo invertido en cada compartimento durante la fase 3 (Test de Preferencia Social Novedosa) expresado en media \pm error estándar de la media (S.E.M.).*

En el gráfico 4 se observa que en los tres grupos experimentales hay una preferencia por pasar tiempo en la zona donde se encuentra la rata desconocida 2 (Zona 2) en comparación con el tiempo invertido en la zona donde está la rata conocida (Zona 1).

En el análisis estadístico con ANOVA no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en función del tratamiento ni en la fase 2 en la Zona 1: [F(2, 57)=1,604, p= .210], en la Zona 2: [F(2, 56)= 0.543, p= .584], ni en la fase 3 en la Zona 1: [F(2, 57)=1.551, p= .221] ni en la Zona 2: [F(2, 58)= 0.058, p= .944].

5. Índice de Sociabilidad (SI) e Índice de Preferencia Social Novedosa (SNI)

Para comprobar si realmente hay o no sociabilidad, se han analizado los índices de sociabilidad (SI) y de preferencia social novedosa (SNI) para los tres grupos experimentales mediante las siguientes fórmulas (Bambini-Junior et al. 2014):

$$SI = \frac{\text{Tiempo exploración}_{\text{desconocido 1}} - \text{Tiempo exploración}_{\text{jaula vacía}}}{\text{Tiempo exploración}_{\text{desconocido 1}} + \text{Tiempo exploración}_{\text{jaula vacía}}}$$

$$SNI = \frac{\text{Tiempo exploración}_{\text{desconocido 2}} - \text{Tiempo exploración}_{\text{conocido 1}}}{\text{Tiempo exploración}_{\text{desconocido 2}} + \text{Tiempo exploración}_{\text{conocido 1}}}$$

El Índice de Sociabilidad (SI) se define como la ratio entre la duración en la zona de la rata desconocida 1 y la duración en la zona vacía, mientras que el Índice de Preferencia Social Novedosa (SNI) se define como la ratio entre la duración en la zona de la rata conocida y la duración en la zona de la rata desconocida 2. Para ambos índices, los rangos de los resultados se mueven entre -1 y 1. Cuanto más se acerque el resultado a 1, mayor será la sociabilidad (en SI) o mayor interés mostrará por el estímulo social novedoso (en SNI) (Kim et al. 2011).

En el caso del protocolo de la prueba de Crawley utilizado en este estudio, el Índice de Sociabilidad (SI) corresponde a los datos obtenidos en la fase 2, mientras que el Índice de Preferencia Social Novedosa (SNI) corresponde a los datos de la fase 3.

Los resultados para ambos índices en función del tratamiento son los siguientes:

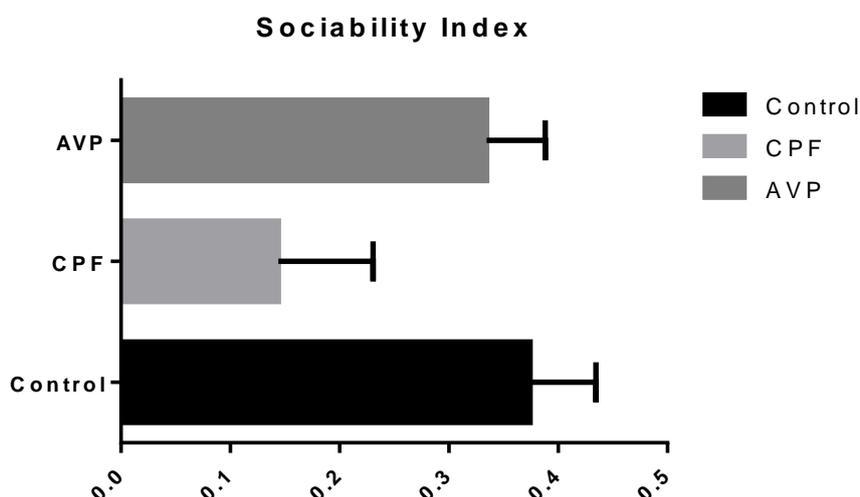


Gráfico 5. Índice de Sociabilidad (SI) en función del tratamiento. Los datos han sido expresados como media \pm error estándar de la media (S.E.M.).

En el Gráfico 5 se observa una disminución de la sociabilidad del grupo Clorpirifos (CPF), mientras que el grupo Valproato (AVP) se mantiene similar al grupo Control.

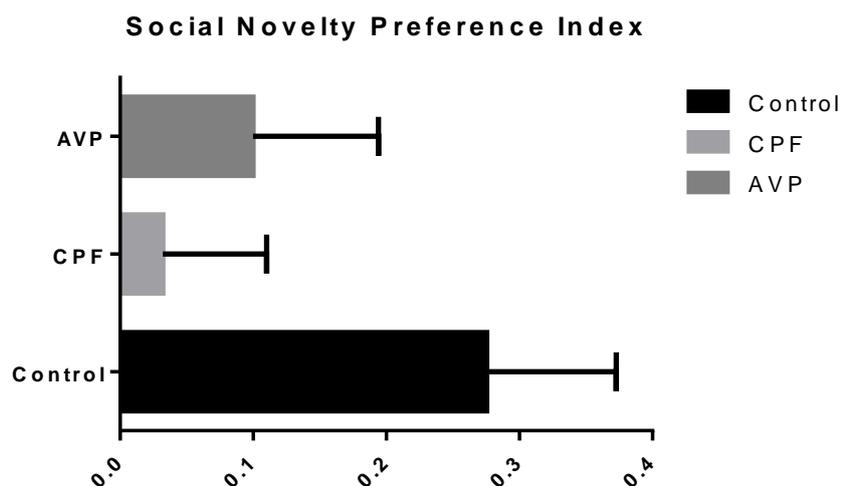


Gráfico 6. Índice de Preferencia Social Novedosa (SNI) en función del tratamiento. Los datos han sido expresados como media \pm error estándar de la media (S.E.M.).

En el Gráfico 6 se observa una clara disminución del interés por estímulo social novedoso (rata desconocida 2) en los dos grupos experimentales (CPF y AVP) respecto al resultado del grupo Control.

Tras analizar los datos obtenidos en ambos índices mediante una ANOVA univariado, ninguno de los grupos experimentales ha mostrado diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento ni en el Test de Sociabilidad (Fase 2): [F(2, 53)= 3.177, p= .050] ni en el Test de Preferencia Social Novedosa (Fase 3): [F(2, 53)= 1.897, p= .160].

6. Control de la maduración

Se ha realizado un estudio del nivel de maduración de las ratas experimentales en función del peso (g) de los animales en el periodo de tiempo en el que se llevó a cabo la prueba de Crawley (PND 37 - 48), más concretamente en los días: PND 30, PND 38 y PND 45. Estos datos han sido analizados en comparación con su respectivo grupo control para comprobar que no existe ningún tipo de retraso en la maduración que pudiese alterar los resultados obtenidos en los Test de Sociabilidad y Preferencia Social Novedosa.

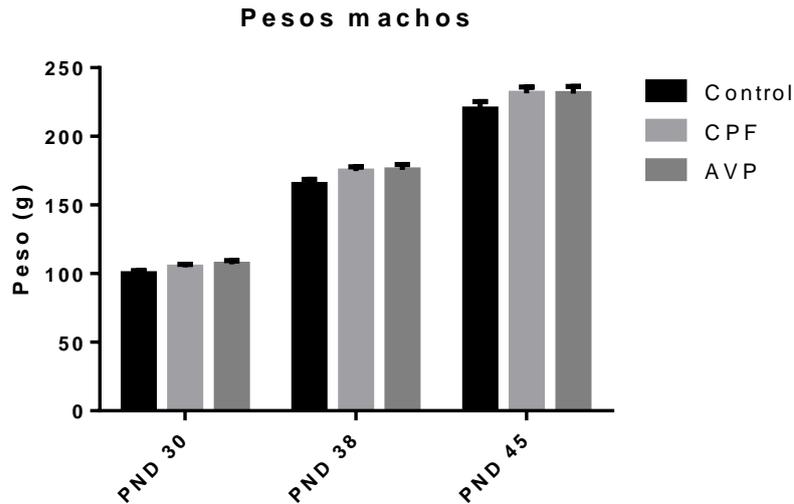


Gráfico 7. Medias de los pesos en los días postnatales 30, 38 y 45 de las ratas macho en función del tratamiento. Los datos han sido expresados como media \pm error estándar de la media (S.E.M.).

En el Gráfico 7 se observa un aumento de peso progresivo en las ratas macho similar en los dos grupos experimentales (CPF y AVP) con respecto al grupo control.

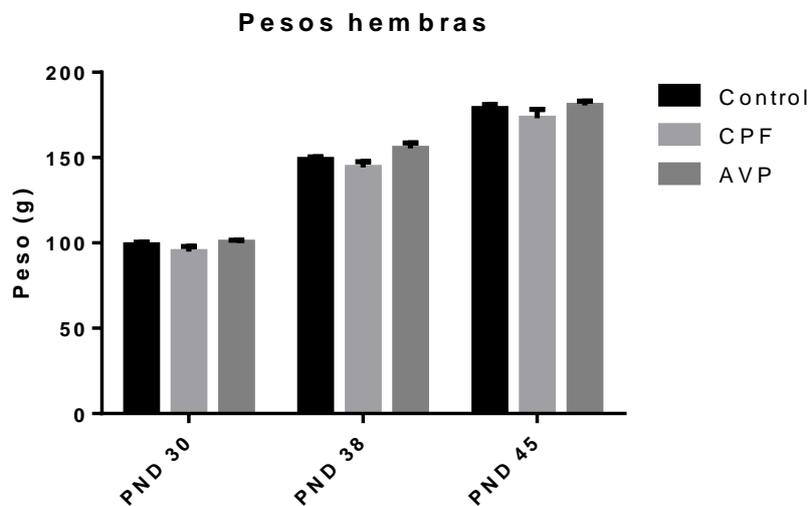


Gráfico 8. Medias de los pesos en los días postnatales 30, 38 y 45 de las ratas hembra en función del tratamiento. Los datos han sido expresados como media \pm error estándar de la media (S.E.M.).

Al igual que sucede en los machos, en el Gráfico 8 se observa que el aumento de peso de las hembras se desarrolla de manera progresiva y similar en los grupos experimentales (CPF y AVP) y en el grupo control.

Discusión

En primer lugar, los resultados de la validación del aparato indican que el aparato utilizado en este estudio funciona correctamente, obteniendo resultados, tanto en la fase 2 como en la fase 3, en ratas controles que coinciden con los descritos en la literatura. Las ratas controles pasan más tiempo durante la fase 2 en la zona de la rata desconocida 1 (Z1) en comparación con el tiempo que pasan en la zona donde se encuentra la jaula vacía (Z2). Por otro lado, en la fase 3, las ratas controles invierten más tiempo con la rata desconocida 2 (Z2) que con la rata conocida 1 (Z1).

De esta forma se descarta que las alteraciones que pudiesen darse en los resultados de los índices de sociabilidad se deban a un mal funcionamiento del aparato.

Los apartados 3 (Control locomotor) y 6 (Control de la maduración) de los resultados han sido analizados para comprobar que los resultados de los índices de Sociabilidad y de Preferencia Social Novedosa no han sido afectados por otras variables.

En el caso del control locomotor, los datos que han revelado mayores diferencias estadísticamente significativas son en función del sexo. Puesto que los índices de Sociabilidad y de Preferencia Social Novedosa no se han analizado diferenciando ambos sexos, el hecho de que existan diferencias en la movilidad de los machos y de las hembras no es relevante para este estudio.

En cuanto al análisis en función del tratamiento, solo se obtuvo un dato estadísticamente significativo en la variable *movilidad (s)* - [$F(2, 55) = 3.366, p = .042$] – de la fase de habituación. En este caso, el análisis Post-Hoc reveló que las diferencias significativas se encuentran entre los grupos Clorpirifos y Valproato.

Al no hallar diferencias significativas en la movilidad de los grupos experimentales con respecto al grupo control, se puede descartar la posibilidad de que los índices de sociabilidad hayan sido afectados por esta variable.

La última variable analizada es el peso de las ratas antes y durante el desarrollo de la prueba de Crawley. Tanto los machos como las hembras siguen un desarrollo de la maduración normal respecto a su grupo control, aumentando de peso de manera progresiva conforme avanza el tiempo.

Los resultados obtenidos en los índices de Sociabilidad (SI) y de Preferencia Social Novedosa (SNI), indican que ni el grupo Clorpirifos ni el grupo Valproato muestran una alteración de la sociabilidad significativa respecto al grupo control cuando se les administra dichas sustancias de forma prenatal en las cantidades descritas anteriormente.

Estos datos han sido corroborados también con el análisis de la media de tiempo (s) que invierte cada grupo en las zonas 1 y 2 durante las fases 2 y 3 de la prueba. Éstos confirman el hecho de que, en ambas fases, los grupos experimentales pasan aproximadamente el mismo tiempo en las zonas 1 y 2 que el grupo control, indicando que no existen diferencias en la sociabilidad entre los distintos grupos.

Los resultados obtenidos aquí, no se ajustan a los encontrados en muchos otros estudios que utilizaron dosis y edades de los animales similares. Algunos de estos estudios son, por ejemplo, los realizados por Kim et al. en 2011, en el que hallaron una ausencia de la sociabilidad y de la preferencia social novedosa en ratas Sprague-Dawley a las que se les había administrado 400mg/Kg de AVP en el GD12 o en su estudio posterior en 2014 en el que encontraron de nuevo una ausencia de la sociabilidad en ratas expuestas a las mismas condiciones anteriormente descritas. Otros estudios como los realizados por Kataoka et al. en 2013, encontraron disminuciones de las interacciones sociales y de la actividad locomotora en ratones ICR CD-1 expuestos a 500mg/Kg en el GD 12.5.

En cuanto a los resultados del grupo Clorpirifos, tampoco se ajustan a los descritos en la literatura por autores como, por ejemplo, Lan et al. en 2017 y en 2019, quienes encontraron una disminución de la sociabilidad de ratones expuestos a CPF durante el periodo gestacional (5mg/Kg en GD12-15).

Conclusiones

La discrepancia de estos resultados respecto a los ya publicados por diferentes autores, no permite confirmar que el protocolo aquí utilizado sea realmente válido para comprobar la existencia de comportamientos pertenecientes al Síndrome del Espectro Autista en ratas Wistar adolescentes que fueron expuestas de forma gestacional a Clorpirifos y Ácido Valproico en dosis de 1mg/Kg (GD12-15) y 400mg/Kg (GD12.5) respetivamente.

Como posibles continuaciones o mejoras de este estudio, los resultados aquí obtenidos podrían contrastarse con los datos de la prueba de Crawley de las mismas ratas cuando ya son adultas, para comprobar si existen diferencias en la sociabilidad a medida que pasa el tiempo. También podría ampliarse con un estudio de otras pruebas conductuales, como el registro de vocalizaciones en neonatos (USV) o el análisis de ciertos parámetros bioquímicos, como el análisis de las Colinesterasas y la Acetilcolinesterasa, que podría ayudar a concluir si biológicamente existen diferencias entre el grupo control y los grupos experimentales.

Referencias

- Arberas, C, Ruggieri, V. (2019). Autismo. Aspectos genéticos y biológicos. *Medicina. Buenos Aires*. 79 (Supl. I) 16-21.
- Bambini-Junior, V., Zanatta, G., Nunes, G.D., Melo, G.M., & Gottfried, C. (2014). Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. *Neuroscience Letters*, 583, 176-181.
- Chambers, H.W. (1992). Organophosphorus compounds; An overview. In *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects* (J. Chambers and P. Levi, Ed.). Academic Press, New York, pp. 11–12.
- Chomiak, T., Turner, N., & Hu, B. (2013). What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid. *Pathology research international*.
- Crawley, J.N. (2004). Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 10 4, 248-58.
- David L. Eaton, Robert B. Daroff, Herman Atrup, James Bridges, Patricia Buffler, Lucio G. Costa, Joseph Coyle, Guy McKhann, William C. Mobley, Lynn Nadel, Diether Neubert, Rolf Schulte-Hermann & Peter S. Spencer (2008). *Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment*, *Critical Reviews in Toxicology*, 38:sup2, 1-125, DOI: 10.1080/10408440802272158.
- Díaz-Anzaldúa, A., & Díaz-Martínez, A. (2013). [Genetic, environmental, and epigenetic contribution to the susceptibility to autism spectrum disorders]. *Revista de neurologia*, 57 12, 556-68.
- Dufour-Rainfray D., Vourc'h P., Tourlet S., Guilloteau D., Chalon S., and Andres C.R. (2011) "Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism", *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 35, no. 5, pp. 1254-1265.
- Elsabbagh M, Divan G, Koh YJ, et al. (2012). Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders. *Autism Res*; 5: 160-79.
- Hamilton, S.M., Green, J.R., Veeraragavan, S., Yuva, L.A., McCoy, A.M., Wu, Y., Warren, J., Little, L., Ji, D., Cui, X., Weinstein, E.J., & Paylor, R.E. (2014). Fmr1 and

- Nlgn3 knockout rats: novel tools for investigating autism spectrum disorders. *Behavioral neuroscience*, 128 2, 103-9.
- Icenogle, L.M., Christopher, N.C., Blackwelder, W.P., Caldwell, D.P., Qiao, D., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., & Levin, E.D. (2004). Behavioral alterations in adolescent and adult rats caused by a brief subtoxic exposure to chlorpyrifos during neurulation. *Neurotoxicology and teratology*, 26 1, 95-101.
- Kataoka, S., Takuma, K., Hara, Y., Maeda, Y., Ago, Y., Matsuda, T., 2013. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 91-103.
- Kim, K.C., Kim, P., Go, H.S., Choi, C.S., Yang, S.I., Cheong, J.H., Shin, C.Y., Ko, K.H., 2011. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats, *Toxicol. Lett.* 201, 137-142.
- Kim, K.C., Lee, D.K., Go, H.S., Kim, P., Choi, C.S., Kim, J.W., Jeon, S.J., Song, M.R., Shin, C.Y., 2014a. Pax6-dependent cortical glutamatergic neuronal differentiation regulates autism-like behavior in prenatally valproic acid-exposed rat offspring. *Mol. Neurobiol.* 49, 512-528.
- Lan, A., Kalimian, M., Amram, B. & Kofman, O. (2017). Prenatal chlorpyrifos leads to autism-like deficits in C57Bl6/J mice. *Environmental health*.
- Lan, A., Stein, D.J., Portillo, M.M., Toiber, D., & Kofman, O. (2019). Impaired innate and conditioned social behavior in adult C57Bl6/J mice prenatally exposed to chlorpyrifos. *Behavioral and Brain Functions*.
- Levin, E.D., Addy, N., Baruah, A., Elias, A., Christopher, N.C., Seidler, F.J., and Slotkin, T.A. (2002). Prenatal chlorpyrifos exposure in rats causes persistent behavioral alterations. *Neurotoxicology and Teratology* 24, 733-741.
- Martínez-Morga M, Quesada-Rico MP, Bueno C, Martínez S. (2019). Bases neurobiológicas del autismo y modelos celulares para su estudio experimental. *Medicina (Buenos Aires)* 79 (Supl. 1), 27-32
- McNaughton, C.H., Moon, J., Strawderman, M.S., Maclean, K.N., Evans, J.T., & Strupp, B.J. (2008). Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Behavioral neuroscience*, 122 2, 293-300.

- Rauh, V.A., Garfinkel, R., Perera, F., Andrews, H.F., Hoepner, L.A., Barr, D.B., Whitehead, R.D., Tang, D., & Whyatt, R.W. (2006). Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics*, *118* 6, e1845-59.
- Ricceri, L., Markina, N., Valanzano, A., Fortuna, S., Cometa, M.F., 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.
- Ricceri, L., Venerosi, A., Capone, F., Cometa, M.F., Lorenzini, P., Fortuna, S., and Calamandrei, G. (2006). Developmental neurotoxicity of organophosphorous pesticides: Fetal and neonatal exposure to chlorpyrifos alters sex-specific behaviors at adulthood in mice. *Toxicological Sciences*. *93*:105–113.
- Tian, Y., Yang, C., Shang, S., Cai, Y., Deng, X., Zhang, J.W., Shao, F., Zhu, D., Liu, Y., Chen, G., Liang, J., Sun, Q., Qiu, Z., & Zhang, C. (2017). Loss of FMRP Impaired Hippocampal Long-Term Plasticity and Spatial Learning in Rats. *Front. Mol. Neurosci*.

Anexo 1. Datos brutos del Test de Crawley

ID	Tratamiento	Sexo	Fase	Zona central	Zona central	Zona central	Desconocido 2	Desconocido 2	Desconocido 2	Desconocido 1	Desconocido 1	Desconocido 1	Zona 1	Zona 1	Zona 1	Zona 2	Zona 2	Zona 2	Distance moved (cm)	Velocity (cm/s)	Angular velocity (degrees/s)	Movement (Moving)	Movement (Moving)	Rearing	Mobility (Immobile)	Mobility (Immobile)	Mobility (Mobile)	Mobility (Mobile)	Mobility (Strong mobile)	Mobility (Strong mobile)
				Frequency	Total duration (s)	Latency of first	Frequency	Total duration (s)	Latency of first	Frequency	Total duration (s)	Latency of first	Frequency	Total duration (s)	Latency of first	Frequency	Total duration (s)	Latency of first												
FS369	2	1	1	3	598,2	1,4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3538,31	5,91	-77,07	392,8	65,47	45	292	368,2	363	203,2	88	27
FS369	2	1	2	12	64,4	2	14	147,6	12	21	205,8	277,6	25	82,6	277	22	93,4	10,2	4076,3	6,84	-70,66	444,6	74,1	93	359	303,2	489	234,8	195	57,6
FS369	2	1	3	15	84,4	4,2	8	123	26,6	17	239,8	68,8	23	47	68	15	98,8	8,6	3613,55	6,12	-97,98	414,4	69,07	101	308	321	443	222,2	173	47,4
FS370	3	1	1	11	251,6	4,8	0	-	-	24	173	214,6	36	168,2	201,8	0	-	-	5540,64	9,33	-57,96	480,6	80,1	99	325	270	523	241,8	244	82
FS370	3	1	2	20	55	4,6	15	65,2	157,6	15	277,4	19,4	23	55	19,2	30	136,6	4,4	4696,12	7,94	-78,52	437,2	72,87	99	286	303	441	214	217	74,2
FS370	3	1	3	9	43,4	4	8	189,2	16,6	15	245,6	252,2	18	77,6	251,8	10	39	15,6	2279,44	3,83	-151,86	276	46	66	212	432,4	269	137	97	25,2
FS382	3	1	1	4	594,4	5	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	0,2	4,8	3359,33	5,66	-90,34	389,2	64,87	40	282	376,6	364	182,6	103	34,2
FS382	3	1	2	13	56	4,6	10	59,6	93,8	25	304,4	32,4	31	106,6	25	15	66,6	93,2	5582,04	9,42	-73,8	469,4	78,23	130	349	258,6	533	234,4	235	99,6
FS382	3	1	3	14	52	3,8	17	223,6	39	10	136,8	11	20	97,4	10	19	82,6	38,6	3253,33	5,48	-99,25	391,2	65,2	84	306	356,6	382	195,8	143	40,8

FS38 1	1	1	1	2	595	4,8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	4054,9 5	6,82	- 74,97	468,6	78,1	63	35 1	316, 8	43 9	241, 8	114	36	
FS38 1	1	1	2	20	59	4,4	14	65	210, 2	28	302	17	40	101, 6	16	21	65,4	208, 2	5541,2	9,4	-62,4	461,2	76,87	11 5	33 9	271, 6	53 3	222, 2	260	95,6
FS38 1	1	1	3	14	75	4,8	11	239, 2	20	12	130, 6	17,6	17	57,2	10	16	88	4,6	3562,8 3	6,01	-70,2	407,4	67,9	83	36 2	342, 6	46 3	210, 8	135	39,6
FS36 8	1	1	1	3	596, 6	2,8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	0,4	3,2	3711,6 6	6,22	- 71,63	382,4	63,73	21	26 8	391, 4	34 7	181	85	24,6
FS36 8	1	1	2	12	107, 6	3,6	14	83,4	93,6	17	273	239, 2	23	55,6	234, 6	21	75,2	84,4	4559,1	7,65	- 76,32	429,2	71,53	78	31 3	330, 2	44 6	216, 6	165	49,4
FS36 8	1	1	3	10	114, 6	3,2	9	236	82,6	5	155, 8	379, 8	7	14,8	181, 4	14	73,6	81,6	2062,4 5	3,48	- 153,1 5	244,6	40,77	32	16 6	482	21 1	98,2	48	11,8
FS37 1	1	1	1	6	595, 2	3,2	2	0,4	9,8	2	0,8	21	1	0,2	20,8	0	-	-	4170,9 3	6,99	- 49,02	454,2	75,7	40	33 9	363, 2	40 1	211, 8	70	21,6
FS37 1	1	1	2	26	85,8	3,6	17	153	43,4	13	235, 6	13,8	30	74,2	10,4	28	44,2	42,6	5387,2 8	9,04	- 78,91	453,8	75,63	79	29 8	312	45 5	216, 8	194	67,4
FS37 1	1	1	3	18	145, 8	3,2	26	246, 8	7,2	6	81,4	217	12	31,2	43,4	37	87,8	6,8	4188,6 7	7,02	- 85,49	426,6	71,1	69	30 7	360	40 8	207, 2	115	29,4
FS39 3	3	1	1	1	597	3	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4095,9 7	6,86	-89	460,4	76,73	24	34 8	352, 8	42 5	221, 6	85	22,4
FS39 3	3	1	2	30	89	3	24	73,8	12	20	226, 2	149, 6	32	101, 4	148, 4	43	103, 6	11,2	6762,0 6	11,3 3	- 74,25	496,8	82,8	10 0	33 4	257	52 2	257, 4	240	82,4
FS39 3	3	1	3	23	119, 6	2,8	36	127, 2	10,4	11	153, 8	96,2	18	45,8	95,6	51	146, 8	10	4481,2 9	7,51	- 84,85	434,8	72,47	60	31 7	349, 4	42 6	209, 4	144	38,2
FS39 4	1	1	1	1	597, 2	2,8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4212,7 3	7,05	- 72,42	466,8	77,8	28	34 5	359, 4	41 4	214, 4	84	23,4
FS39 4	1	1	2	27	82,4	2,4	17	104	118, 2	22	245, 6	8,6	38	85,2	7,8	26	78,2	85,6	6003,0 7	10,0 5	- 66,21	490,6	81,77	87	34 6	281, 6	52 0	241	214	74,8
FS39 4	1	1	3	1	597, 2	2,8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	719,56	1,21	- 285,6 2	96,8	16,13	9	65	572, 6	68	22,6	6	1,8

FS380	2	1	1	1	597,2	2,8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2798,41	4,69	-	127,03	329,2	54,87	10	230	436,2	264	148,6	37	12,2
FS380	2	1	2	16	113,4	2,6	18	117,8	13,8	23	220,8	47	32	89	45,2	27	53,4	12,8	4808,63	8,05	-	68,27	447,2	74,53	65	294	317,4	411	241,4	139	38,4
FS380	2	1	3	7	64	2,2	23	339,4	9,6	1	23	577	2	67	2	31	102,6	9	2869,13	4,8	-	125,7	336,6	56,1	33	237	421,2	275	164,6	48	12
FS383	1	1	1	1	597	3	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4256,26	7,13	-	75,93	440,2	73,37	29	307	374	381	196,8	86	26
FS383	1	1	2	21	59	2,6	19	225,4	42,6	13	168,6	9,6	22	65	8,8	29	73,8	41,6	5033,81	8,43	-	75,25	407,8	67,97	81	300	346,4	438	192	169	58,8
FS383	1	1	3	14	80	2,8	16	176,4	140,6	8	137,8	9	17	69,4	8,6	22	129,6	109	3041,25	5,09	-	113,28	340,4	56,73	44	281	419,6	332	155,8	78	21,6
FS395	2	1	1	1	597,4	2,6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3459,91	5,79	-	80,75	433,2	72,2	22	313	397,6	344	189,6	31	10
FS395	2	1	2	11	86,2	2,4	14	97	319,6	20	256,8	48	27	102,2	45,8	19	53,8	317,2	4012,6	6,72	-	62,35	421,2	70,2	61	298	373,2	392	198	107	26,2
FS395	2	1	3	3	255,4	2,6	4	34,6	560	4	235,6	56	5	61,6	6,8	6	8,8	328	1038	1,74	-	258,81	153,8	25,63	7	86	557,6	90	38	6	1,6
FS399	1	1	1	1	594,6	5,4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2906,21	4,89	-	98,83	374,4	62,4	28	315	424,6	341	162,4	31	7,4
FS399	1	1	2	1	571,6	4,6	0	-	-	3	19,4	578,6	3	4,4	576,2	0	-	-	782,98	1,32	-	261,13	103,6	17,27	4	53	568	55	25,8	4	1,4
FS399	1	1	3	14	110,8	4,4	17	163	0	13	162,8	76,8	18	77,2	70,8	24	84,8	36,8	4752,92	7,98	-	73,58	439,2	73,2	69	321	334,2	429	228	123	33,4
FS397	2	1	1	1	594,8	5,2	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2446,55	4,11	-	107,33	349,4	58,23	10	261	458,8	278	131,6	20	4,2
FS397	2	1	2	12	72,4	5,4	23	189,6	18,4	6	91,6	482,8	7	26	480,2	34	209,2	17,2	3516,89	5,92	-	71,4	416,6	69,43	45	329	380,4	358	202,8	49	11,2
FS397	2	1	3	14	100	5,2	14	155,6	11,8	8	164,6	95	17	83	93,8	22	85,6	11,4	3381,99	5,69	-	71,86	403,6	67,27	39	286	392,2	321	192,8	44	9,6

FS42 0	3	1	1	3	593, 4	6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4166,2 5	7,02	- 94,02	482	80,33	28	42 6	335	48 3	243, 8	67	15
FS42 0	3	1	2	30	87	5, 8	7	43,6	151	26	249, 6	2,2	46	149, 2	12,8	19	64,2	23,4	6309,7	10,6 2	- 66,73	495,2	82,53	78	32 8	270, 6	50 0	263, 8	206	59,6
FS42 0	3	1	3	15	163, 2	7, 2	6	172, 8	133, 4	9	90,6	16,2	16	138, 4	13,6	10	26,4	130, 2	3343,9 5	5,64	- 114,7 4	349,6	58,27	42	26 8	413, 6	32 1	162	70	17
FS42 1	1	1	1	1	593, 2	6, 8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2416,4 8	4,08	-124	359	59,83	7	22 7	455, 6	24 0	132, 8	18	4,6
FS42 1	1	1	2	1	597, 4	2, 6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1259,1 9	2,11	- 308,1 2	207	34,5	4	53	559, 6	58	35,8	7	1,8
FS42 1	1	1	3	7	45	2, 8	9	103, 2	449, 6	18	257, 6	26,8	23	155, 8	24,8	10	35,6	447, 6	3238,4 4	5,42	- 105,0 1	418,2	69,7	27	25 8	395, 4	29 4	192	44	9,6
FS43 6	3	1	1	1	594, 6	5, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3070,8 1	5,17	- 97,49	440	73,33	18	31 7	390, 6	32 6	201, 2	13	2,6
FS43 6	3	1	2	12	252	5, 8	12	42,2	235, 2	17	185, 6	3,8	20	69,8	312, 6	20	45	232, 8	3557,7 4	5,98	- 100,8 4	381	63,5	39	24 0	402, 8	30 3	175, 6	76	16,6
FS43 6	3	1	3	7	338	5, 8	3	114, 4	409, 4	4	82,2	308, 2	8	13	306, 8	7	46	332, 6	1874,5 2	3,16	- 166,4 1	258,6	43,1	16	16 3	487, 8	17 9	102	21	4,2
FS43 7	1	1	1	2	595	4, 8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3611,5 1	6,07	- 127,5 2	429,4	71,57	18	29 6	395	34 2	187	55	13
FS43 7	1	1	2	15	58,8	5, 6	13	93	15,8	15	295, 2	46,8	23	83,2	44,8	20	63	15	4699,6 9	7,91	-82,3	450,2	75,03	66	32 4	333	44 4	226, 6	134	34,6
FS43 7	1	1	3	12	193, 2	2, 6	9	79	35,8	1	6,6	270	6	14,6	116, 2	20	302, 4	5,8	3016,3 3	5,05	- 127,5 6	391	65,17	29	27 3	422, 4	31 0	163, 4	42	11,4
FS39 6	2	1	1	1	535, 8	2, 8	8	46,8	541, 6	0	-	-	0	-	-	8	14,4	538, 8	3773,5 1	6,32	- 87,36	450,2	75,03	36	34 0	387, 4	37 8	198, 8	46	10,8
FS39 6	2	1	2	12	91,2	3	7	78,8	183, 8	15	291, 6	21,8	24	113, 2	16	11	20,8	181, 6	3750,1 7	6,28	- 88,64	387,2	64,53	56	28 5	395, 2	36 7	176, 4	101	25,2
FS39 6	2	1	3	5	67,4	3	42	265, 6	27,2	12	88,6	341, 4	14	59,8	318, 8	44	114, 8	14,2	2104,8 9	3,53	- 144,5 6	259,4	43,23	24	19 1	492, 4	21 2	97,2	26	7,2

FS39 8	3	1	1	11	592, 6	3	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2	0,4	296, 2	5075,5 7	8,5	- 54,89	509,4	84,9	32	38 4	321, 8	45 7	251, 6	86	23,4
FS39 8	3	1	2	10	101, 6	2, 8	11	157, 4	52,2	21	186, 8	235, 2	25	85,6	233, 8	17	64,4	45,4	4486,5 4	7,52	- 72,97	439,8	73,3	63	33 5	349, 8	43 6	217, 6	120	29,6
FS39 8	3	1	3	9	106	2, 8	27	340, 4	13,6	2	22,6	426, 2	7	63,6	76,2	30	62,8	13	2192,8 6	3,67	- 131,8 5	276,6	46,1	22	17 9	492, 2	19 9	98,8	24	6
FS42 2	2	1	1	1	595	5	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3387,9 5	5,7	- 70,88	436,6	72,77	21	35 0	382, 8	36 9	207, 4	20	4,6
FS42 2	2	1	2	11	148, 8	5	12	128, 6	297, 6	18	188, 2	114, 2	24	77,8	111	16	50,8	291, 6	4248,8 4	7,14	- 67,64	423,8	70,63	43	28 4	363, 2	35 6	213	81	18,6
FS42 2	2	1	3	12	44,8	5	13	160, 6	13,8	17	251, 8	221, 6	22	84,8	8,8	21	51,2	13	2956,5 2	4,97	- 107,1 9	326,4	54,4	33	20 5	439, 2	23 3	148, 4	31	7,2
FS42 3	2	1	1	1	594	6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	6	0	3511,1 4	5,85	- 79,04	453,6	75,6	22	34 5	409, 4	36 9	184, 4	27	6
FS42 3	2	1	2	10	109	7, 4	12	71,4	391, 6	18	279	101, 4	23	77,6	100, 6	16	54,8	376, 4	4054,2 5	6,84	- 66,54	375,2	62,53	52	26 4	390, 6	35 2	177, 8	103	24
FS42 3	2	1	3	23	135, 6	6, 8	27	187, 4	5,4	6	46	145, 4	15	41,2	144, 6	37	179	13	4372,3 4	7,37	- 65,62	428,2	71,37	46	28 6	376, 4	34 5	200, 2	77	16,6
FS43 8	2	1	1	1	592, 6	7, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2	7,2	0	2920,3 1	4,87	- 72,89	364,6	60,77	10	28 2	430, 4	30 0	164, 4	22	5
FS43 8	2	1	2	15	54,2	6, 4	11	123, 6	344, 4	18	265	15,8	29	95,2	14	15	54,8	343	4311,9 3	7,27	- 57,94	453,2	75,53	33	32 0	356, 4	37 4	220, 2	70	16,8
FS43 8	2	1	3	14	119, 2	6, 6	9	110	215, 2	11	147	16,4	18	149, 6	11,2	17	66,6	213, 4	3951,2 8	6,66	-80,7	403,6	67,27	29	30 1	390, 6	36 3	180, 2	78	22,4
FS43 9	2	1	1	1	593, 2	6, 8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	4,8	2	2711,0 9	4,57	- 88,57	385,4	64,23	13	30 4	443, 2	31 2	146, 6	13	3,2
FS43 9	2	1	2	1	593	7	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	400,54	0,68	- 242,0 4	59	9,83	2	33	583	33	9,2	2	0,6
FS43 9	2	1	3	7	117	5	21	243	111, 4	5	109, 6	448, 6	7	28,6	447, 4	25	96	109, 6	3740,9 8	6,29	- 76,34	395,2	65,87	37	26 9	401, 8	33 4	175, 4	72	17,6

FS460	2	1	1	1	593,4	6,6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2992,9	5,04	-90,33	396,8	66,13	11	304	401,8	322	186,4	19	5,2
FS460	2	1	2	13	77,2	4,8	12	98	102,4	18	324,2	30,4	25	59	29,4	16	35,6	96,6	3849,88	6,47	-65,43	407,6	67,93	45	273	368,8	334	210,6	72	15,6
FS460	2	1	3	5	60,4	7	43	368	3,6	6	32,4	189,4	8	45,8	168,6	45	89,4	27,2	2521,54	4,24	-123,94	304,8	50,8	20	208	446,8	220	144,2	14	3,2
FS461	3	1	1	1	594,2	5,8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	4,8	1	3325,14	5,59	-93,35	390,2	65,03	12	271	409,6	301	176,8	36	8
FS461	3	1	2	10	215,6	5	10	41,6	507,6	20	220,2	188	26	79	185,8	12	36,8	503,6	3658,54	6,15	-93,01	413,8	68,97	29	262	389,6	319	190,4	63	14,8
FS461	3	1	3	12	121,6	5	15	111,2	49,4	7	200,6	139,4	12	52,4	137	23	107	48,6	2817,57	4,74	-75,37	386,4	64,4	23	294	412,8	307	178,4	16	3,6
FS462	3	1	1	1	593,6	6,4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2	6,2	0	3410,38	5,69	-80,35	411,8	68,63	18	303	402,8	324	191	29	6
FS462	3	1	2	13	61,4	5	7	90	230,8	16	346,2	31,6	24	56,8	30	11	38,2	226	3829,18	6,44	-83,4	426	71	34	270	368,8	328	210,6	66	15,4
FS462	3	1	3	7	34,8	4,8	9	269,8	11,2	11	238,8	187	14	24,4	186,2	12	26,8	10,6	1997,36	3,36	-121,57	232,6	38,77	13	153	489	168	102	19	4
FS463	1	1	1	1	593,6	6,4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3382,9	5,64	-90,5	461	76,83	17	342	391,4	358	203,8	19	4,6
FS463	1	1	2	13	117	6,6	13	72,8	90,6	13	277,8	57,8	22	77,6	49,8	16	46,6	88,8	3764,07	6,35	-91,97	421,8	70,3	32	280	383,2	327	198,2	52	11,8
FS463	1	1	3	12	146,6	5,4	15	134,8	14,6	10	208,8	34,4	14	51,4	27,2	22	52	14,2	3442,43	5,79	-79,4	403,6	67,27	19	270	403,8	295	183,4	30	7,2
FS387	3	1	1	1	594,6	5,4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4039,18	6,8	-66,41	434	72,33	43	351	356	399	222,4	61	16
FS387	3	1	2	15	100,8	6,4	14	76,6	193,2	32	220,4	13,6	40	125	10,8	21	69,6	190,2	5102,23	8,6	-53,99	467,8	77,97	88	342	301,6	476	243,4	166	48,4
FS387	3	1	3	10	77	7,4	20	223	29,2	16	93,2	120,8	20	65,2	113,4	26	130	23,6	3385,26	5,71	-89,17	387,2	64,53	62	289	391,2	356	178,6	88	22,6

FS41 9	3	1	1	1	593,8	6,2	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3867,5 9	6,52	-53,3	409,6	68,27	30	27 1	377, 2	32 2	201, 2	57	15,2
FS41 9	3	1	2	20	64,8	6,4	16	98,6	303, 8	27	260	28,6	39	123, 8	26	22	44,4	296	5363,5 7	9,04	-51,9	445,8	74,3	92	33 0	300, 4	50 9	226, 8	218	66,2
FS41 9	3	1	3	14	59	7,8	24	190, 8	15	8	171, 6	44,2	14	35,8	43,6	31	132, 6	13,8	3494,3	5,9	- 65,92	382,8	63,8	49	28 4	394	35 6	172, 4	92	25,6
FS45 8	1	1	1	1	595	5	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3680,7 5	6,19	- 90,21	431	71,83	35	32 3	368, 8	36 2	215, 6	42	10,4
FS45 8	1	1	2	20	65,2	4,2	29	153, 6	11,2	25	137, 2	58,8	33	130, 2	56,4	38	106, 2	5	4736,3 1	7,95	- 64,19	475,2	79,2	73	34 6	322, 2	43 7	246, 8	117	26,6
FS45 8	1	1	3	10	288, 6	5,6	27	146, 6	10,8	2	25	109, 4	5	11,2	108, 6	34	122	9,2	2102,9 9	3,54	- 135,4	253,2	42,2	28	20 4	474	22 3	112	33	8,2
FS41 7	2	1	1	1	594	6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3669,9 5	6,18	- 96,09	425,6	70,93	36	29 9	377, 4	34 5	203, 6	53	12,8
FS41 7	2	1	2	12	64,6	5,6	14	46,2	418, 6	23	299, 8	45,6	31	102, 2	42	17	81,4	413, 8	4246,8 5	7,15	- 80,39	426,2	71,03	72	28 5	334, 2	39 9	223, 6	141	36,4
FS41 7	2	1	3	9	50,8	5,8	18	141, 4	17	30	117, 8	245, 4	35	188	244, 2	22	95,6	15,2	2522,8 7	4,25	- 144,2 5	273,8	45,63	35	19 4	452, 2	23 5	127, 2	56	14,6
FS45 3	1	1	1	1	597, 4	2,6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3309,3 1	5,54	- 58,08	444	74	38	36 7	376, 4	40 6	208, 8	51	12
FS45 3	1	1	2	1	595, 4	4,6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	649,27	1,09	- 218,4 9	103,4	17,23	4	67	569, 6	71	23,6	7	2
FS45 3	1	1	3	1	593, 4	6,6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	500,06	0,84	- 268,6 7	71,4	11,9	3	29	582	31	10,4	4	0,8
FS41 0	1	1	1	1	595	5	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3955,8 5	6,65	- 59,13	455,4	75,9	53	33 7	328, 4	37 6	254, 6	50	11,8
FS41 0	1	1	2	13	99,2	4,4	10	44,8	172, 6	19	293, 4	69,6	27	100	60	15	57,2	161	4426,3 9	7,44	- 79,47	452,4	75,4	91	35 7	316, 6	46 1	243	136	35,4
FS41 0	1	1	3	20	83,4	5,4	18	260, 6	10,8	9	89,2	200, 6	16	55,4	123, 2	27	100, 8	10,2	3861,0 9	6,5	- 67,03	442	73,67	80	37 0	330, 6	45 6	237	109	26,8

FS47 2	1	2	1	2	594, 8	5	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	0,2	5,6	3376,5 9	5,68	- 98,41	372,8	62,13	46	26 5	389, 4	33 3	181, 8	78	23,6
FS47 2	1	2	2	22	37,6	4, 6	20	131, 4	266	32	281, 4	17,8	45	86,4	14,6	25	47,4	260, 2	5883,8 7	9,91	-62,5	505	84,17	12 4	34 9	250, 8	54 6	247, 8	244	95
FS47 2	1	2	3	14	64,8	5	13	260	12,2	5	152, 4	298, 6	9	18	298, 2	21	97,6	11,4	3726,8	6,27	- 115,6 7	371,8	61,97	79	29 7	358, 8	39 9	190, 6	134	45,4
FS47 5	1	2	1	2	593, 2	6, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	0,4	6,6	3935,5 4	6,63	- 108,2 7	460	76,67	46	36 0	347, 4	44 6	215, 2	101	30,8
FS47 5	1	2	2	18	69,2	7, 4	10	67,6	81,2	20	328	36	32	76,4	34,4	22	38,8	79,8	5166,9 9	8,73	- 87,34	433,2	72,2	94	29 6	313, 8	45 2	197, 6	205	80,2
FS47 5	1	2	3	32	98,4	5, 2	14	337	89	4	61,2	17,4	9	15,4	15	22	75,4	88,4	3500,3 1	5,89	- 106,5	339	56,5	67	24 1	401, 2	34 0	152	118	41,4
FS47 6	2	2	1	1	595, 8	4, 2	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3480,3 9	5,84	- 75,32	433,8	72,3	47	31 4	362, 6	35 7	221, 6	45	11,4
FS47 6	2	2	2	12	62,6	4, 6	19	97,2	40,8	15	290	128, 6	22	47,6	126, 4	24	91,4	30,4	4098,1 5	6,89	- 91,79	408	68	89	29 7	318, 2	41 7	230, 2	146	46,2
FS47 6	2	2	3	20	99,4	5, 4	8	201, 8	10,8	8	142, 8	76,2	14	51,8	71	18	90,8	10,4	3643,0 3	6,13	- 86,55	385,8	64,3	79	30 8	368	40 3	196, 4	115	30
FS47 7	1	2	1	2	594, 4	5, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	0,2	5,8	3711,0 6	6,24	- 71,43	403,6	67,27	47	29 9	365, 6	35 9	208, 2	71	20,6
FS47 7	1	2	2	23	83,4	4	18	120, 6	50,4	21	237, 6	11,2	32	73	9,8	30	74,2	48,2	5237,7 6	8,79	- 81,16	433	72,17	95	28 8	314, 8	45 9	215	205	66
FS47 7	1	2	3	5	173, 8	5, 6	0	-	-	3	384, 8	16,2	7	26,8	14,6	1	3,4	529, 6	1567,2 5	2,64	- 229,8 9	209	34,83	24	15 4	501, 8	17 0	87,8	20	4,6
FS48 8	1	2	1	3	594, 2	5, 2	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3876,9 7	6,52	- 99,77	431,4	71,9	50	32 0	360, 2	40 2	206, 4	93	28
FS48 8	1	2	2	13	31,2	5, 4	12	170, 2	19,8	19	287, 4	201, 8	24	48,4	198, 8	20	56	17,4	5375,1 6	9,07	- 69,15	456	76	11 0	32 6	296, 8	47 9	210, 8	207	84,8
FS48 8	1	2	3	21	90,2	4, 8	17	181, 6	100, 4	12	182, 4	12,2	23	46,8	11,4	29	84,2	99,8	4988,4 5	8,4	- 85,57	475,4	79,23	79	34 4	314, 6	46 5	217, 4	157	61,6

FS490	3	2	1	1	595,4	4,6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3409,86	5,73	-87,58	419,6	69,93	35	354	370	408	210,2	66	15
FS490	3	2	2	1	596,2	3,8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	940,16	1,58	226,19	143,2	23,87	7	99	552,8	101	40,6	9	2,6
FS490	3	2	3	9	296,6	3,6	15	172,8	281,8	9	51,6	456,4	12	21,4	455,2	18	52,4	279,8	3344,74	5,61	-93,03	343,6	57,27	60	260	405,4	349	151,6	101	39,2
FS474	2	2	1	2	594	5,8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	4,2	1,6	2967,06	5,00	-64,68	5	-64,68	17	253	423,2	285	163,4	33	7,4
FS474	2	2	2	19	92,2	8,4	15	121	42,4	16	208,4	174	24	93	173,4	23	73	31,8	4909,43	8,30	-48,48	8,3	-48,48	61	309	317,2	430	231	145	43,2
FS474	2	2	3	10	68,6	7,2	6	78,8	352,8	13	325,6	31	18	74,8	28,2	9	39	352	2856,85	4,82	-116,75	4,82	-116,75	34	202	445,6	250	130	58	17
FS478	3	2	1	1	593,6	6,4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3913,28	6,59	-56,40	6,59	-56,4	40	380	347	435	231,8	64	14,6
FS478	3	2	2	27	67,4	4,6	13	87,2	31,6	31	287,4	96	46	79,8	94,6	25	70,8	29	6985,23	11,74	-45,38	11,74	-45,38	88	306	269,2	504	233,2	238	92,8
FS478	3	2	3	30	69,4	6,4	25	210,6	19,2	24	128,2	14,4	40	85,8	13,6	40	96	18,6	6143,26	10,35	-72,02	10,35	-72,02	71	304	319,4	467	200,2	197	73,8
FS479	2	2	1	1	593,6	6,4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4963,87	8,37	-66,05	8,37	-66,05	32	339	340	435	223,8	111	29,6
FS479	2	2	2	17	90,6	5,2	12	135	121,8	21	161	12,2	29	79,6	10,6	21	126,6	89,6	5601,27	9,42	-62,35	9,42	-62,35	62	325	321	481	209,8	195	63,8
FS479	2	2	3	14	259,8	5,6	8	95,6	24,2	5	95,2	49	9	57,6	9,8	16	83,8	15,6	3994,46	6,72	-94,81	6,72	-94,81	40	268	394,4	349	171,2	102	28,6
FS503	1	2	1	1	596	4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3487,35	5,85	-72,55	5,85	-72,55	30	305	399,4	351	184,4	53	12
FS503	1	2	2	20	66	5,8	19	179	57,2	18	161	17,4	30	98,6	16,4	28	88	55,6	4590,79	7,73	-53,79	7,73	-53,79	64	321	338	437	219,8	135	36,2
FS503	1	2	3	14	106	6	22	249,8	1,2	7	91	47,8	14	35	47,2	29	114,8	12,8	3627,28	6,10	-86,70	6,1	-86,7	49	300	393,8	381	175,6	97	24,8

FS50 0	2	2	1	1	595, 4	4, 6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	5191.3 1	8.72	- 76.20	8,72	-76,2	43	33 8	284, 2	43 8	274, 6	110	36,4
FS50 0	2	2	2	7	51,8	5, 8	21	283, 6	37,6	11	146	413, 8	14	29,2	410, 8	26	82,2	35,4	4737.6 0	7.98	- 64.98	7,98	- 64,98	67	36 0	315, 8	45 8	235, 8	115	42,4
FS50 0	2	2	3	13	47,2	5, 8	15	167, 6	20,6	17	231, 4	35,6	23	90,6	34,8	22	56,6	18,2	4174.6 8	7.03	- 95.09	7,03	- 95,09	49	25 9	374, 8	37 0	181, 4	126	37,8
FS48 9	2	2	1	2	592, 8	7	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	5013.4 4	8.46	- 76.80	8,46	-76,8	38	35 2	329, 6	44 3	228, 2	118	35
FS48 9	2	2	2	21	71,8	5, 6	19	127, 8	19,2	32	239, 6	55,8	46	85,4	54,2	28	67,8	14,8	6628.3 0	11.1 6	- 47.76	11,16	- 47,76	84	34 6	275, 8	53 4	233, 8	227	84,6
FS48 9	2	2	3	17	150	6, 6	11	182, 6	19,6	8	138, 2	22,8	15	24,6	21,2	20	95,2	15,6	4438.7 3	7.48	- 74.34	7,48	- 74,34	45	28 7	379	39 8	167, 4	134	46,8
FS49 1	2	2	1	2	593, 2	6, 6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3884.0 6	6.55	- 79.27	6,55	- 79,27	32	31 6	343	35 9	238, 4	46	11,8
FS49 1	2	2	2	14	82	5, 6	15	172, 6	271, 4	24	165	4	31	93	12,4	20	83,2	270, 4	5446.5 0	9.17	- 71.51	9,17	- 71,51	61	30 0	307, 4	44 4	238, 8	165	48
FS49 1	2	2	3	13	101, 4	6, 8	12	155, 8	147, 6	11	118, 8	36,8	19	104, 4	23	18	112, 2	146, 8	3879.8 1	6.54	- 87.50	6,54	-87,5	40	27 7	372, 8	36 3	194, 8	96	25,4
FS50 1	3	2	1	1	600	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1980.3 1	3,3	- 323.6 9	313	52,17	13	16	596, 4	15	3,4	0	-
FS50 1	3	2	2	1	600	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2551,2	4,25	- 532.8 3	332	55,33	5	7	598	6	1,8	0	-
FS50 1	3	2	3	1	600	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2419.0 1	4,03	- 489.0 9	317,2	52,87	4	6	598, 8	5	1	0	-
FS50 2	2	2	1	1	600	0	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	6271.4 5	10,4 6	- 224,4	594	99	55	40 8	491, 2	40 8	107, 8	2	0,8
FS50 2	2	2	2	6	43,6	6, 6	29	249	17,6	0	-	-	0	-	-	35	298	17	2662.7 1	4,49	- 83.39	337	56,17	62	28 8	414, 2	33 0	160, 8	66	18,2
FS50 2	2	2	3	10	122, 4	4, 8	7	181, 2	16	9	146	216, 6	16	84,6	216	12	58,4	9	3545.4 1	5,96	- 87.12	410,6	68,43	69	34 9	351, 8	41 2	216, 6	98	26,6

FS51 6	2	2	1	1	595	5	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2181,3 2	3,67	- 82,02	326,4	54,4	13	26 7	478, 6	27 9	111, 4	20	4,8
FS51 6	2	2	2	16	44,6	5	15	123, 2	51,2	22	312, 2	11,8	32	73,4	9	19	39,8	50	3973,9 9	6,73	- 70,99	398,6	66,43	64	31 5	363, 6	39 1	199, 8	106	27,2
FS51 6	2	2	3	9	46,4	6, 6	9	263, 8	16,4	13	216, 6	200, 6	16	37,2	200	13	28,2	11,4	2623,4 9	4,42	- 97,89	306,6	51,1	39	25 3	436, 6	29 6	144, 4	51	12,2
FS51 7	3	2	1	2	594, 6	5, 2	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4111,9 7	6,92	-63,2	460,8	76,8	22	34 4	341, 4	39 6	237, 6	59	15,6
FS51 7	3	2	2	17	39,2	4, 6	17	183, 4	12,8	13	202, 4	159, 2	20	72,2	157	25	95,2	9	4962,1 5	8,34	- 64,26	424,2	70,7	68	29 1	317, 6	44 2	218, 8	182	58,8
FS51 7	3	2	3	17	85,2	4, 8	17	204	45,2	9	139	21,8	16	73,4	8,2	28	89,4	33,6	4324,8 1	7,27	- 87,34	373,8	62,3	59	27 7	369	39 9	185, 6	151	40,4
FS51 9	1	2	1	3	592, 4	6, 8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	0,2	385, 4	4437,0 8	7,48	- 77,13	484,6	80,77	51	33 3	349	41 4	219, 2	92	24,8
FS51 9	1	2	2	14	43	5, 2	14	130, 2	312, 8	34	296, 2	27,6	42	82,8	26,8	18	41,2	311, 8	5610,0 8	9,44	- 65,05	486,6	81,1	95	35 6	288	51 3	231, 8	196	74,2
FS51 9	1	2	3	20	128, 8	6, 2	10	181, 2	59,4	11	128, 8	18,2	24	73,2	14,4	17	75	53	4622,5 1	7,79	- 72,01	452	75,33	70	32 6	342, 8	43 0	202, 6	141	48,2
FS53 5	1	2	1	4	594, 8	4, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	0,2	511, 4	4287,3 3	7,2	-83,8	486	81	36	36 4	339, 8	43 1	237, 8	75	17,8
FS53 5	1	2	2	19	43,4	5, 2	16	106, 2	72,6	21	292, 2	11,4	30	92,8	10,8	24	58	71,4	5442,2 1	9,15	- 67,13	450,2	75,03	89	31 5	311	48 6	212, 2	199	71,4
FS53 5	1	2	3	22	47,4	4, 8	16	264, 8	25,4	11	165	8,2	22	44,2	11,8	22	66,2	14,4	4775,2 3	8,03	-59,9	423,6	70,6	67	30 2	351, 4	43 2	188, 4	162	55,2
FS53 3	3	2	1	1	595	5	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3210,9 2	5,4	- 89,29	434,2	72,37	40	33 5	388	35 5	201, 2	25	5,6
FS53 3	3	2	2	18	57,4	4, 4	18	132, 4	22	15	179, 6	287, 8	19	98,8	286, 8	31	120, 6	8,4	4311,1 9	7,25	- 66,37	462,8	77,13	81	35 0	321	44 1	245, 2	111	28,2
FS53 3	3	2	3	9	67,8	4, 2	23	199, 2	11,8	7	87,6	181, 6	9	60	180, 6	29	177	7,4	2892,0 2	4,86	- 119,3 8	356,8	59,47	60	28 6	406	33 3	174, 2	60	14,6

FS54 5	2	2	1	1	595, 2	4, 8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3218,3 5	5,41	- 65,18	420,6	70,1	28	29 2	399, 6	31 1	190	22	5,4
FS54 5	2	2	2	13	76,8	4, 8	9	128, 4	24,6	15	240, 4	54,4	22	92,2	45,2	14	56	15,2	4387,9 7	7,37	- 53,13	415,2	69,2	71	29 7	345, 2	40 2	217, 6	127	32,2
FS54 5	2	2	3	19	112, 8	5	14	198, 6	19,4	7	129, 8	15,8	17	69,6	9,8	21	81,8	18,2	3549,4 4	5,97	- 75,84	372,6	62,1	47	27 0	385, 6	32 4	194, 2	69	15
FS56 3	3	2	1	3	594, 2	5, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	1	5,4	0	3996,3 7	6,69	- 103,2 2	421,4	70,23	37	29 1	384, 4	34 9	192, 6	66	20
FS56 3	3	2	2	11	139, 8	5, 4	11	66,4	413, 8	26	276, 8	90,8	35	70,2	90,4	13	40,8	409, 8	3615,4 6	6,08	- 58,36	399,8	66,63	56	31 8	369, 8	40 7	199, 4	110	25,2
FS56 3	3	2	3	4	61,8	6, 2	1	18,8	581, 2	60	223, 2	55,6	63	288, 6	53,6	1	0,6	580, 6	1154,6 6	1,95	- 208,3 9	139,2	23,2	13	99	539, 8	11 0	51	13	2,8
FS56 9	2	2	1	2	594, 6	5, 2	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	5019,8 5	8,44	- 58,33	513,8	85,63	43	36 5	312, 6	45 9	256	105	26
FS56 9	2	2	2	6	466, 4	4, 8	7	20	534, 8	7	44,2	466, 6	9	27,8	455	12	36	528, 4	2330,5 9	3,92	- 115,2 2	244,2	40,7	28	14 8	477, 4	19 5	101	56	16,6
FS56 9	2	2	3	23	48,2	5	22	251, 4	83	15	184, 6	25,8	25	52,4	25,2	33	56	10,2	5042,7 4	8,48	- 55,96	458,4	76,4	79	34 3	313, 4	49 3	234, 4	174	47
FS50 6	3	2	1	2	592, 4	7, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3837,1 9	6,48	- 85,82	434,4	72,4	43	29 4	368	36 4	207	74	17,4
FS50 6	3	2	2	12	121, 2	5	15	98,8	257, 8	25	235, 8	90,2	33	66,8	89	21	70,4	255, 2	4555,2 4	7,66	-38,7	440,8	73,47	82	32 1	322	46 2	222	169	50,8
FS50 6	3	2	3	10	60,4	6	4	73,6	100, 4	14	246, 2	11	19	173, 4	10,6	8	39,6	98	2896,5 7	4,88	- 115,0 5	318,6	53,1	50	22 6	416, 8	30 2	158, 2	82	18,8
FS55 2	1	2	1	1	595, 6	4, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4333,5 5	7,28	- 34,31	502	83,67	71	37 9	288, 6	45 2	285, 4	92	21,4
FS55 2	1	2	2	14	74,8	5	14	95,4	231, 4	36	251, 4	34,4	43	114	33,4	20	56,8	221, 4	5070,7 1	8,59	- 76,87	469	78,17	11 5	31 3	277, 2	49 5	239, 8	236	73,6
FS55 2	1	2	3	15	63,6	5	26	163, 2	68	11	107, 6	35,4	18	125, 2	14,2	34	133, 2	63,2	4145,9 1	7,03	-93,1	412	68,67	10 4	28 0	317	41 9	223, 4	183	49,4

FS55 3	3	2	1	8	592, 8	4, 6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3	0,6	76,8	5086,5 9	8,55	- 78,59	493,4	82,23	62	35 6	301, 6	47 9	236, 8	154	56,4
FS55 3	3	2	2	22	71,6	4	18	106, 6	113, 8	47	263, 6	10,4	55	92,2	9,2	26	56,2	111, 8	6911,5 1	11,6 7	-53	521,2	86,87	14 0	31 8	216, 6	53 8	247, 4	282	128, 4
FS55 3	3	2	3	21	182, 6	5, 4	17	147, 6	16,6	11	145	128, 4	20	60,2	11,6	19	50,2	15,6	4946,0 6	8,34	- 91,93	491,4	81,9	99	31 8	281, 2	46 7	255, 2	177	57
FS55 4	3	2	1	7	593, 4	4, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	2	0,6	105, 2	5645,0 5	9,49	- 85,29	468,6	78,1	59	30 7	285, 4	47 7	237, 4	204	72,2
FS55 4	3	2	2	27	101, 6	5, 6	12	86	132, 4	30	178, 8	43,8	43	116, 2	42,6	26	107	34,2	6523,9 8	10,9 9	- 77,57	473,6	78,93	98	30 5	273, 8	49 4	229, 8	246	90,2
FS55 4	3	2	3	21	77,6	5, 4	9	125, 6	22,4	7	53,8	178, 6	17	265, 2	120, 6	22	66,8	19	3658,2 8	6,16	- 116,3 3	348,4	58,07	44	25 3	395	33 6	169, 4	120	29,6
FS55 0	2	2	1	6	593	4, 8	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4	1	141, 2	4276,3 5	7,19	- 83,65	434,4	72,4	56	29 2	331, 8	41 3	214, 4	155	48,8
FS55 0	2	2	2	17	108, 2	6	16	95,8	55,4	29	246, 4	151, 4	38	73,8	139	23	67	43,6	5181,9 9	8,76	- 83,43	453,2	75,53	11 5	29 3	262, 2	49 5	239, 4	254	90,2
FS55 0	2	2	3	16	148, 8	3, 6	11	171, 4	133	8	60	40,8	12	152, 6	24,8	19	54,4	131, 8	3696,9 8	6,22	- 99,16	408	68	93	33 5	321, 2	47 0	225, 4	173	48,2
FS54 6	1	2	1	2	595, 4	4, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	4352,4 1	7,31	- 68,71	454,4	75,73	49	34 3	349	41 4	225, 6	78	20,8
FS54 6	1	2	2	29	108, 8	4, 4	17	71	95,4	37	225, 8	41,2	53	122	33,4	30	65,6	85,8	7308,3 2	12,2 7	- 39,62	496,8	82,8	11 1	29 1	252, 6	52 7	247, 8	264	95
FS54 6	1	2	3	31	153	4, 6	29	170	10,4	7	59,8	97,2	18	81	12,8	48	126, 2	9,8	5577,7 8	9,38	- 49,97	449,6	74,93	83	29 4	330, 2	44 4	209, 2	166	55
FS55 7	1	2	1	3	594, 2	4, 6	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3247,7 6	5,46	-73,4	379	63,17	51	29 2	383, 6	35 7	191	82	20,6
FS55 7	1	2	2	19	127	5, 8	13	83,6	141, 4	27	225, 8	36	38	108	34,8	21	48,6	139, 8	4671,1 8	7,88	- 69,12	481,2	80,2	10 7	34 1	263	50 4	281, 8	194	48
FS55 7	1	2	3	11	72,4	5, 6	41	349, 6	29,4	9	56,4	15	15	33,2	14,6	45	81	5,8	2196,9 6	3,7	- 141,2 6	308,6	51,43	73	30 4	421, 8	35 3	154, 6	71	17,4

FS55 8	3	2	1	1	594, 6	5, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3641,5 5	6,13	- 58,91	440,8	73,47	46	34 9	348, 6	41 4	224	75	21,8
FS55 8	3	2	2	14	37,4	7	10	81,8	14,8	30	368	86,2	39	70,6	84,8	16	32,8	14,2	4451,4 1	7,51	- 70,87	468,8	78,13	10 4	36 0	302	50 0	232, 6	176	58,2
FS55 8	3	2	3	6	40	6, 6	17	470, 2	12,6	1	27,4	313, 8	3	15,6	313, 4	17	33,6	11,8	2446,1 1	4,13	- 124,1	327	54,5	51	27 9	407, 2	34 9	164, 4	86	21,2
FS49 5	3	2	1	1	593, 6	6, 4	0	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-	3690,9 2	6,22	- 66,13	401,8	66,97	58	31 6	345, 4	38 4	215, 4	97	32,6
FS49 5	3	2	2	7	23,4	4, 8	22	302, 8	11,4	11	172, 6	141, 8	14	37,4	141, 2	25	58,6	10	4528,3 7	7,63	- 101,1 3	406	67,67	11 0	24 4	313, 4	41 9	199, 8	215	80,4
FS49 5	3	2	3	12	60,2	7, 6	30	307, 8	81,6	9	61,2	14,2	14	68,4	12,8	34	92,6	70,4	3275,1	5,55	- 145,8 2	331,6	55,27	73	23 0	385, 8	33 4	166, 2	124	38