

Tesis de Posgrado

Estudio de posibles estrategias terapéuticas para neuroteratología funcional

Wolansky, Marcelo Javier

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Wolansky, Marcelo Javier. (1999). Estudio de posibles estrategias terapéuticas para neuroteratología funcional. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3119_Wolansky.pdf

Cita tipo Chicago:

Wolansky, Marcelo Javier. "Estudio de posibles estrategias terapéuticas para neuroteratología funcional". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3119_Wolansky.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCE y N BIBLIOTECA

**ESTUDIO DE POSIBLES ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS
PARA NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL**

**TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS DEL**

LICENCIADO MARCELO JAVIER WOLANSKY

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JULIO MARCOS AZCURRA

PROYECTO INTERDISCIPLINARIO DE NEUROTERATOLOGIA

LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

3119
- 3119



RESUMEN

A partir de los años 60s se creó una subdisciplina dentro de la Teratología llamada *Neuroteratología Funcional o de la Conducta*. Ésta estudia específicamente las anomalías comportamentales que persisten a través de la vida del individuo que fue expuesto a agentes químicos neurotóxicos durante el neurodesarrollo. Pese a que en los últimos 30 años se han acumulado numerosas pruebas en modelos animales experimentales y estudios longitudinales y relevamientos epidemiológicos en humanos acerca del potencial neuroteratogénico funcional de muchos agentes químicos de consumo humano rutinario, son sumamente escasos los grupos de investigación que trabajan en el diseño de estrategias terapéuticas para revertir este tipo neurotoxicidad. En esta tesis se reportan los resultados de la aplicación de 3 aproximaciones experimentales distintas probadas en el modelo animal rata. En todas las estrategias terapéuticas ensayadas la evaluación de los cambios comportamentales inducidos se realizó *a posteriori* de los tratamientos farmacológicos o ambientales con el *Test de Entrenamiento Circular* (TEC), el cual fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio y validado para el estudio durante el desarrollo postnatal de alteraciones de conducta inducidas a nivel perinatal. Primero, modificamos las condiciones ambientales de cría durante la pubertad para revertir las alteraciones persistentes -motoras y asociativo-espaciales- inducidas por exposición al psicofármaco *Haloperidol* (HAL) durante la lactancia. En segunda instancia, aprovechando los efectos dependientes de período de desarrollo que tiene el mismo HAL, administramos esta droga durante la lactancia para corregir la neuroteratología motora inducida con la exposición al mismo agente durante la gestación. El mismo abordaje fue realizado en otra serie de experimentos con la droga anticonvulsivante *Difenilhidantoína* (DFH). Aunque las alteraciones motoras que esta droga induce luego de la exposición prenatal no pudieron ser atenuadas con la administración postnatal, sí pudo observarse una corrección de la neuroteratología del comportamiento espacial. Por último, se trabajó con *el Factor de Crecimiento Nervioso*. Con este agente pudimos modificar un período crítico de plasticidad sináptica dependiente de actividad fisiológica que aparece en el núcleo estriado sólo durante la quinta semana de vida. La posibilidad de modular la calidad y la duración de ciertas propiedades plásticas del cerebro durante el desarrollo es un punto de partida para diseñar nuevas estrategias terapéuticas con fármacos, como ha sido ya demostrado en el caso de la maduración de la vía visual. En forma integral, los experimentos presentados confirman la utilidad del test TEC para evaluar con sensibilidad las alteraciones funcionales inducidas en modelos experimentales de Neuroteratología de Conducta. El TEC aparece también útil para determinar el éxito o el fracaso en la examinación de diferentes estrategias terapéuticas para este tipo de disfunciones.

SUMMARY

In the sixties was developed a new field born from Teratology which was named *Behavioral or Functional Neuroteratology*. That is devoted to the study of enduring behavioral anomalies present through the life of an individual after be exposed to neurotoxic chemical agents during neurodevelopment. In the last 30 years it was growing a great body of evidence in experimental animals models, longitudinal follow-ups and epidemiological surveys in humans about the potential risk on human consumption of functional neuroteratogens for brain maturation. Yet, there is an scarcity of research groups working in animal models related to the design of therapeutical strategies to revert this type of developmental neurotoxicity. In this doctoral thesis are reported the results of the application of three experimental approaches working with the rat. For all strategies, the evaluation of behavioral changes induced during the experiments was performed at different times after treatments submitting the animals to the *Circling Training Test* (CT) which was developed in our laboratory and validated to study alterations of the natural pattern of brain maturation. First of all, we modify the rearing-housing environmental conditions during infancy to revert the motor and spatial-associative alterations previously induced by exposure to the psychoactive drug *Haloperidol* (HAL) during lactation. Second, we take advantage of those HAL effects dependent on period of exposure during development. So, we administered this drug during lactation to recover the motor deficits induced with the same agent by exposing rats during gestation. The same approach was applied in other series of experiments working with the anticonvulsant drug *Diphenylhydantoin* (DPH). We had a partial success in this case. At last, we use the *Nerve Growth Factor*, a prototypic neurotrophin. With this agent we could modulate a critical period of activity-dependent synaptic plasticity in rat striatum that normally appears exclusively around the fifth week of life. The modification during development of the quality and extent of the brain plastic properties opens the way to design new pharmacological treatments for developmental alterations. Certainly, it is that happened for the visual model of plasticity, and we detect some analogies in the reported plastic responses to NGF in this cortical system and our striatal model. Altogether, the present experiments confirm the value of the TEC to evaluate with sensitivity induced functional alterations in animal models of Behavioral Neuroteratology. Besides, the TEC appears also a good option to determine the success or failure in examining several therapeutical strategies for this type of dissability.

Agradecimientos

Esta tesis no se hubiera podido hacer sin los aportes materiales y humanos que fui recibiendo en estos seis años de investigaciones.

En primer lugar quiero recordar de donde venía. Por eso quiero agradecer la oportunidad de iniciarme en la investigación, enseñanzas, cafecitos y otras yerbas que me dieron varios de los integrantes del centro CIPYP: Alcira, Ana Adela, Mónica, Guillermo (Master en JTPlogía), Fernando (me enseñaste la importancia de ser ordenado en la mesada y reciclar el material rápido para que otros lo usen), Adriana, la Chueke y otros. Por sobre todo, son de primera como personas.

En segundo lugar quisiera mencionar a donde llegué. Por casualidad o no (existe ??) el Dr. Azcurra vió algo en mí que lo impactó (creo que los anteojos) y así comencé esto, con la dirección, intervención y libertad (todo al mismo tiempo) que sólo él sabe muy bien equilibrar. Julio, por ahí para tu momento actual el significado de una tesis debe ser relativo. Para mí es algo trascendente en mi vida. Gracias por la oportunidad que me diste y tu confianza.

Rol de la Universidad de Buenos Aires en este trabajo: no sólo proveyó los fondos suficientes (un poco justo a veces) sino que creyó y apoyó desde 1994 en los proyectos que presentamos donde un porcentaje importante de los mismos eran los experimentos de esta tesis. Gracias Dra. Fernández Cirelli y otros ejecutivos y niveles de decisión por su parte en esto.

Tercero, quisiera dedicar esta tesis al grupo humano del cuarto piso y la FCEN en general. Uds. no saben lo feliz que me siento cuando pienso que todos los días voy a trabajar en lo que me gusta, que docentes y no docentes me saludan afectuosamente, y que aparte me pagan por eso !!! No muchos pueden decir que tuvieron al lado el grupo humano que yo tuve y tengo. Gracias Guido, Mabel & Cia. por ser como son. Uds. revirtieron la imagen que tenía de la burocracia oficial

Aquí quiero agradecer con el corazón (que en mi caso no es poco) a los que estuvieron y están a mi lado en el lab. Los que estaban cuando entré (Jorge y Elsa, gracias mil por tu afecto), los que siguen estando (Gus Fonito y Gus Rurico, y Emy y Gaby del area *psiquiátrico*), y los que están intentando abrirse camino en este difícil arte de trabajar en algo que en general no da gaita ni fama como Lucas (vas a llegar lejos con la ciencia..... o por lo menos muy alto), y nuestras nuevas pupils Mariana y Soledad (con demostrado alto rendimiento en Matelología).

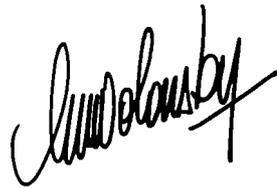
Por último, en estos momentos es cuando uno se pregunta de donde vengo, a donde voy, y muchas otros delirios existencialistas. Yo también los hice.

Pero lo que no me queda dudas es que tengo una familia de primera. Por eso le dedico esta tesis principalmente a mi Mica*, a su madre (Chichu, te prometo que vuelvo a mi rol de esposo full-time) y Gaby (vos sabés realmente cuanto me costó esto en todo sentido desde que empecé la Facu) y Cia. Uri y Shoshi, ya pueden cholulear: tienen un tío doctor !!

También quiero mencionar a la suegra (y demás flia. de mi esposa) que por suerte me tocó en este viaje de vida. Gracias por no ser la bruja de las películas.

Para vos papi y para vos mami (que me enseñaron a no bajar los brazos nunca, ni antes de que parezca todo perdido). Son los que no dudan porqué me copó este tema. Son los que me guían a hacer lo que me gusta ante todo. Son los únicos que lograron que quiera cambiar todo por un mate con ellos.

*** para que no se enoje en el futuro también dedicado con amor al próximo/a
"programado" para el 31-12-2000 !!**



Marcelo J. Wolonsky

INDICE

1.	INTRODUCCION	
1.1.	LA COMPLEJIDAD DEL NEURODESARROLLO	1
1.2.	BIOTRANSFORMACION DE AGENTES EXOGENOS	9
1.3.	CUAL ES LA PROBABILIDAD DE ALTERACION FUNCIONAL POR INTERFERIR EL NEURODESARROLLO ?	12
1.3.1.	TEORIA	17
1.3.2.	REALIDAD	20
1.3.2.1.	LO QUE REPORTA LA CLINICA MEDICA	20
1.3.2.2.	LO QUE REPORTAN LOS EPIDEMIOLOGOS	23
1.3.2.3.	LO QUE REPORTAN LOS NEUROPSICOLOGOS Y EDUCADORES	27
1.4.	DROGAS SELECCIONADAS EN ESTA TESIS PARA INDUCIR NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL	29
1.4.1.	EFFECTOS DE LA EXPOSICION TEMPRANA A HALOPERIDOL	30
1.4.2.	EFFECTOS DE LA EXPOSICION TEMPRANA A DIFENILHIDANTOINA	33
1.5.	LA NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL	38
1.5.1.	EL ESTRIBADO EN EL ESTUDIO DE ALTERACIONES NEUROQUIMICAS O CELULARES ASOCIADAS A NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL	40
1.6.	APROXIMACIONES POSIBLES PARA LA TERAPEUTICA DE NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL	46
1.6.1.	MANIPULACION DE CONDICIONES AMBIENTALES EN PERIODOS CRITICOS DE REMODELAMIENTO SINAPTICO	47
1.6.2.	ADMINISTRACION DE FARMACOS EN PERIODOS CRITICOS DE SENSIBILIDAD POSTNATAL	48
1.6.3.	MODIFICACION DE LA EXTENSION DE PERIODOS CRITICOS DE REMODELAMIENTO SINAPTICO: <i>el Nerve Growth Factor</i>	48
2.	OBJETIVOS	52
3.	MATERIALES Y METODOS	
3.1.	REACTIVOS Y DROGAS	53

3.2.	ANIMALES	54
3.2.1	MANTENIMIENTO DE ANIMALES	55
3.4.	ESTUDIOS COMPORTAMENTALES	
3.4.1.	EL TEST DE ENTRENAMIENTO CIRCULAR	56
3.4.2.	EL ESTUDIO DE LA COORDINACION MOTORA EN EL ROTAROD	62
3.4.	DISECCION DE TEJIDOS	65
3.6.	PREPARACION DE FRACCIONES SUBCELULARES DE MEMBRANAS	66
3.7.	ESTUDIOS NEUROQUIMICOS	
3.7.1.	ENSAYO DE BINDING A (³ H)QNB	68
3.7.2.	ENSAYO DE BINDING A (³ H)SPI	69
3.8.	ANALISIS ESTADISTICO Y REPRESENTACIONES GRAFICAS	70
3.9.	EXPERIMENTO ONTOGENESIS	72
3.10.	INDUCCION DE NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL	73
3.11.	ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS	
3.11.1.	ESTRATEGIA AMBIENTAL	76
3.11.2.	ESTRATEGIAS FARMACOLOGICAS	
3.11.2.1.	EVALUACION DE SIGNOS DE TERATOLOGIA ESTRUCTURAL	79
3.11.2.2.	CORRECCION CON HALOPERIDOL	81
3.11.2.3.	CORRECCION CON DIFENILHIDANTOINA	83
3.11.2.4.	MODIFICACION DEL PERIODO CRITICO DE PLASTICIDAD DEL SISTEMA MOTOR ESTRIATAL	
3.11.2.4.1.	EXPERIMENTO NGF 1	85
3.11.2.4.2.	EXPERIMENTO NGF 2	89

4. RESULTADOS

4.1.	EXPERIMENTO ONTOGENESIS	92
4.2.	EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLOGICOS SOBRE LA VIABILIDAD-MORTALIDAD DE LAS CAMADAS	93
4.3.	ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS	
4.3.1.	MANIPULACION DEL AMBIENTE	96
4.3.2.	USO DE FARMACOS	

4.3.2.1.	NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL INDUCIDA	98
4.3.2.2.	CORRECCION CON HALOPERIDOL	99
4.3.2.3.	CORRECCION CON DIFENILHIDANTOINA	100
4.3.3.	MODIFICACION DEL PERIODO CRITICO DE PLASTICIDAD DEL SISTEMA MOTOR ESTRIATAL	
4.3.3.1.	EXPERIMENTO NGF 1	101
4.3.3.2.	EXPERIMENTO NGF 2	103
5.	DISCUSION	105
5.1.	EXPERIMENTO ONTOGENESIS	108
5.2.	EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLOGICOS SOBRE LA VIABILIDAD-MORTALIDAD DE LAS CAMADAS	110
5.3.	INDUCCION DE NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL	111
5.4.	ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS: ANTECEDENTES	112
5.4.1.	ESTRATEGIA TERAPEUTICA 1: MANIPULACION DEL AMBIENTE	114
5.4.2.	ESTRATEGIA TERAPEUTICA 2: CORRECCION CON HALOPERIDOL	120
5.4.3.	ESTRATEGIA TERAPEUTICA 3: CORRECCION C/ DIFENILHIDANTOINA	125
5.4.4.	MODULACION DE LA PLASTICIDAD ESTRIATAL: ANTECEDENTES	131
5.4.4.1.	EXPERIMENTO NGF 1	134
5.4.4.2.	EXPERIMENTO NGF 2	141
	CONSIDERACIONES FINALES	144
	CONCLUSIONES FINALES	147
	ANEXOS	
	DIVULGACION NACIONAL E INTERNACIONAL DE LOS RESULTADOS INCLUIDOS EN ESTA TESIS	149
	BIBLIOGRAFIA	152

1. INTRODUCCION

En esta introducción se plantea una secuencia de datos que intentan llegar a una explicación alternativa sobre porque los mecanismos que permiten que el SNC madure son sensibles a los agentes químicos de exposición humana frecuente. Simultáneamente, se trata de resumir las variables intra- e interindividuales principales que determinan la presencia o ausencia de neuroteratología funcional en el individuo adulto, luego de haber sido expuesto a potenciales neuroteratógenos durante la gestación, el período postnatal temprano y/o la infancia.

Luego, se compara las expectativas teóricas sobre la incidencia de neuroteratología funcional en humanos luego de analizar los trabajos sobre modelos animales experimentales y la realidad, a juzgar por los pocos estudios longitudinales en humanos expuestos a drogas neuroactivas durante el desarrollo, lo cual permite proponer cual es la relevancia actual del tema en la Salud Pública. Simultáneamente, se presenta una aproximación al grado de urgencia para poner a punto y probar modelos animales de terapéutica para las alteraciones permanentes de conducta inducidas por el contacto con agentes químicos durante los períodos críticos de vulnerabilidad del Sistema Nervioso Central (SNC) inmaduro.

1.1. LA COMPLEJIDAD DEL NEURODESARROLLO

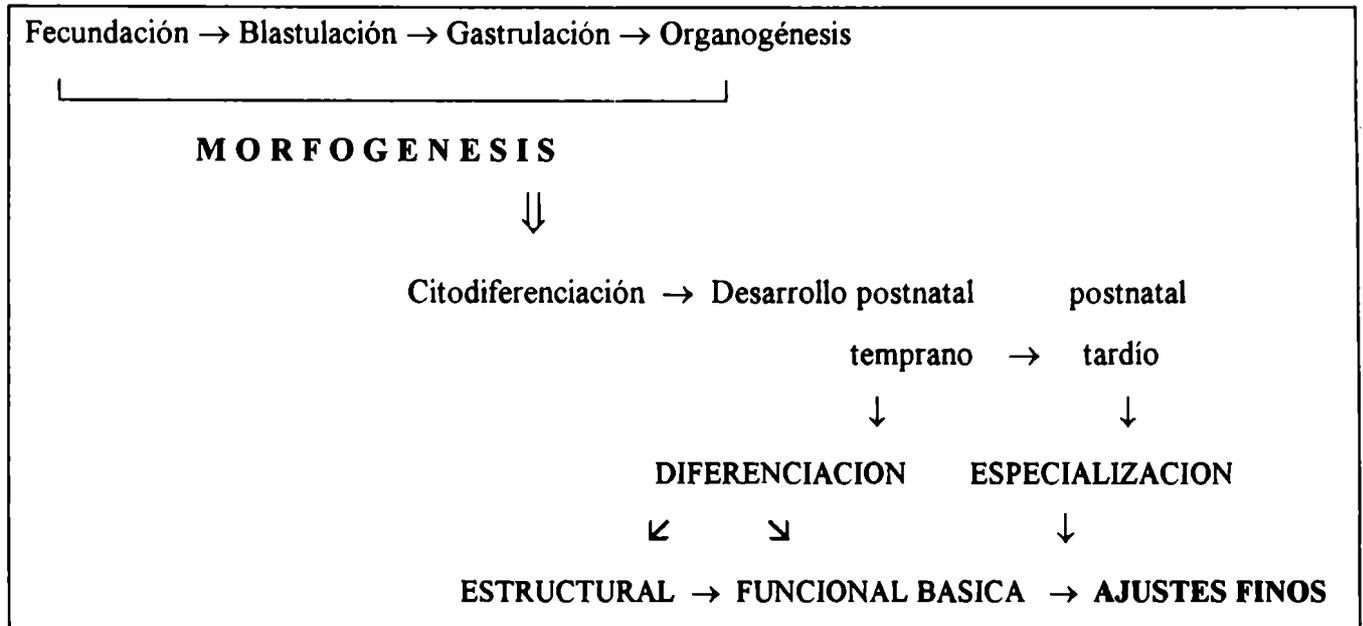
PERIODO DE CONTINUA Y PROFUNDA TRANSICION

ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Durante el desarrollo prenatal y postnatal temprano de organos y sistemas una serie de programas complejos de cambios, ordenados en tiempo y espacio, deben ocurrir para que el individuo en formación pueda alcanzar sus propiedades estructurales y funcionales adultas. Este programa incluye ciertas generalidades que se cumplen ya sea en areas internas o superficiales del cuerpo, y que se pueden sintetizar como cuatro etapas parcialmente superpuestas: i) compromiso para ser un area

específica del organismo, ii) diferenciación fenotípica estructural y funcional básica, iii) crecimiento, y iv) ajustes funcionales dependientes de experiencias.

Desde un punto de vista embriológico y ontogenético se puede representar esta síntesis de la siguiente forma:



El cuadro precedente involucra a una serie de *modificaciones interdependientes* de los distintos elementos de la bioquímica del individuo.

Este cuadro es válido para todos los órganos y sistemas de los mamíferos. El SNC no es la excepción. Por el contrario, cambios estructurales o neuroquímicos sutiles en el patrón de desarrollo del mismo, que de ocurrir en otros areas del individuo no implicarían *a posteriori* deficiencias evidentes, en el SNC pueden representar un discapacidad funcional evidente y permanente.

La mencionada interrelación y/o interdependencia entre distintos tejidos del individuo y los cambios temporo-espaciales asociados a la diferenciación y el desarrollo implica, por ejemplo, que el entorno hormonal de un individuo macho no induzca exactamente los mismos efectos sobre la morfogénesis y diferenciación de órganos y tejidos que el de la hembra. En el caso del SNC, que es el principal interés de esta tesis, la presencia cualitativa y cuantitativa de metabolitos, mecanismos y estructuras participantes de la diferenciación y desarrollo presentan, en muchos casos, dimorfismo sexual, lo cual

a su vez produce diferencias en la maduración para cada sexo y la respuesta funcional en condiciones fisiológicas y luego de desafíos farmacológicos, como ha sido ya demostrado en la rata (Miller, 1983; Shughrue & Dorsa, 1993; Diana et al., 1993). Este simple ejemplo sirve para expresar sólo una de las distintas fuentes de variabilidad de la ontogénesis de mamíferos.

A continuación se presentan algunas fuentes de variabilidad intra- e interindividual existentes durante el programa de maduración funcional del SNC.

COMO SE ALCANZA LA FUNCION NERVIOSA ADULTA CON AMPLIA CAPACIDAD ADAPTATIVA

Durante el neurodesarrollo prenatal, se puede observar como cada región tiene su propio patrón de origen neuronal, aunque los patrones neurogenéticos de áreas funcionalmente acopladas son -en no pocos casos- coincidentes. El gráfico que sigue se construyó a partir de distintos reportes (Rodier, 1977; Van Vulpén & van der Kooy, 1998) sobre estudios de los patrones neurogenéticos en rata (comparar SN vs NE, núcleos morfológica y funcionalmente relacionados, y CER vs NE, núcleos sin acoplamiento estructural directo). Aunque ciertamente no es la regla, se pueden encontrar algunos casos sobre la dependencia de la maduración de un área del desarrollo de otra que está estrechamente relacionada a la primera.

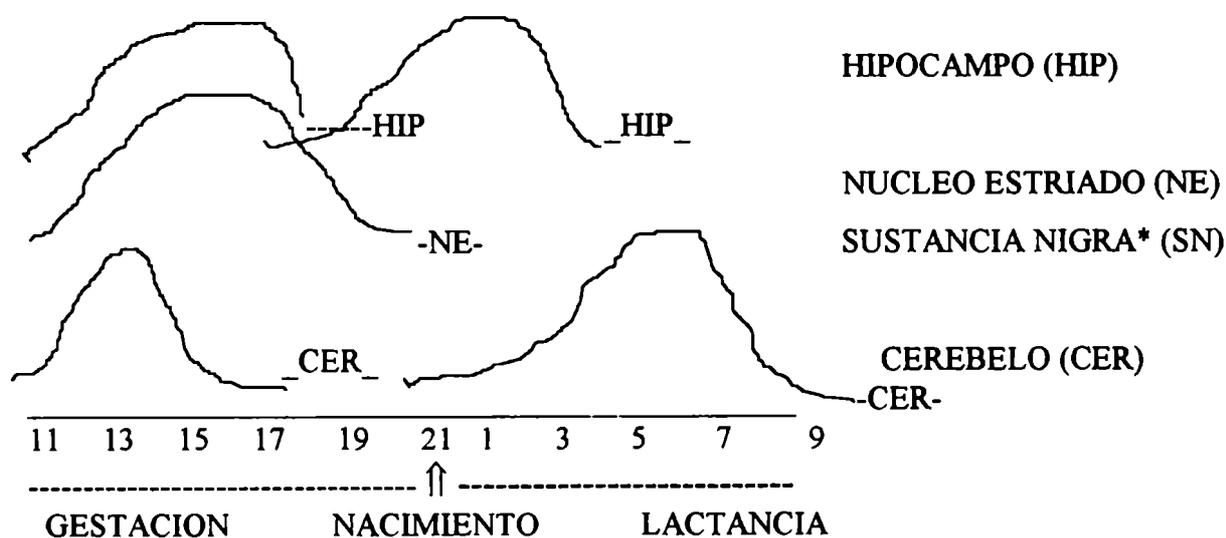


FIGURA 1. PATRONES NEUROGENETICOS EN DISTINTAS AREAS DEL SNC

Además, se ha demostrado que la cantidad de neuronas por unidad de área cerebral al final del desarrollo perinatal está estrechamente ligada a la densidad neuronal del individuo adulto (ver ejemplo cortical en ref. Finlay & Slaterry, 1983).

Por otro lado, en el SNC de mamíferos cada uno de los sistemas de neurotransmisión modifica su respuesta a un estímulo físico o agente químico neuroactivo específico, endógeno o exógeno, en función de su madurez. A partir de un determinado estadio prenatal de compromiso y diferenciación neuronal comienzan a expresarse receptores, canales iónicos, enzimas encargadas de la síntesis de neurotransmisores, etc.

El patrón de expresión de estos marcadores de fenotipo neuronal varía dentro del SNC desde el nacimiento hasta el alcance de los valores adultos, y de región a región para cada tipo de receptor (y dentro de un mismo sistema de receptores, de subtipo a subtipo).

Esto implica además que un área neural que tenía escasa concentración relativa de un receptor (*R* hipotético) en el neonato, puede tener luego un pico máximo de expresión durante el estado adulto mayor respecto a otra área que durante las primeras semanas de vida estaba relativamente enriquecida en *R*.

Para mayor claridad de este concepto, en la Fig. 2 se comparan la densidad de sitios de binding al receptor serotoninérgico 5-HT₄ en el NE y la protuberancia (PROT) desde el primer día de vida hasta la adultez temprana de la rata (Waeber et al., 1996).

Otro paso importante en la obtención de un SNC maduro es la maduración de la comunicación transneuronal entre un área y sus áreas proyectivas. La comunicación directa entre áreas se presenta sólo entre las partes involucradas en un sistema funcional, como podría ser el caso de la comunicación directa nigroestriatal, circuito subcortical principal del sistema motor.

Hacia el final del neurodesarrollo prenatal del NE, comienzan a llegar las aferencias dopaminérgicas nigrales. La activación de la enzima formadora de AMPc -*adenilato ciclasa* (AC)- luego de la unión de dopamina (DA) al receptor tipo D1 (D1R) en NE, se expresa con mayor o menor potencia según el estadio de desarrollo postnatal (Fig.3, a partir de ref. Coyle & Campochiaro, 1976).

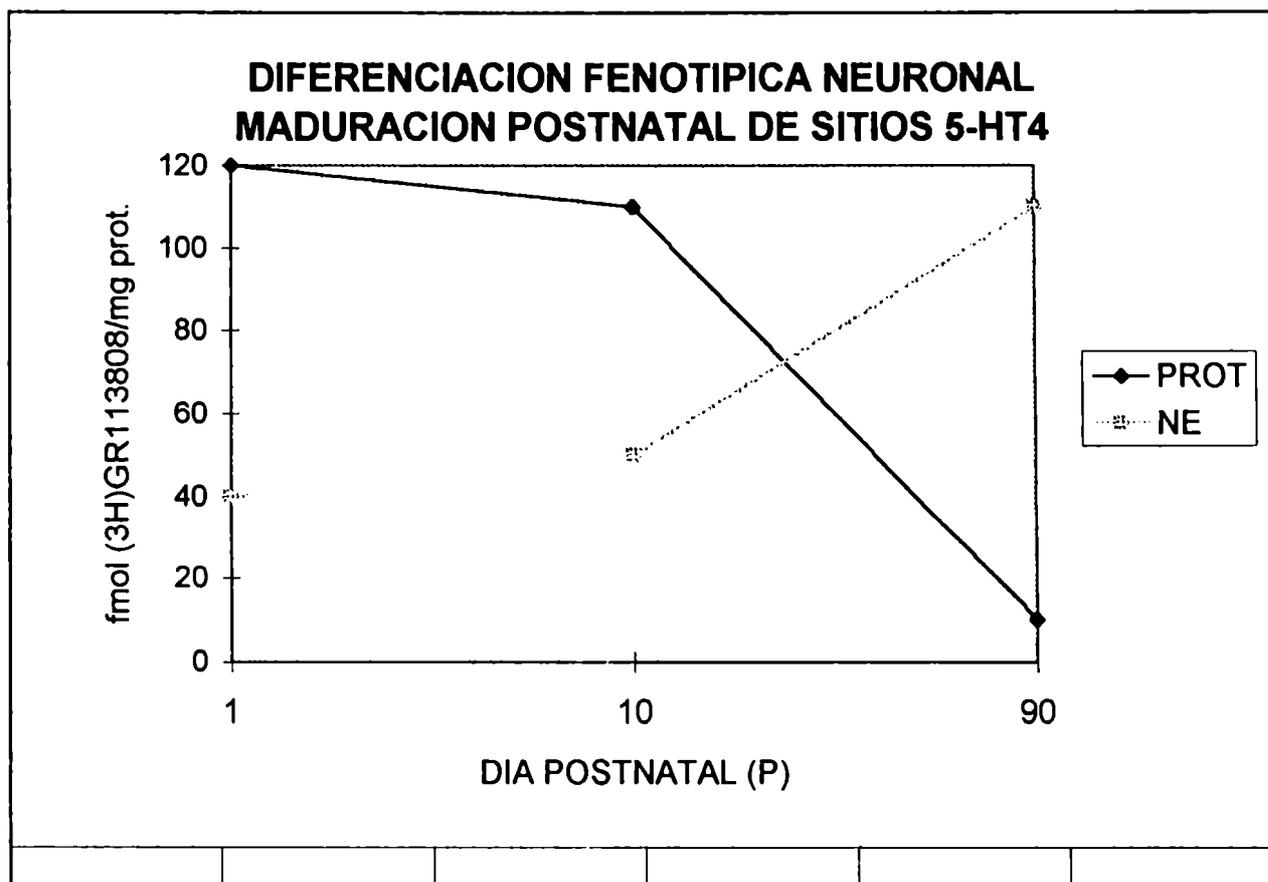


FIGURA 2. PATRONES ONTOGENETICOS DE LA EXPRESION DE SITIOS DE BINDING SEROTONINERGICOS DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

Extraído parcialmente a partir de ref. Waeber et al., 1996

NE = núcleo estriado PROT= protuberancia

Además, la interacción de un neurotransmisor con su sistema receptor específico dispara modificaciones en las conductancias de canales iónicos y/o activa mecanismos de transducción de señales intracelulares, todo lo cual también presenta variaciones temporo-espaciales a través de la ontogénesis postnatal.

A nivel molecular, un ejemplo particular de como el uso de los distintos mecanismos circuitales puede modificar la compartimentalización y organización intraneuronal (y así la capacidad de respuesta de la neurona), es la regulación de la fosforilación del marcador presináptico GAP-43 (Growth Activating Protein-43) por la PKC (Protein-Kinasa C) a través del cambio de la capacidad de binding de la GAP-43 a la Calmodulina, luego de la activación neuronal mediada por receptores colinérgico-muscarínicos (mAChRs) en terminales neuronales (El-Fakahany, 1988). Enfocando el desarrollo podría este podría

ser un ejemplo válido de los mecanismos moleculares de la ontogenia cerebral dado que las proteínas antedichas han demostrado cumplir un rol en procesos de remodelamiento plástico de terminales sinápticos durante el neurodesarrollo (Pfenninger et al., 1991).

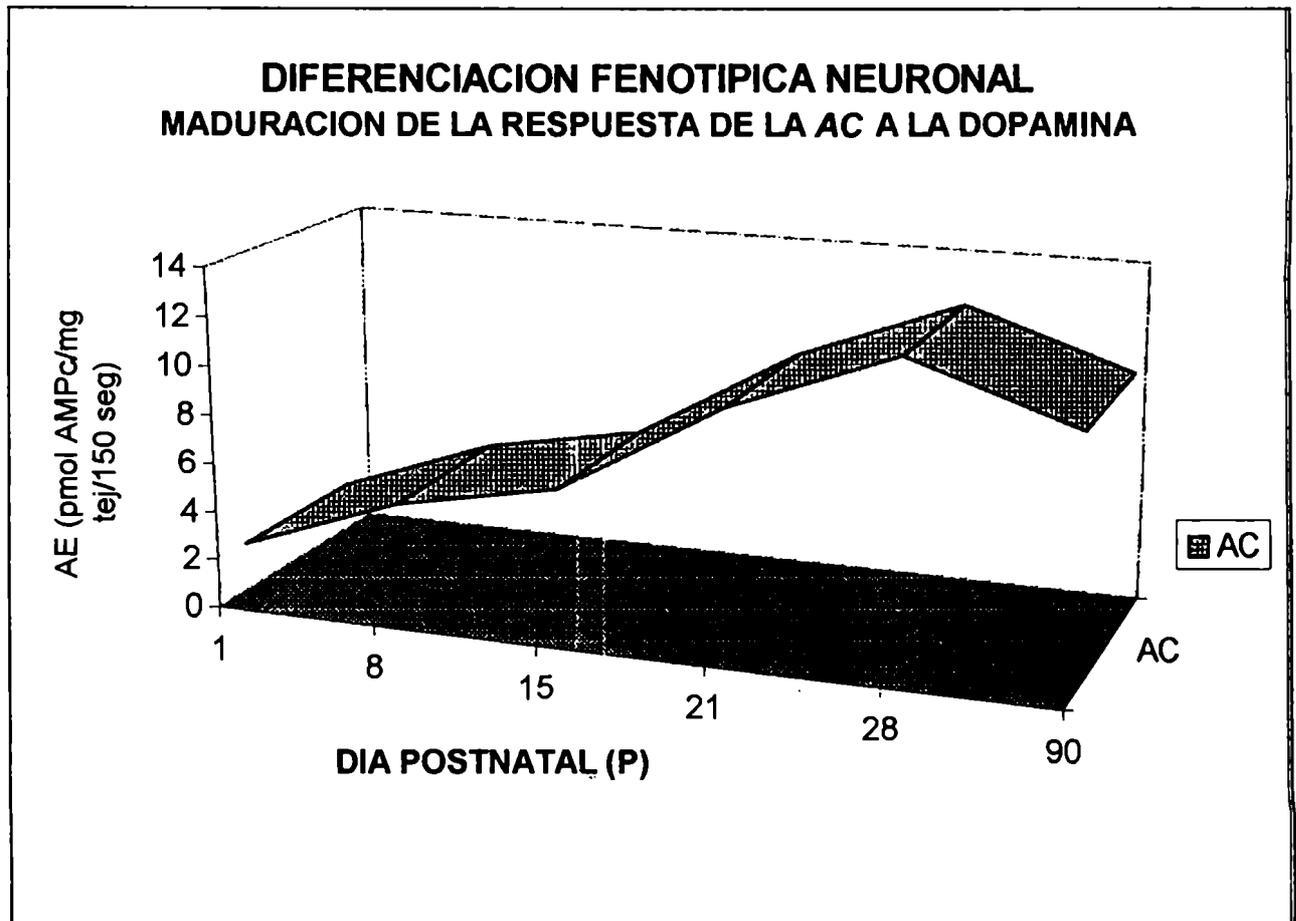


FIGURA 3. PATRON ONTOGENETICO DE MADURACION DE LA FUNCION DE UN MARCADOR ESTRIATAL ESPECIFICO DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL

* AC= adenilato ciclasa

AE= actividad enzimática específica

En este nivel molecular es donde la calidad y cantidad de contactos sinápticos que poseerá el individuo adulto es seleccionada durante el desarrollo del SNC en respuesta a las cantidades y calidades de estímulos ambientales fisicoquímicos o sociales.

Una consecuencia de la maduración de los contactos interneuronales es que entre áreas sinápticamente conectadas existe intermodulación de la expresión de los distintos parámetros de neurotransmisión: síntesis y turnover de receptores y neurotransmisores, liberación y uptake de los neurotransmisores, liberación y uptake de neuropéptidos y factores de crecimiento, etc. Un ejemplo clásico de esta modulación recíproca es nuevamente la comunicación entre la vía colinérgica y la dopaminérgica en el sistema nigroestriatal durante la actividad y la coordinación motora (Hikosaka, 1991). Las actividades de las enzimas *colina-acetiltransferasa* (ChAT) y *tirosin-hidroxilasa* (TH), marcadores de las vías colinérgica y dopaminérgica respectivamente, se expresan en NE durante el neurodesarrollo con un patrón ontogénico bastante similar (Coyle & Campochiaro, 1976).

En condiciones patológicas o farmacológicas también es posible observar casos de alteraciones interdependientes. En la etiología de las disfunciones motoras comunes en la clínica neurológica humana como el Parkinson y Huntington, es posible ver modificaciones dopaminérgicas y colinérgicas muchas veces en forma interdependiente en distintas etapas del proceso neurodegenerativo (Klawans & Rubovits, 1972; Ahlskog et al., 1991).

También se manifiesta la covariación de marcadores de estos sistemas de neurotransmisión en los pacientes tratados por largo tiempo con bloqueantes de receptores a DA como el bloqueante de receptores a dopamina D2R *Haloperidol* (HAL). No sólo se produce una respuesta de aumento (up regulation) de estos últimos, sino que la potenciación posterior del turnover y liberación de DA en NE produciría más tarde aumento de receptores colinérgicos de tipo muscarínico (mAChRs) en este núcleo subcortical (Russi et al., 1993; Dewey et al., 1990).

Aunque en este caso se trata de un reporte hecho con animales adultos sirve como ejemplo de la interregulación entre áreas o poblaciones neuronales funcionalmente relacionadas que posiblemente comience al finalizar la maduración funcional básica, lo cual en el NE ocurriría al final del primer mes de vida (Coyle & Campochiaro, 1976).

De este modo, como una primera síntesis se puede decir que:

A través del neurodesarrollo existe ontogénesis específica para cada área cerebral, para cada circuito interregional y para cada aspecto funcional. Esto implica que se puede obtener un amplio rango de respuestas fisiológicas a los agentes propios del medio interno o a factores exógenos, y hasta se pueden inducir fenómenos totalmente opuestos ante una misma noxa, en distintos momentos del neurodesarrollo

Como segunda síntesis se puede generalizar que:

La particularidad de mayor significado biológico durante el neurodesarrollo sería que, mientras las modificaciones inducidas por estímulos físicos y químicos y la actividad funcional *forma* el SNC, el input en el adulto sólo lo *transforma* y en la mayoría de los casos en forma parcial y/o reversible, puesto que no induce cambios biológicamente trascendentes y permanentes en el mismo.

Hasta este punto, he tratado de aproximar el grado de complejidad que implica el neurodesarrollo. Esta complejidad se debe a la superposición en condiciones normales de numerosos patrones de expresión y actividad de marcadores celulares y moleculares, cada uno con su propia dinámica temporal y espacial. También se puede adelantar que las consecuencias de la exposición temprana a estímulos físicos o químicos, endógenos o exógenos, sobre la dimensión y organización estructural y funcional de cada área neural será entonces significativamente variable según el estadio en que se encuentren el/los blanco/s específico/s del agente. Existen otras variables biológicas que modifican dichas consecuencias. A continuación se presenta, como ejemplo, una síntesis de la importancia del metabolismo de agentes exógenos para las alteraciones funcionales potenciales que pueden resultar de la exposición temprana a una noxa.

He elegido un último ejemplo que resalta el rol trascendente de la biotransformación tanto en la exposición del SNC inmaduro a agentes exógenos como en la vida en general, y que indica que:

La variabilidad en los sistemas de degradación de anticonceptivos hormonales esteroideos orales puede incidir críticamente sobre la actividad biológica de los mismos. La falla en la anticoncepción inducida por hormonas esteroidas **aumenta 4 veces** en mujeres tratadas en forma crónica con antiepilépticos debido a la modificación que realizan estas últimas sobre el aparato de biotransformación (Shuster, 1996). Estas drogas estimulan a las enzimas encargadas de la biodegradación de la terapia hormonal. O sea, indirectamente inciden en el destino del embrión: implante o anticoncepción.

Habiendo presentado el concepto y las implicancias de la biotransformación para la respuesta del organismo a las variadas fuentes de estímulos químicos (aditivos alimentarios, drogas base y excipientes de fármacos, pesticidas y otros compuestos agroquímicos, etc.), es necesario remarcar que la capacidad de respuesta biotransformante también presenta variabilidad biológica intra- e interindividual y varía a través del desarrollo (ver gráfico en pág. 15).

Existen reportes que indican claramente la presencia de patrones de expresión diferencial de los mecanismos de biotransformación de drogas y xenobióticos a través del desarrollo prenatal y postnatal (Klinger, 1974, 1982; Markova, 1990). Por ejemplo, Jahn et al. (1993), han reportado que el tratamiento de ratas con diferentes dosis de CCl_4 produce, 24 horas más tarde, distintas alteraciones del metabolito citocromo P450 y de las capacidades de peroxidación, *en forma dependiente de la edad de los animales tratados*. Para uno de los marcadores de peroxidación evaluados, la inhibición fue mucho más pronunciada en ratas de 15 días de edad (P15) que en P60.

Además, exclusivamente en las ratas más inmaduras, se observó un drástico aumento de la formación de lipoperóxidos endógenos (evaluados como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), y también mayor deterioro histopatológico hepático que en las ratas adultas jóvenes.

Otro factor que agrega diferencias en los mecanismos de biotransformación sería la intensidad de la actividad fisiológica realizada por el individuo durante el desarrollo. Se ha encontrado en modelos animales experimentales y en humanos, que el grado de ejercicio agudo produce varía los niveles plasmáticos de lipoperóxidos y GSH, y dichas respuestas al ejercicio son dependientes de la edad y del grado de entrenamiento previo del individuo (Kretzchmar et al., 1991). Esto sugiere la presencia de diferencias en la capacidad biotransformante en mujeres en edad fértil que fueron expuestas a distintos grados de estimulación durante la maduración postnatal. El aislamiento o hacinamiento por un lado, y la presencia o ausencia de individuos jóvenes que dediquen gran parte del día al juego por otro, podrían ser promotores de variaciones en la capacidad de biotransformación de metabolitos circulantes por plasma.

Se debe considerar también que las actividades enzimáticas involucradas en la biotransformación terminan de madurar durante el desarrollo postnatal (Heimann, 1982).

Respecto a la maduración de la sensibilidad farmacológica en forma dependiente del ambiente de crianza, Exner & Clark (1993) reportaron que algunos de los efectos de la administración periférica de amfetamina en animales adultos eran parcialmente dependientes de la intensidad lumínica a la que habían sido expuestos durante la lactancia y la infancia. Este ejemplo representa a muchos casos de respuesta farmacológica diferencial en función de los efectos directos e indirectos de la estimulación física y social acumulada durante la vida temprana del individuo, y también podría representar otro ejemplo de variabilidad en biotransformación dependiente de la estimulación.

A partir de los reportes mencionados, era predecible que se profundizaran estos estudios a nivel pre- y postnatal temprano. En este sentido, los trabajos han tratado de acercarse al problema de la biotransformación y al estudio de los posibles efectos neurotóxicos de agentes químicos, con dos intereses principales:

1. Diseñar terapias farmacológicas más precisas y efectivas
2. Disminuir al mínimo posible la relación costo/beneficio de la administración de fármacos a mujeres embarazadas o madres de lactantes, y en el caso del tratamiento de neonatos, lactantes o infantes preescolares.

Con este fin, se pueden encontrar diversos trabajos del grupo de Klinger, que confirman la presencia de múltiples variables en el metabolismo de fármacos durante el desarrollo y en las consecuencias de estas sobre la conducta del individuo expuesto, a nivel celular y molecular, como ya fuera anticipado en párrafos anteriores. A manera de resumen de este punto se puede citar:

1. Los efectos del anticonvulsivo (antiepiléptico) fenitoina sobre la biotransformación y lipoperoxidación hepática son dependientes de la edad (Jahn et., 1989).
2. Un significativo porcentaje de mujeres epilépticas, tratadas con mono- o politerapia anticonvulsiva durante el embarazo, presentan complicaciones de parto y malformaciones en los neonatos (Klinger, 1989).
3. El uso de anestésicos e hipnóticos debe considerar la edad y sexo de los individuos (Klinger, 1970; Wenzlik & Klinger, 1976).

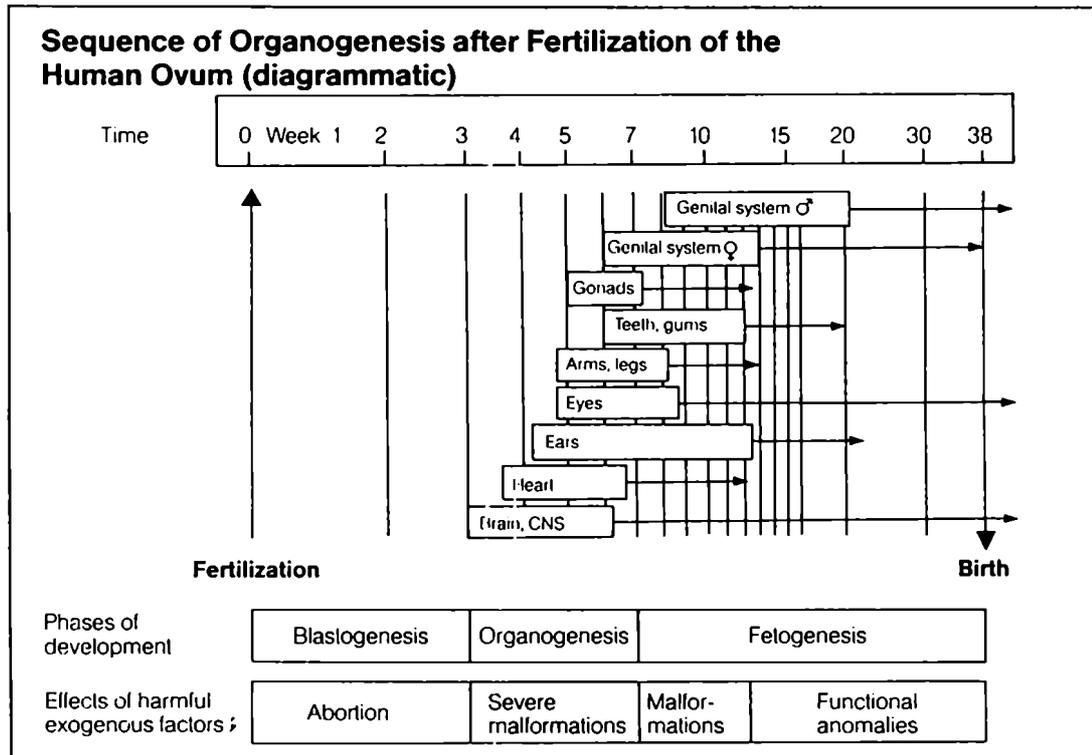
De este modo, la biotransformación es una rama de la farmacología que permite otro nivel de análisis en el momento de explicar los mecanismos por lo cuales los agentes químicos afectan la diferenciación y el desarrollo del SNC.

Considerando todas las fuentes de variabilidad mencionadas previamente, lo que sigue es una discusión sobre los mecanismos de defensa del SNC contra la interferencia de factores externos y la consecuente probabilidad de alteración permanente de conducta por exposición a agentes químicos durante el neurodesarrollo.

1.3. CUAL ES LA PROBABILIDAD DE ALTERACION FUNCIONAL PERMANENTE POR INTERFERIR EL NEURODESARROLLO

El siguiente es un resumen de lo antedicho con el sentido de hacer primero una aproximación general a la sensibilidad del SNC inmaduro frente a la exposición a neuroteratógenos funcionales.

1. Existen muchas variables que inciden en la maduración de la función neural final,
2. Durante la gestación y el período postnatal cada area neural (así como cada órgano del individuo) tiene su propio patrón de desarrollo temporo-espacial que es necesario respetar para alcanzar la maduración final (Fig. 4).



* a partir de Fichtl et al., 1992

3. Luego de la obtención de la estructura básica de cada sistema sensorial, al final de la gestación aparecen esbozos de respuestas a la pequeña gama de estímulos intrauterinos, endógenos o exógenos, que van apareciendo. Bradley & Mistretta (1975) reportaron que la detección inicial de respuestas positivas en el feto humano (*) a la estimulación sensorial inducida se presentaría a las:

Respuestas a estímulos	tactiles	7	semanas
	visuales	13-17	semanas
	sonoros	26	semanas
	gustativos	34-39	semanas

olfativos los sistemas receptores de olores estan listos para responder hacia el final del 3er. trimestre.

(*) duración de la gestación normal en humanos= 39 semanas

4. Los agentes endógenos inductores o moduladores del neurodesarrollo son de la misma clase que las noxas de origen externo a las cuales estamos expuestos en forma continua a través de la alimentación, las adicciones, los fármacos, los cosméticos, el ambiente laboral y la polución, y que sólo una pequeña proporción de estos fue estudiada en cuanto a sus propiedades neurotóxicas (ver tabla I).

AGENTES CATALOGADOS COMO

	<i>Parcial o completa</i> caracterización como Peligroso para la salud	<i>Mínima información</i> es disponible sobre toxicidad	<i>No existe ninguna</i> información sobre toxicidad
Drogas base y excipientes utilizados en las fórmulas farmacéuticas	36	39	25
Aditivos alimenticios	19	35	46
Pesticidas/formulaciones de venenos	34	28	38

** Extraído de: Toxicity testing: Strategies to determine needs and priorities.

National Academy Press, Washington, DC (1984)

Tabla I. Estimaciones sobre el porcentaje de conocimiento toxicológico de diferentes categorías de agente químico; a partir de una compilación hecha por un comité de la Academia Nacional de Ciencias (USA)

Y la mayoría de las drogas utilizadas con rutina en la clínica pediátrica poseerían efectos neurotóxicos funcionales a corto y largo plazo desconocidos. Los especialistas han alertado repetidas veces sobre este punto (Reinhardt & Kusenbach, 1986). Mas concretamente, se ha presentado un trabajo donde

se analiza retrospectivamente el caso de la Talidomida y se llega a la conclusión que había datos durante la experimentación en animales que indicaban la necesidad de hacer estudios mas profundos antes de pasar a los estudios preclínicos y clínicos y ser liberada al mercado farmacéutico. De haber mediado esos estudios adicionales, existe alta probabilidad que esa droga no hubiera llegado al consumo masivo (McBride, 1977; otro iszviski ?).

5. Existen en el organismo sistemas de biotransformación que comienzan a operar a partir del neurodesarrollo prenatal tardío y culminan su maduración durante el período postnatal tardío (Heimann, 1982) los cuales pueden ser modificados por la llegada al organismo de agentes externos (Fig. 5).

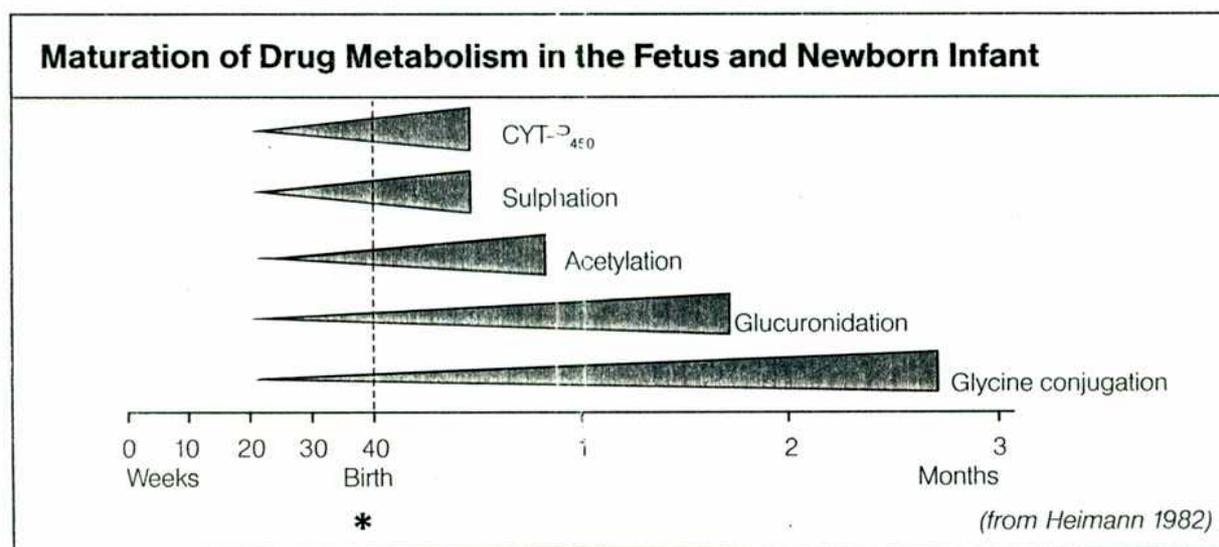


FIGURA 5. MADURACION DE LOS MARCADORES DE BIOTRANSFORMACION

6. Los agentes exógenos pueden adelantar, retrasar, anular o modificar una o más etapas de la ontogénesis normal de cada area neural. En la Fig. 6 que sigue se ven las consecuencias persistentes que produce la exposición prenatal a nicotina sobre el patrón de expresión de receptores colinérgicos muscarínicos durante la maduración postnatal del NE y el Hipocampo (HIP) (a partir de ref. Zahalka et al., 1993).

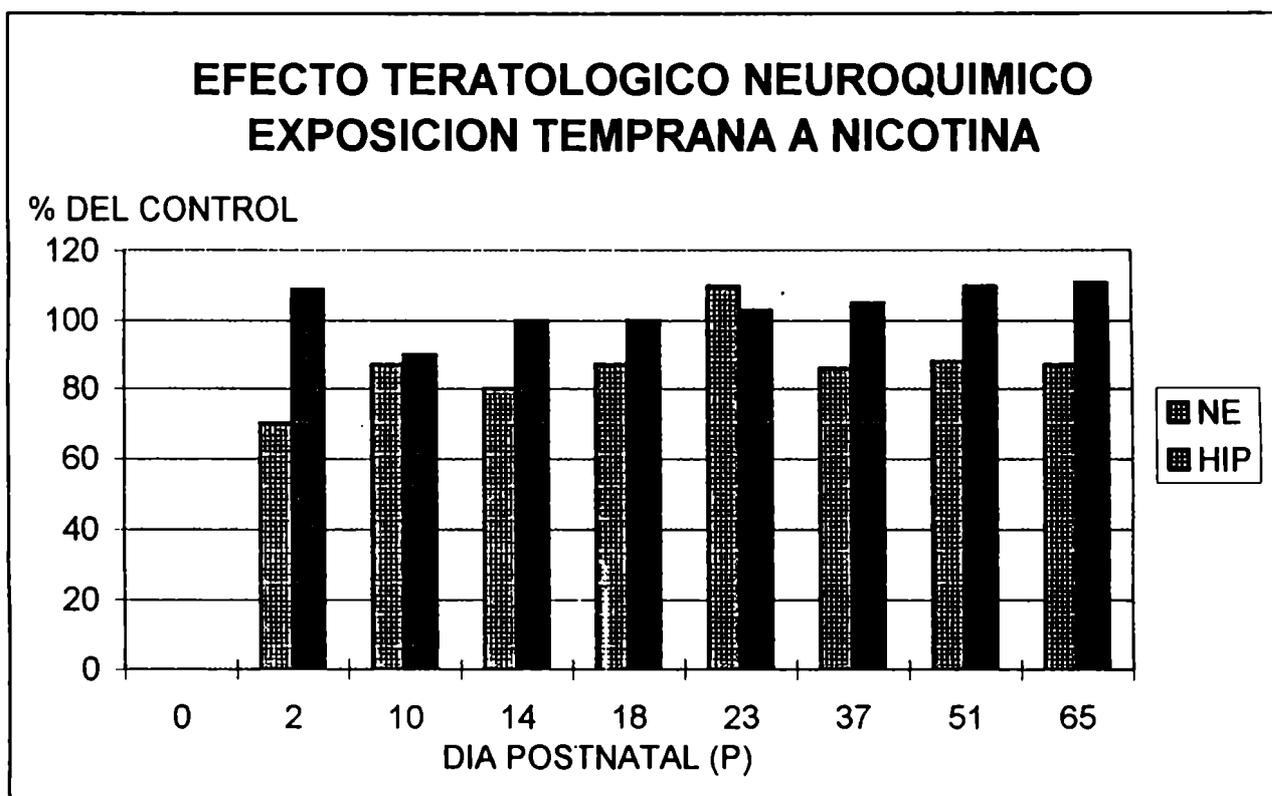


FIGURA 6.

Teniendo en cuenta estos antecedentes como argumentos,

uno podría especular que la **incidencia** de alteraciones funcionales irreversibles del neurodesarrollo humano por exposición temprana a agentes químicos **sería relativamente alta**.

Ciertamente, una revisión del grupo de Greenough del neurodesarrollo, enfocando principalmente la maduración sináptica y la relevancia de la actividad fisiológica en los procesos sinaptogénicos dependientes de experiencia (Greenough et al., 1995), propuso que:

- ➡ Cabría esperar consecuencias adversas por super- o subproducción de sinapsis, y también luego de interferencias en los procesos de estabilización y eliminación sináptica durante el neurodesarrollo.
- ➡ Para cada area del SNC el patrón de conexiones es más importante que el número de las mismas.
- ➡ Los periodos del neurodesarrollo donde se reciben estímulos (ambientales) tanto como la cantidad y calidad de dicha estimulación son cruciales para el pleno desarrollo de los componentes de sostén metabólico del cerebro.
- ➡ Ciertas formas de deficiencia mental podrían ser consecuencia de la disparidad temporal entre la experiencia y la sensibilidad del SNC a la misma.

Aunque este trabajo se refería principalmente a “experiencias” de estimulación fisiológica, en gran parte podría homologarse con las “experiencias” de exposición a agentes químicos.

De este modo, cabe la pregunta de si en la experiencia clínica se ha comprobado esta expectativa de una alta tasa de alteraciones de conducta con este origen.

Para responder esta pregunta, es necesario comparar los resultados de un análisis teórico de este punto para luego brindar las escasas pero significativas estadísticas que han sido elaboradas a partir de modelos animales experimentales y estudios longitudinales en humanos en los últimos 10-15 años.

1.3.1. Teoría

Muchos (sino la gran mayoría) de los cambios producidos por la interferencia de noxas con la amplia gama de patrones de neurodesarrollo considerados normales, deben tener una alta probabilidad asociada de **reversión o compensación cuasitotal**.

Esto puede ser concluido considerando que:

1. Cada una de las 10^{11} neuronas del sistema nervioso están interconectadas formando poblaciones (a su vez interactivas) de distinto número de células, distinta jerarquía relativa y distintas propiedades emergentes. Si se acepta que cada una de esas asociaciones poblacionales debe operar dentro de

ciertos límites electroquímicos y fisiológicos, la modificación del estado de equilibrio electroquímico de un nivel poblacional o jerárquico debe afectar en mayor o menor grado a los otros elementos de ese nivel para evitar las alteraciones del output final del sistema total. Las modificaciones permanentes representarían la imposibilidad de compensación entre los equilibrios de distintas poblaciones en un mismo o distintos niveles jerárquicos, lo cual, por la plasticidad circuital entre las 10^{11} neuronas sería un resultado poco probable (interpretación personal, en parte derivada a partir de Black, 1986).

2. El árbol dendrítico (ramas de entrada de estímulos eléctricos o químicos a la neurona) permite, teóricamente, la recepción de 10.000 a 200.000 señales por neurona. Existe acuerdo en que difícilmente se llegaría a saturar este sistema receptivo (Alkon, 1989).

3. En general se acepta que existe redundancia neuronal para el procesamiento de información puesto que se han reportado en modelos animales experimentales y en humanos numerosos casos de pérdida de densidad neuronal sin efectos sobre la respuesta funcional global del área afectada

4. El neurodesarrollo del individuo depende de la calidad y la cantidad de estímulo familiar y social. Aunque el peso del ambiente es el condicionador principal, no se puede descartar componentes genéticos en la sensibilidad particular al éxito o fracaso de cada etapa de la maduración de la función cerebral (Van Gelder, 1994).

➡➡➡ Por lo tanto, hay que tener en cuenta que existen numerosas fuentes de variabilidad interindividual e intraindividual a nivel neuronal (unidad anatómica mínima para el procesamiento de señales) que permitirían la plasticidad necesaria como para disminuir significativamente la trascendencia de las interferencias exógenas.

En consecuencia, desde el punto de vista teórico, *la atenuación de cambios en la química del cerebro inmaduro sería un evento frecuente*, y sería difícil detectar anomalías funcionales originadas durante el desarrollo perinatal, en el infante o el adolescente, y todavía con mucha menor probabilidad en el adulto.

Los mecanismos evolutivos de seguridad en los mamíferos ejecutan sorprendentes y sofisticados programas de reparación, remoción o compensación de las lesiones originadas tempranamente durante el desarrollo. Los defectos orgánicos irreversibles constituirían el primer paso en la genesis de disfunciones cerebrales. Pero cada una de las etapas de la maduración del SNC, como por ejemplo la diferenciación de los patrones ontogenéticos de expresión de receptores y enzimas involucradas en la síntesis de neurotransmisores, tiene su propia influencia en la función cerebral madura final y una probabilidad normal de éxito (o error) particular.

En consecuencia, el riesgo máximo de alteración (ya sea estructural o funcional) sería la suma integradora de las probabilidades de falla de todos los pasos.

Podríamos suponer entonces que, la naturaleza sólo permite deficiencias por “error probabilístico” o por interferencia del ambiente externo en una tasa mínima durante el embarazo, las cuales son sometidas a ajustes finos durante el desarrollo postnatal.

Ciertamente, las **anomalías estructurales** menores son relativamente infrecuentes aunque no despreciables en humanos. Durante los años 60s se presentaban en menos que el 4% de la población (Marden et al., 1964). En los últimos años las anomalías humanas mayores, con secuelas permanentes para el desarrollo psico-social, se presentan en 1-3% de la población, pero si se incluyen **malformaciones menores** (por ej., orejas bajas) y **alteraciones conductuales** detectadas hasta el primer año de vida, la cifra llegaría a 10-14 % (Fabel, 1988; Iszviski, 1998). De este último porcentaje una proporción menor pero no despreciable ya ha podido ser unívocamente asignada a la exposición a agentes químicos de consumo humano y ambientales (Fabel, 1988).

Ciertamente, una extensa búsqueda bibliográfica sobre los efectos de aditivos y conservantes alimenticios, fármacos, agroquímicos, gases liberados por motores a combustión, etc. en animales permite apreciar que la gran mayoría induce modificaciones, de importancia biológica variable, respecto al grupo control respectivo. Si no fuera en humanos una amplia mayoría de las alteraciones tempranas atenuada hasta la “normalización” del punto afectado, la incidencia de neuroteratología funcional sería todavía mayor al 15-20% de la población infantil que es posible predecir al presente (Arndt et al., 1994; 1995; Azcurra et al., en prensa).

1.3.2. REALIDAD

HALLAZGOS A PARTIR DE MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES Y LA EXPERIENCIA CLINICA HUMANA

1.3.2.1. LO QUE REPORTA LA CLINICA MEDICA

Al presente se prosigue la acumulación de datos respecto al efecto neuroteratogénico de fármacos recientemente liberados y los de prescripción clásica en la práctica médica mediante modelos animales experimentales. Respecto a humanos, ya en 1989 la revista "Pediatrics" presentaba listados de drogas clasificadas en cuanto a su capacidad de liberarse y/o acumularse en la leche materna, los efectos somáticos y fisiológicos en neonatos e infantes, etc. (ver resumen en tabla II).

Si observamos la tabla podemos concluir en primera instancia erróneamente que la amplia mayoría de los fármacos existentes no son capaces de producir neuroteratogenia de conducta.

Droga	Efecto	Droga	Efecto	Droga	Efecto
Ansiolíticos		Anestés./Sedante		Propanolol	
Diazepam		Alcohol	Somnolencia; sueño profundo; diaforesis; debilidad ↓ tasa de crecimiento ↓ reflejo ejección/leche	Antivirales y Bactericidas	
Lorazepam		Hidrato de Cloral	Adormecimiento	↓	
Prazepam		Cloroformo	nr	26 drogas distintas	nr
Antidepresivos		Lidocaína	nr	Isoniasida	Hepatotoxicidad
				Ac. Nalixidico	Hemólisis en infantes con deficiencia de la enzima G 6 P - deshidrogenasa
Amitriptilina	nr	Tiopental			
Amoxapina	nr	Anticoagulantes		Sulfapiridina	Idem anterior; precaución en infantes prematuros o bajo estres

Droga	Efecto	Droga	Efecto	Droga	Efecto
Imipramina	nr	Warfarina	nr	Pildoras anticonc.	
Antipsicóticos		Antiepilépticos		c/estrógeno y progesterona	Raramente ↑ de tamaño de mama; ↓ producción proteica de la leche materna
Clorpromazina	Galactorrea (adulto) - Somnolencia y Letargia (infantes)	Carbamazepina		Vitaminas *	
		Fenitoína	Metahemoglobinemia	B1,B6,B12,K1	nr
Haloperidol	nr	Ac. Valproico	nr	Ac. Fólico	nr
		Fenobarbital	Sedación; espasmo infantil luego del destete		
Primidona	Alimentación-alterada- Sedación	Activas en vías respiratorias		Relajantes musculares	
Otros		d-isoefedrina	Llanto; insomnio; irritabilidad	Baclofen	
Metronidazol	Mutágeno	Terbutalina	nr		
Sulfasalacina	Diarrea hemorrágica	Cardiol Antihip		Estimulantes	
Metoclopramida	nr	Varios distintos	nr	Cafeína	Irritabilidad; Insomnio; se excreta lentamente
Hormonas		Digoxina		Otros Agentes Químicos	
19-nor-esteroides	nr	Diltiazem	nr	Chocolate (teobromina)	Irritabilidad; ↑ de actividad intestinal
Estradiol	Hemorragia Vaginal	Captopril	nr	DDT- otros pesticidas	nr
Prednisona	nr	Metildopa	nr	Hexaclorobencen	Rash dérmico; Diarrea vómitos; Orina oscura; Neurotoxicidad; Muerte
Prednisolona		Minoxidil		Metilmercurio	Puede afectar el neurodesarrollo

Tabla II. Relevamiento de drogas en cuanto a presencia/ausencia de efectos a nivel somático y neurológico en niños expuestos a los agentes químicos durante la lactancia. Extraído parcialmente a partir de un reporte de la Academia Nacional de Pediatría (USA) de 1989

* no aparece en la lista la vit. A, ampliamente sugerida como neuroteratógeno y propuesta como control positivo de rutinas de evaluación de potencial neuroteratógeno estructural o funcional (Brusés et al., 1991; Sallinenfait & Vannier, 1988).

** para varios analgésicos narcóticos y no narcóticos y anti-inflamatorios \Rightarrow nr= no se ha reportado

Lo que se debe considerar en una segunda aproximación es que la experiencia clínica y los relevamientos de este tipo no se dedicaron en el pasado a focalizar las alteraciones funcionales durante la vida postnatal temprana. Por otra parte, recién en los últimos años se han desarrollado tests neuropsicológicos precisos y sensibles para dicho objetivo.

Si observamos con detenimiento encontramos que la presencia de efectos indeseados era demostrada mediante la detección de signos o síntomas funcionales severos y no por la discriminación de respuestas de alta complejidad funcional del SNC, como las cognitivas o de coordinación motora.

Intenté consultar otro relevamiento de datos que sea una referencia mundial a donde la comunidad médica tienda a consultar debido a la jerarquía científica de la entidad encargada de la investigación bibliográfica. En la tabla III que sigue se muestran sólo algunos ejemplos de interés para esta tesis a partir del extenso relevamiento que publicó la Subdirección General Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, en colaboración con el Grupos de Estudios al Nacimiento y el Grupo Interinstitucional de Atención Materno Infantil (auspiciado por OMS/OPS). Este relevamiento incluyó la consulta bibliográfica de miles de reportes. Nuevamente se puede observar que el relevamiento se hizo sobre efectos neurológicos severos y no sobre alteraciones motoras o cognitivas de largo plazo post-exposición al fármaco. **Han aparecido otros relevamientos sobre drogas y sus efectos sobre el neurodesarrollo embriofetal y en el lactante (Bennet, 1988; Schardein, 1993; Briggs et al., 1998).**

En contemporaneidad con estos relevamientos, se reportó que prácticamente todos los antidepresivos estudiados podían ser detectados en la leche materna y hasta podían tener en este compartimento una acumulación diferencial; en gran parte, la relación de concentraciones leche/suero era mayor a 1 (Buist et al., 1990). Mas aun, los niveles séricos de algunos antidepresivos en los lactantes hijos de madres tratadas estarían en algunos casos no muy lejos del rango terapéutico para adultos (por ejemplo, hasta un 50 % del valor maternal para la desmetilsertralina (Stowe et al., 1997). Lo mismo puede ser

encontrado para otros fármacos neuroactivos (Liston, 1998; Yerby & Collins, 1997). Es necesario recordar que hasta un 10% de las mujeres poseen diferentes cuadros depresivos, relacionados a ajustes hormonales, psicológicos y sociales, durante el embarazo y la lactancia (Barreiro et al., 1996). Es así que recién en la segunda mitad de la década pasada comenzaron estudios longitudinales multicéntricos de niños en riesgo de teratología por exposición temprana a fármacos. La bibliografía presente que reporta los primeros resultados de dichos estudios confirma la sensibilidad a neuroteratogénesis funcional del SNC, por lo menos a algunos agentes.

1.3.2.2. LO QUE REPORTAN LOS EPIDEMIOLOGOS

Normalmente, en las casas se encuentra mayor consumo de medicamentos en las mujeres (Trakas & Sanz, 1996) y hasta un 80% de las embarazadas consume de 1 a 3 medicamentos diferentes durante la gestación, incluyendo principalmente antibióticos, anti-inflamatorios, analgésicos y antieméticos (Izviski, 1998). Pero de mayor trascendencia para la neuroteratología funcional es que, según un relevamiento reciente, también en este periodo hasta un 33 % de las embarazadas se automedicarían y/o recibirían prescripción médica de drogas psicoactivas (Lanczik et al., 1998).

Pitlovic et al. (1997) presentaron recientemente los resultados de un seguimiento durante la infancia de 523 (15.8%) niños nacidos con uno o mas factores considerados de riesgo perinatal (incluyendo abuso de cigarrillo y alcohol) de un total de 3318 nacimientos en un periodo de 5 años. De estos niños, un 39% (27% en los controles) tuvieron anomalías neurológicas, incluyendo retraso del desarrollo psicomotriz, retardo mental, desórdenes del lenguaje, disfunción cerebral mínima, etc. Lo recurrente en este tipo de estudios en humanos es que se detectan diferencias significativas en la maduración funcional del individuo afectado en ausencia de diferencias en su desarrollo somático o alteraciones neurológicas maternas (Pitlovic et al., 1997; Nelson, 1991).

En otro estudio un promedio de 1.5% de 427 infantes nacidos de mujeres epilépticas tenían una deficiencia mental contra 0.2% en la población control, siendo el período de exposición de mayor sensibilidad el tercer trimestre de embarazo (Maschover Reinisch et al., 1995). Dado que el pico de ataques epilépticos se presenta al promediar el segundo trimestre, se agrega otra evidencia que por lo menos una parte altamente significativa de la neuroteratología funcional que permanece en el infante o

adulto expuesto tempranamente a drogas antiepilépticas proviene de la mono- o politerapia farmacológica, y no como consecuencia de alteraciones del metabolismo materno post-convulsiones que repercuten en la homeostasis cerebral fetal (Yerby et al, 1992; Granstrom & Gaily, 1992; Maschover Reinisch et al, 1995).

Por otro lado, Streissguth et al. (1987) hicieron un estudio longitudinal prospectivo sobre 1529 embarazos entre 1974-75. Un 46% de las embarazadas relató haber consumido aspirina durante la gestación. En una cohorte de 421 individuos nacidos de aquellas embarazadas expuestas a aspirina durante la primera mitad de la gestación y evaluados a los 4 años se encontró disminución de atención y coeficiente intelectual **en ausencia de efectos físicos.**

También existen reportes de estudios longitudinales en humanos (que confirman los previos en modelos animales experimentales) respecto a que en las poblaciones expuestas a pesticidas se produce un aumento significativo de los niños con dificultades de comportamiento desde el período neonatal hasta el ingreso a la escolaridad primaria respecto a la población control (Jacobson & Jacobson, 1996).

Aunque algunos efectos teratogénicos sobre la tasa de crecimiento tiende a normalizarse años después de la exposición a bifenilos policlorinados (BPCs) parte de los niños afectados a los 7-9 años demuestran apatía y falta de atención (Rogan, 1982). Este tipo de hallazgos se presentan en general en ausencia de neurotoxicidad materna (Chanda & Pope, 1996), lo que nuevamente plantea la sensibilidad diferencial del SNC en desarrollo.

Pero como ejemplos prototípicos de psicofármacos de amplia prescripción y con demostrada capacidad neuroteratogénica, ya sea en animales experimentales o en humanos, que han empezado a surgir en los últimos años se puede citar a los agentes de terapias anticonvulsivantes Difenilhidantoína (DFH) y el barbitúrico Fenobarbital (FB).

El caso de la exposición temprana a DFH es parte de los experimentos de esta tesis y será tratado en las secciones Resultados y Discusión.

Fenobarbital (FB)

El FB es un agente utilizado en la terapéutica de los síndromes convulsivos. Sólo en USA, habría sido prescrito durante la gestación a las madres de **22.000.000 de niños** entre 1950 y fines de los 70's (Maschover Reinisch et al., 1995). En estudios longitudinales sobre los niños expuestos a través de sus madres en Copenhague (Dinamarca), se encontró que los **IQ (intelligence quotient)** eran **menores** que la población control en medio desvío estandar (Machover Reinisch et al., 1995). Notablemente, casi diez años atrás Middaugh (1986) ya había revisado los efectos neuroterato-génicos funcionales positivos de la exposición prenatal a FB en roedores y proponía que los hallazgos aislados reportados en humanos expuestos durante la gestación eran muy similares a los demostrados en modelos animales experimentales.

Por otra parte, casualmente a partir del Registro Psiquiátrico Nacional del mismo país, se encontró altos índices de correlación entre abuso de alcohol y drogas por la madre durante el periodo de lactancia y desarrollo de conductas violentas en los hijos al llegar a la adolescencia tardía y la adultez (Raine et al., 1997). Existe constante debate sobre los criterios de aplicación clínica de drogas neuroactivas en el caso de pacientes embarazadas o en periodo de lactancia (Altshuler et al., 1996).

UNA ENTIDAD CLINICA QUE PODRIA ESTAR ORIGINADA EN NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL

Clásicamente se describieron en el pasado una serie de trastornos funcionales englobados en la entidad *Disfunción Cerebral Mínima (DCM)*. En los últimos años se propuso una nueva denominación en USA. Allí se reconoce como un elemento básico de la clásica DCM al trastorno en la concentración de la atención y se diferencian tres grupos de pacientes con déficit de la atención (denominación nueva **DDA, Desorden de Deficiencia Atencional**)

- 1) **DDA con hiperactividad (DDAH), con inatención, impulsividad e hiperactividad**
- 2) **DDA sin hiperactividad (DDAnoH), con inatención e impulsividad**
- 3) **DDA tipo residual, adolescentes con DDA que fueron hiperquinéticos durante la infancia**

Las manifestaciones clínicas de estos tipos de DDA implican alteraciones en muy diversas funciones cerebrales superiores, que se expresan a través de trastornos en el área de la conducta, de la motricidad y de los niveles superiores del lenguaje, entendiendo esto último como un amplio campo que abarca aspectos neuropsicológicos y lingüísticos, del habla, del aprendizaje de la lectoescritura, del cálculo, etc. (Barkley, 1997). Los síndromes DDA, aunque poseen un origen neurológico u “orgánico”, ciertamente es una “disfunción” o alteración en ciertas funciones cerebrales que pueden tender a mejorar con la maduración del SNC (discusión teórica sobre vulnerabilidad del SNC inmaduro y capacidades compensatorias en pág. 12-19 de esta introducción). De este modo, se incluirían en el síndrome DDA los niños con inteligencia promedio o cercana al promedio, que presentan trastornos del aprendizaje o de la conducta que están asociados a desviaciones en la función del SNC, que se pueden manifestar por distintas combinaciones de impedimentos en la percepción, conceptualización, lenguaje, memoria y control de la atención, de los impulsos o de la función motora. La prevalencia de niños DDA se encuentra en 5 a 15% de la población escolar total (varía según países, clasificación de tipos de DDA, etc., ver ref. Milberger, 1997; Barkley, 1997). Los individuos incluidos en dicho porcentaje tienen alguno de los trastornos mencionados, expresando ya sea conducta hiperquinética o trastorno en el aprendizaje. Existe una significativa diferencia en la prevalencia según sexo, con una relación masculino/femenina de 3- 4/ 1 en la población infantil. Un 25% de los niños con deficiencias de aprendizaje en las escuelas primarias de USA tendrían algún tipo de DA (Roush, 1995). De estos, un 70% serían portadores de síntomas de DA (con o sin H) aun en la adultez (Wender, 1995; Biederman, 1998).

Aunque se han reportado componentes genéticos, se acepta que parte de la etiología de los síndromes DDA estaría representada por los efectos de la *interferencia temprana en períodos críticos de vulnerabilidad* (Barkley, 1990). Siguiendo esta hipótesis, se puede citar un reporte que indica que existen relaciones probables entre factores pre- o perinatales en el origen de estas alteraciones como ser exposición a drogas lícitas o ilícitas como el alcohol, la nicotina, marihuana, cocaína, etc., intoxicación crónica por plomo, mercurio, arsénico, aditivos de los alimentos, factores genéticos, anomalías en la síntesis, liberación o función de neurotransmisores, etc. (Moss et al., 1992; Milberger, 1997). Es necesario remarcar que el panorama para la etiología de DDA no quedaría restringido a los agentes farmacéuticos, puesto que los pesticidas, solventes y otros agentes químicos podrían causar neuroteratología durante el desarrollo en concentraciones que son inocuas para la madre expuesta

(Narotsky & Kavlock, 1995; Gray & Kelee, 1996). Por ejemplo, Elsner et al (1988) reportaron los resultados de un estudio teratológico comportamental colaborativo donde se demuestra la detección de alteraciones funcionales con sensibilidades comparables aplicando una amplia gama de testeos motores y neuroquímicos en animales adultos luego de ser expuestos a diferentes dosis de metilmercurio durante el desarrollo prenatal. El mismo autor (Elsner, 1986) previamente había propuesto que los hallazgos que obtuvo en su modelo animal de inducción de neuroteratología funcional con metilmercurio podían ser homologados a los característicos de los déficits atencionales. Recientemente se ha sugerido una alteración del desarrollo estructural del cerebro como otra variable involucrada en la etiología de DDA. Estudios de RMN han demostrado que los niños DDA portan aproximadamente un 10% de disminución en el tamaño de los lóbulos frontales, el núcleo caudado y el globo pálido (Swanson et al., 1998).

Los DDA fueron tratados en los últimos años con anfetaminas, aunque se siguen probando alternativas terapéuticas farmacológicas como la lamotrigina y otras drogas (Dahlstrom & Theorell, 1997). Estos serían intentos empíricos de controlar la hiperactividad clásica de este síndrome puesto que, notablemente, las anfetaminas son estimulantes psicomotores.

1.3.2.3. LO QUE REPORTAN LOS NEUROPSICOLOGOS Y EDUCADORES

Otra visión del mismo problema ha aparecido en un artículo de la revista Science (Roush, 1995). En el mismo se analiza la participación de distintas deficiencias de conducta en las entidades neuropsicológicas englobadas en la denominación "Discapidad de aprendizaje" (*Learning Disability, LD*) a través de las últimas décadas. Mientras las alteraciones del habla o lenguaje, las emocionales, de origen genético, etc. han permanecido estables o disminuyeron desde 1976 a 1993, del total de niños diagnosticados como "LD", la proporción con dificultad para aprender --principalmente detectable sólo a partir de la escolaridad primaria-- creció desde 24% hasta 50% en este mismo período en USA.

Suponiendo que el tratamiento farmacológico de neuroteratología funcional fuera efectivo como parece en el ejemplo de la atenuación de la sintomatología de los DDA, los que se tratan son niños

diagnosticados durante la escolaridad primaria, o sea, sistemas biológicos que han perdido su capacidad de recuperación persistente. Desde el punto de vista de las aproximaciones de esta tesis, es una prioridad profundizar estudios sobre diagnóstico postnatal y terapia farmacológica tempranos para que, trabajando sobre la sensibilidad y plasticidad del SNC del lactante, producir no un control transitorio de los signos y síntomas, sino una atenuación parcial o total de tipo permanente (Arndt et al., 1993). Sintetizando los hallazgos en modelos animales y humanos respecto a neuroteratología funcional se puede mencionar que (*):

- ➡ Considerando distintos esquemas terapéuticos en cuanto a dosis diaria y duración total del tratamiento, se halla que ***el tercer trimestre es el más sensible a la teratogenización funcional.***
- ➡ La neuroteratología se exagera si aparte del período crítico de sensibilidad también es expuesta otra etapa de la gestación.
- ➡ Los individuos expuestos a dosis terapéuticas antiepilépticas ni son retardados mentales severos ni tienen en general anomalías físicas groseras u obvias, cuando son examinados a largo plazo post-teratogenización.
- ➡ Las familias de individuos expuestos tempranamente son de mayor status socioeconómico, lo que indicaría que los déficits cognitivos y/o motores persistentes en los mismos no es una consecuencia de la educación materna o paterna.
- ➡ No obstante, el análisis de la población expuesta indica que el cuadro funcional se agrava cuando la familia tiene bajo nivel socioeconómico o cuando el afectado representa un nacimiento no buscado. El ambiente social estimulante permitiría atenuar por lo menos algunas de las alteraciones biológicas tempranas.

* parte extraído de Maschover Reinisch et al., 1995

Es evidente que es difícil evaluar alteraciones en el SNC que se manifiestan principalmente como efectos de largo plazo sobre el comportamiento o la respuesta funcional. Muchos patrones de conducta que son importantes para evaluar la normalidad funcional del adolescente o el adulto no pueden ser evidentes o no pueden ser estimados en el neonato, el infante o a través de la niñez temprana. En consecuencia, no es fácil precisar la relación causa-efecto si consideramos que los eventos neuroteratogénicos ocurren principalmente a nivel prenatal o postnatal temprano. Por ejemplo, ciertos déficits cognitivos (habilidad para leer) no se pueden evidenciar hasta que el individuo ha adquirido la capacidad para responder a tareas de determinada complejidad. Así, un niño puede parecer normal en el período neonatal y durante la infancia en términos morfológicos y comportamentales, mientras la examinación específica más tarde puede revelar la aparición de déficits permanentes originados en el evento teratogénico prenatal o postnatal temprano (Ardnt et al., 1994; 1995). De alguna forma esto explica la aparición de ciertos reportes alertando sobre la variabilidad de hallazgos en modelos animales dependiendo del test comportamental seleccionado, de la realización de uno o múltiples diseños de evaluación comportamental, de las edades seleccionadas para hacer los tests, del diseño estadístico, etc., además del período de exposición a la noxa (Loggi et al., 1991; Spear & File, 1996).

1.4. DROGAS SELECCIONADAS EN ESTA TESIS PARA INDUCIR NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL

En esta tesis se trabajó con 2 drogas de amplio uso en la clínica médica:

Droga genérica	Caracterización farmacológica	Target clínico principal (patología)
<i>Haloperidol</i>	neuroléptico	Psicosis
<i>Difenilhidantoína</i>	anticonvulsivo	Síndromes Epilépticos

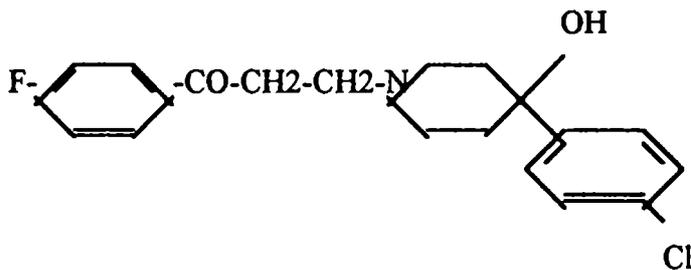
No encontré reportes de trabajos colaborativos multicéntricos sobre el carácter neuroteratogénico funcional de HAL. Si se ha tratado de contrastar resultados de estudios de la ontogenia de reflejos y testeos motores y asociativos luego de la exposición temprana a DFH. Los resultados de una batería de testeos acuerdan el carácter neuroteratogénico funcional de la DFH.

A continuación presentaré un relevamiento bibliográfico de los efectos de estas drogas en modelos animales experimentales, haciendo incapié sobre los cambios inducidos en el mediano y largo plazo post-exposición. De esta forma la intención indirecta es explicar cuales eran los antecedentes que indicaban que estas drogas eran buenos ejemplos para ser utilizados en los esquemas experimentales de esta tesis.

1.4.1. EFECTOS DE LA EXPOSICION TEMPRANA AL HALOPERIDOL

(resumen)

El haloperidol (HAL, 4'-Fluoro-4-{1[4- hidroxí-4-(4'-cloro)-fenilpiperidina]}-butirofenona es un agente neuroléptico prototípico de amplio uso en la clínica médica desde hace casi 3 décadas atrás.



En 1965 salió el primero de una serie de estudios sobre el efecto de distintos neurolépticos en rata indicando sus potenciales especificidades clínicas (Janssen & Awouters, 1994).

Ciertamente es una droga neuroactiva. Se han demostrado numerosos cambios neuroquímicos y funcionales detectables en el individuo inmaduro o en el adulto luego de la exposición aguda o crónica a HAL durante el neurodesarrollo.

EN RATA

Los reportes de alteraciones estructurales y funcionales inducidas por HAL durante el neurodesarrollo de la rata aparecieron al poco tiempo de su uso masivo en la clínica médica (Tuchmann-Duplessis & Mercier-Parot, 1971).

Hallazgos reportados:

1. activación de la enzima clave en la síntesis de catecolaminas, la *tirosin-hidroxilasa* (TH) (Meloni & Gale, 1995).
2. Cambios persistentes en el metabolismo lipoproteico (Van Gent et al., 1991).
3. Modificación de la respuesta farmacológica del individuo adulto (Cuomo et al., 1983; Fujii & Ikeda, 1982).
4. Modifica parámetros neuroquímicos y funcionales del sistema motor en forma dependiente del período de neurodesarrollo expuesto (Madsen et al, 1981; Yamamoto et al., 1981; Cuomo et al., 1985; Hill & Engblom, 1984).
5. Afecta al sistema nervioso inmaduro a través de mecanismos similares a los utilizados por otros agentes neuroactivos con reconocido carácter neurotóxico (Cuomo, 1987; Lin & Walters, 1994).
6. Es un clásico inductor de catalepsia, afectando la lactación y la actividad social de los infantes (Meyer et al., 1994).
7. Modifica también parámetros orgánicos groseros como ser el peso del cerebro y el peso corporal en forma permanente (Holson et al., 1994). Exposición entre G12-16 produce caída permanente de peso cerebral y peso corporal.
8. Interfiere con el patrón de desarrollo normal de los caracteres sexuales en machos y hembras (Bhanot & Wilkinson, 1982; Hull et al, 1984).
9. Modifica la expresión de genes relacionados a la plasticidad temprana del núcleo estriado y otras áreas (Castro et al., 1994).

EN RATAS ADULTAS, se observan efectos similares pero de tipo parcial o totalmente reversible
Ejemplo: Modificación de la neuroquímica y función del cuerpo estriado (Owen et al., 1980; Gongora-Alfaro et al., 1996; Schroder et al., 1994).

HUMANOS

También desde el comienzo de su uso en humanos aparecieron reportes que discutían la bioseguridad del HAL en pacientes embarazadas o en edad fértil (Dieulangrard et al., 1966, 1969; McCullar & Heggeness, 1975).

Desde los años 60's hasta el presente el HAL ha sido usado como agente anti-agitación psicomotriz (antipsicótico de elección), antidisquinético, coadyuvante en el tratamiento del dolor crónico severo y antiemético (Gilman et al., 1985).

Hallazgos reportados:

1. El HAL se excreta en concentraciones cuasifarmacológicas en la leche materna lo cual restringe su uso en pacientes psiquiátricos crónicos (Numberg, 1980, Stewart et al., 1980; Liston, 1998).
2. A partir de los pocos reportes accesibles por Internet existen evidencias que indican efectos neurotóxicos persistentes del HAL sobre el feto expuesto durante la gestación a través del consumo materno. A continuación se cita un ejemplo.

“Un recién nacido fue expuesto continuamente a HAL a partir de la semana 12 y hasta el parto, el cual fue inducido en la semana 39. Pese a que el índice de Apgar no es un indicador sensible de la respuesta funcional cerebral compleja, ya pudo verse puntaje 7 al minuto 1 y 8 al minuto 5, aparte de debilidad muscular moderada y déficit en la succión durante los primeros días de vida” (Kudoh et al., 1994).

Teniendo en cuenta que el período de exposición al HAL en este caso coincidió casi totalmente con la ontogénesis prenatal de los receptores a dopamina de tipo D2 y colinérgicos tipo mAChRs en núcleo estriado, sistemas de neurotransmisión directa o indirectamente afectados por HAL (Ravikumar &

Sastry, 1985, 1992), se puede explicar como la administración del neuroléptico puede producir un déficit neurológico en el recién nacido como el citado anteriormente.

Recientemente ha aparecido un reporte alertando sobre los riesgos de secuelas comportamentales en los hijos de mujeres tratadas con HAL durante la gestación (Cohen & Rosenbaum, 1998). La exposición a psicotrópicos durante la gestación en los últimos años no sería un problema menor en la Salud Pública dado que según un estudio colaborativo multinacional de 14.800 partos entre 1988 y 1990, aprox. 500 mujeres habían consumido estos agentes neuroactivos durante el embarazo (3.5%), y 31 de 444 mujeres consumidoras (8%) hizo uso en forma crónica (Marchetti et al., 1993). Estas cifras serían conservadoras, puesto que Lanczik et al. (1998) han sugerido que hasta un tercio de las mujeres embarazadas tomarían drogas psicotrópicas como mínimo una vez durante la gestación.

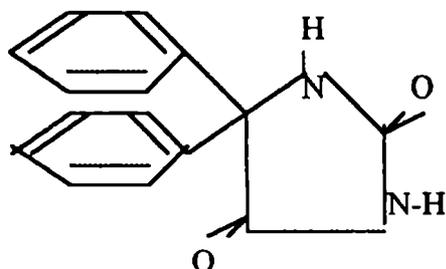
El HAL posee **categoría C** en las 2 escalas para teratogenicidad y efectos tóxicos durante el embarazo para madre o feto (ver clasificación en anexo I). Clásicamente, se recomienda usarlo en mujeres embarazadas sólo cuando se trate de pacientes psicóticos que requieren tratamiento de largo-plazo (Briggs et al., 1998).

No pude encontrar recomendación o legislación mas precisa para este y otros casos de fármacos que han demostrado reiteradamente afectar en forma persistente los patrones funcionales normales despues de la exposición perinatal. En otras palabras, sería muy escasa la información oficial (a nivel nacional e internacional) accesible e integral que indique las pautas de trabajo que deben seguirse con las terapéuticas en base a agentes con demostrado carácter neuroteratógeno de conducta.

1.4.2. EFECTOS DE LA EXPOSICION TEMPRANA A LA DIFENILHIDANTOÍNA

(resumen)

La difenilhidantoína (5,5-Difenilhidantoína ó Fenitoína, DFH) pertenece a la familia de la hidantoínas



La DFH es una droga ampliamente utilizada en la clínica neurológica como anticonvulsivo, siendo parte de la terapéutica de los síndromes epilépticos. Su efecto más relevante en el adulto es la depresión funcional de la corteza motora.

Notablemente, en sus orígenes la DFH, al igual que hoy en día HAL, fue aplicada como antipsicótico de preferencia durante los años 40s (Fenwick, 1992).

Actualmente, no es prescrita para el tratamiento psicológico.

EN RATA

La DFH sería la más potente inductora de neuroteratogénesis funcional entre las hidantoínas estudiadas en modelos animales experimentales (Minck et al., 1991).

Los efectos estructurales y en la morbilidad animal que se han reportado luego de la exposición temprana indican que:

1. Es la que mayor mortalidad predestete produce entre la familia de las hidantoínas (25% contra 12.5% de la Etotoína y 0.8% en el grupo control) (Minck et al., 1991).
2. Induce disminución de supervivencia y peso corporal, disminución de peso cerebral hasta P90, aunque la relación cerebro/cuerpo se mantiene constante (Elmazar & Sullivan, 1981).
3. Provoca hipersensibilidad a la administración de HAL en el individuo adulto (Fujii et al., 1982).
4. Produce efectos neuroquímicos a mediano plazo *opuestos según el periodo perinatal tratado*. Por ejemplo, Galager & Mallorga (1980) reportaron que la DFH producía una caída o aumento en el N° de sitios para (³H)Diazepam en la fracción de membranas de corteza de rata, según se administrara el psicofármaco en el periodo prenatal o postnatal temprano de vida, respectivamente.
5. Administrada durante el desarrollo perinatal produce a largo plazo hiperactividad motora, como fue demostrado por Vorhees (1986). La exposición prenatal a DFH induce alteración del comportamiento locomotor espontáneo y del aprendizaje asociativo-motor (Vorhees, 1986, 1987)
6. Produce retraso de hasta 15 días en la aparición de reflejo de righting (enderezamiento), déficit en la coordinación motora en el testeo en Rotarod y en la Varilla Elevada (Elmazar & Sullivan, 1981).

EN MONO

La exposición prenatal a DFH, en esquemas farmacológicos de mono- o politerapias, produce alteraciones de la memoria de reconocimiento hasta los 3 meses de vida asociado a hiperexcitabilidad respecto a los animales controles: aumento de chillidos, rechazo a atender a los estímulos propuestos y déficit en la orientación visual (Phillips & Lockard, 1996).

EN HUMANOS

Aunque con anterioridad ya se esbozaba el problema (Loughnan et al., 1973; Yang, 1978; Hill, 1982) recién en los últimos 10 años es posible encontrar reportes sobre efectos a mediano y largo plazo de la DFH sobre los patrones de conducta en seres humanos. Este hecho puede deberse en parte a que sólo a partir de la década pasada fue posible medir con eficacia los niveles de DFH en plasma. De este modo era difícil precisar una relación *dosis terapéutica* ➔ *riesgo neuroteratológico*. Con anterioridad, los ajustes de dosis eran hechos en base a los hallazgos clínicos durante el tratamiento. En consecuencia, antes del monitoreo terapéutico de drogas los niveles plasmáticos de DFH pudieron ser relativamente altos, aumentando la probabilidad de alteraciones del desarrollo perinatal.

Los primeros trabajos hicieron incapié en determinar la presencia de teratogenia estructural y alteraciones neurológicas de comportamientos básicos (Hattig et al., 1987; Gaily et al., 1988).

Al comprobarse la presencia de efectos en los primeros reportes se comenzó a trabajar en la interpretación de los mecanismos que se dispararían para producir dichos cambios. Parte de los trabajos enfocaron la dependencia de complemento génico del individuo para la sensibilidad a teratogenización por DFH (Strickler et al., 1985; Phelan et al., 1982).

Entre los primeros trabajos sobre la performance cognitiva de niños expuestos durante la gestación a DFH cabe citar los reportes de Gaily et al. (1988) y Vanoverloop et al. (1992).

“ En niños entre 4 y 8 años de edad, expuestos a DFH a través de la madre durante la gestación, se evaluaron las habilidades cognitivas, respecto a una población control compuesta de niños donde se identificaron 3 o más anomalías menores. Aunque los niños DFH ni los controles fueron encontrados retardados la DFH indujo registros significativamente menores del IQ

(intelligence quotient) de performance (P-IQ), del IQ para escala total (full scale IQ, FS-IQ) y en el testeo de integración visual motora". Actualmente, continúan los estudios longitudinales sobre la maduración neuropsicológica en la niñez temprana y la preadolescencia luego de la exposición prenatal a DFH (Scolnik et al., 1994).

Hace pocos años se ha comenzado a investigar parámetros que permitan la evaluación temprana de la sensibilidad a DFH en pacientes embarazadas en tratamiento crónico por síndromes epilépticos (Buehler et al., 1993).

En realidad, actualmente se cree que no existe un síndrome hidantoínico, valproático, etc., sino que gran parte de las anomalías estructurales y funcionales son compartidas por los infantes expuestos a cualquiera de las clásicas drogas antiepilépticas y no específicos de una monoterapia determinada (Yerby et al., 1992; Granstrom & Gaily, 1992; Maschover-Reinisch et al., 1995).

Los Síndrome Fetales por exposición a los agentes terapéuticos

Trimetadiona, Hidantoínas, Valproato, Primidona, Carbamacepina, Fenobarbital, incluyen:

HALLAZGOS GENERALES: Retraso en desarrollo perinatal y crecimiento intrauterino

ANOMALIAS ESTRUCTURALES: Cejas en V Implantación baja de orejas

Anormalidades cardíacas Epicantus

Microcefalia Hernia Inguinal

ANORMALIDADES CRANEOFACIALES:

Puente nasal ancho Nariz corta u otras alteraciones

Alteraciones en labios Hipertelorismo

Alteraciones en boca Ptosis o estrabismo

Hipoplasia digital distal y/o hipoplasia de uñas

ANOMALIAS FUNCIONALES: Dificultades en el habla Deficiencia mental

Retraso psicomotor Déficit cognitivo (permanente)

TABLA IV. Neuroteratogenia estructural y funcional inducida por exposición a distintos agentes anticonvulsivantes. La lista se ha resumido. Extraído principalmente a partir de

Otra perspectiva sobre el diseño e interpretación de modelos experimentales de Neuroteratología Funcional puede ser advertida en un reporte de Khera (1987). Dado que un patrón similar de malformaciones es inducido luego de la exposición prenatal a aminopterina, alcohol, warfarin, ácido valproico, fenitoína, fenobarbital y trimetadiona, y en patologías como fenilcetonuria y diabetes mellitus, Khera propone que se estudie cuantos son los casos en los que el origen de la teratogenia no es el agente en sí sino los cambios homeostáticos y la respuesta a la toxicidad por parte de la madre que influirían en el neurodesarrollo intrauterino fetal.

Es posible que la consideración de los efectos comportamentales a mediano y largo plazo luego de la exposición prenatal a dosis no malformantes, no neurotóxicas para la madre, pero que sí inducen neuroteratogenia funcional sea un buen indicador de que la etiología principal no se encuentra en la respuesta materna al neurotóxico sino en el efecto en el SNC inmduro (los 3 últimos que cita Khera aparecen en: Vorhees, 1983).

Es evidente que no es tarea sencilla trabajar en humanos para realizar un seguimiento longitudinal de efectos neuroteratogénicos desde el período neonatal a la adultez del individuo afectado. Estas dificultades para coleccionar datos de seres humanos trasciende al campo de la investigación clínica al no permitir un adecuado control de nuevos fármacos y farmacovigilancia de los ya presentes en el mercado farmacéutico. Esta sería una de las razones principales de las incertezas y modificaciones en la clasificación de principios farmacológicos neuroactivos según su bioseguridad en el uso durante la gestación, la lactancia y el infante preescolar. La migración de los individuos, la subjetividad, predictibilidad y variabilidad propia de cada batería de testeos comportamentales hace difícil la tarea de detectar y clasificar drogas respecto al riesgo para el consumo humano. Además, los procesos de desarrollo neural postnatal tardío y las patologías concomitantes en pacientes adultos mujeres en edad fértil hacen que sus consecuencias funcionales se superpongan a las propias de la teratogenización temprana (Khera, 1987).

Considerando todo lo expuesto en esta introducción hasta aquí, se entiende porque hoy en día la comunidad científica y las instituciones oficiales de Salud Pública consideran a pocos agentes

químicos como neurotóxicos para el desarrollo funcional (Anon, 1982; Briggs et al., 1998; Batagol, 1993). Consecuentemente, han aparecido estudios que discuten la eficacia de los métodos de evaluación de bioseguridad teratológica en fármacos y otros agentes neuroactivos de consumo humano (Rees et al., 1990).

También se debe recordar que la gran mayoría de los principios activos de la farmacopea moderna fue pensada, desarrollada e introducida en el mercado farmacéutico para individuos adultos, lo cual permite entender que, de acuerdo a estudios epidemiológicos, hasta **30% de los neonatos hospitalizados presentan efectos colaterales** a las terapias farmacológicas prescritas (Reinhardt & Kusenbach, 1986).

1.5. NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL: DISCIPLINA QUE ESTUDIA LAS ALTERACIONES FUNCIONALES DEL SNC ORIGINADAS DURANTE EL NEURODESARROLLO POR EXPOSICION A AGENTES QUIMICOS

Las señales ambientales pueden ser percibidas y procesadas en forma completa -incluyendo una respuesta funcional acorde a la calidad y cantidad del estímulo- ya en el **primer día de vida postnatal de la rata**, como fue reportado por Johanson & Hall (1979) en un clásico test de aprendizaje apetitivo. Hasta el período neonatal los programas ontogenéticos del neurodesarrollo serían modulados mayoritariamente a través de mecanismos autosuficientes de expresión génica. Luego, gradualmente crecería el peso del componente ambiental hasta hacerse mayoritario y fundamental para la maduración normal de la integridad neurobiológica adulta. Sintetizando, la estimulación ambiental es necesaria para el desarrollo normal de los circuitos neuronales, pero tanto la sub- como la hiperestimulación producen alteraciones funcionales de tipo permanente en los sistemas afectados (Spitz, 1946; Van Gelder, 1994; Greenough et al., 1995; Ansiman et al., 1998; Hayashi et al, 1998). Como ya fue expuesto, durante este neurodesarrollo hay etapas en las cuales el SNC puede ser particularmente afectado por la llegada de estímulos exógenos, y dado que en estos períodos se definen las propiedades del SNC que poseerá el individuo adulto, la interferencia en estos períodos

denominados *críticos* del neurodesarrollo puede producir *alteraciones de conducta de tipo permanente*.

Si la interferencia es durante un *periodo critico prenatal*, entonces existe alta probabilidad de que se altere el número, distribución u organización de las neuronas del area afectada. Si en cambio se introduce en el SNC un agente externo durante un *periodo critico de la maduración postnatal*, es muy probable que la alteración no sea tan evidente ante un análisis poco profundo puesto que lo que se puede modificar son las habilidades motoras, cognitivas o psicológicas del individuo en su interacción con el medio. En este sentido, los individuos pueden ser inhabiles para la ejecución de tareas de diversa complejidad de acuerdo al area y el estadio de neurodesarrollo afectados, lo cual sólo permitiría evidenciar el déficit recién cuando, durante la evolución normal, el individuo es exigido a realizar dicha tarea (por ejemplo, normalmente recién se exige a un niño a aprender a dividir a los 9-10 años).

En el caso de la especie humana, las consecuencias del contacto del SNC con agentes químicos promotores de malformaciones anatómicas (o sea, *agentes neuroteratógenos estructurales*) son bien conocidas; como caso ejemplificador se puede recordar las malformaciones innatas observadas en los años 60's en neonatos nacidos a partir de madres que habían consumido *talidomida* durante la gestación (Smithells, 1973; McBride, 1977).

Mas tarde se desarrolló dentro de las neurociencias un area que se ocupa de las alteraciones funcionales permanentes del sistema nervioso inducidas por la exposición a especies químicas neurotóxicas (*agentes neuroteratógenos funcionales*) durante el período perinatal.

Esta disciplina es denominada *Teratología de la Conducta* o *Neuroteratología Funcional* (Riley & Vorhees, 1986).

Este campo de la neurobiología es relativamente joven y precisa para su abordaje inicial la integración de los datos obtenidos en otros campos como ser la toxicología, la neuroquímica y la fisiología del neurodesarrollo y la psicología infantil experimental. La Neuroteratología Funcional es un campo en rápido crecimiento gracias a los recientes avances en la neurobiología molecular y funcional de mamíferos y la disponibilidad de compuestos con mayor selectividad farmacológica. Se ha reunido evidencia que valida la correlación de los reportes científicos de modelos animales de neuroteratología

funcional con los hallazgos de la clínica humana (ver discusión de este punto en Werler et al., 1985). Como ejemplo se puede citar la similitud de los hallazgos de neuroteratogenia funcional luego de la exposición prenatal experimental a Fenitoína en rata, y luego de la prescripción médica de mono- y politerapias anticonvulsivantes durante la gestación de mujeres con distintos cuadros epilépticos (ver ref. Yerby et al., 1992; Granstrom & Gaily, 1992; Vorhees, 1983, 1986, 1987).

Dichos estudios experimentales son útiles para predecir las consecuencias de la exposición neuroteratogénica temprana, y para revelar los mecanismos neurales subyacentes a la alteración funcional. Luego de haber alcanzado una cierta conciencia de lo que implica para la Salud Mental de la población el impacto de neuroteratógenos funcionales durante la vida temprana, en la actualidad se abre la necesidad de **diseñar y poner a prueba alternativas terapéuticas viables.**

1.5.1. EL NUCLEO ESTRIADO EN EL ESTUDIO DE ALTERACIONES NEUROQUÍMICAS O CELULARES ASOCIADAS A NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL

En el caso del núcleo estriado (NE), la neurogénesis a partir de neuroblastos potenciales comienza hacia el comienzo de la segunda mitad de la gestación. Este proceso multiplicador de neuronas prosigue hasta el final de la gestación y muy pocas neuronas son generadas de esta forma en los primeros días de vida postnatal (Rodier, 1977; van Vulpen & van der Kooy, 1998).

La muerte celular programada estriatal, principalmente a través del fenómeno denominado *apoptosis*, ocurre mayoritariamente en la primera semana de vida postnatal. Después de la segunda semana no se detecta neuronas positivas para apoptosis (Maciejewska et al., 1998).

Este período sería bastante coincidente con el de la apoptosis nigral, la cual estaría prácticamente completada hacia P14, contando el número de neuronas positivas para TH, ya sea para la porción dopaminérgica *pars compacta* como para la no dopaminérgica *pars reticulata*. La *pars lateralis* no presenta cambios en la densidad neuronal en este período (Tepper et al., 1994). Oo & Burke (1997), propusieron que la apoptosis nigral sería bifásica, con un pico ancho inicial entre E20 y P8 (máximo en P2) y un segundo pico, bastante menor que el anterior, hacia P14.

La ontogénesis apoptótica nigral no debe ser analizada como un evento ajeno a la dinámica estriatal durante el desarrollo postnatal. La lesión estriatal postnatal temprana con ác. quinolínico resulta en una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas de la SN pars compacta en el individuo adulto (Macaya et al., 1994), y es posible que el nivel de muerte celular programada de SN durante el neurodesarrollo temprano afecte la tasa de apoptosis natural del NE a partir de mecanismos mediados por dopamina (Hattori et al., 1998) o por competencia de las neuronas estriatales por factores liberados en forma dependiente de la actividad nigral (Fishel et al., 1991).

Este período de selección del número de neuronas podría coincidir con el período de sensibilidad neuronal a la privación del factor de crecimiento neuronal prototípico, el Nerve Growth Factor (NGF). Este punto ha sido tratado recientemente por Eaton et al. (1997), quienes trabajando con el ganglio cervical superior de roedores encontraron que la clásica respuesta de mayor supervivencia neuronal en el cultivo adicionado con NGF se perdía en neuronas extraídas de animales de cuatro semanas de vida. Este hallazgo podría ser *a priori* transferido al NE, considerando lo reportado por Abiru et al (1996), quienes demostraron que, en el NE, el NGF previene la muerte de neuronas colinérgicas estriatales en cultivos provenientes de animales de dos semanas, pero la muerte celular programada no podía ser atenuada si los cultivos neuronales provenían de animales de cuatro semanas de vida.

O sea, hacia el último tercio del primer mes de vida la neurona colinérgica estriatal es insensible a la acción antiapoptótica del NGF, y entonces, a partir de la cuarta semana de vida postnatal, el NGF comenzaría a actuar ya no como agente trófico promotor de supervivencia, sino en otros aspectos de la maduración neuronal postnatal tardía. Como veremos mas adelante, este es uno de los tantos ejemplos de la trascendencia del NGF y otras neurotrofinas para la maduración del NE.

Durante la selección neuronal por apoptosis, continúa paralelamente la maduración celular con una activa tasa de crecimiento en volumen y masa (Zahalka et al., 1993) por un lado, y de llegada de terminales desde las áreas aferentes (principalmente vías Tálamo-estriatal, Nigroestriatal y Cortico-estriatal) por otro.

Día Postnatal (P) Peso (mg)

P2	14 ± 1
P4	19 ± 1
P7	38 ± 1
P10	39 ± 2
P14	44 ± 2
P18	45 ± 2
P23	57 ± 4
P37	79 ± 5
P51	93 ± 8
P65	92 ± 5

En realidad, este proceso de migración de conos neuríticos hacia el NE comienza hacia el final de la gestación y el patrón espacial de contactos entre el NE y la periferia estaría prácticamente terminado al final de la tercera semana de vida (Coyle & Campochiaro, 1976). Estas conexiones no sólo afectan a las sinapsis sino también a la consecuencia del procesamiento de señales posteriores a la comunicación interneuronal. Por ej., la actividad dopaminérgica nigroestriatal afecta la expresión génica del neuropéptido preproencefalina A en el NE (Normand et al., 1988).

Luego de que el andamiaje (“wiring”) básico está instalado, la actividad funcional ya no es aprovechada en forma crítica para formar un mayor número de circuitos a través de los cuales transitarán las señales electroquímicas puesto que este punto ya está consolidado. En consecuencia, a partir de la tercera semana de vida la activación eléctrica comenzaría a transformarse en el disparador de la liberación local de factores tróficos y neuropéptidos los cuales a su vez modularían la probabilidad de supervivencia de los contactos sinápticos expuestos al soporte trófico (Black, 1986; Neuper et al., 1996; Berninger & Poo, 1996). De esta forma se seleccionarían ya no neuronas en forma directa, sino que la eliminación de terminales por selección sináptica conllevaría como efecto secundario la muerte de la neurona que no logra abastecer su metabolismo en forma suficiente. Esta segunda eliminación de neuronas estriatales sería poco significativa en número comparada a la de las primeras dos semanas de vida postnatal. Esta “mínima” disminución de neuronas estaría relacionada a

eventos de particular significación biológica. De esta forma comienzan los ajustes finos que demarcarán la fisiología final del NE, como ser:

Cuál será su sensibilidad farmacológica específica? Cuál será el umbral de sensibilidad?

Cuál será su respuesta funcional máxima ?

Y algo mas tarde,

Cuál será su soporte glial ? Cuál será su velocidad de envejecimiento, etc. ?

Finalmente, desde el final de la neurogénesis hasta la cuarta semana de vida madura la expresión de marcadores somáticos y sinápticos específica de tipo neuronal. Clásicamente se ha descrito que la ontogenia de marcadores estriatales gabaérgicos, colinérgicos y dopaminérgicos finaliza al final de la cuarta semana de vida (Coyle & Enna, 1976; Coyle & Yamamura, 1976; Fiedler et al., 1987; Okamura et al., 1997) aunque existen pocos reportes que indican que podría precisarse mas tiempo para completar esta maduración, como con los marcadores colinérgicos ChAT y HACU, que alcanzan los valores adultos al comienzo de la séptima semana postnatal (Yamada et al., 1986; Aubert et al., 1996) y que los distintos subtipos de mAChRs maduran recién en P75 (Balduini et al., 1987; Aubert et al., 1996).

Un resumen de estos fenómenos ontogenéticos en el NE de rata son mostrados en un diagrama en pág. 44.

En relación a porqué el NE podría ser un área ideal para correlacionar cambios comportamentales inducidos con neuroteratogenos se puede citar el caso de la nicotina. En los últimos años, en modelos animales experimentales se han reportado pruebas sobre la capacidad neuroteratogénica estriatal de la **nicotina** durante la gestación, demostrado por Zahalka y col. (1993), los cuales observaron un **cambio en las etapas ontogenéticas de la expresión de receptores colinérgicos tipo m1 estriatales**, o las consecuencias de la exposición a **metadona** en el período prenatal, que incluyen un **retraso en la maduración postnatal de las neuronas colinérgicas estriatales** (ver Fig. 6 en pág. 16)(Robinson y col., 1993).

CRECIMIENTO (en masa y volumen)

NEUROGENESIS

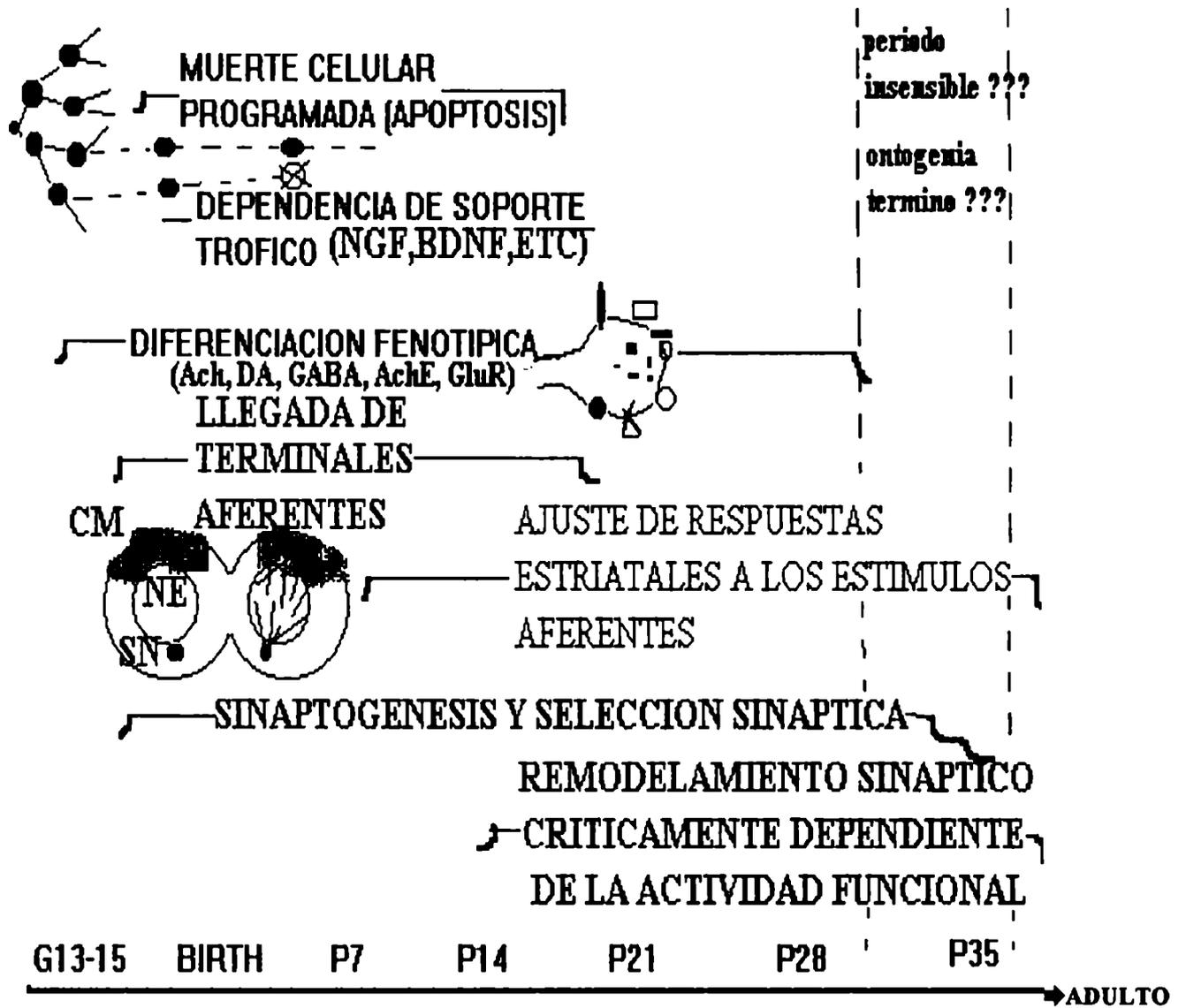


FIGURA 7. PATRONES ONTOGENETICOS APROXIMADOS DE MADURACION ANATOMICA, CELULAR, NEUROQUIMICA Y FUNCIONAL DEL NUCLEO ESTRIADO

CM= corteza motora
 NE = núcleo estriado
 SN = sustancia nigra

Ach= acetilcolina
 DA= dopamina GABA= ácido γ-amino butírico
 AchE= enzima acetilcolinesterasa
 GluR= familia de receptores para Glutamato

El NE también podría ser de alto interés para estudiar la neurobiología de los síndromes comportamentales en humanos que tienen su origen en interferencias del neurodesarrollo. Por ejemplo Swanson et al. (1998) han encontrado cambios en el NE según los estudios de RMN realizados en niños con DDA con hiperactividad, que reforzaría la utilidad del NE en modelos animales de inducción y terapéutica de alteraciones funcionales permanentes originadas durante el neurodesarrollo.

En consecuencia, si acordamos con la mayoría de la bibliografía que se terminan todas las particularidades estructurales y dinámicas del NE hacia el final del primer mes de vida, cabe la pregunta: ***En la rata, sólo durante el antedicho período G12 → P28 de maduración estriatal es posible interferir la ontogenia con consecuencias permanentes para la neuroquímica y la función del NE adulto ?***

Rearmando la pregunta: ***A partir de P28 el NE está ya respondiendo como un núcleo neural totalmente maduro, donde la llegada de estímulos físicos y químicos no afectan en forma persistente la neuroquímica y la respuesta funcional ?***

Es posible luego de la cuarta semana de vida postnatal provocar cambios neuroquímicos y/o funcionales persistentes en el NE operando con estimulación fisiológica o estrategias farmacológicas ?

Estas preguntas son en parte respondidas mas adelante en la interpretación y discusión de los resultados de esta tesis.

Entonces,

➡ la condición normal o anómala -clínica o subclínica- en el SNC maduro, que en el pasado contactó un supuesto agente neuroteratógeno funcional durante el neurodesarrollo, se define de una u otra forma *en ese mismo periodo de la ontogénesis neural,*

y, por lo tanto, es posible hipotetizar que si existe un modo y un tiempo precisos para que una interferencia afecte en forma permanente una función central,

➡ *debe existir un modo y un tiempo también muy precisos para corregir el desbalance bioquímico involucrado con otra interferencia farmacológica o ambiental*

Si esta hipótesis era correcta, se podía desarrollar la estrategia terapéutica adecuada a cada caso para acercar la respuesta motora y/o cognitiva del individuo afectado, al valor normal para la población en cuestión. Dentro del marco del proyecto IPON se intentó entonces poner a prueba distintas estrategias de atenuación o reversión de neuroteratogenia funcional.

En las líneas de investigación que incluye esta tesis se ha tratado de determinar las condiciones básicas necesarias para aplicar distintas estrategias terapéuticas para atenuar neuroteratología funcional.

La primera etapa incluyó utilizar el test de entrenamiento circular (TEC) para determinar los cambios funcionales que ocurren en animales normales desde la lactancia hasta la maduración final (adulto joven). Con este testeo ya había sido posible detectar alteraciones motoras inducidas con vit. A y HAL durante la gestación (Brusés et al., 1991; Brusés & Azcurra, 1993), y en pruebas preliminares había demostrado ser sensible a los cambios fisiológicos del sistema motor durante el desarrollo postnatal tardío.

Estas modificaciones durante el desarrollo postnatal eran probables debido a que durante la maduración tardía de la rata (post-destete) se han detectado cambios en la respuesta funcional a distintos grados de estimulación ambiental (Brain, 1976; Einon & Morgan, 1977; Gentsch et al., 1982a, 1982b., 1983; Schecter & Cocanon, 1984; Ibarra et al., 1995, 1996).

Cabe citar la revisión de Spear & Scalzo (1986) donde se reporta que la hiperactividad que produce el neuroléptico HAL cuando es administrado repetidamente durante la lactancia, se detecta antes o después pero no dentro del período P27-46, aplicando siempre el mismo testeo comportamental (de end point motor).

La segunda etapa fue reproducir en nuestro modelo animal alteraciones de conducta inducidas por los neuroteratogenos seleccionados (HAL y DFH) y determinar si los efectos de la neuroteratogenia funcional inducida en distintos periodos de la gestación o la lactancia dependía de la edad seleccionada para el testeo en función de los hallazgos en animales controles entrenados a distintas edades postnatales.

La tercera etapa fue diseñar y poner a prueba tres abordajes con el mismo objetivo terapéutico.

I. MANIPULACION DE CONDICIONES AMBIENTALES EN PERIODOS CRITICOS DE REMODELAMIENTO SINAPTICO DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD

Considerando lo antedicho, podía ser posible que la modificación de las condiciones de estimulación socio-ambiental y la exposición a agentes químicos actúen en distintos períodos sobre el SNC inmaduro induciendo modificaciones neuroquímicas y/o funcionales de mediano o largo plazo. Si se obtenían modificaciones opuestas con un agente químico y una condición ambiental determinados se podía diseñar una estrategia terapéutica para neuroteratología funcional.

El ambiente de cría y las experiencias de los infantes de rata durante los primeras etapas de vida postnatal modifica el grado de recuperación de la actividad motora y la respuesta cognitiva frente a un condicionamiento, cuando los animales han sido previamente tratados con hidroxidopamina, neurotoxina clásicamente utilizada para depletar la vía nigro-estriatal de dopamina (Pearson et al., 1980; Rose et al., 1993) y puede alterar el patrón de desarrollo neural y las respuestas a distintos desafíos ambientales y farmacológicos (Brain, 1976; Uylings et al., 1978; Uylings et al., 1994; Fernández et al., 1993; Ansiman et al., 1998).

Además, la privación social disminuye los niveles de D2R en cuerpo estriado de rata (Bean & Lee, 1991), y la administración postnatal temprana de HAL aumenta este marcador dopaminérgico en el mismo núcleo basal (Rosengarten & Friedhoff, 1979).

El aislamiento social y ambiental produce cambios en distintos parámetros de la vía nigroestriatal y mesocorticofrontal (Bean & Lee, 1991; Blanc et al., 1980). Varios autores encontraron aumento en la actividad locomotora espontánea (por ejemplo en el testeó en open field) luego del aislamiento (Gentsch et al., 1982a, 1982b). Einon & Morgan (1977) describieron un periodo crítico para los efectos locomotores producidos por la privación sensorial y el aislamiento social. Sólo encontraban

la clásica hiperactividad post-aislamiento si los animales eran privados de interacción social antes o después, no dentro del período P25-45.

Más aun, en nuestro laboratorio hemos encontrado que el período P30-37 representa una etapa de plasticidad estriatal dependiente de actividad, o sea un período crítico estriatal (PCE) (Ibarra et al., 1995; 1996), con ciertas analogías al período crítico de la corteza visual descrito por Hubel & Wiesel (Wiesel, 1982).

La hipótesis a probar en este caso fue que la capacidad de la privación para disminuir el nivel de sitios de unión a radioligandos específicos para receptores D2R compensaría, parcial o totalmente, las consecuencias neuroquímico-comportamentales ya enunciadas de la administración de HAL durante el período posnatal temprano.

II. ADMINISTRACION DE FARMACOS EN PERIODOS CRITICOS DE SENSIBILIDAD POSTNATAL

Siguiendo la hipótesis planteada en pág. 46 seleccionamos 2 drogas de elección en la clínica médica (un antipsicótico, Haloperidol, y un anticonvulsivante, Difenilhidantoína) para inducir neuroteratología funcional y para corregir las alteraciones tempranas, aprovechando que el SNC tiene una sensibilidad dependiente de período de exposición para estas drogas (relevamiento de reportes sobre neuroteratología inducida por estas drogas en páginas 30-36).

III. MODIFICACION DE LA EXTENSION DE PERIODOS DE REMODELAMIENTO SINÁPTICO DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD FISIOLÓGICA

El Nerve Growth Factor

Ya desde el descubrimiento del nerve growth factor (NGF) en los años 50s se reconocía que esta biomolécula jugaba un rol principal en el neurodesarrollo, particularmente en la supervivencia y la maduración de células en los ganglios sensoriales y en el SNA (Levi-Montalcini & Angeletti, 1968; Black, 1993). Estudios bioquímicos revelaron que el NGF es internalizado en sitios receptores

especificos de alta afinidad localizados en terminales axonales y transportados retrógradamente al soma neuronal. Los pasos metabólicos y las consecuencias funcionales disparados por la presencia de NGF en la célula no son completamente entendidos. Los principales avances al respecto se han hecho trabajando principalmente con líneas celulares en cultivo de las células denominadas PC12 (derivadas de feocromocitoma) y neuronas sensoriales espinales, en donde se ha demostrado que la transducción de señales involucra la expresión de protooncogenes (Gabellini et al., 1992; Batistatou et al., 1992).

Luego de las primeras caracterizaciones químicas y biológicas del NGF otros factores tróficos fueron aislados y purificados tales como la neurotrofina derivada de cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4/5 (NT4/5), factor neurotrófico ciliar (CNTF), etc. De esta forma, considerando que gran parte de los anteriores revelan una homología polipeptídica considerable y un rol similar durante el desarrollo neural, los mismos pertenecen a la "familia de neurotrofinas" (Cuello & Thoenen, 1995).

La hipótesis neurotrófica es el concepto que explica la mayoría de los analisis experimentales sobre el rol de las neurotrofinas durante el neurodesarrollo. Esta hipótesis establece que las neurotrofinas localizadas en el area blanco de una neurona toman contacto con las membranas plasmáticas de los terminales axonales, son internalizadas y transportadas retrógradamente al soma para afectar las funciones metabólicas por distintos caminos. Los niveles endógenos de NGF en el SNC y en la periferia están en el orden de los pg NGF/g tejido (Mobley et al., 1989; Korsching et al., 1985); en consecuencia la biodisponibilidad de NGF es fisiológicamente un factor limitante, lo cual permite hipotetizar que los niveles del mismo podrían controlar el número de células y la densidad de inervación (Black, 1986). Durante el neurodesarrollo existe evidencia que los niveles de neurotrofina en el blanco son up-regulados mientras las primeras fibras inervan a este ultimo. También se ha demostrado que neuronas pequeñas peptidérgicas dependen de NGF para sobrevivir. La exposición del individuo durante la gestación o el período postnatal temprano a anticuerpos anti-NGF previene la supervivencia de neuronas expresando TrkA. En el caso de las aferencias nociceptivas (neuronas que expresan y liberan sustancia P) el requerimiento por NGF termina hacia P2. De este modo, cada area neural tiene su propio patrón de dependencia de soporte trófico (Knüsel et al., 1994). La imposibilidad para recibir dicho soporte en el periodo crítico para la supervivencia neuronal de cada area particular conllevaría a cambios significativos en la densidad neuronal en el individuo adulto.

Los estudios iniciales con neurotrofinas enfatizaron la importancia de estos agentes en el neurodesarrollo perinatal y postnatal temprano. Pero el hecho que los receptores de alta afinidad como

el TrkA (para NGF) son expresados en el individuo adulto (Knüsel et al., 1994), permite postular un rol de las trofinas neurales mas alla del desarrollo temprano durante el cual los efectos tróficos se manifiestan casi exclusivamente como modulación de la supervivencia neuronal.

Ciertamente, modula aspectos somáticos y comportamentales del neurodesarrollo de la rata (Aloe y col., 1981; Calamandrei & Alleva, 1989; Mendell, 1995).

Mas aun, se ha reportado que las neuronas nociceptivas continuan requiriendo NGF para mantener su fenotipo normal bastante después que la dependencia de NGF para supervivencia ha finalizado (Mendell, 1995). Este rol adicional del NGF corresponderia ya no el alimento de las neuronas sino el activador y/o estabilizador de los patrones de maduración fenotípica.

También, utilizando la línea celular PC 12, ha sido demostrado en cultivo que afecta el balance iónico a través de la membrana plasmática al regular la expresión de canales (como por ej. el canal voltage-dependiente de K⁺, Sharma y col., 1993), y la concentración de receptores colinoceptivos muscarínicos (Jumblatt y col., 1982) y nicotínicos (Madhok y col., 1992) con la línea celular PC12. Recientemente, se ha encontrado que NGF sería la única neurotrofina con efectos depresores sobre la descarga sináptica espontánea (Forander et al., 1996, Berninger & Poo, 1996).

En los años 90's distintos grupos han propuesto un nuevo rol a las neurotrofinas en general y al NGF en particular.

A partir de los hallazgos de la presencia de un período crítico de ajuste sináptico estructural y funcional dependiente de actividad funcional en la vía visual, sin los cuales la percepción visual del individuo adulto es deficitaria en forma irreversible (Wiesel, 1982), estos grupos probaron la capacidad del NGF para modificar las consecuencias de la deprivación visual durante el período de máxima sensibilidad. Así fue que se reportó que la administración de NGF durante el período crítico en animales deprivados por sutura temprana de párpado impedía que se pierda la capacidad de la via visual para hacer ajustes sinápticos luego de finalizado el período crítico natural. Pero también se encontro que la administración de NGF en la via visual de gatos adultos restablecía las propiedades plásticas dependientes de actividad funcional pese a operar sobre un SNC maduro* (Domeneci et al., 1991; Carmignoto et al., 1993; Gu et al., 1994; Gu, 1995).

Esto ha planteado un nuevo horizonte en el campo de la terapéutica de las alteraciones tempranas de la ontogénesis neural. Estos antecedentes y un estudio bibliográfico de los efectos neuroquímicos,

estructurales y funcionales del NGF endógeno o exógeno sobre el NE (ver en discusión) sugirió que esta neurotrofina era un candidato ideal para una primera prueba de modulación del PCE con fines terapéuticos.

* La reinducción de plasticidad dependiente de actividad funcional en el gato adulto no sería patrimonio exclusivo de las neurotrofinas como el NGF, sino que también drogas como la *anfetamina* han demostrado ser capaces de interactuar con la experiencia visual para restablecer la percepción binocular de la distancia al objeto después de ablación de corteza visual (Feeney & Hovda, 1985).

2. OBJETIVOS

DISEÑAR UN MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL DE TERAPÉUTICA DE NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL

Este objetivo general se abordó por medio de dos aproximaciones

1. USO DIRECTO DE AGENTES FARMACOLOGICOS 6 MODULACIÓN DE LA ESTIMULACION AMBIENTAL

OBJETIVO: seleccionar agentes farmacológicos y/o condiciones ambientales adecuados para atenuar o revertir neuroteratogenia funcional inducida

TRANSFERENCIA POTENCIAL A LA CLÍNICA HUMANA

Aporte de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el conocimiento de los cambios neuroquímicos y funcionales que se suceden durante la ontogénesis normal y luego de la exposición perinatal a neuroteratógenos de conducta

2. USO DE AGENTES MODULADORES DE PLASTICIDAD NEURONAL

OBJETIVO: seleccionar un agente de esta clase y las condiciones ontogenéticas adecuadas para realizar una modificación persistente en las propiedades neuroquímicas y plásticas del área tratada

TRANSFERENCIA POTENCIAL A LA CLÍNICA HUMANA

Modificar la calidad de la respuesta farmacológica y las consecuencias persistentes de la misma en el área tratada, permitiendo así, en una segunda etapa, el diseño y aplicación temprana de nuevas terapéuticas de corrección permanente de neuroteratogenia funcional del tipo de las presentadas en la línea experimental 1

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. REACTIVOS Y DROGAS UTILIZADAS

En todos los casos se utilizó reactivos de calidad analítica. En los tratamientos farmacológicos se administraron las siguientes drogas:

Haloperidol, a partir de *Halopidol* ampollas, 5mg/ml, gentilmente donado por el Sr. Stein, Laboratorio Janssen, Buenos Aires

Difenilhidantoina, a partir de *Epamin* ampollas de 50mg/ml, gentilmente donado por el Dr. Moretto, Laboratorio Parke-Davis, Buenos Aires

Todos los radioligandos tritiados usados en la determinación de sitios de binding fueron comprados a New England Nuclear (NEN). En la determinación de binding inespecífico se usó: **Sulfato de Atropina**, a partir de *Isopto-Atropina* gotas 1%, Lab. Alcon, Buenos Aires, y **Sulpirida**, a partir de *Vipral* ampollas, Lab. Armstrong, Buenos Aires.

La **apomorfina** derivó del producto comercial apokinon (clorhidrato de apomorfina, Lab. Aguetant, Francia) fue gentilmente donada por el Dr. Diewzchapolski, Instituto ININFA-UBA

El **Nerve Growth Factor** (Factor de Crecimiento Nervioso, NGF) utilizado en los Exp. NGF 1 y NGF 2 fue gentilmente donado por el Dr. Eugene M. Johnson, Jr. (Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, USA) y el Citocromo C de corazón de caballo fue comprado a Sigma, Co. (St.Louis, Missouri, USA)

3.2. ANIMALES Y CEPAS UTILIZADAS

El animal escogido como modelo experimental fue la rata (*rattus rattus* sp.) de la cepa Sprague-Dawley. En las estrategias farmacológicas de terapéutica para Neuroteratología Funcional (Experimentos HAL/HAL y DFH/DFH) individuos adultos machos y hembras (180-300g) fueron suministrados por el Bioterio Central de la FCEN. Los cruzamientos se realizaron colocando un macho por cada tres hembras en jaulas de acero inoxidable de 18dm³. Luego de 24 hs, se buscó bajo el microscopio óptico la presencia de espermatozoides en lavados vaginales realizados con solución fisiológica estéril en cada una de las hembras. Cuando un preparado dió positivo para la inseminación, la hembra respectiva fue alojada en una jaula de cría, considerándose ese día como día gestacional (G) G1.

Para los estudios de la ontogenia del comportamiento motor y asociativo-espacial en el TEC y los experimentos sobre la modificación de la plasticidad muscarínica durante el periodo crítico estriatal (Exp. NGF 1-2), los animales fueron de la misma cepa pero provinieron del Bioterio Central del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME).

Dentro de lo permitido por c/u de los diseños experimentales, después del nacimiento y para disminuir la variabilidad derivada del "efecto camada" (Abbey & Howard, 1973; Spear & File, 1996), en el día P2-P3 las crías de cada camada fueron codificadas y colocadas en distintas jaulas. Las camadas fueron siempre limitadas a un máximo de 9 neonatos. Los animales fueron siempre pesados en forma individual.

El día de nacimiento de las camadas fue estimado con un error máximo de 24 hs. Para no estresar demasiado a las hembras luego del parto, el conteo de neonatos vivos y muertos se estimó primero desde el exterior de la jaula en día P1. En los gráficos se presentan el número de crías totales, los animales encontrados muertos, y los desaparecidos respecto a la primera observación. Estos últimos son considerados como comidos por la madre, luego que se

presenció ese comportamiento anómalo en algunas oportunidades y que no quedó rastro alguno de dichos neonatos en la segunda observación.

3.2.1. MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES

Mientras no eran tratados de alguna forma antes, durante y después de los experimentos, los animales fueron criados en un ambiente controlado, termostatzado a 20-22°C, bajo un **régimen de luz/oscuridad de 12/12 hs**, con bebida (agua) y comida (alimento balanceado para roedores - dieta N°1, Nutrimento SA, Buenos Aires) *ad libitum*. Considerando los efectos de las condiciones fisico-químico-sociales de cría sobre el desarrollo estructural y funcional del SNC (como ejemplo ver Exner & Clark, 1993), se procuró disponer las jaulas de cada grupo experimental en las mismas condiciones de luz, cantidad de espacio por individuo y estimulación social para atenuar la perturbación de estas variables sobre las respuestas comportamentales y marcadores neuroquímicos estudiados en los animales.

En todos los casos que animales fueror. sometidos al test de entrenamiento TEC, luego de finalizado el mismo, las ratas fueron criadas en condiciones normales y pesadas en promedio cada 3 días para **control de recuperación de peso** durante 15 días. Al finalizar el testeo en el TEC los animales llegan a bajar entre un 5 y un 10% de su peso inicial (ver procedimientos con el TEC mas adelante). En todos los casos, las ratas normalizaron su tasa de crecimiento durante dicho lapso. En los diseños experimentales se trató de administrar los tratamientos farmacológicos y realizar los testeos comportamentales siempre dentro de los mismos horarios para todos los grupos experimentales considerando que se ha reportado variabilidad intraindividual dependiente de ritmo circadiano para diversos marcadores neuroquímicos.

En todos los casos los animales fueron sacrificados al finalizar las pruebas funcionales por decapitación.

En todos los procedimientos de los experimentos de esta tesis los animales fueron tratados, dentro de las posibilidades que ofrece la FCEN, en acuerdo con las recomendaciones de la guía del Consejo Nacional de Investigaciones (NIH, USA) para el cuidado y uso de animales de laboratorio en investigación.

3.4. ESTUDIOS COMPORTAMENTALES

3.4.1. EL TEST DE ENTRENAMIENTO CIRCULAR (TEC)

3.4.1.1. DISEÑO Y CARACTERISTICAS DEL APARATO PARA TEC

A fin de realizar el TEC en forma automatizada y así obtener mediciones objetivas, en nuestro laboratorio se desarrolló un aparato acoplado a un dispositivo electrónico que permitiera realizar el conteo de vueltas, el tiempo requerido para realizar una determinada cantidad de vueltas y la administración de la recompensa en forma automática (Bruses & Azcurra, 1993; Bruses et al., 1991).

El aparato empleado está conformado por una pista circular de 16 cm de ancho construida con dos cilindros de metal concéntricos de 1.8 mm de espesor y 31 cm de alto a cada lado de la pista. Los cilindros de 24 y 40 cm de diámetro, fueron colocados sobre una base de madera y el piso de la pista fue recubierto con goma antideslizante. Todo el material fue pintado de negro. La pista de entrenamiento fue iluminada con una luz blanca externa al aparato que incidía homogéneamente sobre toda la pista y recubierta con una tapa de acrílico de 2 mm de espesor con 4 orificios a 90° coincidiendo, cada uno, con la posición de cada par emisor-detector infrarojo. Cuatro emisores de rayos infrarrojos fueron colocados por dentro del cilindro interno, y cuatro sensores o detectores infrarrojos fueron colocados por fuera del cilindro externo,

enfrentado cada uno a su respectivo emisor. Cada par emisor-detector fue ubicado a cada 90° de la circunferencia a 2 cm por encima del piso y numerados del 1 al 4 en sentido horario. Los cuatro sensores fueron conectados a una unidad de memoria en forma secuencial. Los sensores son activados cuando el haz infrarrojo es interrumpido, lo cual sucede cuando algo se interpone entre el emisor y el detector correspondiente, en este caso el animal estudiado. Los sensores fueron conectados al circuito de memoria de manera tal que siempre se requiere que el sensor anterior haya sido activado para que la activación del siguiente sea registrada. Así, a medida que el animal va recorriendo una vuelta en el sentido prefijado como correcto, los sensores van siendo activados. Por ejemplo, si el animal tiene que realizar una vuelta en el sentido horario para obtener su recompensa, debe interrumpir el rayo infrarrojo del detector 1 antes de interceptar el rayo del emisor 2, de lo contrario por más que el segundo rayo sea interceptado esto no es registrado en el circuito de memoria, y lo mismo sucede con el par emisor/detector 3 y 4. Cuando el tercer sensor es activado, el animal ya recorrió $\frac{3}{4}$ de la pista circular total en el sentido correcto y se activa el dispensador de la recompensa que libera, a la altura del cuarto sensor una gota de solución de sacarosa 10 % a partir de un recipiente anexo. Al llegar el animal al cuarto sensor, el mismo es activado, una vuelta es computada por el contador, y se resetea el dispositivo de memoria quedando en condiciones de iniciar un nuevo ciclo de intercepción de rayos. El animal puede moverse libremente en ambos sentidos dentro del aparato, pero sólo recibirá la recompensa si realiza una vuelta completa en el sentido previamente asignado como correcto, ya que cada vez que el animal intercepta el cuarto sensor el dispositivo de memoria es reseteado, borrando así el registro de sensores que puedan haber sido activados hasta el momento.

El aparato cuenta con un interruptor que permite seleccionar el sentido de giro en el cual los sensores deben ir siendo activados para que finalmente la recompensa sea liberada. Esto permite disponer de dos alternativas de giro: horaria y antihoraria.

El dispositivo dispensador de agua fue construido con una válvula electromagnética o solenoide cuyo conducto de entrada está conectado a un frasco que contiene la recompensa colocado a una altura suficiente que permita la circulación de la solución por presión hidrostática. Al orificio de salida de la válvula se le conectó un tubo de goma hasta la parte superior del aparato de

entrenamiento cuyo extremo distal fue conectado a una aguja dispensadora a su vez en contacto con el orificio superior del aparato por encima del cuarto par emisor/sensor.

El diseño de la conexión aguja-tapa de acrílico fue realizado de tal forma como para que animales en desarrollo de distintos tamaños no puedan tocar la aguja ni extraer la recompensa directamente al pararse en forma bípeda.

Al ser activado el tercer sensor se envía un pulso eléctrico a la válvula, la cual permanece abierta el tiempo que dure el pulso. Mientras la válvula está abierta la solución de la recompensa circula y cae al piso de la pista en el lugar indicado, donde es ingerida por el animal. La duración del pulso eléctrico puede ser regulada por medio de un potenciómetro. De esta forma es posible regular el volumen de la gota de recompensa según el diseño experimental particular. En las condiciones establecidas para los experimentos de esta tesis la gota liberada tenía un volumen de entre 50 y 80 μl de acuerdo al tamaño de los animales estudiados.

3.4.1.2. PROCEDIMIENTO PARA ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO MOTOR Y ASOCIATIVO DE LOS ANIMALES CON EL TEC

Este es un paradigma para el estudio del comportamiento motor y asociativo (Yamamoto & Freed, 1982; Bruses et al., 1991; Brusés & Azcurra, 1993; Brusés, 1993).

El TEC consiste en el testeo por 8 días consecutivos, una sesión por día, de la respuesta del animal a un condicionamiento de tipo operante.

Los animales son privados de agua por 24 h previo a la sesión S_0 del TEC

En dicha sesión al animal se le enseña manualmente una determinada consigna para poder acceder a la gota de sacarosa (SAC). Debe dar una vuelta en un determinado sentido de giro recorriendo un circuito circular de un metro de perímetro con piso y paredes negros. En los primeros 10 min (t_0 a t_{10}) de la sesión S_0 se recompensa al animal con una gota de SAC cada cuarto de vuelta correcta. Durante los segundos 10 min (t_{10} a t_{20}) la recompensa es entregada cada media vuelta en sentido correcto. Los últimos 10 min (t_{20} - t_{30}) de dicha sesión de enseñanza

de la consigna el animal recibe, automáticamente, una gota de sacarosa cada vuelta completa correcta.

Luego de la sesión S_0 siguen 7 sesiones adicionales, una por día, en cada una de las cuales el animal se entrena en el condicionamiento aprendido. Cada una de las sesiones S_{1-7} tiene un determinado criterio para la finalización de la sesión.

En las sesiones S_{1-3} la sesión es finalizada retirando la rata del aparato de TEC cuando se llega a 100 vueltas en sentido correcto o cuando transcurrieron 30 min. En las siguientes sesiones S_{4-7} la ejercitación en el TEC termina cuando se llega a 150 vueltas o cuando transcurren 30 min.

Al igual que los últimos 10 min de la sesión S_0 , cada una de las sesiones S_{1-7} se realiza en forma automatizada dado que las paredes internas del circuito circular cuentan con fotocélulas que envían una señal a un dispensador automático cuando la rata ha recorrido $3/4$ del circuito en sentido correcto (ver punto anterior). De esta forma la detección de vueltas, el conteo del tiempo transcurrido dentro del tambor del TEC, y el suministro de las recompensas fueron automáticamente ejecutados. El sentido horario o antihorario de giro fue asignado azarosamente en cada experimento.

Para evaluar el componente de aprendizaje asociativo-espacial, los errores en la elección del sentido de giro fueron registrados durante las sesiones de TEC.

Los errores asociativos fueron observados en los primeros 5 min de las sesiones S_1 , S_3 y S_7 (Exp. HAL/DEP) o durante todo el tiempo utilizado para cumplir el criterio de cada sesión (Experimentos ONTOGENESIS, DFH/DFH y NGF 1).

Para poder definir un error cuatro suaves líneas transversales fueron pintadas a través de la pista circular, las cuales dividieron el círculo en cuatro cuartos iguales. Cada vez que el animal cruzaba como mínimo una línea (cuando las cuatro patas de la rata se apoyaban sobre el cuarto de la pista que seguía a la línea incorrectamente atravesada), en sentido opuesto al recompensado, se anotaba un error en la planilla respectiva. Para las sesiones analizadas los errores fueron clasificados como:

i) *error en la dirección* (independientemente de la distancia corrida), y ii) **Nº de cuartos de vuelta** acumulados en el sentido contrario al asignado como correcto (representativo de la *persistencia en el error*). Estos registros son mostrados en las figuras como, errores de elección *tipo I*, y persistencia en el error o errores *tipo II* (ver esquema de muestra del aparato de TEC).

De este modo, los animales entrenan aproximadamente entre 10 y 30 min por día. Para condicionamientos sensoriomotores en general, este lapso de actividad funcional ya ha demostrado ser suficiente para que neuronas tónicamente activas del NE adquieran respuestas condicionadas y cambios que permiten que se retenga el condicionamiento hasta por lo menos 4 semanas (Aosaki et al., 1994).

3.4.1.3. PROCEDIMIENTO CON LOS ANIMALES CONTROLES

Animales controles no entrenados fueron también mantenidos diariamente en el aparato de TEC pero no fueron condicionados en la antedicha tarea. Los controles fueron sometidos al mismo esquema de privación hídrica. Cada uno recibió una ración diaria de agua equivalente al promedio de ingesta hídrica de los animales entrenados en el lote experimental correspondiente.

Estos controles de entrenamiento fueron habituados al aparato de TEC durante un tiempo aproximadamente igual al promedio de permanencia de los animales entrenados de ese lote experimental para cada sesión. En este caso, el conteo de vueltas correctas nunca fue superior a 20. En gran parte de los casos, luego de recorrer en uno y otro sentido de giro el camino circular la rata control permanecía el resto de la sesión inmóvil y/o dormía. Se debe considerar que la rata es un roedor de actividad mayoritariamente nocturna, lo cual podría explicar la antedicha respuesta cuando el aparato de TEC deja de ser un ambiente novel.

Dado que entre sesión y sesión las ratas no llegan a recuperar el 100% del peso perdido por la privación, los animales son compensados proporcionalmente a su caída de peso con agua luego de 3 hs de transcurrida la sesión.

Los animales controles de tratamiento farmacológico que fueron entrenados y no cumplieron con el criterio establecido sesión a sesión hasta S_3 (los que no llegaron a 100 vueltas en S_3 o disminuyen mas del 10 % de su peso inicial al llegar a S_7), fueron descartados de las pruebas y los análisis posteriores. Este tipo de descarte de datos fue despreciable.

3.4.1.4. REGISTROS MOTORES Y ESPACIALES EN EL TEC

Los datos obtenidos son:

V = vueltas por min, en cada sesión

y dado que los gráficos V vs S se aproximan a una hipérbola cuadrática, es posible linealizar los datos y obtener un ajuste de los mismos a una recta si se realiza la siguiente transformación matemática,

$$V/R_a \text{ vs } V$$

donde

V = vueltas por min en sesión S_n , desde S_1 a S_7

R_a = refuerzo acumulado = vueltas totales realizadas hasta S_n

Ajustando los datos a una recta y obteniendo por extrapolarción $X(V)$ para $Y (V/R_a) = 0$, se puede calcular la velocidad máxima del grupo experimental de animales evaluados (V_m).

Y la inversa de la pendiente de la recta, " L ", representa la magnitud del refuerzo para alcanzar una determinada respuesta, o sea, es el parámetro que se relaciona al aprendizaje mixto asociativo-procedural en este paradigma comportamental.

$A < L, >$ coordinación motora y habilidad espacial durante el aprendizaje

$A > V_m, >$ respuesta motora

Se realizó un estudio adicional: la *evaluación de los errores*.

Este dato representa un marcador cuantificable del aprendizaje asociativo, dado que sólo se evalúa la elección del sentido de giro, y dado que los animales pueden libremente escoger su recorrido, permitiría detectar aquellos animales que perseveran en un sentido de giro incorrecto en el cual no reciben recompensa.

El criterio consiste en asignar el valor 1 a cada evento locomotor en sentido contrario al consignado. Considerando que se clasificó los errores de dos formas distintas, se obtuvo entonces:

N° errores de *tipo I* vs. sesión

Y, teniendo en cuenta la persistencia en c/u de los errores anteriores:

N° cuartos de vuelta o errores de *tipo II* vs. sesión

Se grafican así los datos:

i) Er. I vs. S

ii) Er. II vs. S

De este modo,

A < N° Er. I/sesión, > capacidad de aprendizaje asociat.-espacial, sesión a sesión

A < N° Er. II/sesión, > capacidad de aprendizaje asociativo-espacial intrasesión

3.4.2. EL ESTUDIO DE LA COORDINACION MOTORA EN EL ROTAROD

Se utilizó un aparato Rotarod (RR) gentilmente prestado por el Dr. Baratti de la cátedra de Farmacología de la Fac. Farmacia y Bioquímica (UBA). En consecuencia, estos estudios se realizaron en la sala que posee dicho laboratorio para estudios comportamentales. También en este caso se usó el sonido de funcionamiento de un extractor de aire como ruido de fondo. Los animales fueron llevados al Laboratorio del Dr. Baratti 24-48 hs antes de la primera sesión de RR para permitir la atenuación del estrés asociado al transporte de las ratas desde Ciudad Universitaria hasta Fac. Farmacia y Bioquímica.

3.4.2.1. APARATO DE ROTAROD UTILIZADO

Rotarod-Treadmill para ratas modelo 7700, Ugo Basile Biological Research Apparatus (Milan, Italia).

3.4.2.2. PROCEDIMIENTO PARA EL TESTEO EN EL ROTAROD

La *primera sesión* (S_1) consistió de 10 pruebas de coordinación motora con intervalos de 2 min entre c/u.

En la primera prueba de S_1 (S_{1-1}) los animales fueron colocados con sus cuatro patas sobre el eje de rotación bloqueado. A continuación se activó el sistema eléctrico con lo cual el eje alcanza rápidamente una velocidad de giro de **15 v/min**. Si en las primeras tres pruebas el animal no llegaba a completar más de 5 vueltas antes de caerse, los registros eran descartados del procesamiento de datos posterior, y se consideró como S_{1-1} a la cuarta prueba.

Se decidió aplicar este criterio dado que una parte importante de los animales quedaba estático, sin movilizar ninguno de sus miembros, o con movimientos tendientes a escaparse del aparato de RR en las primeras pruebas. De haber considerado estos registros, se hubiera agregado una fuente de variabilidad no deseada por las siguientes razones:

1. Considerando la observación de los animales mientras entrenaban en el RR, y los registros del resto de las pruebas, esos primeros datos poco se relacionaban a la capacidad de coordinación motora del animal. Mas bien aparentaban estar relacionados al estrés inicial asociado al testeo en RR.
2. Dado que se presenta los datos como el promedio de tiempo entre las pruebas por sesión, de haber comparado animales que tuvieron 4 con otros que tuvieron 7 primeras pruebas con registros menores a 5v/prueba, hubiera resultado una variabilidad por grupo experimental bastante mayor a la directamente relacionada a la variabilidad inter-individual para la respuesta motora en el RR.

Se finalizó cada una de las 10 pruebas de S_1 cuando el animal alcanzaba los **150 seg** sin caerse en una prueba. Se registró así el tiempo (igual o menor a 150 seg) que el animal permanecía en el RR sin caerse.

En la *sesión* S_2 se realizaron los mismos procedimientos que en S_1 excepto que las pruebas fueron finalizadas cuando el animal alcanzaba los **200 seg**. Además, en la S_{2-1} el animal fue colocado inicialmente sobre el eje que ya estaba girando a **15v/min**.

En la *sesión* S_3 se realizaron los mismos procedimientos que en S_2 , excepto que en todas la pruebas el eje giró a **22v/min** para agregar una nueva exigencia al animal, en acuerdo con los protocolos de trabajo con el RR que permiten discriminar cuantitativamente diferencias motoras con mayor sensibilidad (Rozas et al., 1997).

En la *sesión* S_4 se realizaron los mismos procedimientos que en S_2 , excepto que 20 min antes de la primera prueba de esta sesión los animales fueron inyectados en forma SC con 0.5 ml de apomorfin.



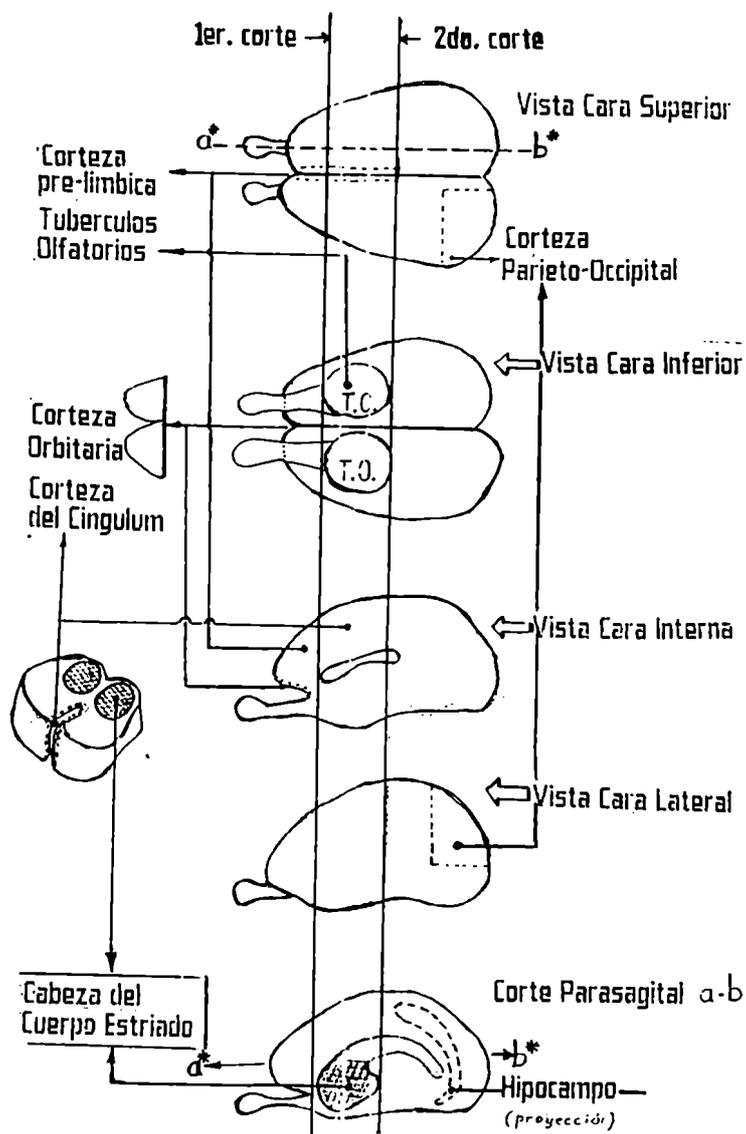
RATAS MIENTRAS SON EVALUADAS EN EL ROTAROD (pruebas piloto)

3.5. DISECCION DEL NUCLEO ESTRIADO, CORTEZA MOTORA Y CEREBELO

La extracción del cerebelo se vé facilitada por su ubicación occipital y fácil despegamiento del tronco encefálico.

En el caso del núcleo estriado (NE), se seleccionó una porción representativa que se puede disectar en unos pocos pasos: la cabeza frontal que contiene principalmente el NE.

En el esquema I se observa cuales son los cortes que se realizaron para acceder a esta porción del NE.



ESQUEMA I. Disección del núcleo estriado, la corteza motora y el cerebelo.

En los tiempos indicados en cada diseño experimental, los animales fueron sacrificados rápidamente por decapitación con guillotina. Luego se realizó, en forma inmediata, un corte longitudinal de la piel en la línea media del cráneo y la misma fue removida dejando al descubierto la calota. Posteriormente, se hizo un corte con alicate de la parte posterior del hueso occipital, se introdujo un espátula de punta roma entre la membrana aracnoide y la pia madre con el fin de que entre aire en el espacio subaracnoideo para luego poder introducir el alicate sin dañar el cerebro. A continuación se realizaron dos cortes longitudinales de la calota a la altura de la comisura parieto-occipital del lado izquierdo y derecho, y la parte superior de la calota fue removida. Se introdujo una espátula en el sentido postero-anterior por delante de los lóbulos frontales y se seccionaron los tubérculos olfatorios, y el cerebro fue levantado hacia atrás, retirado de la cavidad encefálica, colocado en un vaso de precipitado con solución fisiológica a 0°C y enfriado a -20°C durante 2 min.

A continuación, el cerebro fue apoyado sobre una cápsula de petri previamente colocada sobre hielo granizado y cubierta con papel de filtro Whatman humedecido. Para explantación del NE se realizaron cortes transversales con una hoja de afeitar o un bisturí, uno por delante de la porción proximal de los tubérculos olfatorios seccionados, y otro por detrás de los mismos. Luego, las distintas áreas a estudiar fueron disectadas con espátulas. Se disectaron ambas hemipartes del NE, izquierda y derecha, y en algunos casos la corteza motora que se ubicaba en posición dorsal y dorso-lateral a cada hemiparte estriatal (ver en esquema).

3.6. PREPARACION DE LA FRACCION SUBCELULAR DE MEMBRANAS

En todos los casos las muestras de NE, cerebelo y corteza motora fueron procesadas, estudiadas por ensayo de binding y analizados los datos individualmente. Este procedimiento tiene la ventaja de poder obtener una información más precisa de la variabilidad biológica real existente

en los grupos controles o tratados de cada experimento, aunque una desventaja asociada es la imposibilidad de trabajar con un tamaño de muestra biológica por grupo experimental alto por el consumo de tiempo de cada etapa de los procedimientos técnicos y por las limitaciones relacionadas al equipamiento disponible en nuestro laboratorio y el departamento de Biología de la FCEN.

Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos luego de los estudios comportamentales. Los cerebros fueron removidos rápidamente y según el caso se disectaron las porciones frontales del NE, corteza motora y cerebelo. Posteriormente, los NE fueron homogenizados y analizados separando las hemipartes izquierda y derecha para detectar posibles asimetrías en los grupos controles o tratados. Luego de apoyar las áreas disectadas en caja de petri mantenida a 2-4°C, las mismas fueron pesadas. Las áreas fueron homogenizadas en 20 mM Tris-ClH pH 7.4 (solución 10% P/V), 0.32 M sacarosa, 1 mM EDTA y 0.5 mM PMSF (Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo).

Cada uno de los homogenatos fueron sometidos a fraccionamiento subcelular en centrífuga de alta velocidad (mod RC5C, Sorvall Instruments). Se usó en todos los casos rotor de ángulo fijo SS-34 (Sorvall). La preparación de membrana plástica de sinaptosoma fue obtenida de acuerdo a una modificación del método de Azcurra y De Robertis (1967). La homogeneización fue llevada a cabo a 1300 rpm mediante 3 series de 20 golpes cada una en un sistema de homogeneización vidrio-teflon (Potter-Evehjem, clearance = 0.25 mm). Luego de centrifugar el material a 1090 x g durante 10 min, los pellets (fracción nuclear cruda) fueron lavados dos veces y luego descartados. Los sobrenadantes fueron pooleados y recentrifugados a 13000 x g durante 30 min (pellet = membranas plasmáticas de la fracción mitocondrial- "MP"). Luego los pellets fueron resuspendidos en forma manual agregando el buffer de homogeneización dentro de cada tubo y realizando 40 golpes con embolo de teflon. En todos los experimentos de esta tesis la concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry (Lowry et al., 1951) usando seroalbúmina bovina (fracción V) como standar.

3.7. ESTUDIOS NEUROQUIMICOS

3.7.1. EVALUACION DEL RECEPTOR COLINERGICO MUSCARINICO (mAChR)

ENSAYO DE BINDING AL RADIOLIGANDO (³H)QNB

La cuantificación de sitios receptores aparentes de tipo mAChR se realizó mediante la evaluación de sitios de unión (binding) competitiva (Scatchard, 1949) usando como radioligando específico para este tipo de sistema receptor el (³H)Quinuclidilbenzilato ((³H)QNB). La determinación de sitios receptores mAChR fue realizada por ensayos con radioligando saturante (2 nM de (³H)QNB) sobre las distintas muestras de tejido obtenidas a partir de la fracción de MP del pellet mitocondrial. Para ello, el tejido (100 µg de proteína) fue incubado 30 min a 32°C en buffer Tris-ClH 50 mM, pH 7.4, volumen final de incubación 0.5 ml, bajo agitación constante. Cada determinación fue realizada por triplicado. La unión inespecífica del radioligando fue evaluada en presencia de 10µM de Sulfato de Atropina por duplicado.

Los procedimientos para la determinación del binding específico fueron basados en la técnica descrita por Yamamura & Snyder (1974). Luego de la incubación, el radioligando unido se separó del libre por filtración por succión ejercida por bomba de vacío utilizando un aparato de filtración de 8 bocas de diseño casero (tipo Millipore) y usando filtros de papel Whatman GF/B. El promedio de velocidades de flujo fue de 5 ml por min (la diferencia entre los flujos de dos filtraciones seguidas nunca superó el 10% del valor promedio). La incubación se finalizó con el traspaso de los tubos a un recipiente con hielo granizado, y el agregado de 3 ml de buffer de incubación frío a cada tubo. Inmediatamente después se volcaron los incubados en cada uno de los filtros y se lavó dos veces cada filtro con 4 (primer lavado) y 5 ml (segundo lavado) del mismo buffer. A continuación los filtros se colocaron en un vial y se secaron en estufa termostaticada a 42°C durante toda la noche. Los viales se cargaron en la mañana siguiente con 10 ml de cocktail para determinación de centelleo líquido (0.25 g POPOP + 4 g PPO por cada litro de Tolueno). Así fueron mantenidos a 15-20°C en oscuridad durante una hora y luego se

realizó el conteo de desintegración (equipo TM Analytic, mod.Delta 300). En todos los casos, luego de la eliminación del ligando libre, la radioactividad remanente fue cuantificada aplicando como procesamiento de datos posterior el programa de determinación de Quenching por el método de la Relación de Canales y una curva Standar para Tritio.

Las desintegraciones por min (dpm) se obtienen conociendo las cuentas por min (cpm) que detecta el aparato y la eficiencia (Ef) de conteo a partir de la relación de canales obtenida

$$\text{dpm} = \frac{\text{cpm}}{\% \text{Ef}}$$

Las dpm obtenidas a partir de un tubo incubado en presencia del competidor no radiomarcado (Sulfato de Atropina 10uM en este caso), corresponden a la unión inespecífica del ligando al tejido. Incubando en ausencia del desplazante frío se obtienen las dpm totales. De esta forma, las dpm correspondientes a la unión específica radioligando-receptor es:

$$\text{dpm en R} = \text{dpm totales} - \text{dpm inespecíficas}$$

La cantidad molar de sitios de binding específico correspondiente a las dpm de cada medición se calculan a partir de la actividad específica del radioligando utilizado.

Los resultados se expresan en **fmoles de sitios mAChR/mg proteína**.

3.7.2. EVALUACION DEL RECEPTOR DOPAMINERGICO TIPO D2 (D2R) ENSAYO DE BINDING AL RADIOLIGANDO (³H)SPI

La cuantificación de sitios receptores de tipo D2R se realizó mediante la evaluación de sitios de unión (binding) competitiva usando como radioligando específico para este tipo de sistema receptor el (³H)Spiroperidol ((³H)SPI). La determinación de sitios receptores D2R fue realizada por ensayos con radioligando saturante (1.2 nM de (³H)SPI) sobre las distintas muestras de tejido obtenidas a partir de la fracción de MP del pellet mitocondrial. Para ello, el tejido (150 ug

de proteína) fue incubado 60 min a 32°C en buffer Tris-ClH 50 mM (pH = 7.4), 120mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 1mM Na₂EDTA y, justo antes de utilizar, 0.1 % Ácido ascórbico. El volumen final de incubación fue 1.8 ml, en presencia del (³H)SPI saturante y bajo agitación constante. Cada determinación fue realizada por triplicado y la unión inespecífica del radioligando fue evaluada en presencia de 10uM de Sulpirida por duplicado.

Los procedimientos para la determinación del binding específico fueron basados en la técnica descrita por Seeman (Seeman et al., 1984). El resto de los procedimientos fue similar al del protocolo de determinación de sitios mAChRs.

Las dpm obtenidas a partir de un tubo incubado en presencia del competidor no radiomarcado (Sulpirida en este caso) corresponden a la unión inespecífica del radioligando al tejido. Incubando en ausencia del desplazante frío se obtienen las dpm totales. De esta forma, las dpm correspondientes a la unión específica radioligando-receptor es:

$$\text{dpm en R} = \text{dpm totales} - \text{dpm inespecíficas}$$

La cantidad molar correspondiente a las dpm de cada medición se calculan a partir de la actividad específica del ligando utilizado.

Los resultados se expresan en **fmoles de sitios D2R/mg proteína**.

3.8. ANALISIS ESTADISTICO Y REPRESENTACIONES GRAFICAS

Los análisis estadísticos aplicados en esta tesis (ver Sokal & Rohlf, 1991) fueron ejecutados utilizando como software el programa *Statistica* corrido bajo Windows 3.11. Las figuras fueron realizadas con el graficador *Excel* del programa Microsoft Office.

Las correlaciones de los ajustes a linealidad de los datos del TEC fueron graficadas utilizando el programa *Statistica*. En estas últimas las cabezas de flecha indican la velocidad máxima teórica (V_m) de cada grupo experimental en el TEC, luego de extrapolar la función lineal resultante al eje x cuando y=0.

Las respuestas asociativas o motoras obtenidas a través del estudio con el TEC y el RR fueron analizadas *a priori* con el Test de ANOVA de 2 factores, SESION y TRATAMIENTO. Cuando los animales fueron evaluados en más de 1 sesión (ya sea en el TEC o el RR) se aplicó una ANOVA de dos factores con diseño de medidas repetidas en el factor sesión. En algunos casos se discriminó un tercer factor, SEXO. En la amplia mayoría de los casos los datos no precisaron transformación matemática alguna dado que cumplían los requisitos de homogeneidad de varianza y ajuste a la distribución normal luego del análisis de los valores con los testeos de **Barlett** y de **Kolmogorov-Smirnov**, respectivamente.

A posteriori los datos fueron sometidos al test de **Tukey HSD**. En los casos en que el tamaño de muestra por grupo experimental fue heterogéneo se utilizó una derivación del test de Tukey denominada **Test de Stoline-Sjotvoll** adecuado para muestras con distinto N.

Las covariaciones entre V y V/Ra de los distintos grupos experimentales fueron estudiadas *a priori* por *análisis de covarianza (ANCOVA)* de un factor, Tratamiento. En algunos casos se estudió también como segundo factor, SEXO. La diferencia entre las pendientes (L) de los distintos grupos experimentales fue analizada *a posteriori* por la **Prueba de Paralelismo**. Otros detalles sobre los procesamientos de datos son dados al final de la parte metodológica correspondiente a cada experimento.

En el caso de los ensayos de binding a radioligandos, determinación del peso corporal o de áreas neurales, determinación de proteínas, etc. los promedios de los distintos grupos experimentales fueron comparados aplicando *a priori* el ANOVA de 1 factor, TRATAMIENTO. Cuando se precisó comparar los patrones temporales de la ganancia de peso prenatal o postnatal, se utilizó *a priori* ANOVA de 2 factores, TRATAMIENTO y DIA evaluado, con diseño de medidas repetidas en este último factor. En algunos casos, también se pudo incorporar el factor SEXO al análisis por ANOVA. *A posteriori*, las medias y sus respectivos desvíos estandar ($X \pm DS$) fueron comparadas aplicando el Test F de Scheffé. En todos los análisis de datos el criterio para clasificar una diferencia como estadísticamente significativa fue $p < 0.05$.

EXPERIMENTO “ONTOGENESIS”

3.9. CAMBIOS FUNCIONALES EN EL TEC DURANTE LA MADURACION POSTNATAL DE LOS SISTEMAS MOTOR Y ASOCIATIVO

Los distintos grupos experimentales fueron sometidos al testeo en el TEC en distintos períodos del desarrollo postnatal. Las condiciones del testeo fueron las mismas para todos los grupos. La única diferencia al respecto fue que se adecuó el volumen de la recompensa de acuerdo a pruebas piloto de caída del peso por la deprivación intrasesión. Este cambio se debió a la necesidad de un mayor refuerzo calórico en los animales mayores (los cuales llegan a tener mas del doble de peso y volumen con respecto a los animales de los otros grupos) para evitar que entre las sesiones S1 y S7 los animales pierdan mas de 10% de peso, lo que afectaría su respuesta motora en el TEC en las últimas sesiones.

Grupos experimentales:

T21 (n=20): animales testeados entre P21 y P28

T30 (n=22): animales testeados entre P30 y P37

T40 (n=17): animales testeados entre P40 y P47

T75 (n=14): animales testeados entre P75 y P82

P=día postnatal

Luego del entrenamiento en el TEC en las edades correspondientes se realizó el ajuste de los datos registrados a linealidad a través de la transformación matemática de Herrnstein para condicionamientos comportamentales con refuerzo continuo. En resumen, los datos obtenidos en el TEC son expresados como una relación entre la velocidad (V) y refuerzos acumulados (Ra), y correlacionados con la velocidad de cada sesión. Los ajustes a linealidad permitieron obtener los parámetros Vm y L.

Diez animales de cada uno de los grupos P21, P30, P40 fueron también estudiados en cuanto a su eficiencia en la adquisición de la consigna espacial inherente al testeo comportamental en el

TEC. Para ello fueron examinados en el sentido de giro durante las sesiones del TEC. Los valores son presentados como medias \pm DS.

Los errores espaciales*, fueron analizados estadísticamente como los resultados de respuesta motora en el TEC (ANOVA con diseño de medidas repetidas en el factor SESION).

* sólo Errores tipo I: *errores en la elección del sentido de giro*
(ver materiales y métodos para más detalles)

3.10. INDUCCION DE NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL Y EVALUACION COMPORTAMENTAL CON EL TEC

3.10.1. NEUROTERATOLOGIA INDUCIDA CON DIFENILHIDANTOINA (DFH) DURANTE LA GESTACION O LA LACTANCIA

Seis hembras preñadas fueron tratadas con solución fisiológica estéril, SF (n=2, volumen administrado equivalente al promedio de cada día para el grupo tratado con D) o DFH durante la gestación (n= 2, período de exposición G10-18, 30mg/kg/día, ip.). Un tercer grupo fue tratado con DFH sólo durante la infancia (n=2, período de exposición P13-23, 50 mg/kg/d). *A posteriori* todos los animales de las camadas fueron evaluados con el TEC a las edades P40-47.

Nota: Como ya disponíamos antecedentes que la administración de SF durante la lactancia no afecta la respuesta motora en el TEC (Brusés, 1993; Brusés et al., 1991, 1993) realizado a distintas edades en este caso los controles fueron sólo los animales expuestos a SF durante la gestación.

De esta forma los grupos se denominan de la siguiente forma:

C (tratamiento gestacional), n= 6 hembras y 5 machos
DFH-G (tratamiento gestacional), n= 5 hembras y 6 machos
DFH-I (tratamiento durante lactancia), n= 5 hembras y 5 machos.

3.10.2. EDAD DE TESTEO COMO UN FACTOR PRINCIPAL EN LA DETECCION DE NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL INDUCIDA DURANTE EL NEURODESARROLLO

La respuesta motora de los animales tratados durante la gestación o la lactancia con haloperidol (HAL) fue comparada con aquella de animales controles, como porcentaje de cambio respecto a un 100% de la respuesta promedio de los animales tratados con solución salina (grupo control C) en los periodos correspondientes, cuando el TEC es realizado en distintas etapas del desarrollo postnatal. Estos estudios tuvieron como fin evaluar la permanencia o la compensación de alteraciones comportamentales luego de la exposición a agentes neuroactivos.

3.10.2.1 NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL INDUCIDA CON HALOPERIDOL (HAL) DURANTE LA GESTACION

Machos provenientes de 7 camadas tratadas con SF (n=3, 1 ml/kg/d) o HAL (n=4, 2,5 mg/kg/d) durante la gestación (período G5-18) fueron evaluados en el TEC a las edades P30-37 (n=14) o en P75-82 (n=11).

De este modo los grupos presentados son denominados: C30 (n=6), HAL30 (n=8), C75 (n=6), HAL75 (n=5). Tres machos de cada uno de los grupos C75 y HAL75, entrenados originalmente en el período P75-82, fueron luego evaluados en su habilidad motora en el TRR a la edad P180-183. Este segundo testeo consistió de tres sesiones de equilibrio en el eje en rotación del aparato de rotarod, mas una última sesión de entrenamiento 20 min luego de recibir una inyección, por vía SC, de apomorfina.

3.10.2.2. NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL INDUCIDA CON HALOPERIDOL (HAL) DURANTE LA LACTANCIA

Los infantes provenientes de diez camadas fueron designados al azar para ser tratados con SF estéril (10 µl/g/d, n= 15 machos+17 hembras) ó HAL (1,2 mg/kg/d, n= 18 machos+17 hembras)

durante el período P5-21. Luego algunos fueron evaluados en el TEC a las edades P30-37 (grupo control *C30*, tratados con SF, 7 machos + 8 hembras; grupo tratado con HAL, *HAL30*, 8 machos + 7 hembras), o P40-47 (grupo control *C40*, tratados con SF, 8 machos + 9 hembras; grupo tratado con HAL, *HAL40*, 10 infantes de cada sexo). Los procedimientos para evaluación en el TEC fueron los mismos en ambas edades. Se registraron también los errores tipo I en las sesiones $S_{1,3,5,7}$.

3.10.3. PERIODO DE EXPOSICION COMO UN FACTOR PRINCIPAL EN LA INDUCCION DE NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL

La respuesta funcional de los animales adolescentes o adultos jóvenes, tratados en distintos periodos del neurodesarrollo con HAL son agrupados en estos gráficos para mostrar las diferencias respecto a los grupos controles respectivos. La figura muestra las V por sesión, en % de diferencia de los grupos tratados con respecto al grupo control respectivo.

3.10.3.1. EFECTO DE LA EXPOSICION A HAL ANTES O DURANTE EL PERIODO CRITICO DE SENSIBILIDAD PRENATAL AL MISMO

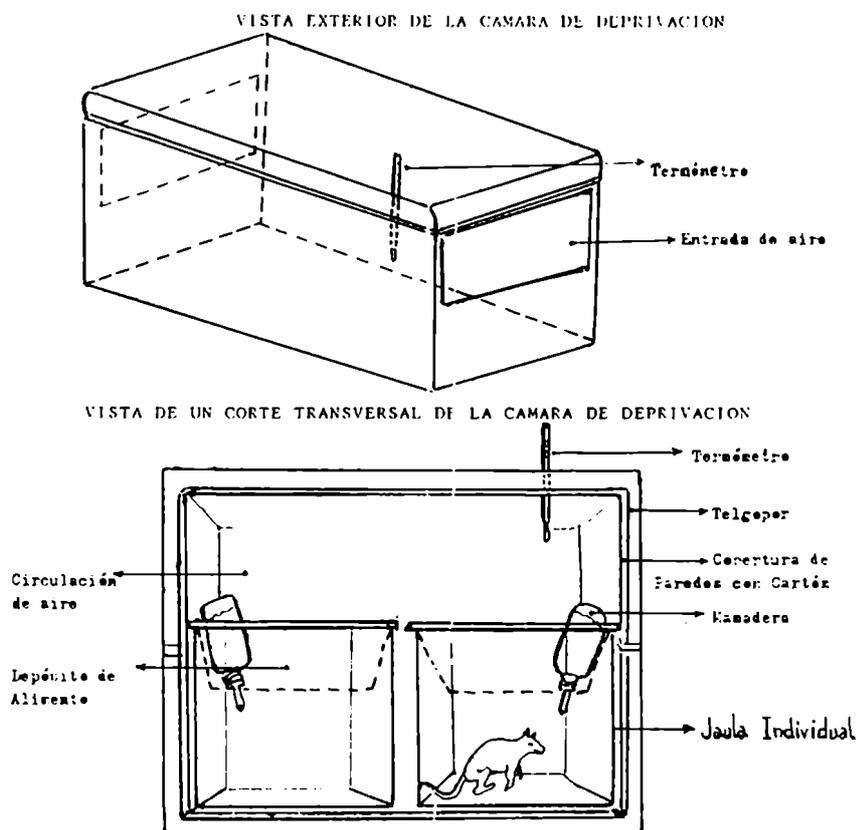
Se expusieron 6 ratas preñadas en distintos periodos del desarrollo prenatal a HAL (2,5 mg/Kg/d, ip.). Un grupo tratado fue inyectado durante el período **G5-18** (a partir de dos ratas preñadas tratadas, n= 8), otro grupo fue expuesto al mismo esquema farmacológico pero administrado sólo durante la primera mitad de dicho período, **G5-11** (a partir de dos ratas preñadas, n= 8). El grupo control (dos ratas preñadas, n= 6) incluyó animales nacidos de dos ratas que recibieron SF, una durante **G5-11** y la otra durante **G5-18**. Sólo se presentan datos de los machos de las camadas que incluye este experimento. El entrenamiento en el TEC fue realizado en el período P75-82.

3.11. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS

3.11.1. ESTRATEGIA AMBIENTAL

3.11.1.1. DISEÑO DE LAS CONDICIONES DE DEPRIVACION SOCIAL-AMBIENTAL

El grupo de animales privado (grupo DEP, n=10) fue aislado de contacto físico y social entre los días P25 y P39 por medio de la cría en jaulas individuales de 5 dm³ de volumen, introducidas a su vez de a 3 o 4 en cámaras de poliestireno (ver diseño en esta pág.). El grupo control (C, n= 10) incluyó animales criados en condiciones socio-ambientales estandar. En la mañana del día P40 los individuos aislados fueron reintegrados a jaulas grupales de cría estandar. El TEC fue realizado en el período P40-47. Durante y después del TEC los animales previamente privados fueron mantenidos en las mismas condiciones de cría que los animales controles. Sólo se registró la respuesta motora de los grupos experimentales (V por sesión)



Esquema 2. Rata dentro del ambiente de privación socio-ambiental

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 1

3.11.1.2. MODIFICACION DE CONDICIONES SOCIO-AMBIENTALES DURANTE EL PERIODO CRITICO ESTRIATAL PARA CORREGIR ALTERACIONES COMPORTAMENTALES INDUCIDAS DURANTE LA LACTANCIA

Exp. HAL/DEP

Diez camadas fueron asignadas al azar a cuatro grupos experimentales: Control ("C", n=2); Tratado con Haloperidol ("HAL", n=3); Sometido a Deprivacion Socio-ambiental ("D", n=2); Tratado con Haloperidol y luego deprivado ("HALDEP", n=3).

De estas camadas se utilizaron para este experimento 28 hembras (7 en cada condición experimental) y 40 machos (10 en cada condición experimental).

Durante la lactancia, los infantes de los cuatro grupos fueron inyectados, por vía ip, diariamente, desde el dia P5 a P21, siempre entre las 15 y 18 horas. Aquí se presenta una síntesis de las condiciones farmacológicas y ambientales y los estudios neuroquímicos y comportamentales de cada uno de los grupos experimentales de este exp.

	TRATAMIENTO		EVALUACION	
	DROGA administrada	AMBIENTE de cría	TEC	ENSAYO DE BINDING
	PERIODO P5-21	P27-40	P40-47	P90
GRUPOS			TODOS LOS GRUPOS	
C	S*	NORMAL		
HAL	HAL**	NORMAL		
D	S	DEPRIVADO		
HALDEP	HAL	DEPRIVADO		

* S = solución fisiológica estéril, 10 µl/g/d

** HAL = haloperidol, 1 mg/kg/d

El cálculo de la dosis de HAL como neuroteratógeno en este y los siguientes experimentos fue realizado considerando el peso corporal del animal y teniendo en cuenta los criterios que se aplican cuando se investiga la relación dosis-toxicidad durante los procedimientos de aprobación de nuevos agentes químicos en modelos animales experimentales, previo al consumo humano (ver anexo II). Otro factor también considerado fue el rango de dosis con efectos sobre el comportamiento motor y asociativo según la bibliografía existente y trabajos preliminares.

Después del destete (P21) todos los infantes fueron ubicados en jaulas de cría convencionales de medidas 22x18x45cm (aprox. 18 dm³), tres a cuatro individuos por jaula, excepto en los grupos D y HALDEP. Estos últimos fueron introducidos en jaulas individuales, aislados de estimulación física y social. Esto fue realizado a partir de P27 alojando estos animales en jaulas de acero inoxidable de medidas 15x15x25cm (5,6 dm³). A su vez, estas jaulas individuales permanecieron durante las dos semanas de privación dentro de una sala en un área libre de sonidos y ruidos de origen humano. Para atenuar aún más la llegada de estímulos físicos, químicos o sociales, cada jaula fue parcialmente cubierta con paredes de 1/2" de poliestireno y ubicadas a una distancia de 100cm una de la otra, reduciéndose así gran parte de los estímulos auditivos, olfatorios y visuales. Estas ratas privadas fueron pesadas tres veces por semana.

Todos los grupos recibieron alimento y agua *ad libitum* excepto cuando indicado (ver condiciones de entrenamiento en el TEC).

En la mañana del primer día de testeo comportamental los animales privados fueron retornados a las condiciones estándar de cría, 3-4 individuos por jaula. Todos los animales fueron testeados en el TEC durante el período P40-47. Se registraron automáticamente las V por sesión, y en forma manual los errores de **tipo I (elección)** y de **tipo II (cuartos de vuelta incorrectos)** por sesión en los primeros 5 min de las sesiones S1, S3 y S7. Sólo se presentan datos espaciales correspondientes a los machos. Los resultados comportamentales fueron analizados estadísticamente discriminando el factor sexo.

A la edad P90 los machos fueron sacrificados y los estriados pooleados (NEI + NED) y cerebelos (CER) fueron procesados para la determinación de sitios de binding al radioligando (^3H)SPI en fracciones subcelulares ricas en membranas.

3.11.2. TERAPEUTICAS FARMACOLOGICAS

3.11.2.1. REGISTROS DE TERATOLOGIA ESTRUCTURAL

En los experimentos de corrección de neuroteratología funcional se evaluó la posibilidad de que los tratamientos realizados en los distintos grupos experimentales produjeran alteraciones del desarrollo de otro tipo como ser malformaciones, alteraciones comportamentales severas, etc.

Con este fin se determinó en cada experimento los siguientes parámetros:

- ➡ Ganancia de peso de la rata preñada durante la neuroteratogenización prenatal.
- ➡ Alteraciones comportamentales detectables a simple vista en la madre durante el tratamiento.
- ➡ Aparición de camadas sub- o supernumerarias.
- ➡ Número de neonatos nacidos muertos, comidos en los primeros días de vida, y número de infantes muertos durante el tratamiento postnatal.
- ➡ Ganancia de peso de los infantes correspondientes a los distintos tratamientos farmacológicos.
- ➡ Alteraciones comportamentales detectables a simple vista en los infantes o adolescentes durante el tratamiento postnatal.
- ➡ Efecto de los tratamientos farmacológicos sobre el peso del NE y CER en el día del sacrificio de los animales.

Dado que no en todos los diseños experimentales se tomaron los registros respectivos estrictamente en las mismas fechas, en las figuras se presentan los resultados de estos estudios

con un N por grupo experimental que representa a animales de distintos lotes que fueron evaluados, para el parámetro en cuestión, en las mismas condiciones y etapas del desarrollo prenatal o postnatal.

En el caso de la evaluación del efecto de los tratamientos farmacológicos sobre el peso del NE y el CER, la porción frontal de los hemiestriados izquierdo y derecho fue pesada separadamente el día del sacrificio de los animales (en $P90 \pm 2$ días). Los datos provienen de machos y hembras del experimento HAL/HAL presentado y de pruebas piloto donde se aplicaron las mismas condiciones experimentales para aumentar el N y así hacer mas sensible el testeo.

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 2**3.11.2.2. CORRECCION CON HALOPERIDOL DE NEUROTERATOLOGIA MOTORA INDUCIDA CON LA MISMA DROGA DURANTE LA GESTACION****Exp. HAL/HAL**

Ocho ratas preñadas fueron designadas al azar en dos grupos, de acuerdo al tratamiento farmacológico prenatal: SF ("S", n=4), con 1.5 ml/kg/d de solución fisiológica estéril (NaCl 0.9%); HAL ("HAL", n=4), con 2.5 mg/kg/d de solución de HAL en soluc. fisiológ. estéril

En cada jaula durante la lactancia, cada madre alimentó a lactantes previamente tratados con SF o HAL durante la gestación. Los lactantes fueron inyectados, por vía ip., diariamente entre los días P5 y P21 entre 15 y 18 hs de acuerdo al tratamiento farmacológico postnatal: SF ("S", n=27), con 10 µl/kg/d de soluc. fisiológ. estéril; HAL ("HAL", n=32), con 1.5 mg/kg/d de solución de HAL 0.1% en soluc. fisiológ. estéril.

De este modo, considerando los grupos experimentales según los tratamientos en uno y otro período, la denominación en los gráficos es la siguiente:

Tratamiento		N total	Hembras	Machos
Prenatal (G5-18, 14 dosis)	Postnatal (P5-21, 17 dosis)			
Control S/S		13	5	8
S	HAL	15	6	9
HAL	S	14	6	8
HAL	HAL	17	7	10

Entre P30-37 los animales fueron condicionados y entrenados en el TEC. Se registró en forma automática las vueltas por sesión.

En P90 todos los machos fueron sacrificados para el ensayo de binding a (^3H)SPI en fracciones subcelulares de membranas de NE (analizando separados NEI y NED) y CER.

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 3

3.11.2.3. CORRECCION POSTNATAL CON DIFENILHIDANTOINA (DFH) DE UN DEFICIT ESPACIAL INDUCIDO DURANTE LA GESTACION DFH

EXP. DFH/DFH

Seis ratas preñadas fueron designadas al azar en dos grupos, de acuerdo al tratamiento farmacológico prenatal: SF ("S", n=3), con 1.5 ml/kg/d de S estéril (NaCl 0.9%); DFH ("DFH", n=3), 30 mg/kg/d.

Los lactantes fueron inyectados ip. diariamente entre los días P13 y P23 entre 15 y 18 hs de acuerdo al tratamiento farmacológico postnatal: SF ("S",n=23), con 10 µl/kg/d de S (NaCl 0.9%); DFH ("DFH", n=23), 50 mg/kg/d.

De este modo, considerando los grupos experimentales según los tratamientos en uno y otro período, la denominación en los gráficos es la siguiente:

Tratamiento		N total	Hembras	Machos
Prenatal (G10-18, 9 dosis)	Postnatal (P13-23, 11 dosis)			
Control S/S		11	6	5
S /	DFH	11	5	6
DFH /	S	12	6	6
DFH /	DFH	12	5	7

G - Dia gestacional P - Dia posnatal

Luego de los tratamientos farmacológicos todos los animales fueron condicionados y entrenados en el TEC durante el período postnatal P40-47.

En este experimento, aparte de obtener los parámetros funcionales V_m y L a partir de los registros del TEC, también se hizo un estudio de los errores en las sesiones S_1 , S_3 , S_5 y S_7 (ver procedimientos en pág. 62).

En nuestro laboratorio se ha determinado que los animales "recuerdan" el condicionamiento motor hasta varios meses después del primer entrenamiento, ejecutando un perfil de *respuesta motora vs sesión* similar al original aunque alcanzando el plateau aproximadamente una o dos sesiones antes (dependiendo de cuanto tiempo transcurrió entre el primer y segundo entrenamiento). O sea, no precisan una sesión S_0 de enseñanza de la consigna (Brusés, 1993).

En **P180**, los distintos grupos experimentales de este experimento fueron sometidos nuevamente al TEC, pero esta vez **con sentido de giro contrario** al prefijado en P40-47. En consecuencia, en este caso se realizó una sesión S_0 de enseñanza manual de la nueva consigna, tras lo cual, en las siguientes sesiones, se evaluó la capacidad del sistema funcional para ejecutar la nueva tarea, teniendo almacenada en la memoria espacial una consigna previa contraria a la presente.

Durante este 2do. testeo en TEC también se registraron los errores con el fin de observar si las alteraciones encontradas en el aprendizaje asociativo-espacial de los grupos tratados eran de tipo permanente. O sea, si se podía reproducir la respuesta asociativa del TEC realizado en P40-47, en el segundo testeo en P180, cuando los animales ya son adultos.

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 4**3.11.2.4. MODIFICACION DEL PERIODO CRITICO DE PLASTICIDAD
DEL SISTEMA MOTOR ESTRIATAL****3.11.2.4.1. RESPUESTA DEL NUCLEO ESTRIADO PRETRATADO CON NGF AL
TEC EJECUTADO LUEGO DEL PERIODO CRITICO DE PLASTICIDAD****EXP. NGF 1****ANIMALES Y CLASIFICACION DE GRUPOS EXPERIMENTALES**

Los machos de diez camadas de ratas fueron divididos al azar en trece grupos usados en tres experimentos.

Grupos Exp.1: dos grupos no operados, entrenados en P30-37 (grupo T_{30} , N=6) o en P40-47 (T_{40} , N=6), y los controles de entrenamiento respectivos (animales sólo habituados al aparato de TEC, C_{30} , N=6 y C_{40} , N=6, respectivamente).

Grupos de Exp. 2-3 (total=nueve grupos): en estos experimentos los grupos fueron perfundidos intraestriatalmente por dos semanas comenzando en P25. Con este fin se implantaron cánulas en la parte frontal del hemiestriado izquierdo en animales que luego fueron entrenados entre P40-47.

Denominación de los grupos de los experimentos 2 y 3

Exp.2: control de cirugía ("sham") entrenado (grupo SH_T , N=6), perfundido con Citocromo C (CC) entrenado (grupo CC_T , N=6), perfundido con Nerve Growth Factor (NGF) entrenado

(grupo NGF_T , N=5), y los respectivos grupos controles de entrenamiento: SH_C, CC_C y NGF_C (para cada uno, N=3).

Exp.3: clasificación similar a Exp.2, pero una velocidad de perfusión menor fue utilizada. De esta forma los tres grupos fueron denominados: sh_T , N=6; cc_T , N=6; ngf_T , N=5.

PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS

La canulación intraestriatal (coordenadas en mm: A=0.5; L=5; V=4.5) y el implante de las minibombas fueron realizados a la edad P25 en los grupos operados bajo procedimientos estériles (White & Schwartz, 1994). Cada animal fue anestesiado con 3 ml/kg de Equitesina (ip), preparada con fenobarbital (10 mg/ml) e hidrato de cloral (40 mg/ml), y canulado dentro de la porción frontal del estriado izquierdo con un kit de perfusión intracerebral. Siguiendo la canulación, una minibomba osmótica (model 2002, 14 días de infusión continua, 0.5 μ l/h) fue inmediatamente ubicada en la región intrascapular a nivel subcutáneo (minibomba y kit de infusión intracerebral a partir de Alza Corp., Palo Alto, CA). Luego la bomba fue conectada a la cánula por medio de una tubuladura vinílica. NGF 2.5S extraído y purificado a partir de glándula salival de ratón (1.4 or 0.4 μ g/day para Exp. 2 y 3, respectivamente) fue perfundido a los grupos operados y perfundidos con NGF. El CC fue usado como un control biológico dado que esta biomolécula tiene propiedades fisico-químicas similares al NGF pero no posee ninguna de las actividades características de la familia de neurotrofinas. El vehículo para las diluciones de NGF y CC fue fluido cerebroespinal artificial (FCA). Después de la cirugía, los controles “*sham*” (grupos SH y sh) y los animales tratados con CC y NGF fueron ubicados en jaulas individuales de acero inoxidable de 5.6 dm³ con agua y alimento *ad libitum* excepto cuando indicado para los procedimientos asociados al entrenamiento en el TEC. Las bombas de perfusión fueron extraídas en la mañana de P39, bajo anestesia suave con eter.

Los animales de los grupos controles positivo y negativo (T_{30} , C_{30} , T_{40} , C_{40}) al igual que los grupos operados fueron alojados en jaulas individuales, para que no haya diferencias entre grupos operados y no operados con respecto al efecto del aislamiento social durante el neurodesarrollo (Bean & Lee, 1991; Ansiman et al., 1998).

EVALUACION MOTORA EN EL TEC

Los animales entrenados fueron estudiados mediante el TEC comenzando a la edad P30 (grupo T_{30}) o P40 (grupo T_{40} y todos los grupos operados). Para mayor claridad y dado que no modificaba los resultados gráficos, sólo los datos de las sesiones $S_{1,3,5,7}$ se utilizaron para hacer la transformación de Herrnstein y obtener V_m .

Los animales no entrenados derivados de cada grupo fueron privados de agua y recibieron una ración de sacarosa igual a la ingestión promedio de las ratas entrenadas durante las sesiones del TEC. Además, estos grupos no entrenados fueron introducidos diariamente en el aparato del TEC 30 min sin entrenamiento condicionado. Antes de cada sesión el peso corporal fue registrado. Después del entrenamiento, animales retornaron a sus jaulas individuales. Al ser decapitados en P70, no se detectó ninguna diferencia significativa en el peso corporal de las ratas de estos experimentos.

HOMOGENIZACION DE LOS NUCLEOS ESTRIADOS

Cada cerebro fue rápidamente removido de la cada cavidad craneana y las hemipartes izquierda y derecha del núcleo estriado rostral (NEI y NED) fueron disectadas y homogenizadas. Los ensayos de binding se realizaron sobre fracciones mitocondriales de membranas (mas detalles en pág. 65-69).

ENSAYO DE BINDING A (³H)QNB

Muestras de membranas a partir de cada rata fueron analizadas separadamente por ensayo de binding. Los sitios aparentes mAChRs fueron determinados sobre 100µg de proteína de membrana (mas detalles en pág. 68-69).

SINTESIS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

GRUPO	N* Exp.1	PERIODO TEC	BINDING (³ H)QNB
ENTRENADO EN PCE <i>-como grupo control positivo-</i>	6	P30-37	P70
CONTROL RESPECTIVO	6		
ENTRENADO FUERA DE PCE <i>-como grupo control negativo-</i>	6	P40-47	
CONTROL RESPECTIVO	6		

GRUPO	N Exp2*	N Exp.3	CANULACION	PERIODO PERFUSION	PERIODO de TEC	BINDING (³ H)QNB
CONTROL (SH y sh)	9	6	MANIPULACION QUIRURGICA SIMULADA (grupos "Sham")			
CITOCROMO (CC y cc)	9	6	P25	P25-39	P40-47	P70
NGF (NGF y ngf)	8	5				

*incluye 3 animales no entrenados en TEC por grupo experimental

3.11.2.4.2. ENTRENAMIENTO EN EL PERIODO CRITICO ESTRIATAL DE RATAS SIMULTANEAMENTE PERFUNDIDAS CON NGF

EXP. NGF 2

ANIMALES Y CLASIFICACION DE GRUPOS EXPERIMENTALES

Los machos provenientes de cinco camadas fueron divididos al azar en tres grupos experimentales, cada uno de los cuales fueron a su vez subdivididos en individuos entrenados en el TEC y controles de entrenamiento.

En este experimento los grupos fueron perfundidos intraestriado izquierdo por 12 días, comenzando en P25, por medio de cánulas y minibombas implantadas (ver procedimientos quirúrgicos en Exp. NGF 1), y luego entrenados en el período crítico (P30-37).

Denominación de grupos:

1. **Control de procedimientos quirúrgicos** (“Sham”) entrenado (SH_T , N=6),
2. **Perfundido con Citocromo C** (CC) entrenado (CC_T , N=6),
3. **Perfundido con NGF 2.5S** entrenado (NGF_T , N=6),

y los respectivos controles de entrenamiento (animales sólo habituados al aparato de TEC), grupos SH_C , CC_C y NGF_C (N=4 cada uno).

PROCEDIMIENTOS QUIRURGICOS

Se procedió igual que con los animales operados del Exp. NGF 1 (ver procedimientos en pág. 86). NGF 2.5S de ratón (0.4 µg/día) fue perfundido a los grupos tratados con NGF. Citocromo C (CC, 0.4 µg/día) fue también usado en este experimento como control de actividad biológica.

El vehículo fue también FCA. Después de la cirugía, se mantuvo a los animales en las mismas condiciones que en el Exp. NGF 1. En el día P37, 2 hs después de finalizada la última sesión del TEC, se extrajeron las minibombas de perfusión bajo anestesia suave con eter para evitar la infusión de NGF hasta P40, según las propiedades de las bombas de perfusión implantadas en P25. Nuestro interés era la acción del NGF únicamente en el período reportado como PCE.

ESTUDIO DE LA RESPUESTA MOTORA EN EL TEC

Los animales entrenados fueron condicionados y entrenados para correr en el aparato de TEC comenzando a la edad P30 (grupos SH_T, CC_T y NGF_T). Se registraron automáticamente las V/sesión y se obtuvo la Vm por transformación de Hernstein.

Como fuera ya mencionado, cuatro animales de cada grupo experimental fueron habituados al aparato del TEC pero no entrenados. En este caso no se realizaron estudios de la respuesta espacial en el TEC.

HOMOGENIZACION

Todos los animales fueron sacrificados a la edad P70. Cada cerebro fue rápidamente removido de la cavidad craneana y las hemipartes izquierda y derecha del núcleo estriado (NEI y NED, respectivamente) fueron disectadas y homogenizadas como explicado anteriormente. Los ensayos de binding se realizaron sobre fracciones mitocondriales de membranas (ver más detalles en pág. 65-67).

ENSAYO DE BINDING A (³H)QNB

Muestras de membranas a partir de cada rata fueron analizadas separadamente por ensayo de binding. Los sitios aparentes mAChRs fueron determinados sobre 100µg de proteína de membrana (ver más detalles en pág. 68-69).

SINTESIS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

GRUPOS	CIRUGIA	PERIODO DE PERFUSION	PERIODO de TEC	ENSAYO DE BINDING A (³H)QNB
CONTROL (SH, n=10*)	MANIPULACION QUIRURGICA SIMULADA (GRUPO "SHAM")			
CITOCROMO C (CC, n=10*)	P25	P25-37	P30-37	P70
NGF (NGF, n=10*)				

*incluye 4 animales no entrenados en TEC por grupo experimental

4. RESULTADOS

4.1. EXP. ONTOGENESIS

En este experimento se evaluaron las respuestas motoras y espaciales de los animales en el TEC ejecutado a distintas edades del desarrollo postnatal temprano y tardío (desde P21 a P75). (esquema experimental en pág. 72-73).

Como puede observarse en las Fig. 1 - 2 tanto en la respuesta motora ($F(3,69)=6.41$, $p<0.0007$) como en la asociativa-espacial ($F(2,27)=18.3$, $p<0.0001$) para el efecto principal edad de testeo se encontraron cambios estadísticamente significativos.

Una observación de los resultados indica que:

1. Los mayores cambios en ambas respuestas entre sesiones se producen entre S_0 - S_4 .
2. Se alcanza el plateau de respuesta motora entre S_{4-5} .
3. Se alcanza el plateau de respuesta asociativa entre S_{3-4} .

Las linealizaciones de las funciones permitió realizar un análisis de ANCOVA para detectar diferencias en la velocidad máxima teórica (V_m) o en el componente de aprendizaje (L). Puede observarse una máxima respuesta motora en el grupo más joven (P21) asociado a un menor L (Efecto principal EDAD de TESTEO, $p<0.0001$; Test de Paralelismo, $p<0.001$). En los grupos P30, P40 y P75 tomados de a pares no se encontraron diferencias estadísticas.

Por otro lado, el aumento de la respuesta motora sesión a sesión tendió a ser inversamente proporcional al descenso en el número de errores espaciales, en cada edad testada. Esto puede ser concluido así a partir del análisis de covarianza (ANCOVA) de V vs EI por sesión, que mostró alta significación estadística para el efecto principal EDAD de TESTEO ($F(2,17)=37.1$, $p<0.00001$) (ver Fig. 3), y altos índices de correlación.

r resultante para cada grupo experimental:

P21, $r = -0.97$

P30, $r = -0.98$

P40, $r = -0.91$

Para la correlación total, $r = -0.78$

Las comparaciones *a posteriori* de los perfiles de V por ANCOVA confirmó los resultados del análisis de ANOVA: entre P21 y P30 se encuentran diferencias significativas ($p < 0.01$) las cuales se ven luego atenuadas (por ejemplo, entre P30 y P40, $p = 0.59$).

Los valores de errores de todos los grupos evaluados en las últimas 3-4 sesiones (tendiendo asintóticamente a un mínimo que podría ser aproximado por extrapolación de la correlación V vs EI al eje x en Fig.3) pueden ser considerados como una respuesta de la saciedad de los animales en la segunda mitad de cada sesión. En general estos errores fueron registrados luego de que el animal había ingerido una alta proporción de la recompensa total de la sesión. La situación fue distinta en las primeras sesiones, donde la mayor proporción de errores fueron cometidos en los primeros 10-15 min de la sesión cuando la consolidación del aprendizaje espacial no estaría aun terminada.

4.2. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLOGICOS SOBRE LA VIABILIDAD-MORTALIDAD DE LAS CAMADAS

A continuación se presentan observaciones (en general cualitativas) de animales provenientes de distintos experimentos que son agrupados con el fin de extraer mas información sobre los efectos de los tratamientos farmacológicos realizados.

Evaluaciones realizadas:

1. Observación del comportamiento materno durante el tratamiento;
2. Evaluación de la ganancia de peso materno durante el tratamiento;
3. Conteo de camadas, registros de neonatos nacidos muertos y detección de canibalismo de la madre sobre sus crias durante el período de lactancia;
4. Evaluación de la ganancia de peso de los infantes durante el tratamiento postnatal
Análisis del efecto del tratamiento prenatal o postnatal o la consecuencia de la interacción de ambos sobre la ganancia de peso de los infantes ;
5. Evaluación de la disminución del peso asociado al stres producido durante la ejecución del TEC;
6. Evaluación de las areas cerebrales examinadas en el momento del sacrificio de los

animales para realizar estudios neuroquímicos;

7. Evaluación de signos neurológicos - posturales groseros en el largo plazo;
8. Registro de animales muertos desde el tratamiento farmacológico hasta el día de sacrificio (cambios en la morbi-mortalidad)

HALLAZGOS

1. En algunos casos se observó un comportamiento materno anómalo que incluyó un aumento de susceptibilidad a los estímulos externos (mayor agresividad, hiperactividad o hipoactividad) y al nacer la camada menor cantidad de tiempo dedicado a la lactancia. Las alteraciones postnatales en el cuidado materno fueron atenuadas ubicando las camadas en jaulas con madres nodrizas o ratas con tratamiento control, en los primeros días de vida (ver consideración del factor camada en pág. 54).

2. Aunque por aleatoriedad, se observa una diferencia en el peso inicial promedio de las hembras tratadas con DFH, la Fig. 4 muestra que ambas drogas produjeron leves cambios al peso materno durante la gestación. Aunque las diferencias no mostraron significación estadística luego del análisis de ANOVA, se presenta una tendencia a la disminución de la ganancia de peso siendo la DFH la de mayor efecto.

3. El conteo de las camadas y las relaciones de neonatos muertos/totales guardaron cierta relación a la disminución del peso de las ratas preñadas tratadas. Nuevamente la DFH presentó mas efecto sobre la viabilidad de la camada e indujo mayor canibalismo en la madre que el HAL, aunque analizando diferencias sólo se llevo al límite del criterio de significación estadística.

Respecto a la presencia de neonatos muertos en los primeros días de vida, he encontrado un reporte que, en acuerdo con lo antedicho, muestra que la administración de HAL en dosis de 2.5 o 5 mg/kg/día entre los días gestacionales G6-20 (régimen farmacológico similar al del exp. HAL/HAL de esta tesis) no potencia los valores de mortalidad neonatal encontrados en las ratas controles (Williams et al., 1992), lo cual acordaría con la similitud del grupo HAL con los resultados del grupo control (Fig. 5).

4. Al comenzar los tratamientos farmacológicos postnatales también se observa una disminución del peso de los infantes tratados durante la gestación con DFH y HAL, siendo la segunda mas nociva en este aspecto del desarrollo. La caída del peso postnatal en los primeros registros se mantuvo y en algunos casos se incrementó durante y después del tratamiento farmacológico, aunque las diferencias no tuvieron significación estadística posiblemente debido a las relaciones N/DS para cada grupo experimental (ver Fig. 6. A-B). Dado que neonatos de los grupos tratado prenatalmente con DFH o HAL en P5 en general ya partían de un peso individual menor, es posible que la diferencia tenga principalmente un origen prenatal y que posibles alteraciones en la actividad de lactación por efecto de los tratamientos postnatales incrementen las dificultades para aumentar el desarrollo corporal general. Ya han sido reportado efectos persistentes de la exposición prenatal a HAL sobre el peso corporal y el cerebral que en general se compensan durante el desarrollo postnatal tardío (Williams et al., 1992; Holson et al., 1994).

5. En todos los experimentos los animales tratados y controles perdieron aproximadamente el mismo peso entre las sesiones S1 y S7 del TEC, y *a posteriori* del testeo recuperaron el peso perdido con el mismo patrón temporal (datos no mostrados).

6. En coincidencia con lo expuesto en el punto 4, en los animales tratados con HAL durante la gestación también llegamos a detectar una leve caída del peso del NE y el CER (ver Fig. 7) cuando aumentamos el N por grupo experimental juntando para el análisis estadístico los animales correspondientes a distintos lotes experimentales que habían sido tratados con las mismas condiciones y sacrificados en la misma edad..

7. En los desplazamientos horizontales como en la actividad vertical de los animales tratados con los distintos tratamientos nunca se evidenció (a simple vista) alteraciones neurales groseras. Sí pudo observarse que los tratamientos con DFH que indujeron hiperactividad en el testeo en el TEC también produjeron una mayor actividad motora y social dentro de las jaulas durante los tratamientos farmacológicos. En este sentido, aunque no fue cuantificado, parecieron mostrar mayor actividad intrajaula las hembras.

8. Agrupando los datos de distintos lotes experimentales los niveles de mortalidad durante o después de los tratamientos farmacológicos fue relativamente baja siendo los animales tratados

con HAL los más afectados (datos no mostrados), lo cual podría deberse a que el tratamiento postnatal con HAL abarcó casi toda la lactancia (P5-21) y que induce somnolencia y letargia (Goodman & Gilman, 1990). Esto último podría producir disminución del tiempo diario dedicado a lactancia afectando así el desarrollo físico y funcional general (esto pudo observarse aunque no fue cuantificado).

4.3. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS

4.3.1. MANIPULACION DEL AMBIENTE PARA REVERTIR NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 1

EXP. HALDEP

El efecto sobre la respuesta motora en el TEC de las condiciones de privación seleccionadas es presentado en la Fig. 8. Como puede observarse ya sea en los registros de V/sesión o en las Vm extrapoladas de las linealizaciones de los datos no se encontró ninguna diferencia significativa entre los grupos DEP y el control C.

En las Fig. 9-10 se muestran los resultados de la aplicación de dichas condiciones de privación en un experimento de corrección de neuroteratología motora y espacial inducida durante la lactancia con HAL. El diseño de este experimento es resumido en la pág. 77 para permitir un más rápido seguimiento de la interpretación de los resultados.

El peso y el desarrollo corporal y comportamental general de los animales privados no mostró diferencias con los animales del grupo C (datos no mostrados).

Las respuestas motoras de las hembras y machos de los distintos grupos experimentales se muestran en Fig. 9.

Los animales del grupo C mostraron respuestas motoras similares a los registros históricos que poseíamos para ratas Sprague-Dawley a través de varios años de investigaciones en nuestro laboratorio (Brusés et al., 1991; Brusés, 1993; Brusés & Azcurra, 1993).

condicionamiento espacial hubo un aumento en V estadísticamente significativo del 35% en favor del grupo DEP (Tukey, $p < 0.04$).

Los animales tratados con HAL durante la lactancia expresaron un aumento en la actividad locomotora (aumento máximo: 45%) respecto a los controles, lo cual se evidenció también como un incremento en la V_m obtenida por linealización de la curva (Fig. 10: en vueltas/min, grupos: C=13.6, HAL=17.8). No se encontraron diferencias significativas ni en las respuestas motoras por sesión ni en V_m entre los grupos DEP y HALDEP con respecto al control C (Fig. 10: V_m en vueltas/min, D=13.9, HALDEP=14.2). Por otro lado no se encontraron diferencias significativas entre las pendientes luego del análisis de ANCOVA y a *posteriori* Test de Paralelismo.

El grupo de animales privados *a posteriori* de la administración de HAL durante la lactancia aproximaron sus registros motores a los del grupo control (Fig. 9. A y B, hembras y machos, respectivamente).

Los errores fueron registrados de dos formas distintas en las sesiones S₁, S₃ y S₇: errores tipo I o errores en la "elección", y errores de tipo II o "de persistencia" en el error (ver más detalles de los procedimientos y registros con el TEC en pág. 59-60). Como puede verse en las Fig. 11. A-B, ya sea para los errores de tipo I o II, las evaluaciones espaciales permitieron detectar un efecto disturbador del HAL sobre la respuesta asociativa (con respecto al grupo C, aumento estadísticamente significativo para Errores I, $p < 0.003$, y en los registros acumulados en las tres sesiones evaluadas para Errores II, $p < 0.0005$).

El grupo HALDEP no mostró diferencias significativas en la respuesta espacial con respecto al C (para ninguna de las dos formas en que se registraron los errores) y presentó una corrección del comportamiento motor alterado previamente por la HAL (todo esto evaluado simultáneamente).

Un último estudio incluyó la determinación de los sitios de binding a (³H)Spiroperidol ((³H)SPI) en el NE a la edad P90. En estas determinaciones neuroquímicas no se encontró ninguna diferencia significativa entre grupos excepto que se halló un aumento del 17 % en los sitios aparentes D2Rs en el grupo HAL respecto al control C que alcanzó significación estadística ($p < 0.05$). Resultados en fmoles (³H)SPI/mg proteína (DS entre paréntesis): C=300 (33); HAL= 352 (42); DEP= 288 (35) y HALDEP= 308 (43) (ver Fig. 12).

4.3.2. USO DE FARMACOS PARA REVERTIR NEUROTERATOLOGIA

4.3.2.1. EVALUACION DE LA NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL INDUCIDA DURANTE LA GESTACION O LA LACTANCIA

Aquí se muestran los efectos funcionales en el largo plazo inducidos por los agentes químicos los cuales fueron utilizados, en otros experimentos, en las estrategias terapéuticas farmacológicas ya sea como agente neuroteratogénico o como terapia.

Sobre los efectos motores inducidos en el largo plazo por la exposición a DFH durante la gestación o la lactancia se discutirá junto con los resultados del Exp. DFH/DFH.

Como previamente había sido demostrado (Brusés et al., 1991, 1993) la exposición prenatal a HAL induce una caída de la respuesta motora en el TEC ya sea que el test sea realizado en P30-37 o P75-82, aunque se observa una atenuación parcial de la diferencia entre tratados y controles en el testeo más alejado del período de exposición al HAL (Fig. 13.A). Los hallazgos del testeo en P30-37 confirmaron resultados previos de nuestro laboratorio (Brusés et al., 1991, 1993).

Cuando se aplicó un testeo de mayor exigencia para el sistema motor entre P180-183, como es el rotarod (TRR), en los animales tratados con HAL durante el periodo prenatal y que habían sido testados con el TEC a partir de P75 se encontró que el déficit motor del grupo HAL con respecto al control persistía. La administración de *apomorfina* previa a la última sesión en el TRR no produjo una respuesta farmacológica diferencial entre el grupo HAL75 y el C75 (Fig. 13.B).

En la Fig. 14 se muestran animales tratados con HAL durante la lactancia y evaluados con el TEC en distintos períodos desde la adolescencia hasta la adultez temprana. Notablemente, el tratamiento con HAL produjo *a posteriori* alteraciones comportamentales en la respuesta motora en el TEC en forma dependiente del período seleccionado para realizar el entrenamiento. Mientras el testeo en P40-47 demostró una clara hiperactividad en el grupo tratado con HAL, en animales con el mismo tratamiento farmacológico la evaluación en P30-37 no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control correspondiente.

Por último, en la Fig. 15 se presentan animales que fueron tratados durante la gestación con HAL en distintos períodos: uno que abarca la etapa de máxima sensibilidad para la inducción de

neuroteratología motora, G5-18 y otro que es insensible a estas consecuencias, G5-11 (Rosengarten & Friedhoff, 1979). Mientras el tratamiento prenatal en el primer período gestacional indujo hipoactividad en la respuesta motora en el TEC realizado en P75-82 (al igual que la observada en otros experimentos), el grupo que fue expuesto a HAL sólo en la primera mitad de la gestación respondió en el TEC en forma similar al grupo control C (para el efecto principal, $F(2,19) = 17.5$, $p < 0.0001$).

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 2

4.3.2.2. EXP. HAL/HAL

En acuerdo con trabajos previos de nuestro laboratorio (Brusés et al., 1991, 1993), el grupo HAL/S tuvo una menor respuesta motora en el TEC realizado en P30-37.

Como puede observarse en las Fig. 16.A-B, mientras el tratamiento con HAL durante la lactancia (grupo HAL) no indujo diferencias en la respuesta motora en el TEC realizado a esta edad respecto al grupo control C, ese mismo tratamiento farmacológico postnatal revirtió totalmente en el grupo HAL/HAL la hipoactividad motora inducida por medio de la exposición a HAL *in utero*. La linealización de los datos permitió confirmar lo antedicho en términos de V_m (Fig. 17.A-B).

No se detectaron en los registros de velocidad por sesión ni en los procesamientos estadísticos diferencias entre machos y hembras ya sea para neuroteratología motora inducida o el éxito en la corrección funcional. Cuando el análisis estadístico incluyó el factor SEXO se confirmó lo antedicho.

Se analizaron fracciones mitocondriales de membranas por ensayo de binding competitivo al radioligando (3H)SPI en NE y CER a partir de animales machos provenientes de los distintos grupos experimentales. Como puede observarse en la Fig. 18, la única diferencia con significación estadística se relacionó a un aumento del 19% ($p < 0.05$) en la densidad de sitios de binding en el grupo S/HAL con respecto al control C.

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 3

4.3.2.3. EXP. DFH/DFH

Estudios previos habían demostrado que ya sea la administración de DFH pre- o postnatal, este anticonvulsivante induce aumentos persistentes en la respuesta motora en el TEC realizado en P40-47 (Fig. 19. A-B). No se detectaron durante el TEC diferencias entre hembras y machos en la sensibilidad a la DFH.

En acuerdo con lo antedicho, en la estrategia terapéutica donde se usó este fármaco como neuroteratógeno y como agente corrector, se detectaron diferencias de todos los grupos tratados respecto al control. Los efectos motores de la exposición postnatal a DFH fueron parcialmente aditivos a los producidos por la exposición prenatal (Fig.20.A-B). Se puede observar que, testeando con el TEC entre P40-47, la administración postnatal de DFH no sólo no revirtió el grado de hiperactividad motora inducido por la exposición prenatal a DFH, sino que en algunos casos la potenció levemente. En el grupo DFH/DFH estuvieron los animales que tuvieron mayores registros de V en las últimas sesiones y fue notable que ya entre las sesiones S₂₋₃ algunos alcanzaron la respuesta máxima que los controles alcanzaban recién en S₅₋₆.

Sin embargo, dado que no hubo diferencias significativas entre el grupo DFH/DFH y el DFH/S, puede decirse que la exposición a DFH en ambos períodos perinatales no produce ni aditividad ni sinergismo, por lo menos en cuanto a la respuesta motora en el TEC en el largo plazo post-tratamiento. Las linealizaciones de las curvas de V vs S confirmaron el aumento de la respuesta motora de todos los grupos tratados respecto al control, aunque no se observaron diferencias significativas entre los valores de L (Fig. 21. A-B).

Por dos formas distintas de registro del error (ver procedimientos en pág. 59-60) se encontraron diferencias significativas entre los grupos DFH/S o S/DFH vs C, en la sesión S₁ y en el total de errores acumulado (S₁₊₃₊₇). En las Fig. 22.A-B, se puede apreciar que mientras los grupos tratados con DFH en uno u otro período perinatal cometían mayor cantidad de errores en la elección del sentido de giro en el TEC, el grupo tratado en **ambos períodos** no presentó diferencias significativas con los errores del grupo C. Cuando los animales (sólo machos) fueron

sometidos al TEC por segunda vez en P180-185, con un sentido de giro recompensado contrario al de los testeos anteriores, se reprodujeron las diferencias en la actividad motora y la habilidad espacial vistas en el primer TEC realizado entre P40-47 (ver Fig. 23.A-B, para datos motores y espaciales, respectivamente).

4.3.3. MODULACION DE LA PLASTICIDAD ESTRIATAL

MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

MODIFICACION DEL PERIODO CRITICO DE SENSIBILIDAD MUSCARINICA ESTRIATAL DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD FISIOLOGICA INDUCIDA

4.3.3.1. EXP. NGF 1

Luego de los procedimientos quirúrgicos de implante de cánulas y minibombas todas las ratas se recuperaron totalmente en el término de 6-12 hs (ver pasos de cirugía en pág. 86-87).

Como controles positivos o negativos para la respuesta plástica muscarínica inducida por el TEC se designaron grupos de ratas preadolescentes que fueron entrenadas *durante* o después del PCE, (grupos E₃₀ y E₄₀, respectivamente). Las ratas fueron evaluadas en el TEC realizado a partir de P30 o P40 (ver protocolo en pág. 88).

Por medio de comparaciones por pares incluyendo todos los grupos experimentales (operados y los no operados E₃₀ y E₄₀), ninguna diferencia estadística significativa en los registros de V pudo ser detectada por análisis de ANOVA ($F(7,38)= 1.21, p=0.32$). Además, luego de comparar grupos operados (Fig. 2 .B) vs los no operados E₃₀ y E₄₀ ningún cambio en V tuvo significación estadística ($F(1,44)= 2.36, p=0.13$) (ver Fig. 25.A).

Por otra parte, para todos los grupos operados y no operados el análisis de ANCOVA de las linealizaciones de los registros motores no mostró diferencias significativas ni en la Vm ni en la

pendiente (Fig. 25.B). Tampoco se detectaron diferencias en el análisis del error en la elección del sentido de giro (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta que todos los animales corrieron aproximadamente la misma distancia total a través de las siete sesiones de entrenamiento en el TEC (900 m), es posible considerar que la actividad motora circular no fue afectada por el estrés involucrado en los procedimientos quirúrgicos o los tratamientos farmacológicos.

En todos los casos los animales no entrenados respectivos de cada grupo operado durante las sesiones exploraron el camino circular del aparato de TEC pero ninguno alcanzó más de 10 vueltas por sesión (datos no mostrados).

La Fig. 26 muestra el binding de (^3H)QNB a membranas plasmáticas estriatales a partir de ratas adultas jóvenes (P70) que fueron entrenadas comenzando en P30 o P40 (grupos E₃₀ y E₄₀). Al momento del sacrificio de estos animales no operados se pudo detectar un efecto persistente del entrenamiento *per se* sobre los sitios estriatales de binding a (^3H)QNB sólo en el grupo E₃₀ (MANOVA para animales no operados, Exp.1: $R(6,38)=5.63$, $p<0.0003$). El testeo *post hoc* de Scheffé resultó en caídas significativas del 32% ($p<0.001$) y 28% ($p<0.008$) en los sitios de binding a (^3H)QNB en las hemipartes estriatales NEI y NED, respectivamente, con respecto a los animales controles de entrenamiento (C₃₀ y C₄₀).

En la Fig. 27, se presentan los resultados de la determinación de sitios de binding a (^3H)QNB en ratas sacrificadas en P70 correspondientes a todos los grupos operados y/o perfundidos que fueron previamente entrenados a partir de P40. En el panel C de esta figura también se muestran los datos de los grupos controles (SH_C, CC_C, NGF_C) de entrenamiento de los grupos operados en el Exp.2 donde se aplicó la dosis más alta de NGF o CC.

Los datos derivados de los Exp. 2 y 3 (tasas de perfusión: 1,4 y 0,4 $\mu\text{g}/\text{d}$, respectivamente) son presentados separadamente. Dado que en todas las comparaciones por pares entre los grupos sham (grupos SH y sh) y los controles de tratamiento farmacológico (grupos CC y cc) no se detectó ninguna diferencia significativa en los resultados del binding a (^3H)QNB, los efectos

inducidos por NGF son analizados estadísticamente comparando los grupos perfundidos con NGF (grupos NGF y ngf) con los perfundidos con CC (CC y cc), respectivamente.

Las fracciones de membranas de los estriados canulados de ratas entrenadas previamente tratadas con NGF por dos semanas (incluyendo el PCE), mostraron una disminución de los sitios de binding específico a (^3H)QNB del 42% (Fig.27.A, 1,4 μg NGF/d, $p < 0.0004$) o 33% (Fig. 27.B, 0,4 μg NGF/d, $p < 0.02$). Los hemiestriados no canulados (NEDs) de los grupos operados fueron estudiados como controles internos individuales para parearlos con los NEIs canulados en los procesamientos estadísticos. Sólo en el grupo tratado con la dosis más alta de NGF se produjo una caída significativa (-44%, $p < 2 \cdot 10^{-5}$) de sitios aparentes mAChRs en el lado derecho.

Para detectar posibles efectos del NGF sobre el sistema muscarínico estriatal no dependientes de actividad funcional, los NEs de los animales no entrenados perfundidos con la dosis mas alta de NGF o CC (Exp.2) fueron evaluados en ensayo de binding a (^3H)QNB, y los resultados son presentados en el panel C de Fig.27). Sólo alcanzó a detectarse un suave aumento no significativo del 15% en los sitios de binding del NEI del grupo NGF_C con respecto al grupo CC_C.

Dado que poseíamos animales entrenados y no entrenados en el Exp. 2 se realizó un análisis estadístico adicional sobre los datos de este experimento. Una MANOVA de dos factores (1.TRATAMIENTO, 2. CONDICION EN EL TEC) sobre estos datos mostró que había relativamente baja significación estadística cuando el efecto principal era el Tratamiento ($R(4,38) = 3.85$, $p < 0.01$) o la Condición en el TEC ($R(2,19) = 3.24$, $p < 0.06$), pero la significación estadística fue potenciada cuando se evaluó el efecto de la interacción de los factores ($R(4,38) = 6.93$, $p < 0.0003$).

4.3.3.2. EXP. NGF 2

Por medio de comparaciones por pares, ninguna diferencia estadística significativa pudo ser detectada en la repuesta motora en el TEC de los distintos grupos experimentales a través de análisis de ANOVA ($F(2,15) = 0.31$, $p = 0.74$) (datos en Fig. 28.A). Los registros de V por sesión estuvieron dentro del rango histórico para animales controles cuando son entrenados en el período P30-37 (Brusés et al., 1991; ver también Fig.1 de esta tesis). Por otra parte, para todos los grupos el análisis de ANCOVA de para obtener Vm y L a partir de los registros motores no

mostró diferencias significativas en ninguno de los dos parámetros (Fig. 28.B; ANCOVA, $F(2,17)=0.56$, $p=0.58$). De este modo, así como en el Exp. NGF 1, la actividad circular no fue afectada por los procedimientos realizados sobre sobre los animales.

Los animales controles de entrenamiento demostraron la misma actividad de exploración dentro del aparato de TEC que en el experimento anterior (datos no mostrados).

La Fig. 29 muestra el binding de (^3H)QNB a membranas plasmáticas estriatales a partir de todas las ratas de 70 días de edad que fueron previamente entrenadas comenzando el testeó a partir de P30. Este estudio neuroquímico permitió detectar una respuesta diferencial en los sitios aparentes mAChRs estriatales al entrenamiento en el PCE del grupo NGF_E con respecto a los dos controles entrenados, SH_E y CC_E (Efecto Grupo, $R(4,46)=7.38$, $p<0.0002$, Efecto Interacción, $R(4,46)=2.50$, $p=0.43$). Mientras en estos grupos controles entrenados hubo una caída en los sitios de binding a (^3H)QNB en ambos hemiestriados [como promedio de los cambios en NEI y NED del 24% ($p<0.05$) y 22% ($p<0.03$), respectivamente], en el grupo tratado con NGF no se detectaron diferencias significativas entre los animales entrenados y no entrenados (Δ promedio= -13%).

Dado que en todos los análisis los grupos controles SH y CC no demostraron diferencias significativas entre sí, los efectos neuroquímicos provocados por NGF son analizados para cada hemiestriado comparando los grupos perfundidos con NGF (NGF_E y NGF_C) a los tratados con CC (CC_E y CC_C).

Aquí también se consideró al estriado no canulado, NED, como un control biológico interno del efecto de NGF sobre los cambios plásticos inducidos por la actividad desarrollada en el TEC en el PCE. La densidad de sitios de binding en el NED de los animales tratados con NGF y entrenados (grupo NGF_E) fue más baja que en el NEI ($\Delta=-19\%$), pero esta diferencia tuvo significación estadística mayor a 0.05 ($p=0.07$). Sin embargo, cuando se comparó NEI de los animales entrenados tratados con NGF con los NEI de los controles respectivos CC_E, la diferencia se mostró acentuada (-23%, $p<0.02$), sugiriendo una atenuación total de la caída de sitios (^3H)QNB en el NEI (y una parcial en el NED) de los animales del grupo NGF_E.

EXP. ONTOGENESIS

Los distintos grupos experimentales fueron sometidos al testeo en el TEC en distintos períodos del desarrollo postnatal. Las condiciones del testeo fueron las mismas para todos los grupos.

P=día postnatal

FIGURA 1 A. RESPUESTA MOTORA EN EL TEC

Para el efecto principal **EDAD DE TESTEO**, $F(3,69)=6.4$, $p<0.001$.

A posteriori Tukey HSD-Spjøtvoll-Stoline reveló diferencias crecientes entre el grupo T21 y los demás a medida que aumentaba la edad de testeo

$p<0.050$, T21 vs T30

$p<0.020$, T21 vs T40

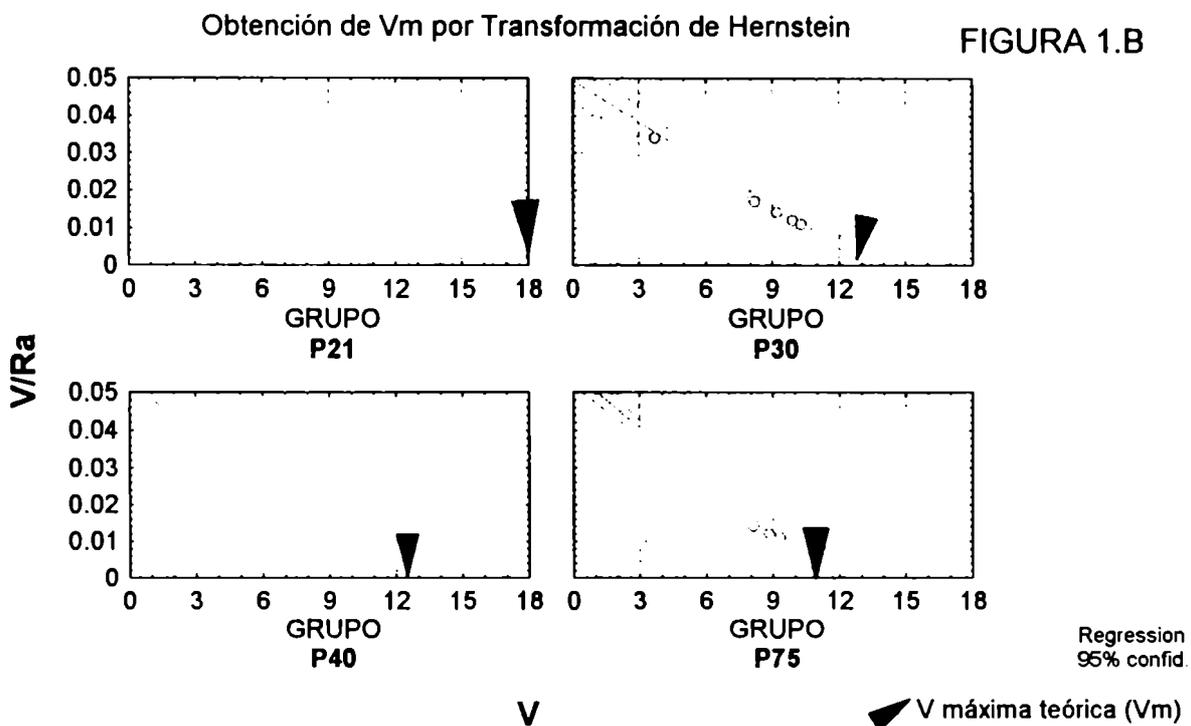
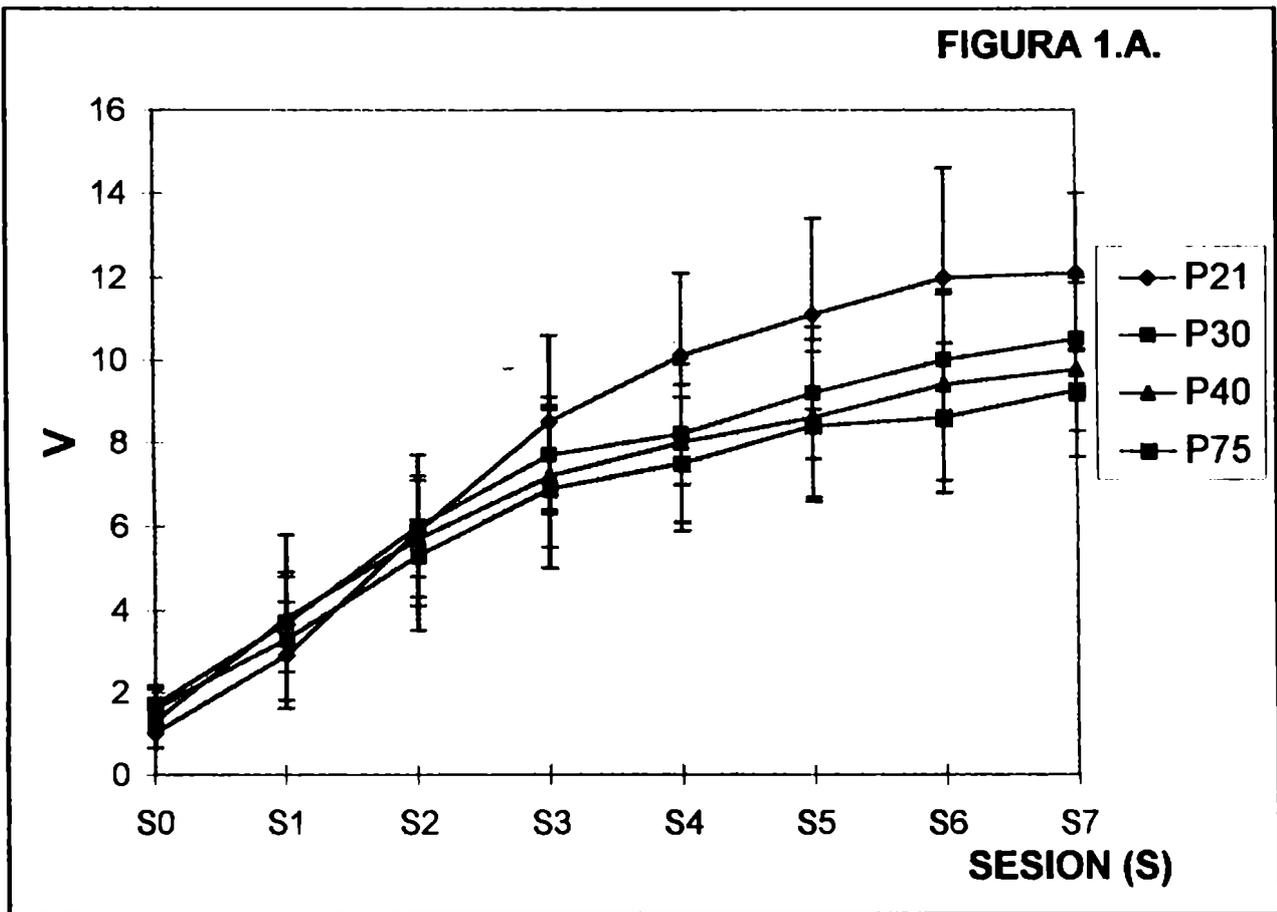
$p<0.003$, T21 vs T75

B. OBTENCIÓN DE V_m

Ajuste de los datos del Gráfico A a linealidad a través de la transformación matemática de Hernstein para condicionamientos comportamentales con refuerzo continuo. El procedimiento es análogo a la transformación de Scatchard. Los datos obtenidos en las sesiones S_1 - S_7 del TEC son expresados como una relación entre la velocidad (V) y refuerzos acumulados (R_a), y correlacionados con la velocidad de cada sesión. La extrapolación de cada función lineal al eje x representa la velocidad máxima teórica (V_m), la cual es indicada en el gráfico por medio de una flecha. La inversa de la pendiente (L) correspondiente a cada grupo experimental representa la cantidad de refuerzos acumulados necesarios para alcanzar la mitad de la V_m .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANCOVA DE 1 FACTOR, 1. **EDAD DE TESTEO**, con V como variable dependiente y V/R_a como variable covariante a través de las siete sesiones.

Efecto principal **EDAD DE TESTEO**, $F(3,23)= 12.5$, $p<0.0001$



Leyendas de gráficos

Tukey HSD para V_m : $p=0.12$, T21 vs T30

$p<0.030$, T21 vs T40

$p<0.004$, T21 vs T75

Para analizar la significación de las diferencias entre los valores de L se compararon las pendientes con el Test de Paralelismo: $F(3,20)=9.1$, $p<0.001$

FIGURA 2 RESPUESTA ESPACIAL EN EL TEC

Los animales fueron examinados en los errores en el sentido de giro durante las sesiones del TEC. Los valores son presentados como $X \pm DS$. Los errores espaciales de tipo I*, fueron analizados estadísticamente como los datos de la Fig. 1.A. Sólo se determinaron los errores I en los grupos T21, T30 y T40.

* Errores en la elección del sentido de giro, ver materiales y métodos para más detalles

Efecto principal **EDAD DE TESTEO**: $F(2,27)=18.3$, $p<0.0001$

A posteriori Tukey HSD-Spjtvol-Stoline: $p<0.002$, T21 vs T30

$p<0.0002$, T21 vs T40

$p = 0.20$, T30 vs T40

FIGURA 3 CORRELACION ENTRE RESPUESTA MOTORA Y ESPACIAL.

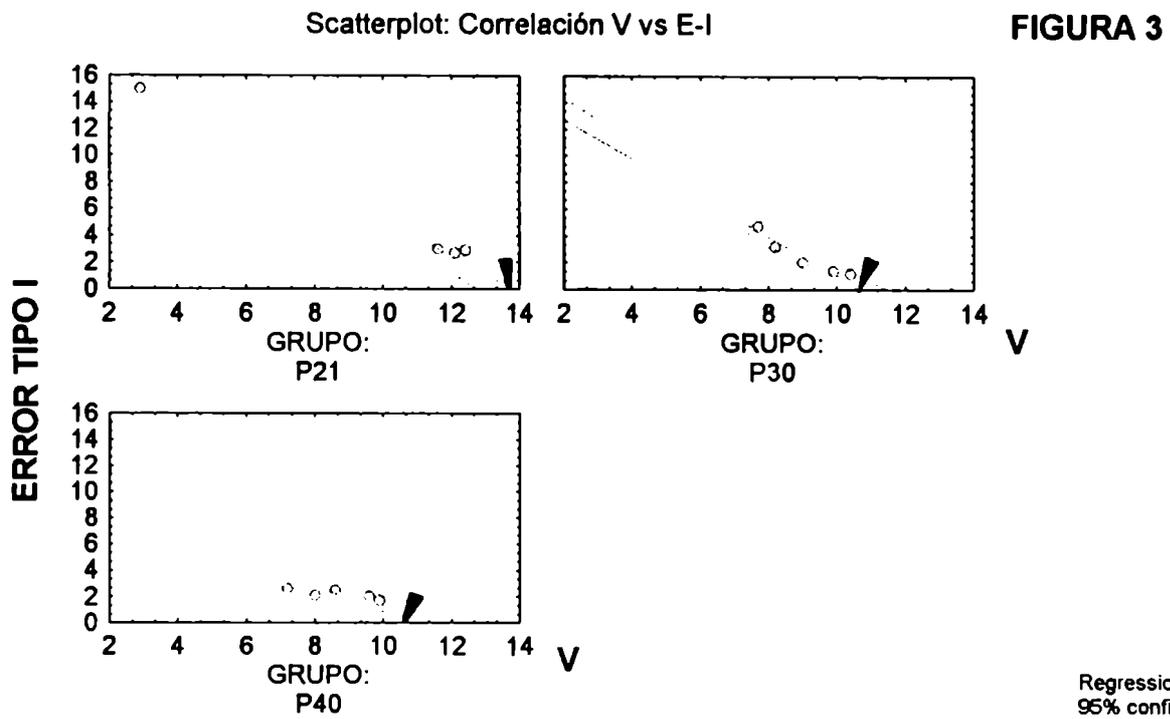
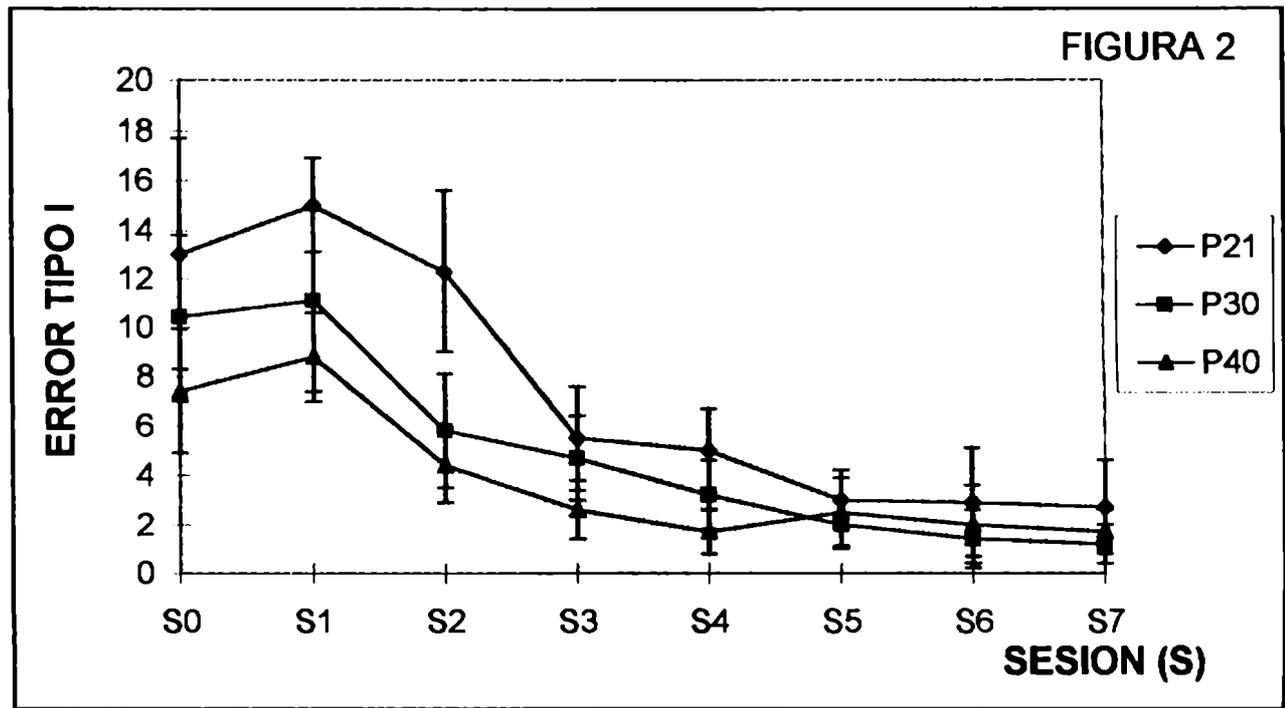
Los datos obtenidos en los grupos P21, P30 y P40 pudieron ser más ampliamente analizados realizando un estudio de correlación (ANCOVA) para determinar la posible presencia de covariación entre el aprendizaje motor y espacial.

Efecto principal **EDAD DE TESTEO**: $F(2,17)=37.1$, $p<0.00001$,

Coefficientes r P21, $r = -0.97$

P30, $r = -0.98$

P40, $r = -0.91$



EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLOGICOS SOBRE LA VIABILIDAD- MORTALIDAD DE LAS CAMADAS UTILIZADAS

FIGURA 4. EVOLUCIÓN DEL PESO DE LAS RATAS PREÑADAS DURANTE LOS TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

El gráfico reúne datos derivados de distintos lotes de animales donde se aplicaron las mismas condiciones experimentales. Posteriormente a la detección de esperma en una muestra de secreción vaginal obtenida por lavado con solución fisiológica estéril, las ratas fueron pesadas en los días gestacionales (G) que se indican en la abcisa de la figura.

Grupos experimentales de acuerdo a agente inyectado:

- C** (n=10) = solución fisiológica estéril, 1,0 ml/Kg/d, ip.
HAL (n=9) = solución haloperidol 2.5 mg/ml, 2,5 mg/Kg/d, ip.
DFH (n=6) = solución difenilhidantoína 25 mg/ml, 30 mg/Kg/d, sc.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO; 2. DÍA GESTACIONAL. *A posteriori* se aplicó el Test de Tukey HSD-Spjtvol-Stoline.

RESULTADOS ANOVA

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el análisis *a priori*.

$F(2,22) = 1.6, p = 0.22$.

A posteriori, el análisis del efecto del factor 1 no alcanzó significación estadística menor a 0.05 para las diferencias entre grupos.

$p = 0.72$, HAL vs C $p = 0.25$, DFH vs C $p = 0.59$, HAL vs DFH

FIGURA 5. MORTALIDAD NEONATAL

Para no estresar demasiado a las hembras luego del parto, el conteo de neonatos vivos y muertos se estimó primero desde el exterior de la jaula en el día P1. En el gráfico se presentan el número de crías totales, los animales encontrados muertos, y los desaparecidos respecto a la primera observación. Los resultados son expresados en $\text{media} \pm \text{DS}$ por cada camada. Los desaparecidos entre la primera y la segunda observación son considerados como comidos por la madre, luego que se presencié ese comportamiento anómalo en algunas oportunidades.

Grupos experimentales de acuerdo a agente inyectado:

C (n=11) = solución fisiológica estéril 1,0 ml/Kg/d, ip.

HAL (n=10) = solución de haloperidol 2,5 mg/Kg/d, ip.

DFH (n= 7) = solución difenilhidantoína 30 mg/Kg/d, sc.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: MANOVA DE 1 FACTOR, 1. **AGENTE INYECTADO**, con tres variables dependientes, **NEONATOS TOTALES**, **NEONATOS MUERTOS**, **NEONATOS COMIDOS**.

RESULTADOS DE MANOVA

EFEECTO 1. $R(6,46)=2.1$, $p=0.07$

A posteriori Tukey HSD-Spjøtvoll-Stoline.

	NEONATOS TOTALES	NEONATOS MUERTOS	NEONATOS COMIDOS
C vs HAL	p=0.65	p=0.92	p=0.97
C vs DFH	p=0.10	p=0.30	p<0.02
HAL vs DFH	p=0.22	p=0.17	p<0.03

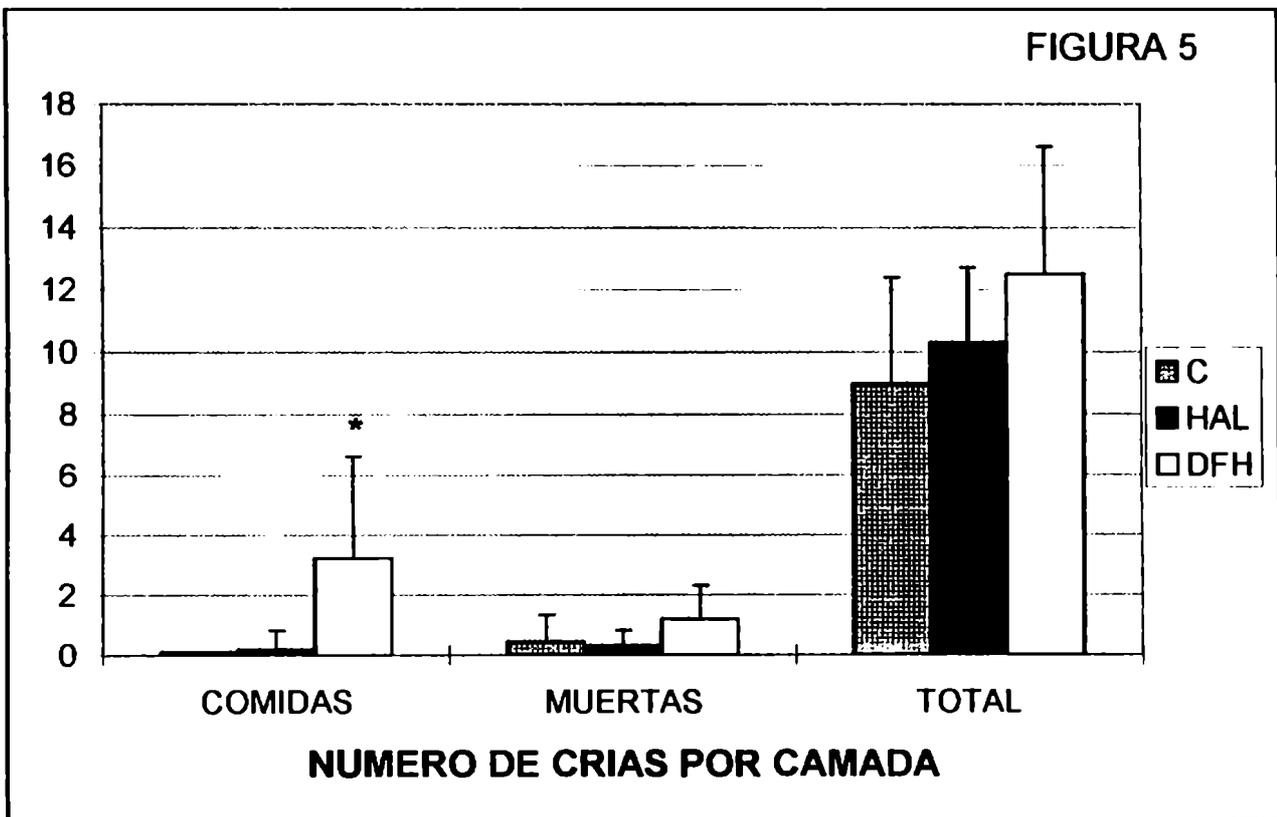
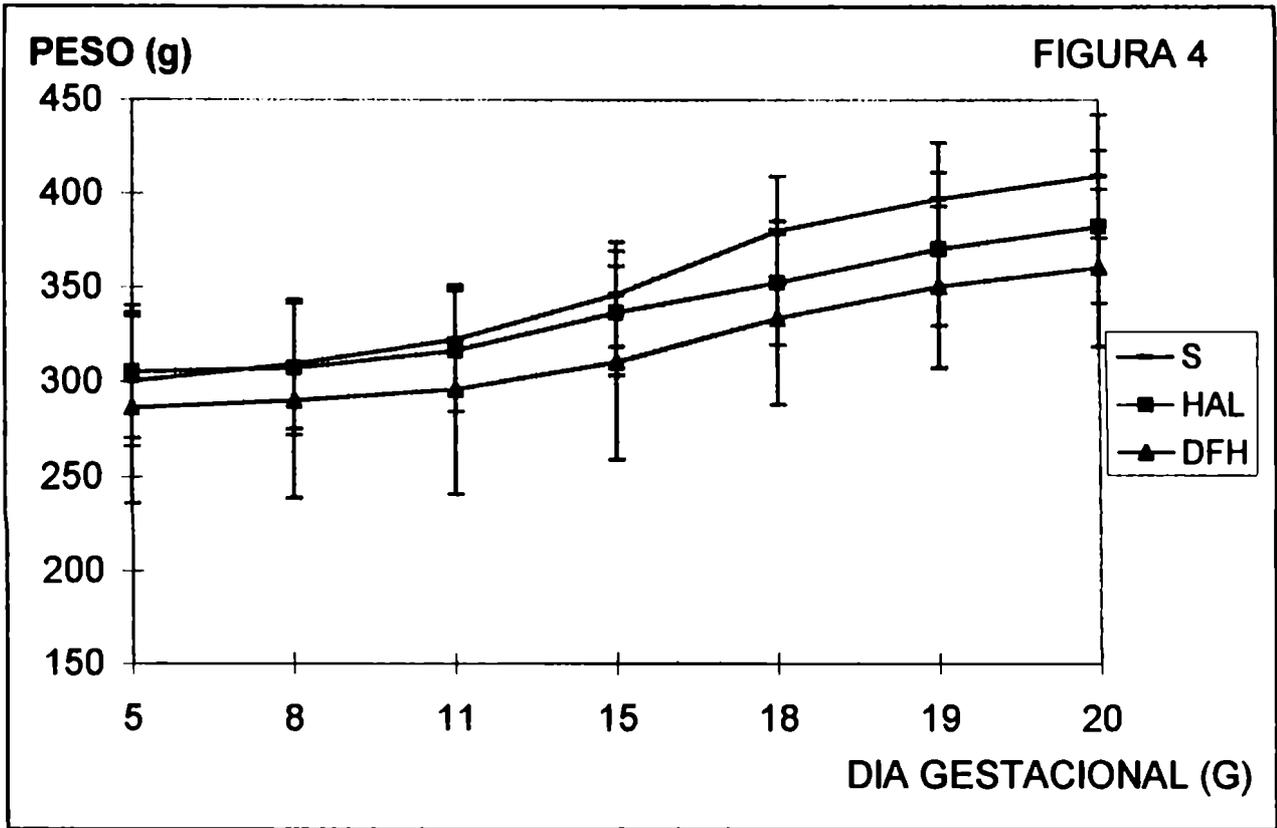


FIGURA 6.
EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA GANACIA DE PESO POSTNATAL

En los días indicados en la abcisa se pesaron los infantes en forma individual. Se presentan las medias± DS. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 3 FACTORES 1. TRATAMIENTO PRENATAL; 2. TRATAMIENTO POSTNATAL; 3. DÍA POSTNATAL.

A. EFECTO del HAL

RESULTADOS ANOVA

EFECTO PRINCIPAL 1: $F(1,66)= 15.40, p<0.0003$

EFECTO PRINCIPAL 2: $F(1,66)= 7.08, p<0.011$

INTERACCIÓN 1 X 2: $F(1,66)= 5.26, p<0.026$

A posteriori Tukey-Spjtvol-Stoline

S pre vs HAL pre, $p< 0.001$

C vs S/HAL, $p< 0.035$

C vs HAL/HAL, $p< 0.003$

C vs HAL/S, $p< 0.005$

B. EFECTO de la DFH

RESULTADOS ANOVA

EFECTO PRINCIPAL 1: $F(1,36)= 4.94, p<0.033$

EFECTO PRINCIPAL 2: $F(1,36)= 1.80, p=0.19$

INTERACCIÓN 1 X 2: $F(1,36)= 0.44, p=0.51$

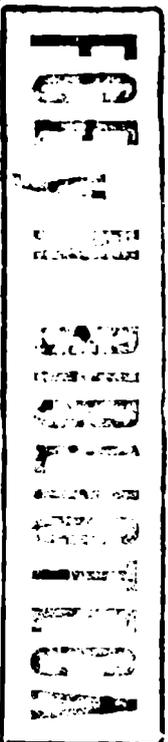
A posteriori Tukey-Spjtvol-Stoline

S pre vs DFH pre, $p<0.05$

S/S vs S/DFH, $p=0.44$

S/S vs DFH/S, $p=0.22$

S/S vs DFH/DFH, $p=0.12$



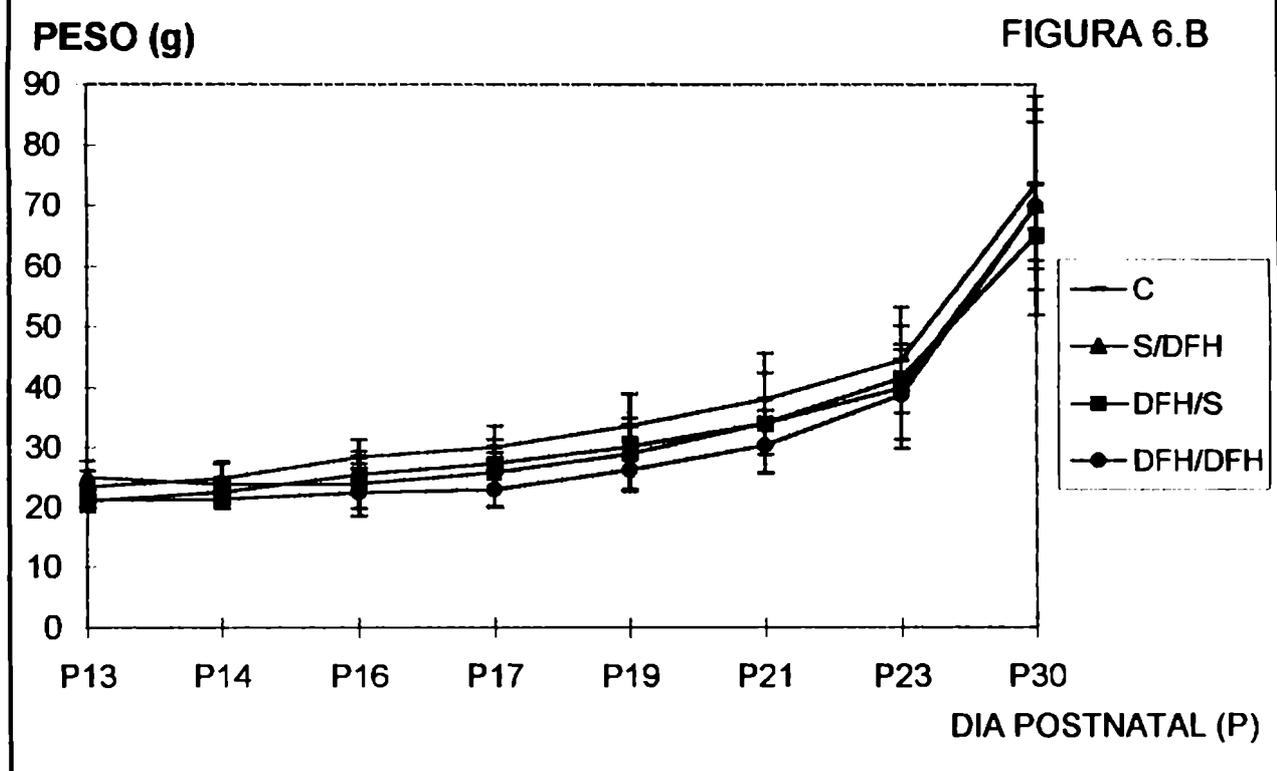
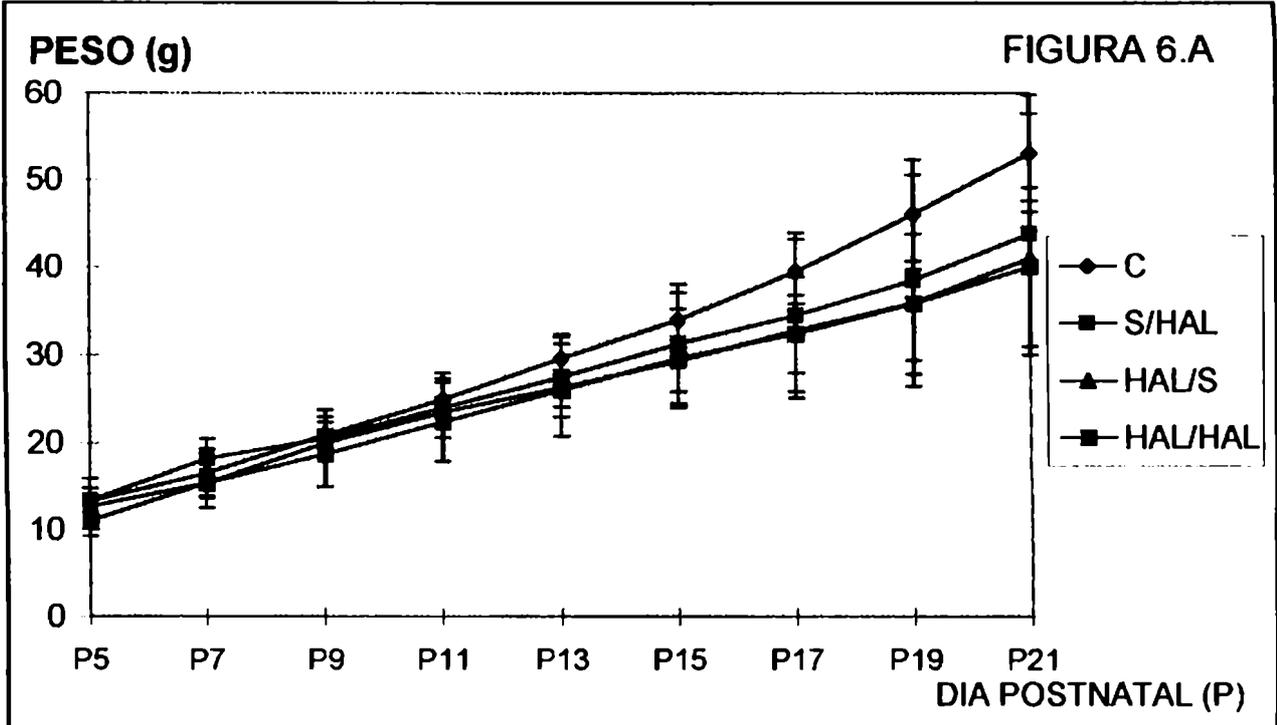


FIGURA 7.
EFFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE EL PESO DEL NUCLEO ESTRIADO

Las partes frontales de los hemiestriados izquierdo y derecho (NEI y NED) fueron disectadas y pesadas el día del sacrificio de los animales (P90). Los datos provienen del Exp.HAL/HAL presentado en esta tesis y de pruebas piloto donde se aplicaron las mismas condiciones experimentales.

Grupos experimentales:

1. C (n=21), animales expuestos a SF estéril durante la gestación (1 ml/Kg/d, ip.) y la lactancia (10 µl/Kg/d, ip.); 2. HAL/S (n=37), expuesto a Haloperidol (2.5 mg/Kg/d, ip.) durante la gestación y SF estéril durante la lactancia; 3. S/HAL (n=21), expuesto a Haloperidol (1.5 mg/Kg/d, ip.) durante la lactancia y SF estéril durante la gestación; 4. HAL/HAL (n=25), expuesto a Haloperidol durante ambos periodos de desarrollo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: MANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO PRENATAL, 2. TRATAMIENTO POSTNATAL, con 3 variables dependientes, NEI y NED y CEREBELO (CER).

RESULTADOS MANOVA

A posteriori Test de Tukey-Spjøtvoll-Stoline

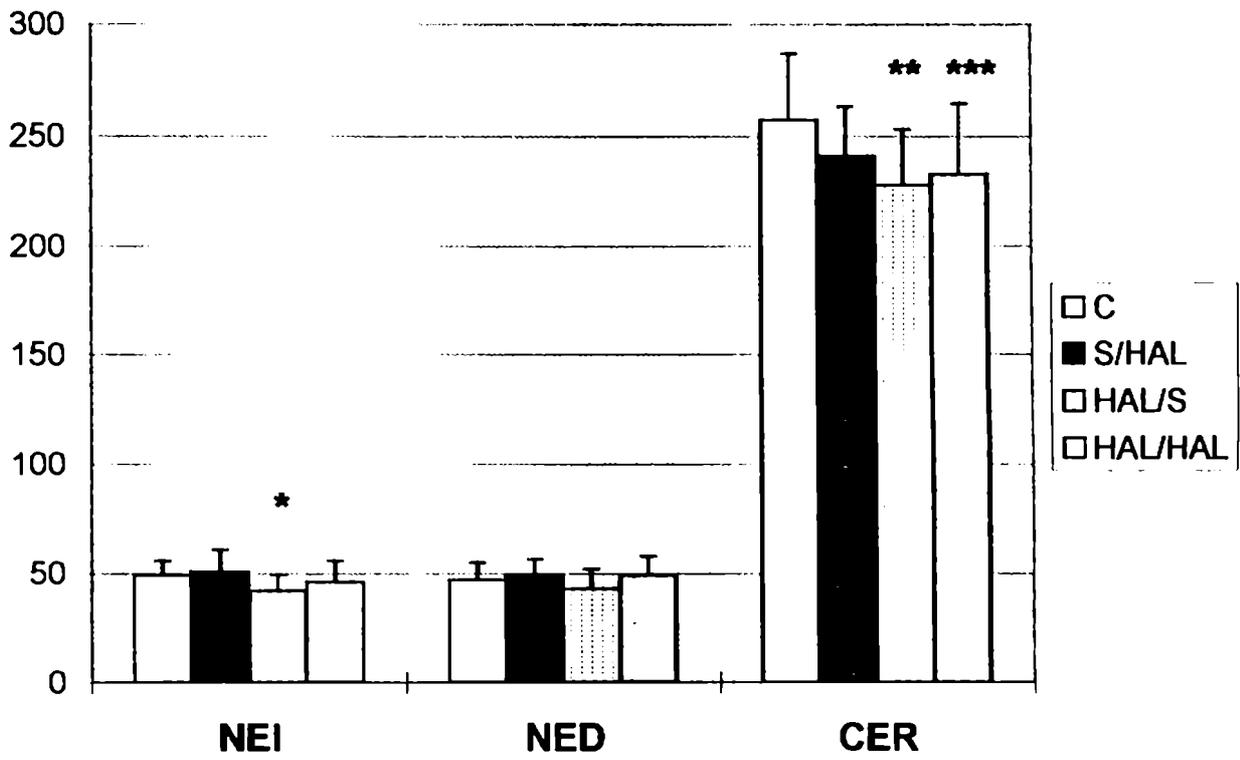
EFFECTO 1.	R(1,98)= 7.38, p<0.0002	EFFECTO 1	EFFECTO 2
EFFECTO 2.	R(1,98)= 2.57, p=0.080	para NEI p<0.030	p=0.055
INTERACCIÓN 1 x 2:	R(1,98)= 1.29, p=0.28	para NED p= 0.07	p<0.02
		para CER p<0.030	p=0.34

INTERACCIÓN 1 x 2

C vs	S/HAL	HAL/S	HAL/HAL
para NEI	p=0.83	p<0.05	p=0.12
para NED	p=0.66	p=0.67	p=0.74
para CER	p=0.28	p<0.01	p<0.03

PESO (mg)

FIGURA 7



EFFECTO DE LA DEPRIVACION AMBIENTAL SOBRE LA RESPUESTA MOTORA

El grupo deprivado (DEP, n= 10 machos) fue aislado de contacto físico y social entre P25 y P39 por medio de la cría en jaulas individuales, introducidas a su vez en cámaras de poliestireno (ver diseño en Materiales y Métodos). En la mañana del día P40 los individuos aislados fueron reintegrados a jaulas grupales de cría standard. El TEC fue realizado en el periodo P40-47. El grupo control C (n= 10 machos) recibió los tratamientos normales de cría, 3 a 4 individuos por jaula de 9 dm³.

FIGURA 8. A. RESPUESTA MOTORA EN EL TEC

Los animales deprivados (grupo DEP) no presentaron diferencias significativas en V por sesión con el grupo control (C).

RESULTADO ANOVA

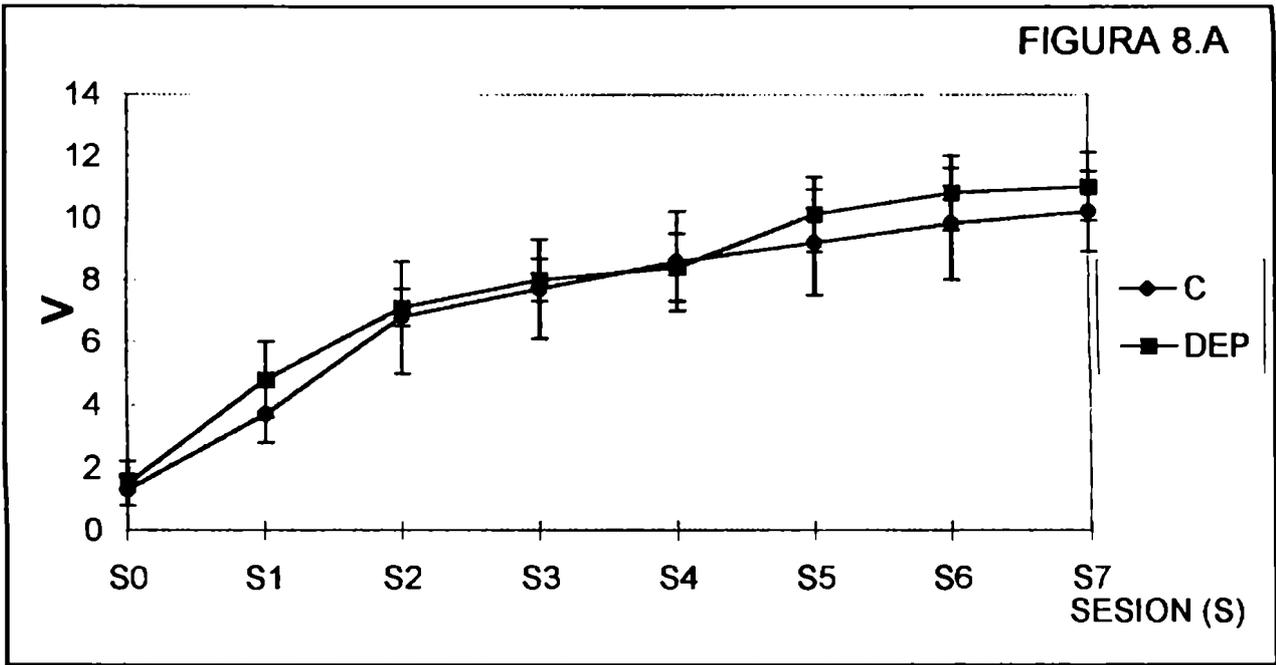
EFFECTO CONDICIÓN AMBIENTAL: $F(1,18)=2.0$, $p=0.18$.

INTERACCIÓN CONDICIÓN AMBIENTAL x SESIÓN: $F(6,108)=0.93$, $p=0.48$.

A posteriori Tukey HSD

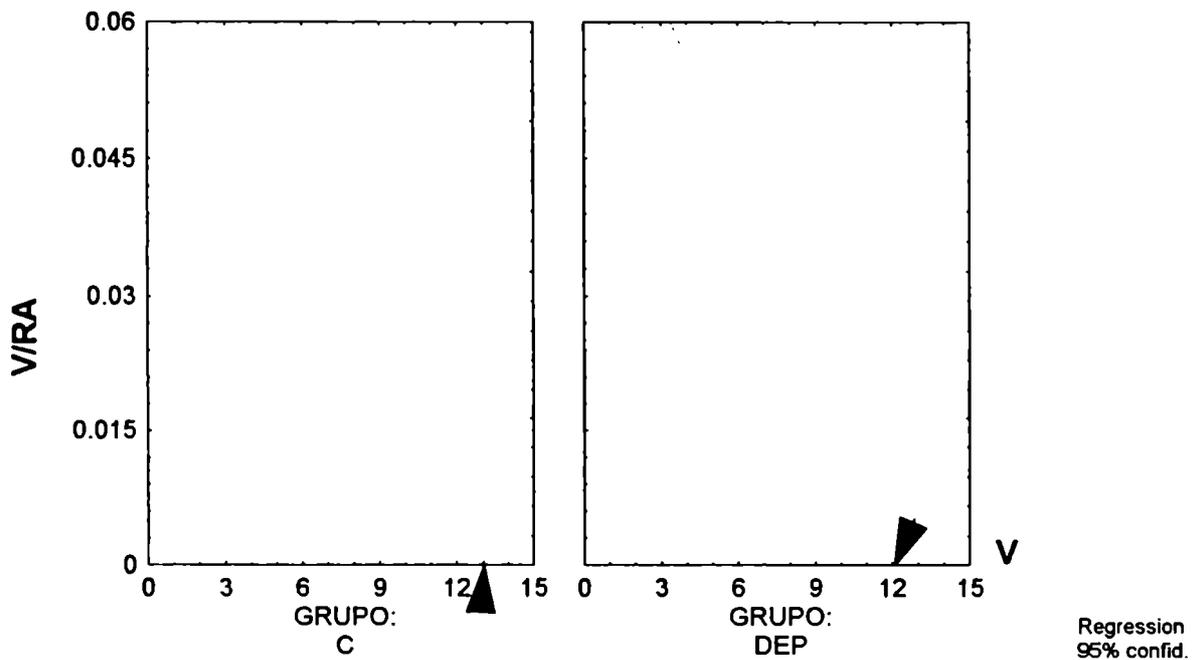
No se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Para la sesión S1, donde el grupo DEP tuvo la mayor diferencia de V, +33% sobre el valor de C, la significación estadística fue $p=0.10$. El análisis de ANCOVA de la linealización de las respuestas motoras tampoco mostró diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados).

FIGURA 8.A



Scatterplot: Transformación de Hernstein

FIGURA 8.B



ESTRATEGIA TERAPÉUTICA 1

MANIPULACION DEL AMBIENTE PARA REVERTIR NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL

68 neonatos fueron sometidos a distintos tratamientos farmacológico-ambientales (10 machos y 7 hembras en cada grupo experimental):

1. Tratados con SF estéril durante la lactancia y criados en forma estándar (control absoluto *C*)
2. Tratados con HAL durante la lactancia y criados en forma estándar (grupo *HAL*)
3. Tratados con SF durante la lactancia y luego deprivados (grupo *DEP*)
4. Tratados con HAL durante la lactancia y luego deprivados (grupo *HALDEP*).

Durante la lactancia los infantes fueron inyectados diariamente, ip., desde P5 a P21: grupos *C* y *DEP*, con 10 µl SF/g/d, grupos *HAL* y *HALDEP*, 1 mg HAL/kg/d. El período de deprivación fue P27-40. Los animales fueron testeados en el TEC durante en el período P40-47.

FIGURA 9. RESPUESTA MOTORA EN EL TEC

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: TEST DE ANOVA DE 3 FACTORES, 1. TRATAMIENTO FARMACOLOGICO; 2. CONDICIÓN AMBIENTAL; 3. SESIÓN

RESULTADOS ANOVA	HEMBRAS	MACHOS
EFECTO 1.	F(1,13)= 14.5, p<0.003	F(1,36)= 27.2, p<0.0001
EFECTO 2.	F(1,13)= 4.9, p<0.046	F(1,36)= 14.1, p<0.0007
INTERACCIÓN.	F(1,13)= 5.5, p<0.037	F(1,36)= 33.3, p<0.0001

A posteriori Tukey HSD

C vs HAL,	p=0.002	p=0.0002
C vs DEP,	p=0.99	p=0.49
C vs HADE,	p=0.69	p=0.73

FIGURA 9.A

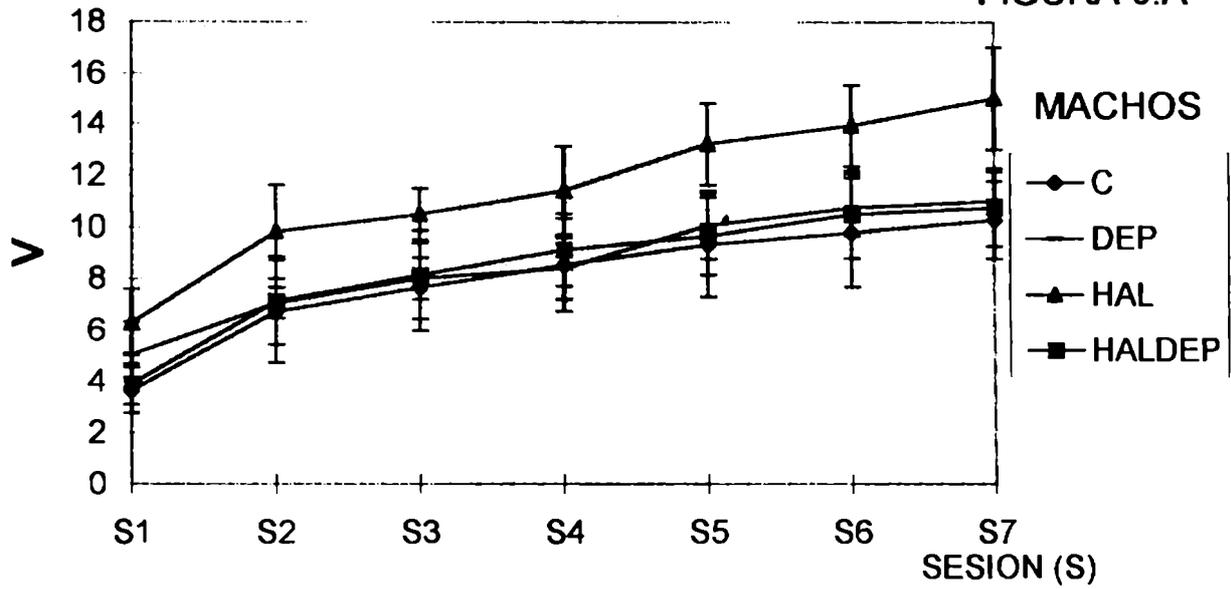


FIGURA 9.B

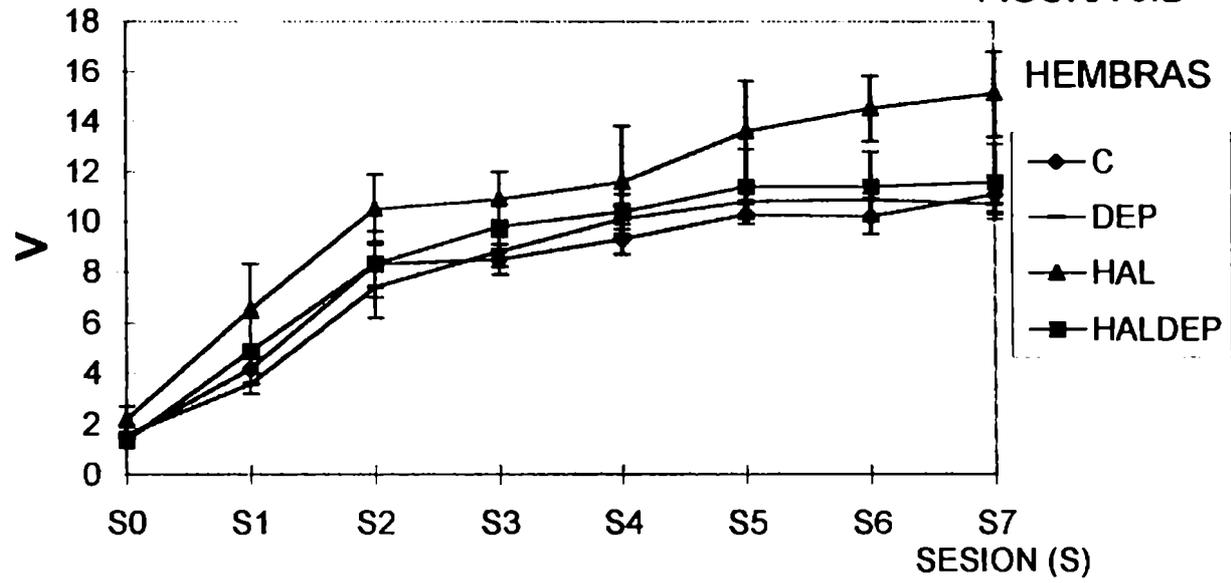


FIGURA 10. OBTENCIÓN DE V_m

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANCOVA DE 1 FACTOR, 1. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO y AMBIENTAL, con V como variable dependiente y V/Ra como variable covariante.

RESULTADO ANCOVA:	HEMBRAS	MACHOS
EFFECTO TRATAMIENTO	F(3,23)=23.9, p<0.00001	F(3,23)=50.0, p<0.00001
PENDIENTES (1/L) (Test de Paralelismo)	F(3,20)=0.72, p=0.55	F(3,20)=1.18, p=0.33
VELOC. MAX. TEÓRICA (V_{max}) (Test de Tukey)	C vs HAL, p<0.0004 C vs DEP, p=0.99 C vs HADE, p=0.45	p<0.0002 p=0.51 p=0.75

FIGURA 11. RESPUESTA ASOCIATIVA-ESPACIAL EN EL TEC

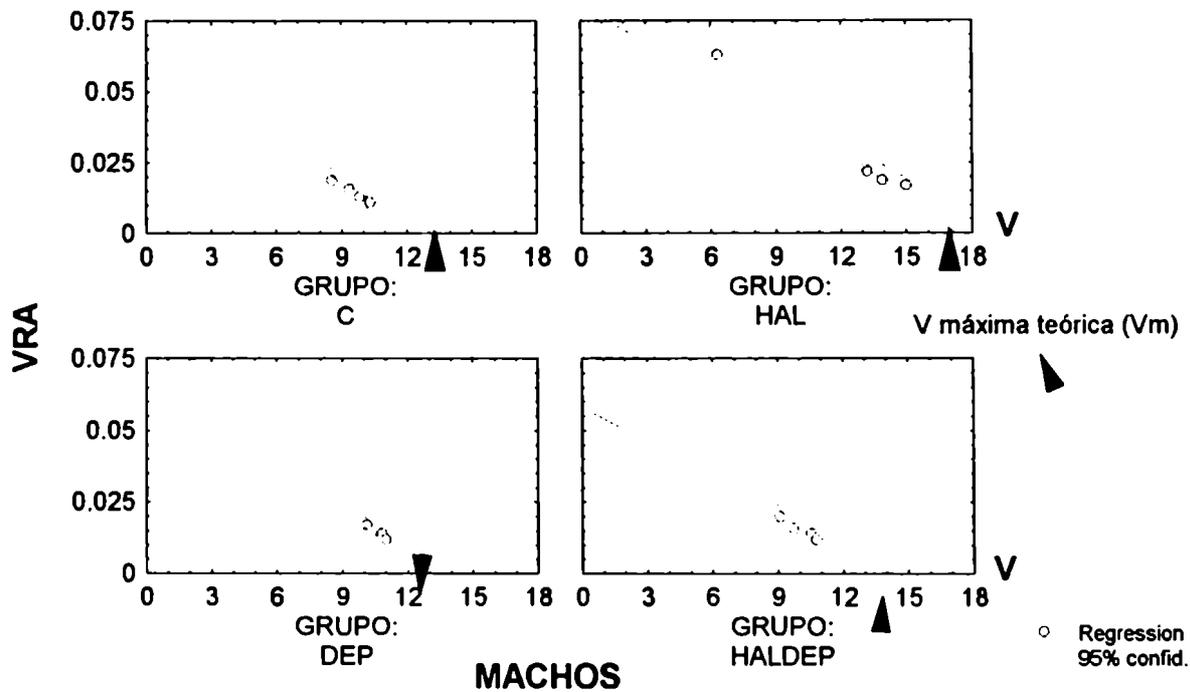
Los animales fueron estudiados en cuanto a su eficiencia en la adquisición de la consigna espacial inherente al testeo comportamental. Para ello fueron examinados en su desplazamiento circular durante los primeros 5 min de las sesiones S₁, S₃ y S₇ del TEC. Los valores son presentados como medias±DS. Sólo se presentan los datos correspondientes a machos.

El **panel I** principal muestra el número de **errores de tipo I por sesión: errores en la elección del sentido de giro**. Análisis estadístico como en Fig. 9.

RESULTADOS ANOVA	EFFECTO DROGA.	F(1,36)= 4.55, p<0.038
	EFFECTO AMBIENTE.	F(1,36)= 1.26, p=0.27
	INTERACCIÓN.	F(1,36)= 11.34, p<0.002
Tukey HSD	INTERACCIÓN. C vs HAL,	p<0.0025
	C vs DEP,	p=0.40
	C vs HADE,	p=0.89

Obtención de V_m por Transformación de Hemstein

FIGURA 10.A



Obtención de Vm por Transformación de Hemstein

FIGURA 10.B

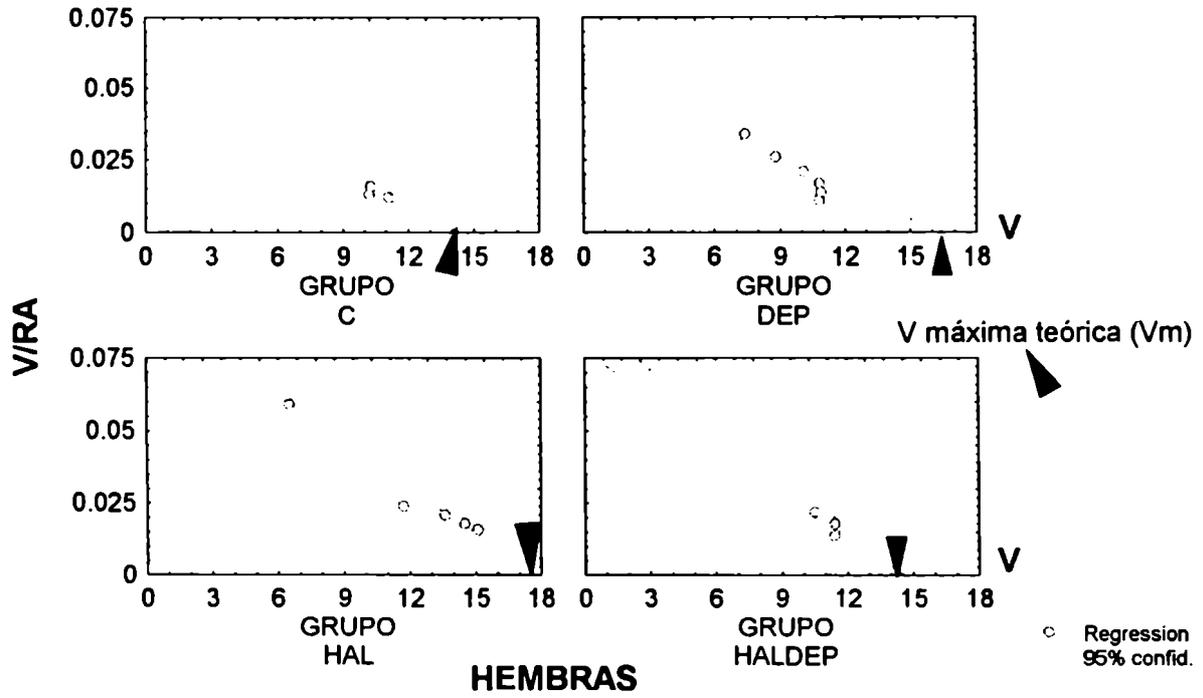


FIGURA 11.A

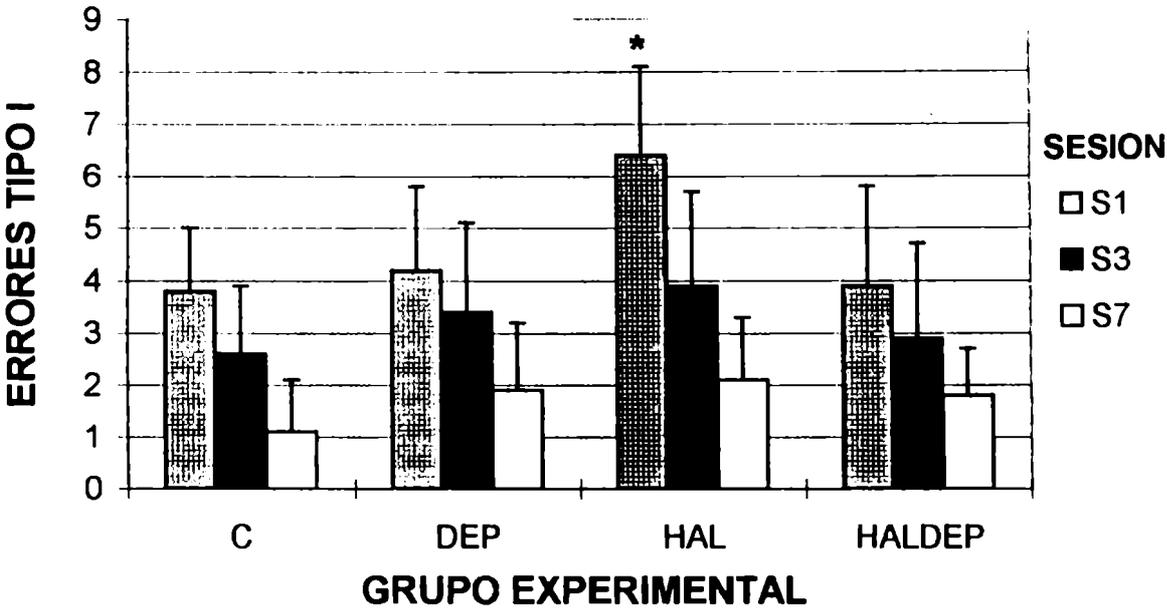
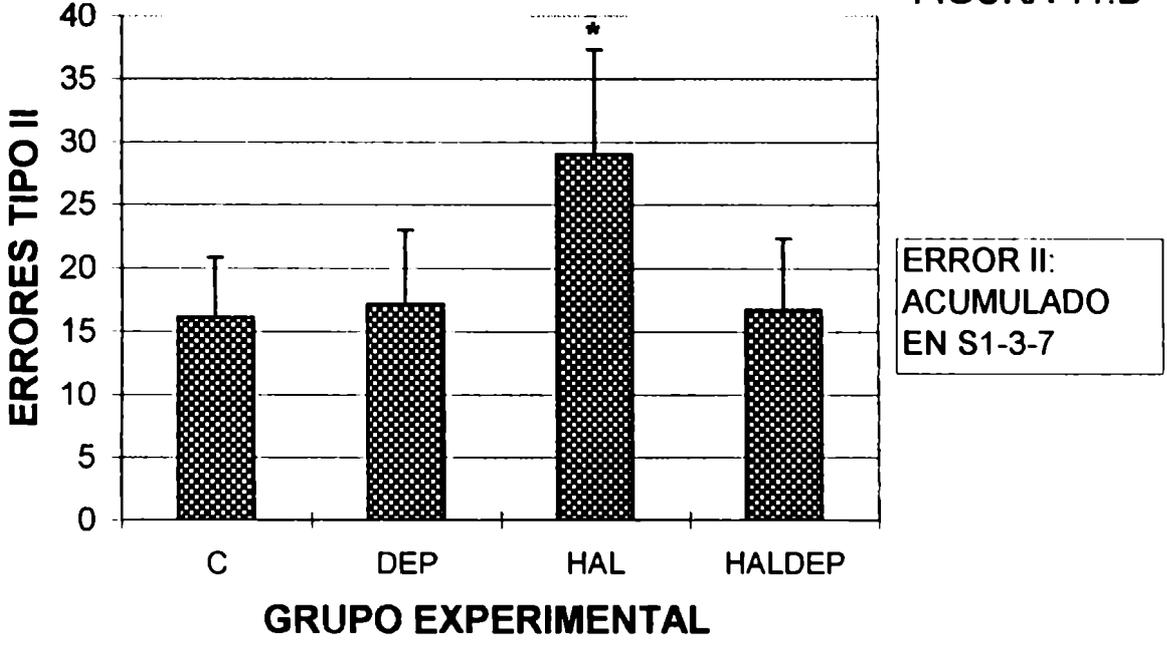


FIGURA 11.B



En el **panel II** se presentan los registros de **errores de tipo II**; cuartos de vuelta acumulados en sentido incorrecto, como un indicador de la *persistencia en el error*. Se presenta la suma de los registros de las 3 sesiones evaluadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO FARMACOLOGICO, 2. CONDICIÓN AMBIENTAL.

RESULTADOS ANOVA EFECTO 1. $F(1,36)= 9.75, p<0.004$

EFECTO 2. $F(1,36)= 7.96, p=0.009$

INTERACCIÓN 1 x 2. $F(1,36)= 11.1, p<0.002$

Tukey HSD INTERACCIÓN 1 x 2. C vs HAL, $p<0.0005$

FIGURA 12. ENSAYO DE BINDING AL RADIOLIGANDO (³H)-SPI

En P90 los animales fueron sacrificados y las porciones izquierda y derecha de los núcleos estriados agrupadas y los cerebelos (CER) fueron procesados para la determinación de sitios de binding al radioligando (³H)SPI en fracciones subcelulares ricas en membranas. Los datos son expresados en fmol de ligando/mg proteína de fracción de membranas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: MANOVA DE DOS FACTORES, 1. AGENTE INYECTADO, 2. CONDICIÓN AMBIENTAL, con 2 variables dependientes, NE y CER

RESULTADOS MANOVA EFECTO 1. $R(2,35)= 4.05, p<0.030$

EFECTO 2. $F(2,35)= 8.30, p<0.003$

INTERACCIÓN 1 x 2. $F(2,35)= 6.41, p<0.005$

Post Hoc Scheffé F-Test:

	NE	CER
EFECTO 1.,	$p<0.050$	$p<0.030$
EFECTO 2.,	$p<0.050$	$p<0.005$
INTERACCIÓN 1 x 2., C vs HAL,	$p<0.05$	$p<0.010$

FIGURA 12

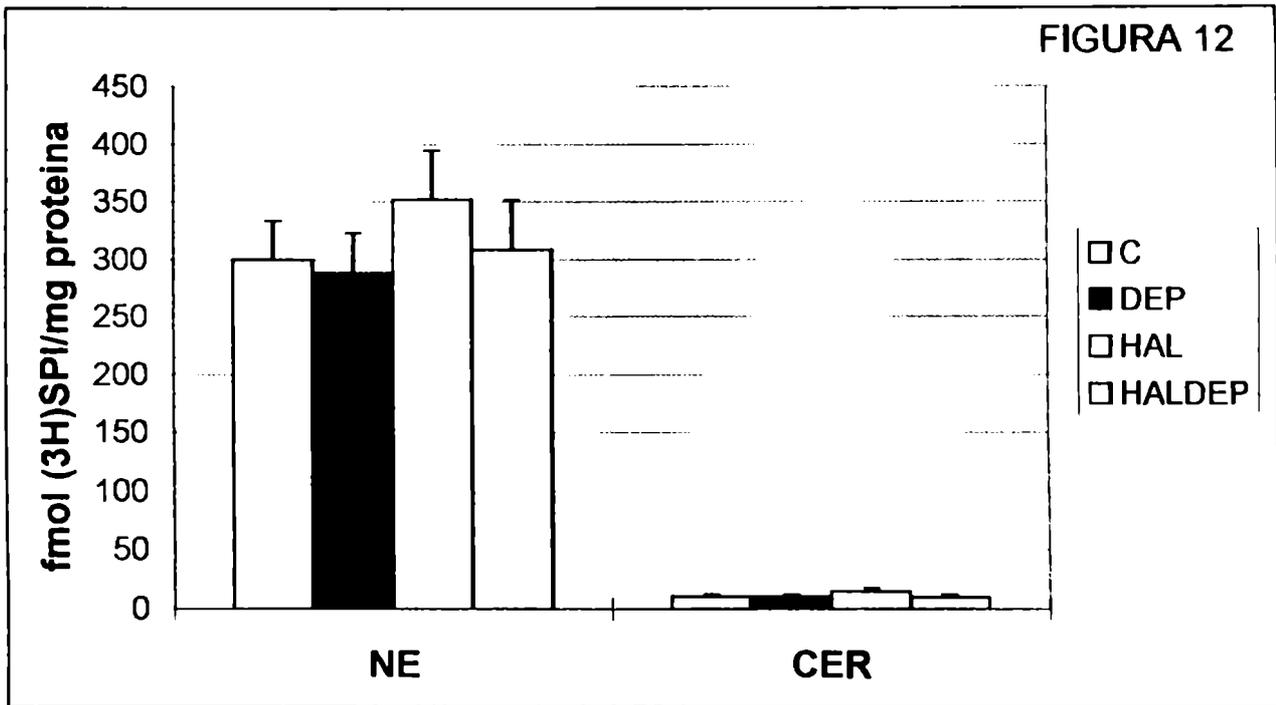


FIGURA 13. PERSISTENCIA DE LA NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL INDUCIDA CON HALOPERIDOL DURANTE LA GESTACIÓN

Parte de los animales tratados con SF (grupo control C) o HAL (2,5 mg/kg/día) durante la gestación (período G5-18) fueron evaluados en el TEC a las edades P30-37 (6 controles y 8 tratados) y la otra parte en P75-83 (6 controles y 5 tratados). Las figuras muestran las $X \pm DS$ de los grupos. Los grupos incluyeron machos y hembras. Los grupos son denominados de acuerdo a la edad de testeo: controles *C30* y *C75* y tratados *HAL30* y *HAL75*.

La **hipoactividad motora** en el TEC, inducida por exposición a HAL durante la gestación presenta alta significación estadística cuando los animales son entrenados en el período **P30-37** (grupo *HAL30* vs *C30*). Estas diferencias funcionales se atenuaron cuando el testeo fue realizado en **P75-83** (grupo *HAL75* vs *C75*). En el TRR nuevamente se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados con HAL y los controles (se evaluaron 6 animales representativos de los resultados del testeo previo en TEC para cada tratamiento).

A. EVALUACION EN EL TEC

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 2 FACTORES; 1. TRATAMIENTO, 2. SESIÓN

RESULTADO ANOVA:

Efecto principal TRATAMIENTO: $F(3,23) = 19.39, p < 0.00002$

***A posteriori* Tukey HSD-Spjøtvoll-Stoline:**

C30 vs HAL30, $p < 0.0002$

C75 vs HAL75, $p < 0.04$

B. COORDINACION MOTORA EN TRR

FIGURA 13.A

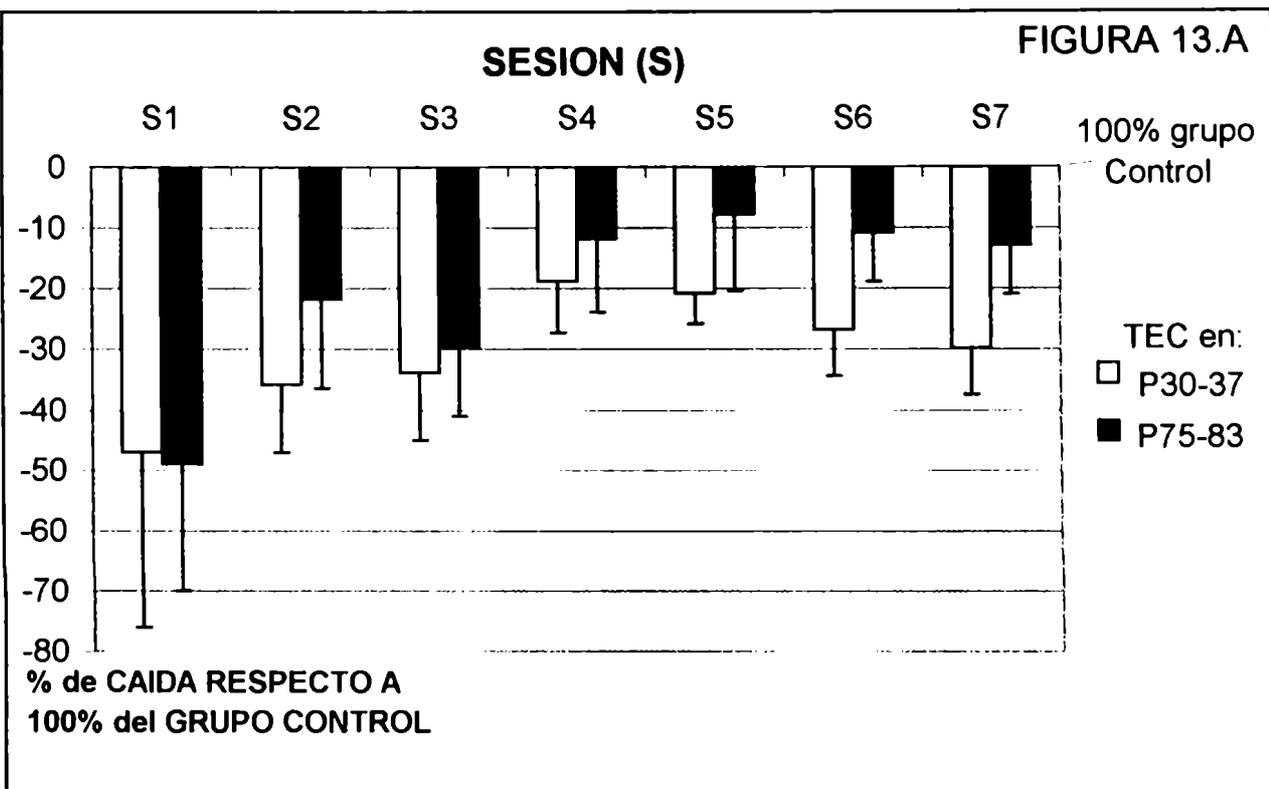


FIGURA 14. NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL INDUCIDA CON HAL DURANTE LA LACTANCIA: DEPENDENCIA DE LA EDAD DE TESTEO

La **hiperactividad motora** inducida por exposición a HAL (1,2 mg/Kg/d, ip., n=35) durante el período postnatal P5-21 sólo presentó significación estadística cuando los animales fueron entrenados en el período **P40-47** (grupo *HAL40*, n= 10 animales tratados de cada sexo). Estas diferencias funcionales son claramente atenuadas cuando el testeo es realizado en **P30-37** (grupo *HAL30*, n= 8 machos y 7 hembras). Grupos controles de los entrenamientos en P30-37 y P40-47, *C30* (n= 7 machos y 8 hembras) y *C40* (n= 8 machos y 9 hembras), respectivamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO, 2. SESIÓN

Efecto principal **TRATAMIENTO**: $F() =$

A posteriori **Tukey HSD-Spjøtvoll-Stoline**:

C30 vs HAL30,

C40 vs HAL40,

C75 vs HAL75,

FIGURA 14.A - TEC P40-47

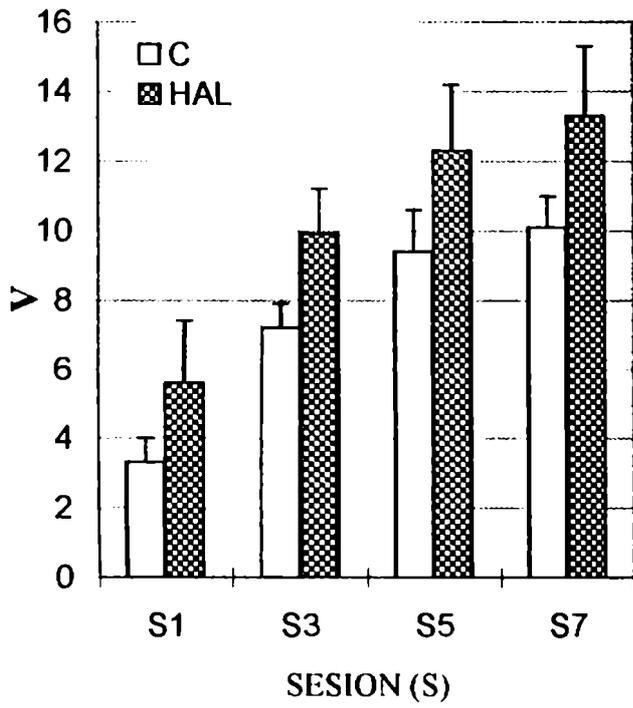


FIGURA 14.B - TEC P30-37

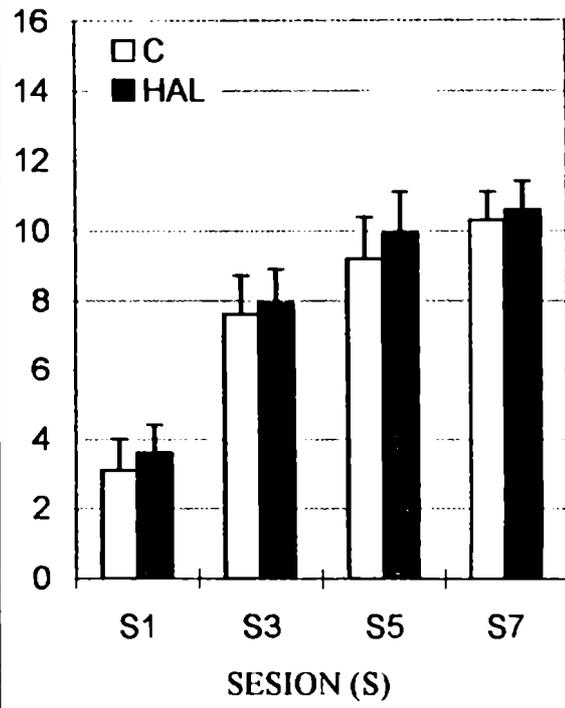


FIGURA 15. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A HALOPERIDOL ANTES O DURANTE EL PERIODO DE SENSIBILIDAD PRENATAL AL MISMO

EVALUACION EN EL TEC

La exposición a HAL (2,5 mg/Kg/d, ip.) durante el período **G5-18** indujo **hipoactividad motora** en el TEC. Contrariamente, el mismo esquema farmacológico administrado sólo durante la primera mitad de dicho período (**G5-11**), produjo leves oscilaciones alrededor de los valores controles, las cuales **no alcanzan significación estadística**. El entrenamiento en el TEC fue realizado en el período P75-83 (adultez temprana).

ANÁLISIS ESTADÍST.: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. PERIODO EXPUESTO, 2. SESION

RESULTADO ANOVA:

EFFECTO PERIODO EXPUESTO: $F(2,16)=20.6, p<0.00004$

A posteriori **Tukey HSD-Spjøtvoll-Stoline**

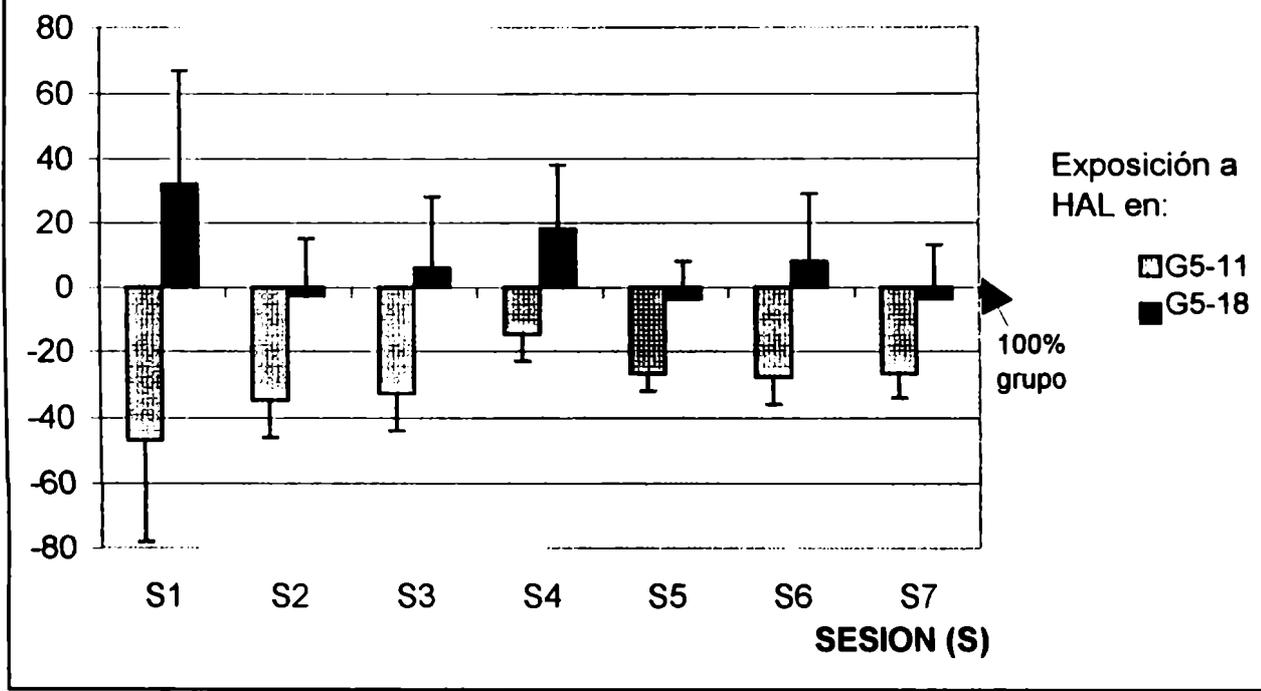
C vs HAL5-18, $p<0.001$

C vs HAL5-11, $p=0.78$

H5-18 vs HAL5-11, $p<0.001$

FIGURA 15

% variación respecto a 100% del grupo



ESTRATEGIA TERAPÉUTICA 2

CORRECCIÓN CON HALOPERIDOL DE NEUROTERATOLOGÍA MOTORA INDUCIDA CON HALOPERIDOL DURANTE LA GESTACIÓN

Los distintos grupos experimentales fueron tratados con HAL durante el período prenatal G5-18 (grupo *HAL/S*, machos n=8, hembras n=6), postnatal P5-21 (grupo *S/HAL*, machos n=9, hembras n=5), o en ambos períodos con solución salina (grupo Control *C*, machos n=8, hembras n=5) o con HAL (grupo *HAL/HAL*, machos n=10; hembras n=6).

Todos los animales fueron evaluados en su respuesta motora en el TEC en el período P30-37.

FIGURA 16. RESPUESTA MOTORA EN EL TEC

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 3 FACTORES, 1. TRATAMIENTO PRENATAL, 2. TRATAMIENTO POSTNATAL, 3. SESIÓN

RESULTADO ANOVA	HEMBRAS	MACHOS
EFFECTO 1.	F(1,18)=10.30, p<0.005	F(1,31)=5.14, p<0.031
EFFECTO 2.	F(1,18)=11.90, p<0.004	F(1,31)=23.1, p=0.00004
INTERACCIÓN	F(1,18)= 2.09, p= 0.18	F(1,31)=24.7, p<0.00003

Tukey

	HEMBRAS	MACHOS
EFFECTO 1.	p<0.008	p<0.033
EFFECTO 2.	p<0.003	p<0.0002
INTERACCIÓN C vs SH,	p=0.54	p=0.98
C vs HS,	p<0.002	p<0.0004
C vs HH,	p=0.65	p=0.38
HS vs HH,	p<0.010	p<0.0002

FIGURA 16.A

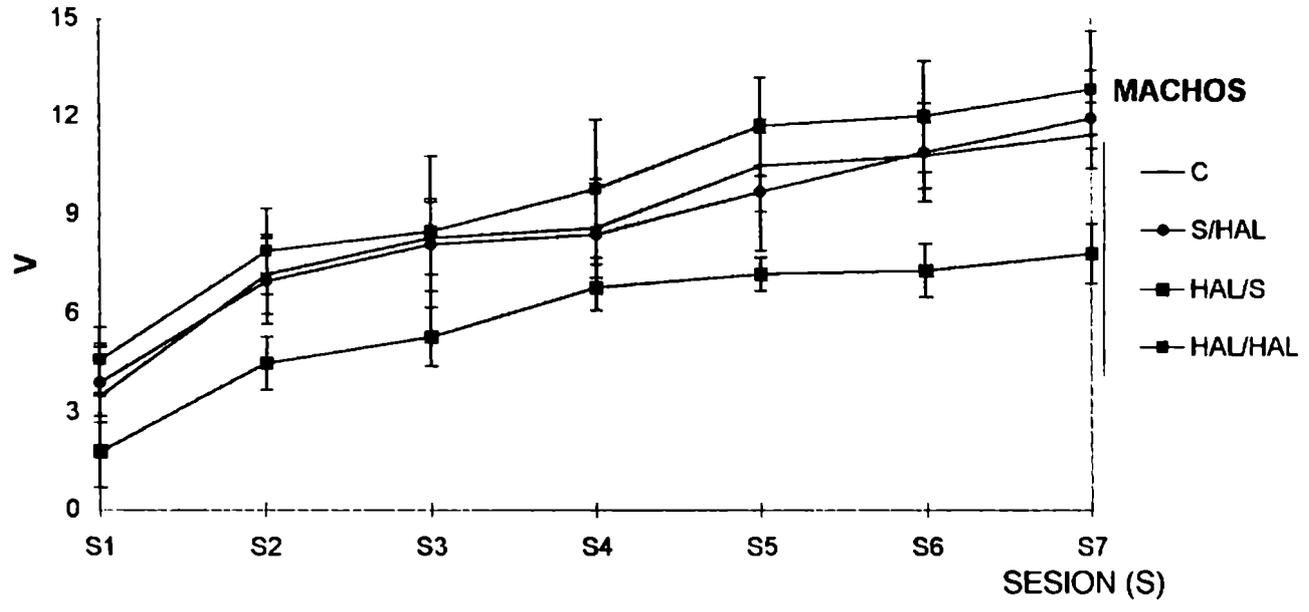


FIGURA 16.B

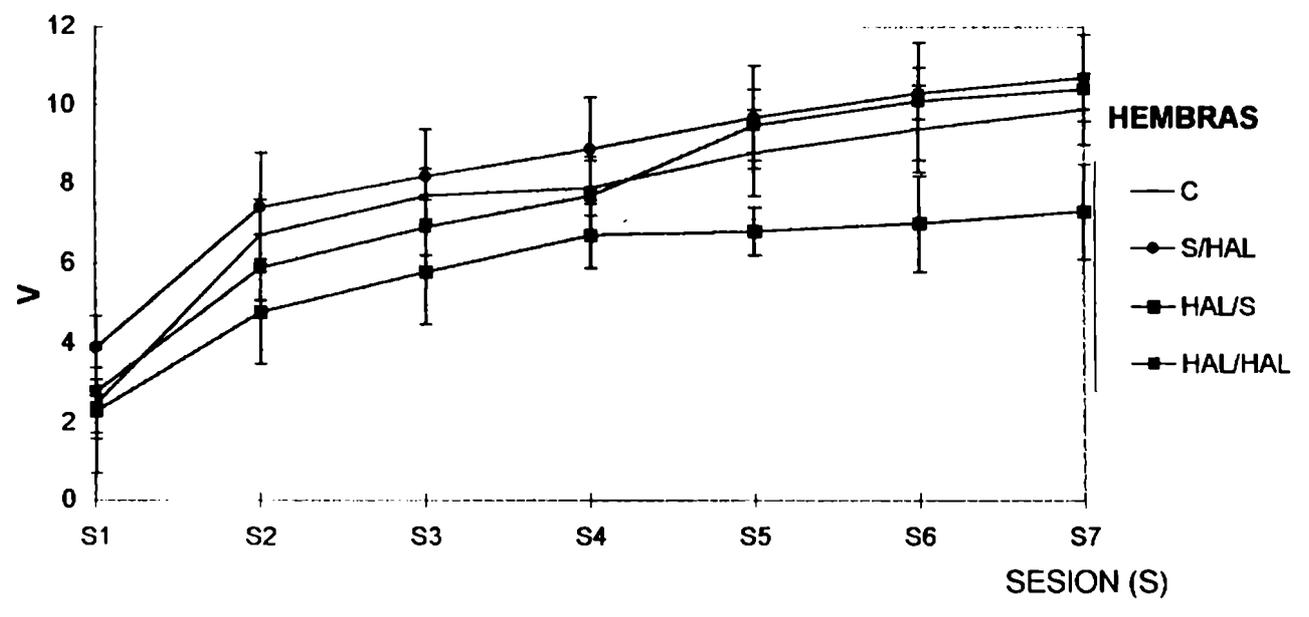


FIGURA 17. OBTENCIÓN DE V_m

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANCOVA DE DOS FACTORES, 1. TRATAMIENTO PRENATAL, 2. TRATAMIENTO POSTNATAL; con una variable, V, y una covariable, V/Ra

Resultado ANCOVA	HEMBRAS	MACHOS
EFFECTO 1.	F(1,23)=17.53, $p<0.001$	F(1,23)=14.0, $p<0.0010$
EFFECTO 2.	F(1,23)=20.44, $p<0.002$	F(1,23)=79.9, $p<0.0001$
INTERACCION.	F(1,23)=0.72, $p=0.40$	F(1,23)=67.1, $p<0.0001$
PENDIENTES (1/L)	F(3,20)=1.23, $p=0.32$	F(3,20)=0.87, $p=0.48$
Test de Paralelismo		
VELOC. MAX.	C vs SH, $p=0.45$	$p=0.99$
TEÓRICA (V_{max})	C vs HS, $p<0.05$	$p<0.0003$
Tukey HSD	C vs HH, $p=0.99$	$p=0.15$
	HS vs HH, $p<0.050$	$p<0.0002$
	HS vs SH, $p<0.004$	$p<0.0003$

FIGURA 18. ENSAYO DE BINDING AL RADIOLIGANDO (3H)Spiroperidol (SPI)

Los animales machos fueron sacrificados en P90 y se les extrajo y homogenizó los hemisferios izquierdo y derecho (NEI y NED) y el cerebelo (CER). Sobre fracciones mitocondriales crudas de las áreas estudiadas se realizó ensayo de binding al radioligando dopaminérgico (3H)SPI. Los datos son expresados en fmol/mg proteína de fracción de membranas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: MANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO PRENATAL, 2. TRATAMIENTO POSTNATAL, con tres variables dependientes, NEI, NED y CER.

Leyendas de gráficos

RESULTADOS ANOVA:

EFFECTO 1. $R(3,29)=13,42$, $p<0.00002$

EFFECTO 2. $R(3,29)= 8,73$, $p<0.0003$

INTERACCION 1 x 2. $R(3,17)= 1,13$, $p=0.35$

Post hoc Scheffé F-test.

	NEI	NED	CER
INTERACCION 1 x 2. C vs S/HAL,	$p<0.04^{***}$	$p= 0.09$	$p<0.04^*$
HAL/S,	$p=0.24$	$p=0.06$	$p<0.03^{**}$
HAL/HAL,	$p=0.82$	$p=0.99$	$p=0.81$
HAL/S vs S/HAL,	$p<0.001$	$p<0.0001$	$p<0.010$
HAL/HAL,	$p<0.05$	$p<0.01$	$p=0.12$

Obtención de V_m por Transformación de Hernstein

FIGURA 17

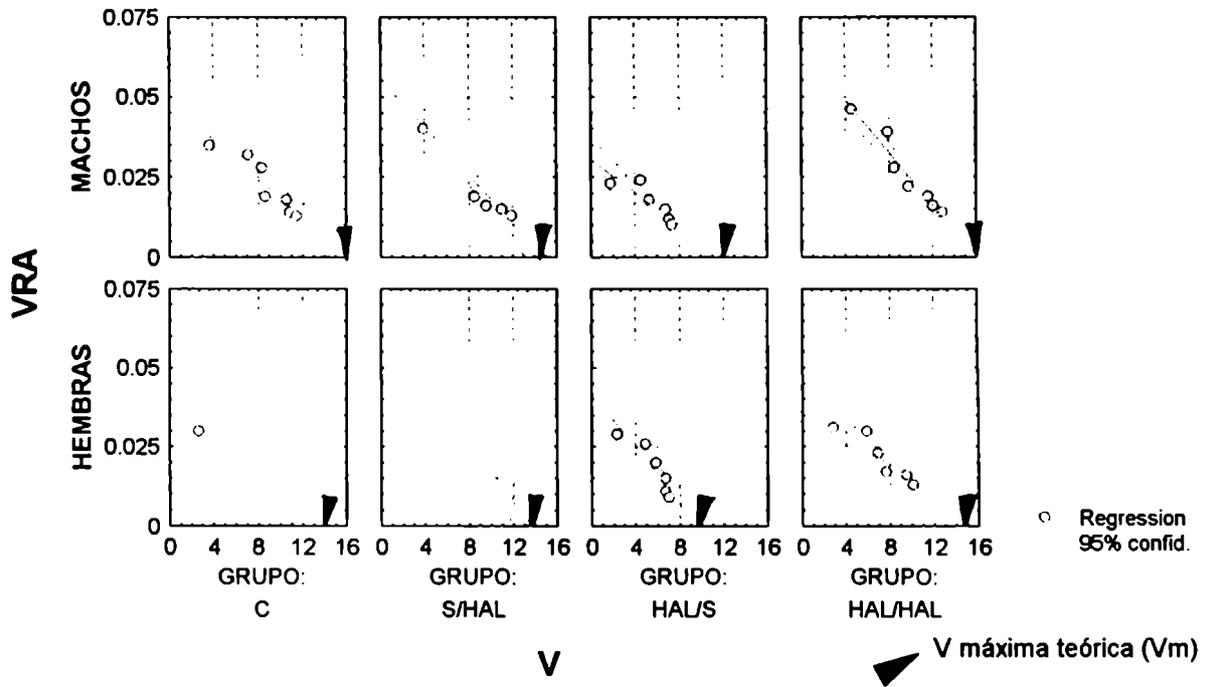
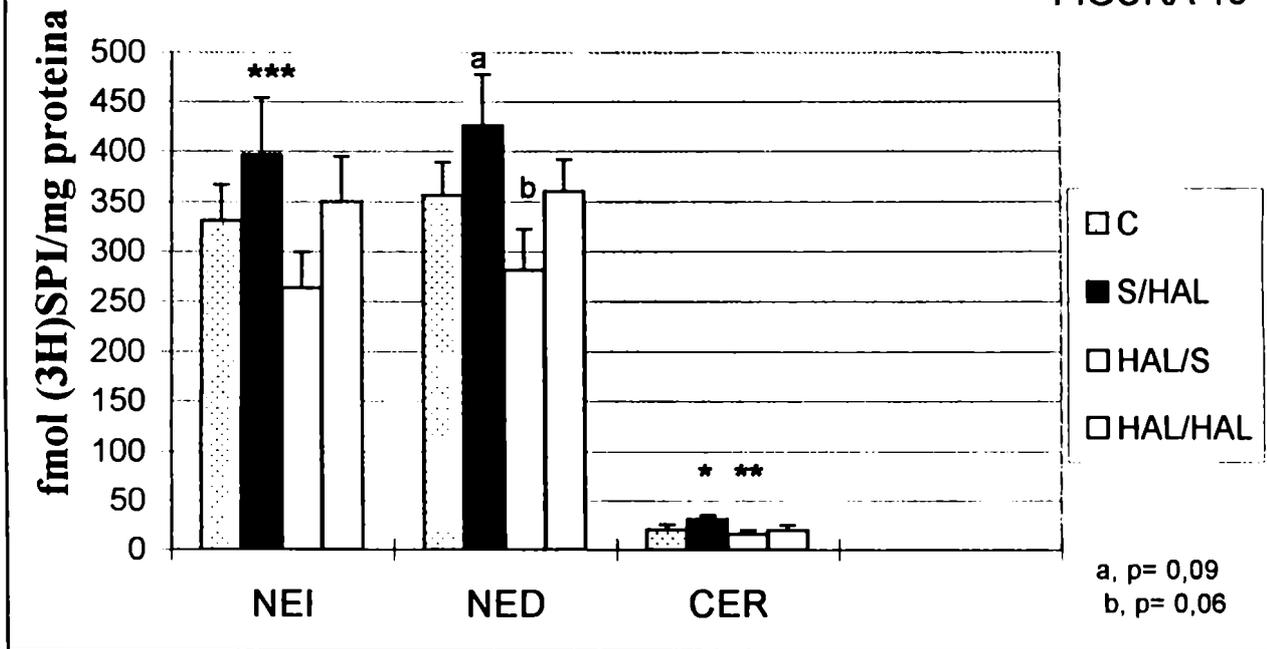


FIGURA 18



ESTRATEGIA TERAPEUTICA 3

ALTERACIONES FUNCIONALES INDUCIDAS POR EXPOSICION A DIFENILHIDANTOINA DURANTE LA GESTACIÓN O LA LACTANCIA

Animales tratados durante la gestación (grupo *DFH-G*, n= 5 hembras + 6 machos, período expuesto G10-18, 30 mg DFH/kg/d) o durante la infancia (grupo *DFH-I*, n= 5 crías de cada sexo, período expuesto P13-23, 50 mg DFH/kg/d) fueron evaluados con el TEC en su respuesta motora en P40-47. El grupo control C (n= 6 hembras + 5 machos) consistió de animales que fueron expuestos a SF durante la gestación en el período G10-18, con un volumen diario inyectado equivalente al promedio del grupo tratado *DFH-G*.

FIGURA 19. RESPUESTA MOTORA EN EL TEC

ANÁLISIS ESTAD.: ANOVA DE 3 FACTORES: 1. TRATAMIENTO, 2. SEXO, 3. SESION

Para el efecto principal **TRATAMIENTO**, $F(2,26)= 13.5$, $p<0.0001$

Para el efecto principal **SEXO**, $F(1,26)= 0.19$, $p= 0.67$

Para la interacción 1 x 2, $F(2, 26)= 0.2$, $p= 0.82$

Análisis a *posteriori* de Tukey -Spjotvol-Stoline

EFECTO TRATAMIENTO	INTERACCIÓN 1 x 2:	HEMBRAS	MACHOS
C vs <i>DFH G</i> , $p<0.0002$	C vs <i>DFH G</i> ,	$p< 0.007$	$p< 0.005$
C vs <i>DFH I</i> , $p=0.055$	C vs <i>DFH I</i> ,	$p = 0.43$	$p = 0.60$

FIGURA 19.A

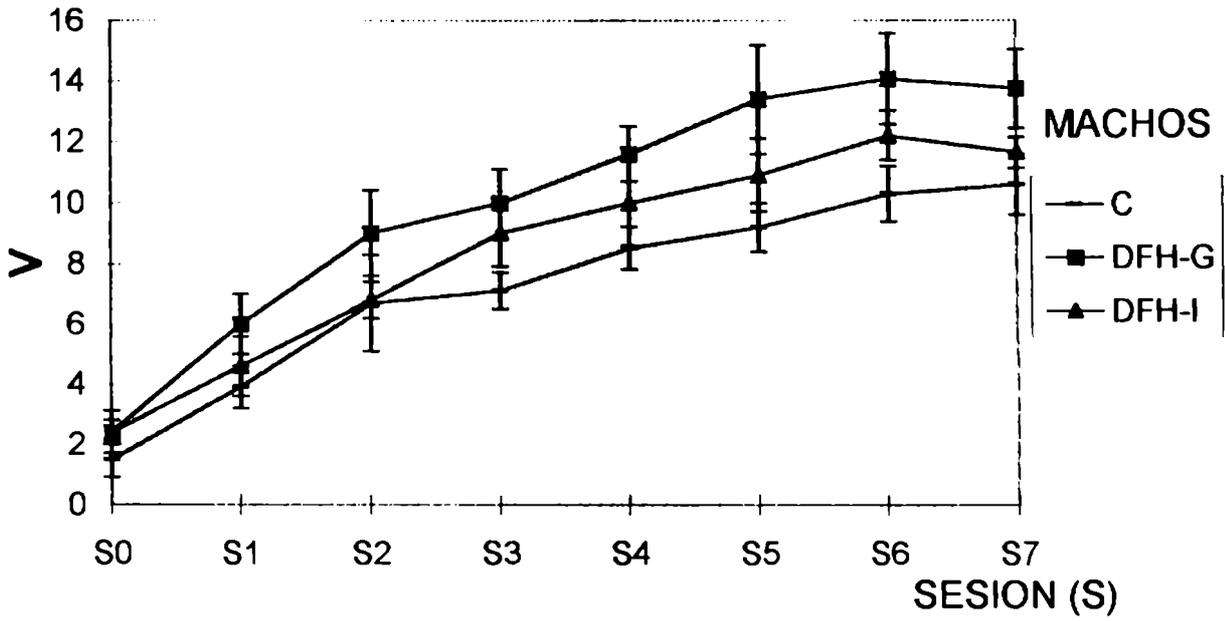
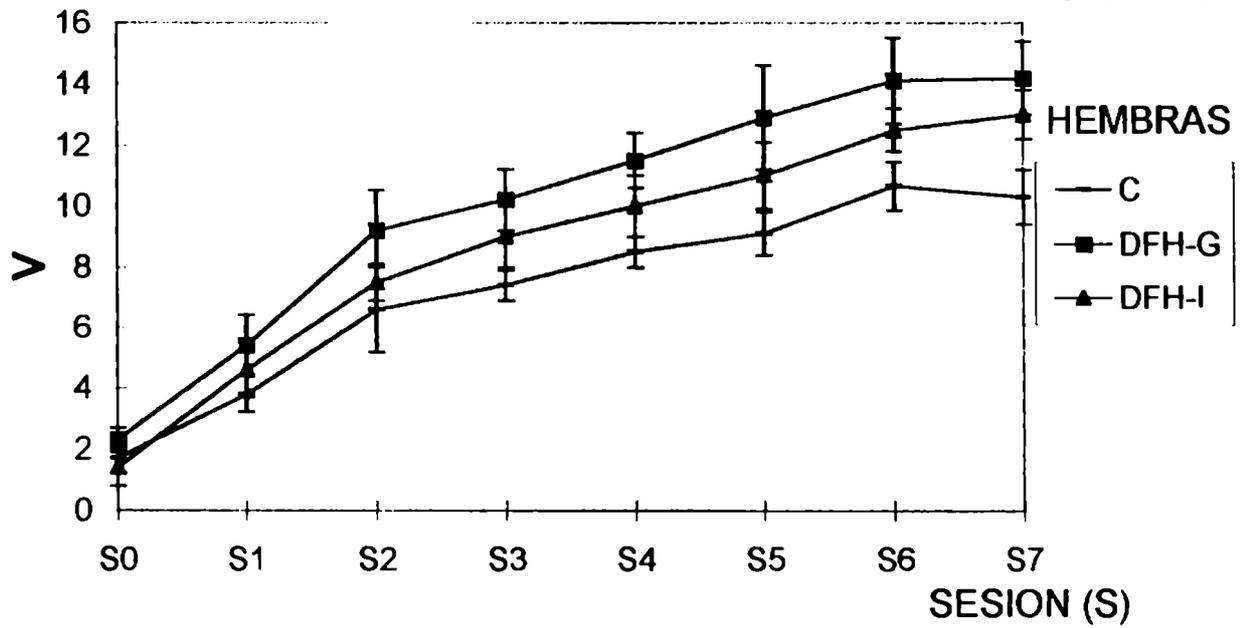


FIGURA 19.B



CORRECCION DE NEUROTERATOLOGIA ESPACIAL CON DIFENILHIDANTOINA

Los distintos grupos experimentales fueron tratados con DFH durante el período prenatal G10-18 (30 mg/Kg/d, grupo *DFH/S*, machos n=6, hembras n=6), postnatal P13-23 (60 mg/Kg/d, grupo *S/DFH*, machos n=6, hembras n=5), o con ambas exposiciones con SF (grupo Control, C, machos n=5, hembras n=6) o con DFH (grupo *DFH/DFH*, machos n=5, hembras n=6). Todos los animales fueron sometidos al entrenamiento en el TEC en el período P40-47 (preadolescencia). Se evaluaron la respuesta motora simultáneamente al aprendizaje espacial. De este modo, se registraron las velocidades V y los errores por sesión de tipo I (de elección) y de tipo II (de persistencia). Los animales machos fueron evaluados por segunda vez en TEC con sentido de giro recompensado contrario al anterior P180. En este segundo testeo comportamental se registraron también las respuestas espaciales y motoras.

FIGURA 20. RESPUESTA MOTORA EN EL PRIMER TESTEO

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 3 FACTORES, 1. TRATAMIENTO PRENATAL, 2. TRATAMIENTO POSTNATAL, 3. SEXO, 4. SESION

RESULTADOS ANOVA: EFECTO TRATAMIENTO PRENATAL: $F(1,37)= 52$, $p<0.0001$

EFECTO TRATAMIENTO POSTNATAL: $F(1,37)= 6.3$, $p< 0.017$

EFECTO SEXO: $F(1,37)= 0.25$, $p= 0.63$

INTERACCION 1 x 2: $F(1,37)=0.82$, $p=0.37$

1 x 3: $F(1,37)=0.82$, $p=0.38$

2 x 3: $F(1,37)=0.06$, $p=0.83$

***A posteriori* Tukey HSD-Spjtvol-Stoline:**

EFECTO TRATAMIENTO

PRENATAL DFH vs C, $p< 0.0002$

POSTNATAL DFH vs C, $p< 0.020$

FIGURA 20.A

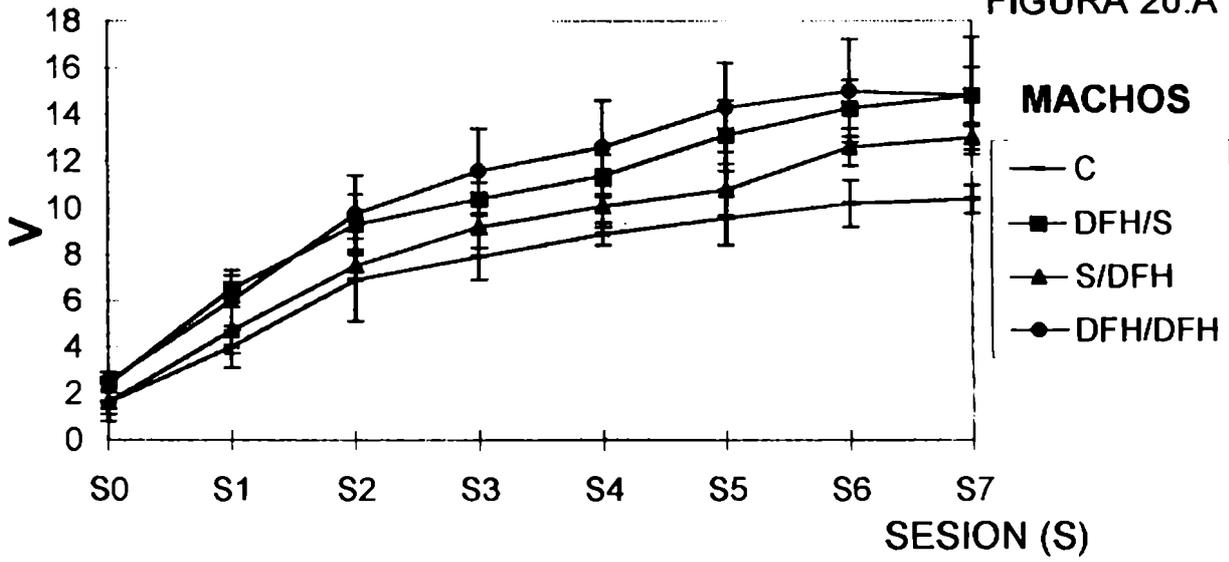
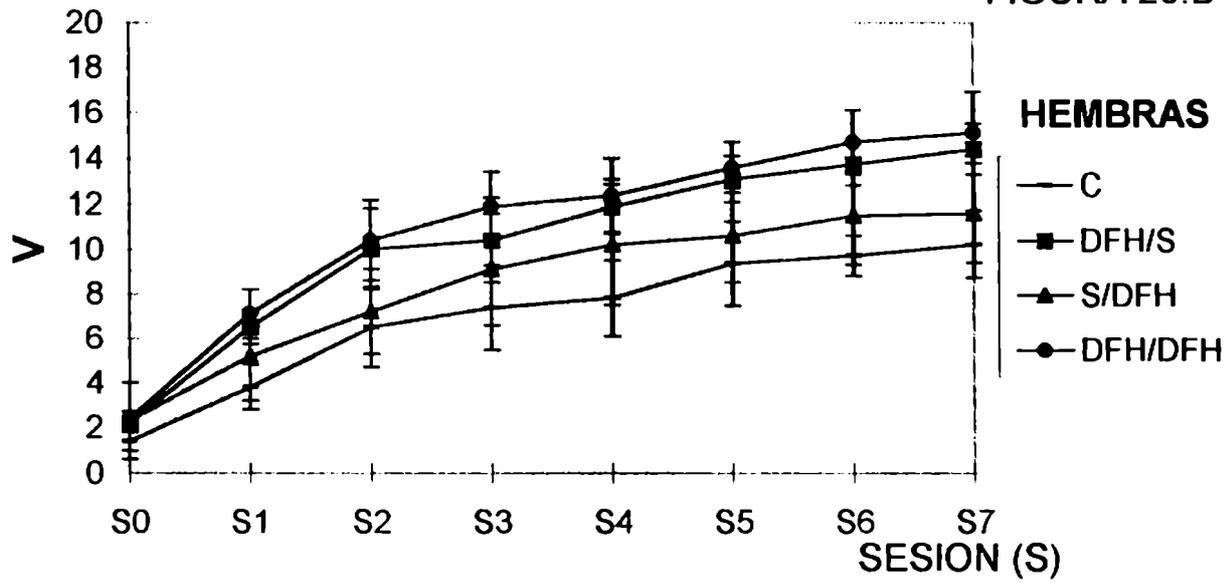


FIGURA 20.B



Leyendas de gráficos

EFECTO INTERACCION 1x 2	EFECTO INTERACCION 1 x 2 x 3	
	HEMBRAS	MACHOS
C vs SD, $p = 0.10$	C vs SD, $p = 0.57$	$p = 0.88$
DS, $p < 0.0002$	DS, $p < 0.0007$	$p < 0.040$
DD, $p < 0.0002$	DD, $p < 0.0002$	$p < 0.005$

FIGURA 21. OBTENCION DE V_m

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANCOVA DE DOS FACTORES, 1. TRATAMIENTO PRENATAL, 2. TRATAMIENTO POSTNATAL; con una variable, V, y una covariable, V/Ra

	HEMBRAS	MACHOS
EFECTO TRATAM. PREN.	$F(1,23)=340.8, p < 0.00001$	$F(1,23)=175.6, p < 0.00001$
EFECTO TRATAM. POSTN.	$F(1,23)= 63.1, p < 0.00001$	$F(1,23)= 54.4, p < 0.00001$
INTERACCION 1 x 2:	$F(1,23)= 1.96, p=0.18$	$F(1,23)= 0.77, p=0.77$
A posteriori Tukey HSD		
C vs SD,	$p < 0.010$	$p=0.055$
C vs DS,	$p < 0.0002$	$p < 0.0002$
C vs DD,	$p < 0.0002$	$p < 0.0002$
DS vs DD,	$p < 0.010$	$p=0.070$

Obtención de V_m por Transformación de Hemstein

FIGURA 21

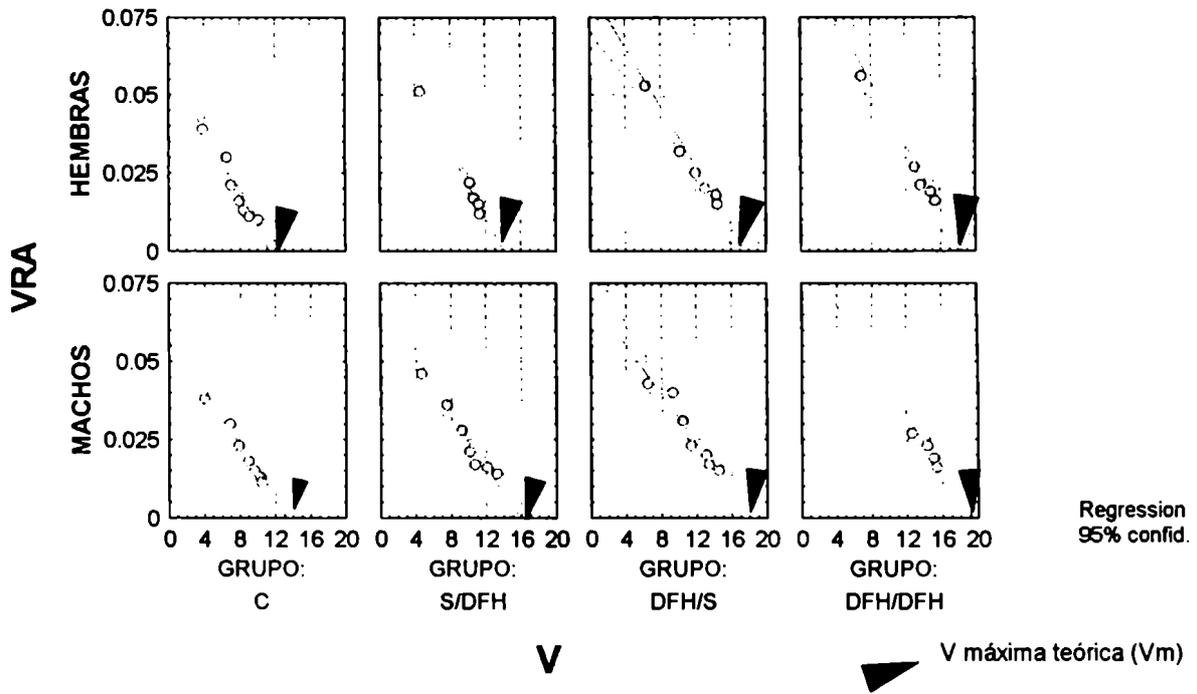


FIGURA 22. RESPUESTA ESPACIAL EN EL PRIMER TESTEO

ANALISIS ESTADISTICO: ANOVA DE 2 FACTORES (para err. I), 1. TRATAMIENTO, 2. SESION. ANOVA DE 1 FACTOR, TRATAMIENTO (para err. II).

	ERROR I	ERROR II
EFFECTO TRATAMIENTO	F(3,18)=5.45, p <0.008	F(3,18)=3.61, p< 0.040

A posteriori Tukey HSD-Spjtvol-Stoline:

C vs SD,	p < 0.05	p = 0.14
DS,	p < 0.03	p< 0.040
DD,	p = 0.88	p = 0.71
DD vs DS,	p = 0.10	p = 0.25

FIGURA 22.A

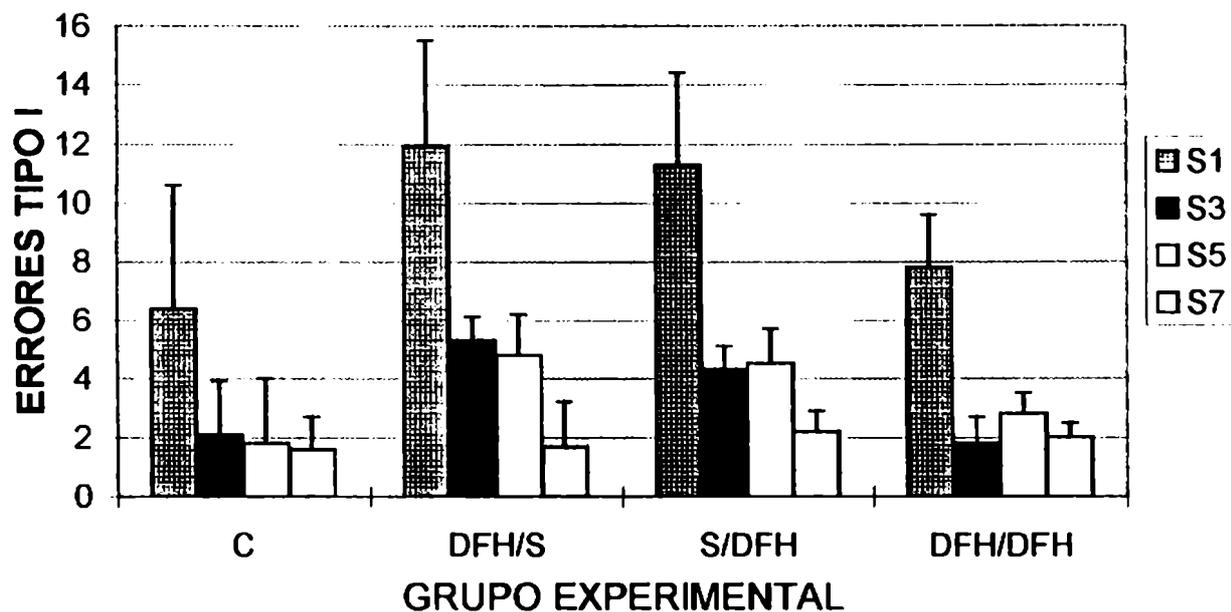


FIGURA 22.B

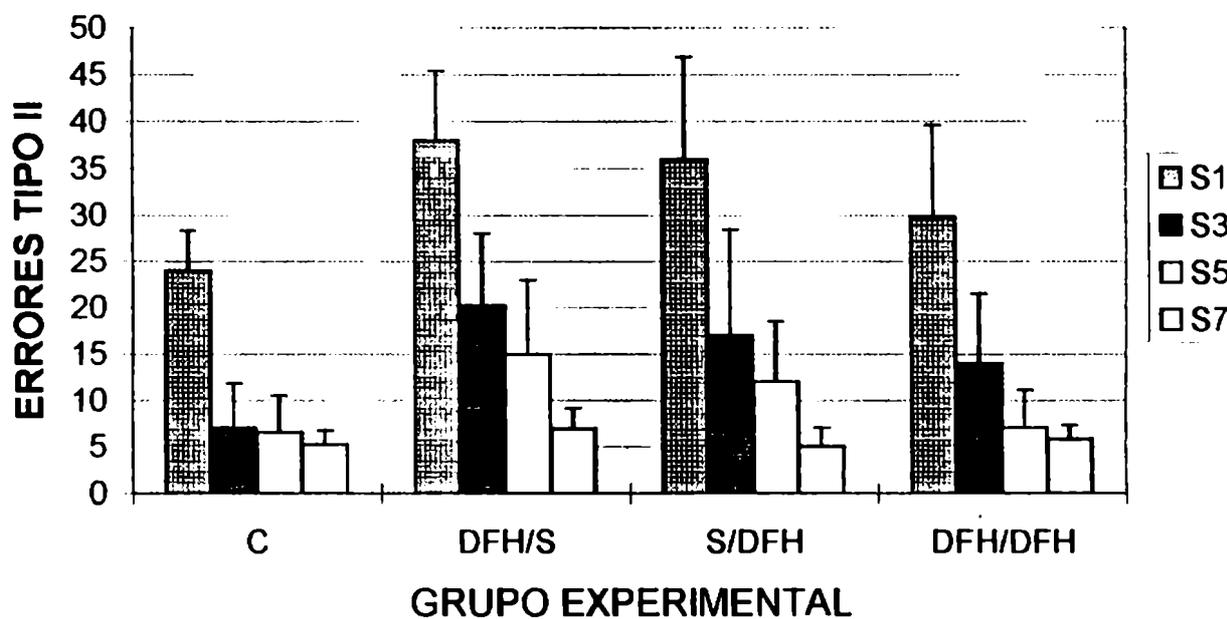


FIGURA 23. A. RESPUESTA MOTORA EN EL SEGUNDO TESTEO (sólo machos)

ANALISIS ESTADISTICO: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO, 2. SESION
RESULTADOS ANOVA

EFFECTO TRATAMIENTO, $F(3,18)=9.43$, $p<0.0006$

A posteriori Tukey HSD-Spjtvol-Stoline:

C vs SD, $p=0.32$

DS, $p<0.001$

DD, $p<0.02$

B. ACTIVIDAD MOTORA TOTAL DURANTE EL SEGUNDO TESTEO

En el segundo testeo se registraron las vueltas correctas y las incorrectas por separado, lo cual permitió al sumarlas obtener la actividad locomotora inducida total en cada sesión. De este modo, en el gráfico se muestran los desplazamientos en vueltas totales promedio por sesión \pm DS para cada grupo experimental.

ANALISIS ESTADISTICO: ANOVA DE 1 FACTOR., 1. TRATAMIENTO

RESULTADOS ANOVA:

EFFECTO TRATAMIENTO, $F(3,18)= 8.11$, $p<0.002$

A posteriori Tukey HSD-Spjtvol-Stoline:

C vs SD, $p=0.18$

DS, $p<0.002$

DD, $p=0.43$

C. RESPUESTA ESPACIAL EN EL SEGUNDO TESTEO CON EL TEC

Los errores de tipo I por sesión fueron evaluados en cada grupo experimental de la misma forma que en el primer testeo con el TEC.

ANALISIS ESTADISTICO: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO, 2. SESION

RESULTADOS ANOVA

EFECTO TRATAMIENTO: $F(3,18)= 4.72$, $p<0.014$

A posteriori Tukey HSD-Spjøtvoll-Stoline:

C vs SD, $p=0.07$

DS, $p<0.02$

DD, $p=0.99$

FIGURA 23.A

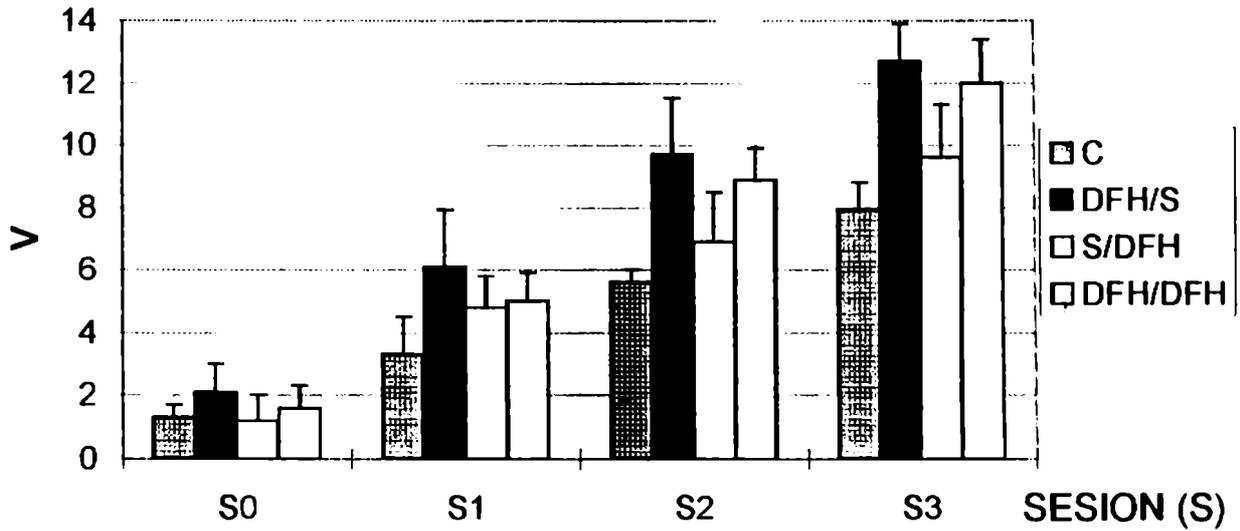


FIGURA 23.B

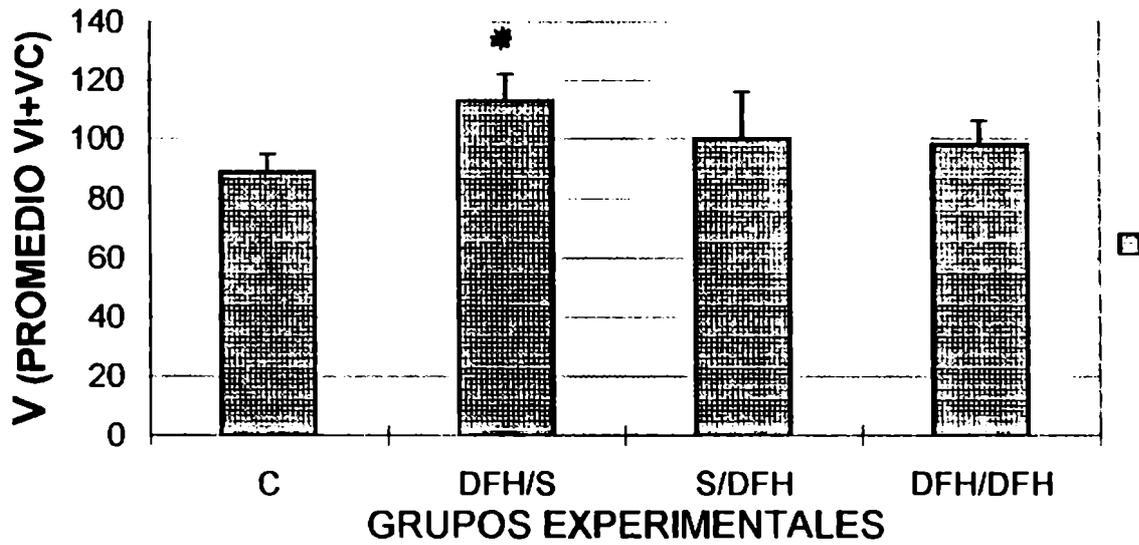
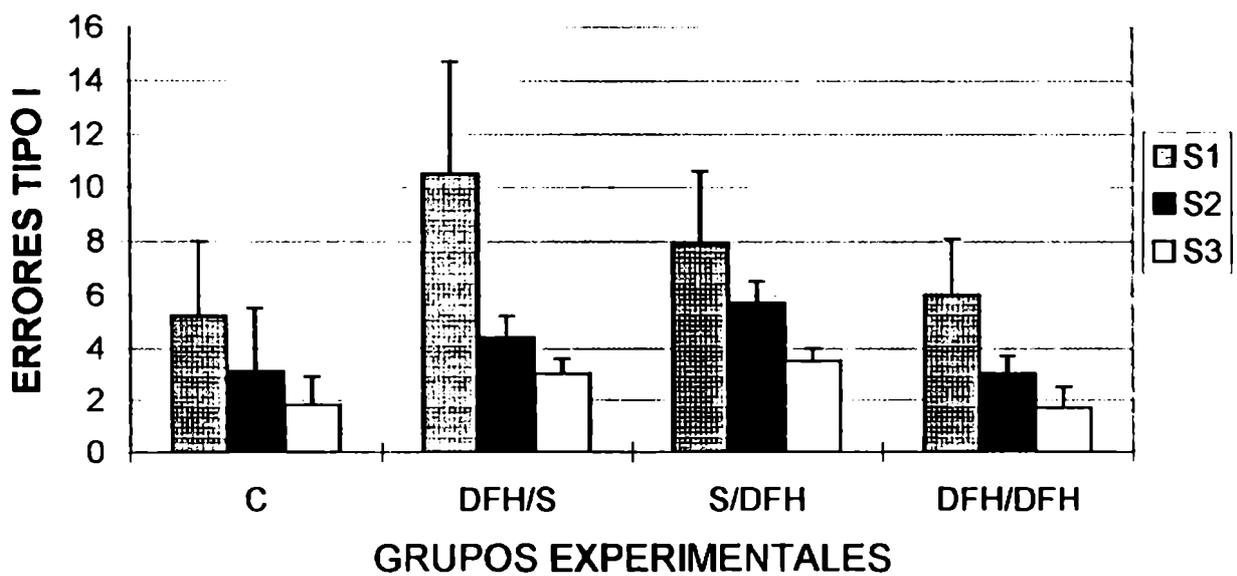


FIGURA 23.C



ESTRATEGIA TERAPEUTICA 4

MODULACION DE LA PLASTICIDAD ESTRIATAL

EXPERIMENTO NGF 1

Los animales del grupo control del procedimiento quirúrgico (grupos *SH*) y los canulados en el NEI y perfundidos en forma continua entre P25 y P39 con Citocromo C (grupos *CC*) o NGF 2.5S (grupos *NGF*), fueron pesados 2-3 veces por semana a partir del día de la cirugía. Entre P40 y P47 todos los grupos operados fueron sometidos a los procedimientos del testeo en el TEC. A la edad P70 se sacrificaron los animales y se obtuvieron fracciones subcelulares ricas en membranas sobre las cuales se realizó ensayo de binding al radioligando muscarínico (^3H)QNB. También se dispusieron animales no operados entrenados y habituados como controles positivos (TEC en P30-37) o negativos (TEC en P40-47) de la respuesta muscarínica en el período crítico estriatal.

FIGURA 24. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE LA GANANCIA DE PESO

Sólo se muestran datos de los animales perfundidos con la dosis mas alta de NGF o CC

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO, 2. DIA POSTNATAL, con el peso corporal como variable dependiente.

RESULTADOS ANOVA: EFECTO TRATAMIENTO: $F(2,14)=3.0$, $p=0.18$

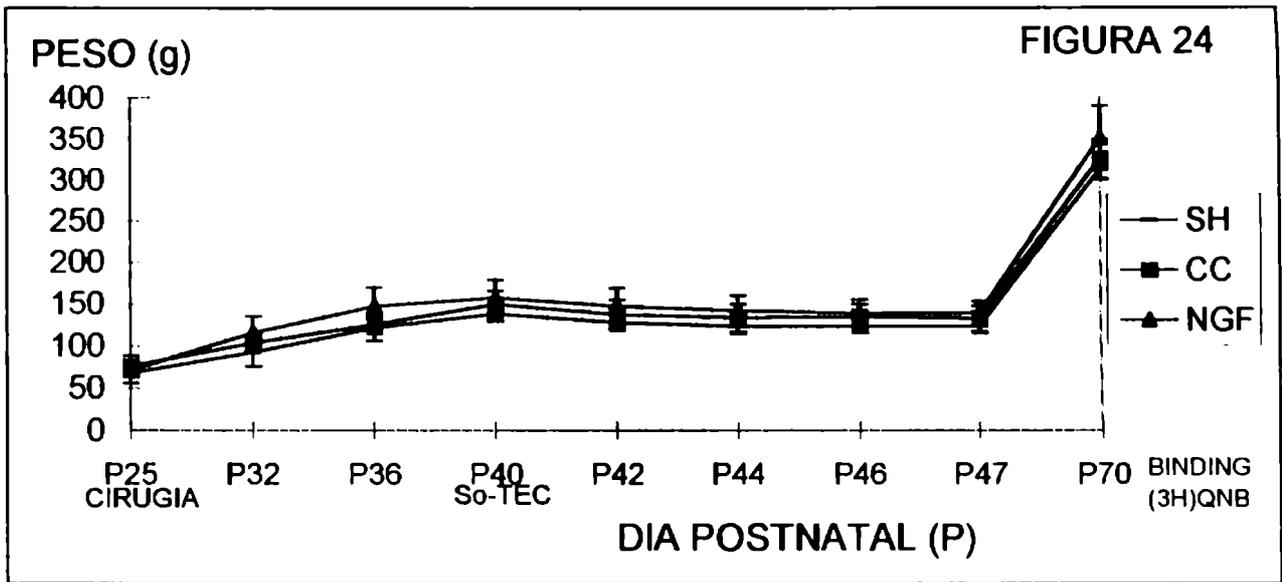


FIGURA 25. RESPUESTA MOTORA EN EL TEC

En el panel I, se presentan las velocidades por sesión de los animales no canulados (Exp.1) entrenados en el TEC entre P30-37 (grupo E₃₀) o P40-47 (grupo E₄₀, n=6).

En el panel II, se muestran las velocidades de los grupos controles del procedimiento quirúrgico, o canulados y perfundidos con CC o NGF. Los experimentos 2 y 3 sólo se diferencian en la dosis diaria del agente perfundido y los grupos se presentan con la misma sigla pero en mayúsculas para el Exp. 2 (1.4 µg/d) y en minúsculas para el Exp. 3 (0.4 µg/d). V se expresa como media± DS.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO, 2. SESION.

Para mayor claridad gráfica sólo se muestran los resultados derivados de cuatro sesiones representativas (S1, S3, S5, S7). Tres animales adicionales de cada uno de los grupos operados del Exp. 2 fueron habituados al aparato de TEC pero no entrenados, representaron los controles del efecto del entrenamiento *per se*.

RESULTADOS ANOVA EFECTO TRATAMIENTO. F(7,38)=1.21, p=0.35

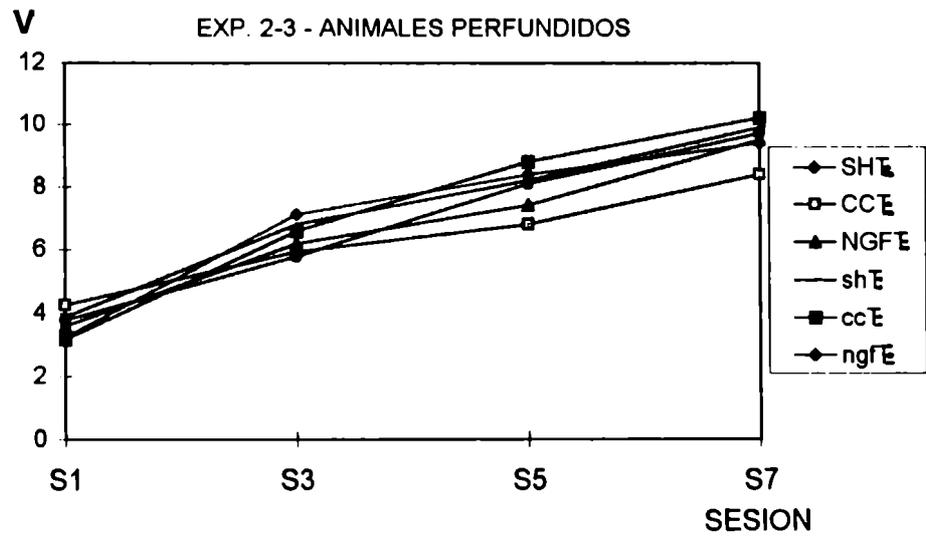
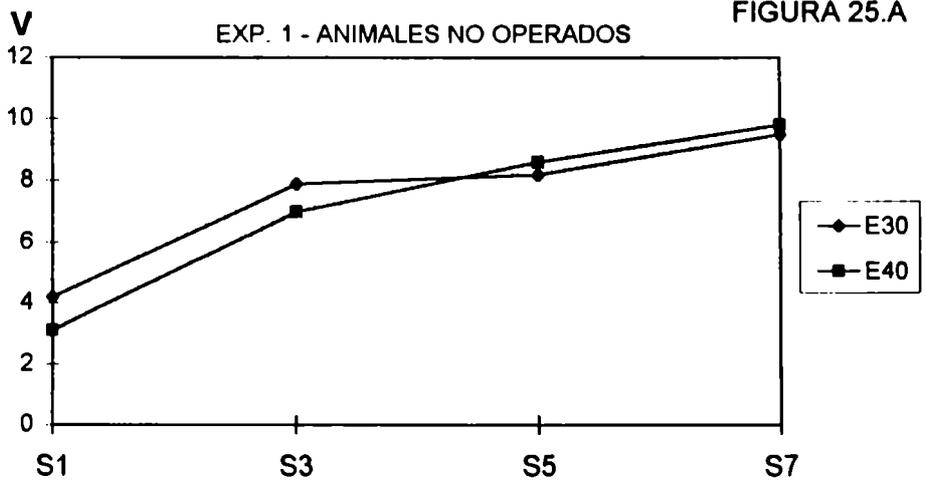
B. OBTENCION DE V_m

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ANCOVA DE 1 FACTOR, 1. TRATAMIENTO, con V como variable dependiente y V/Ra como variable covariante.

RESULTADO ANCOVA EFECTO TRATAMIENTO. R(7,23)=0.91, p=0.52
PENDIENTES (1/L). F(7,16)=2.10, p=0.11

No se detectaron diferencias significativas en V_{máx} entre los grupos evaluados de a pares

FIGURA 25.A



Obanci3n de V_m por la Transformaci3n de Hernstein

FIGURA 25.B

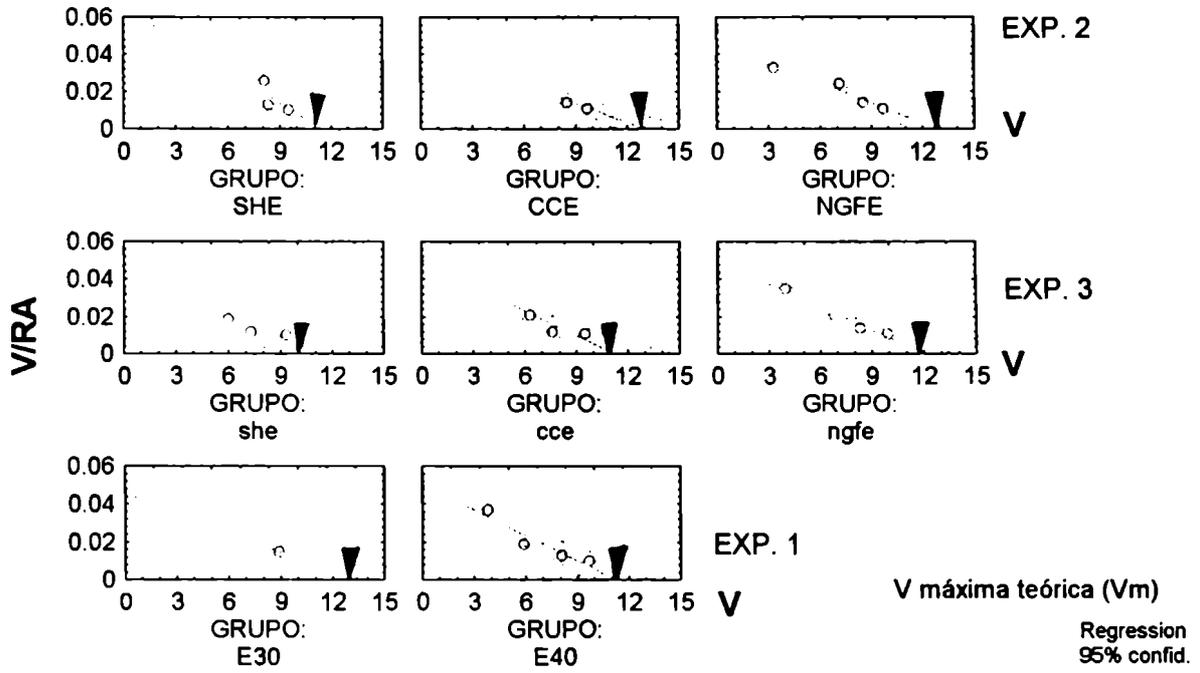


FIGURA 26. ENSAYO DE BINDING A (³H)QNB EN ANIMALES NO OPERADOS

Los valores de unión específica a (³H)QNB se expresan como fmol.mg⁻¹ proteína, media± DS. Los grupos E₃₀ y E₄₀ incluyen animales entrenados comenzando el protocolo del TEC en P30 o P40, respectivamente. Los grupos C₃₀ y C₄₀ son los respectivos controles no entrenados. Los estriados izquierdo (NEI) y derecho (NED) fueron homogenizados y estudiados por binding separadamente.

ANALISIS ESTADÍSTICO: MANOVA DE UN FACTOR, 1. **TRATAMIENTO**, con las variables dependientes NEI y NED. EFECTO TRATAMIENTO: R(6,38)= 5.63, **p<0.0003**

Post hoc Scheffé F-test,

EFECTO CONDICION EN EL TEC (entrenamiento vs habituación)

para NEI, grupo C₃₀ vs E₃₀ , * **p<0.001**

para NED, grupo C₃₀ vs E₃₀ , ** **p<0.008**

FIGURA 26

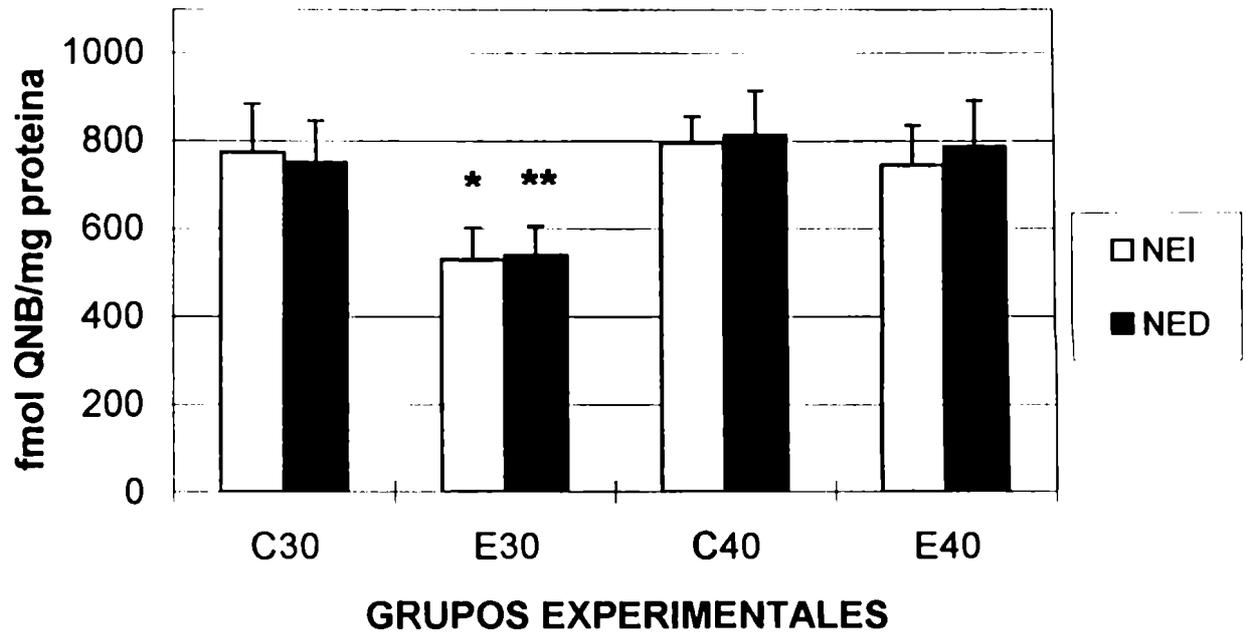


FIGURA 27. BINDING A (³H)QNB EN ESTRIADOS PERFUNDIDOS

La figura muestra el binding específico a (³H)QNB en núcleos estriados provenientes de los grupos perfundidos y entrenados en el TEC en el período P40-47 mas los resultados de los animales perfundidos pero sólo habituados. En Panel A se presentan los grupos del Exp.2 perfundidos con la dosis mas alta de CC o NGF (grupos NGF_E y CC_E , respectivamente), y el control de procedimientos quirúrgicos, SH_E

En Panel B se muestran los resultados de los grupos del Exp.3, perfundidos con la dosis mas baja de NGF o CC (grupos ngf_E y cc_E , respectivamente) y el control de cirugía respectivo, sh_E .

ANALISIS ESTADISTICO: MANOVA DE 1 FACTOR, 1. TRATAMIENTO, con las variables dependientes NEI y NED.

RESULTADOS MANOVA: $R(10,54)= 8.43, p<0.0001$

Post Hoc Scheffé F-test * $p<0.0004$ ** $p<0.02$ *** $p<0.0001$

En Panel C se encuentran los resultados de los ensayos de binding en muestras provenientes de los animales controles de entrenamiento para cada uno de los grupos experimentales del Exp.2 (designados como SH_C , CC_C y NGF_C).

Para los resultados del panel C (animales no entrenados) respecto a los del panel A (animales con el mismo tratamiento pero entrenados):

ANALISIS ESTADÍSTICO: MANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO QUIRURGICO-FARMACOLOGICO, 2. CONDICION EN EL TEC, con las variables dependientes NEI y NED.

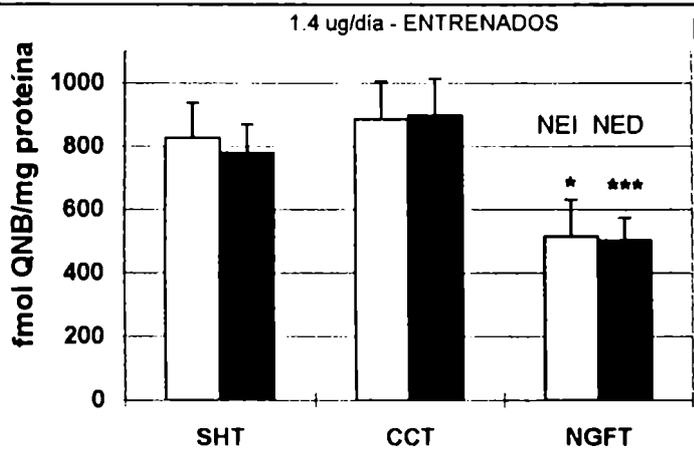
RESULTADOS MANOVA EFECTO 1. $R(4,38)= 3.85, p<0.01$

EFECTO 2. $R(2,19)=3.24, p=0.062$

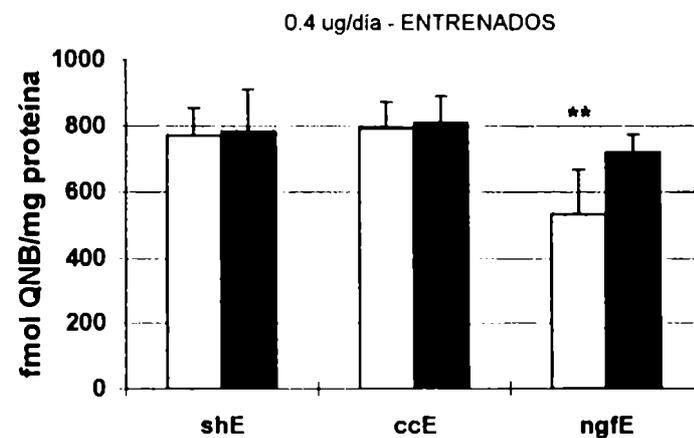
INTERACCION 1 x 2: $R(4,38)=6.93, p<0.0003$

Post Hoc Scheffé F-test * $p<0.0004$ ** $p<0.02$ *** $p<0.0001$

FIGURA 27 A

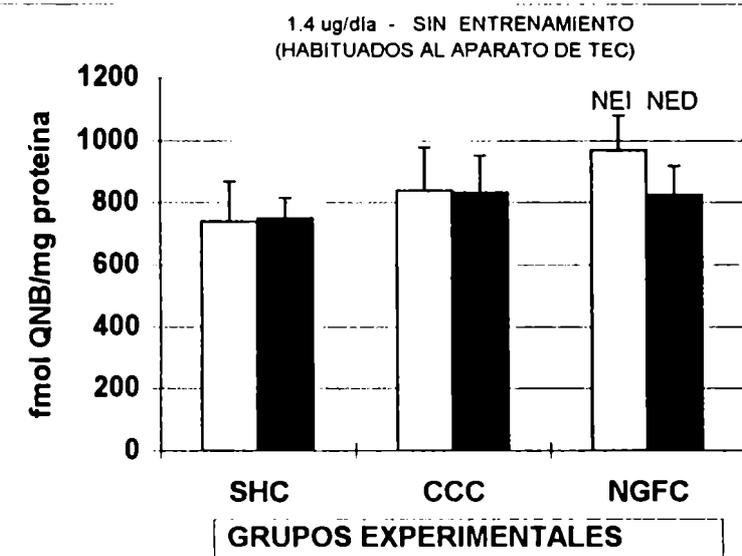


B



□ EI ■ ED

C



GRUPOS EXPERIMENTALES

EXPERIMENTO NGF 2

Tasa de perfusión de NGF o CC= 0.4 µg/día. Los animales operados en P25 fueron entrenados en el TEC durante PCE (P30-37), al mismo tiempo que eran perfundidos. Los grupos entrenados fueron denominados SH_E , CC_E y NGF_E (n=6 cada uno) y los controles de entrenamiento respectivos, SH_C , CC_C y NGF_C (n= 4 cada uno). En P70 todos los animales fueron sacrificados y se disectaron los hemiestriados NEI y NED. Se obtuvieron fracciones subcelulares de membranas sobre las cuales se realizó ensayo de binding al radioligando (3H)QNB.

FIGURA 28. RESPUESTA MOTORA EN EL TEC

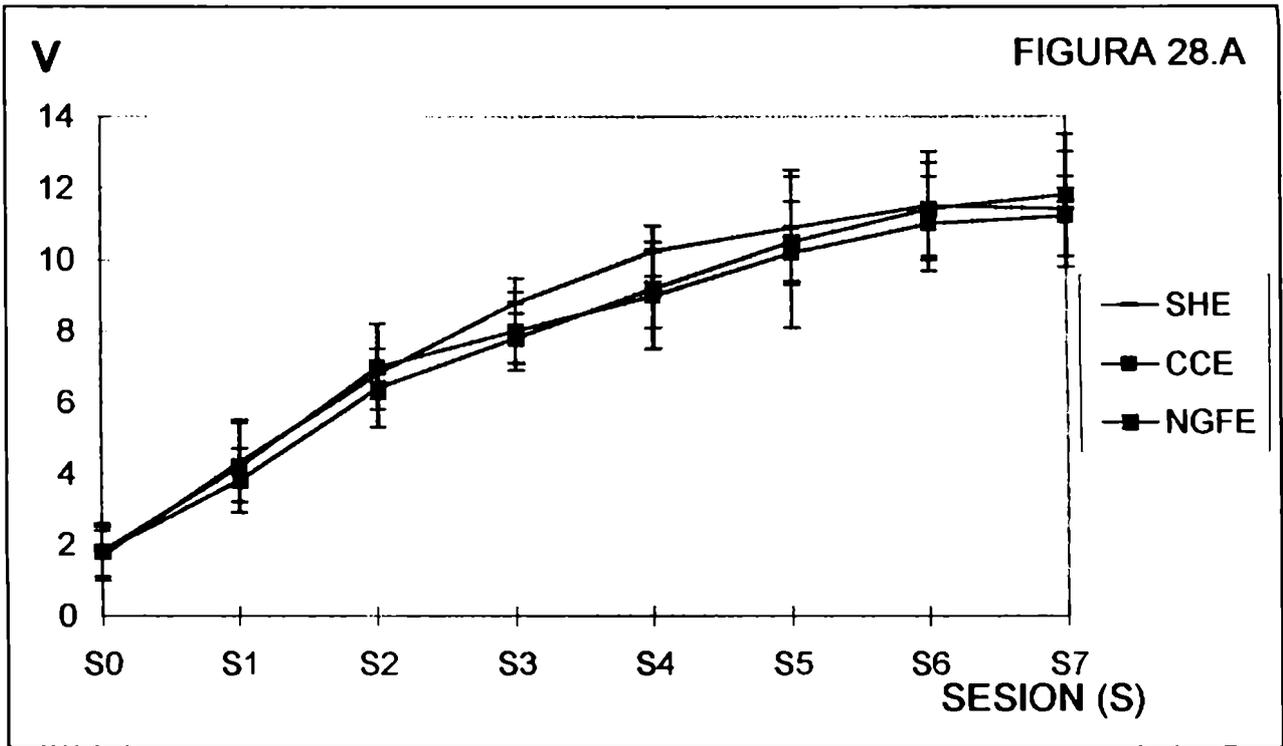
ANALISIS ESTADISTICO: ANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO, 2. SESION.

RESULTADOS ANOVA

EFEECTO TRATAMIENTO: $F(2,15)= 0.31$, $p=0.74$

A posteriori Tukey HSD: No se detectaron diferencias significativas entre grupos

FIGURA 28.A



Obtención de V_m por Transformación de Hernstein

FIGURA 28.B

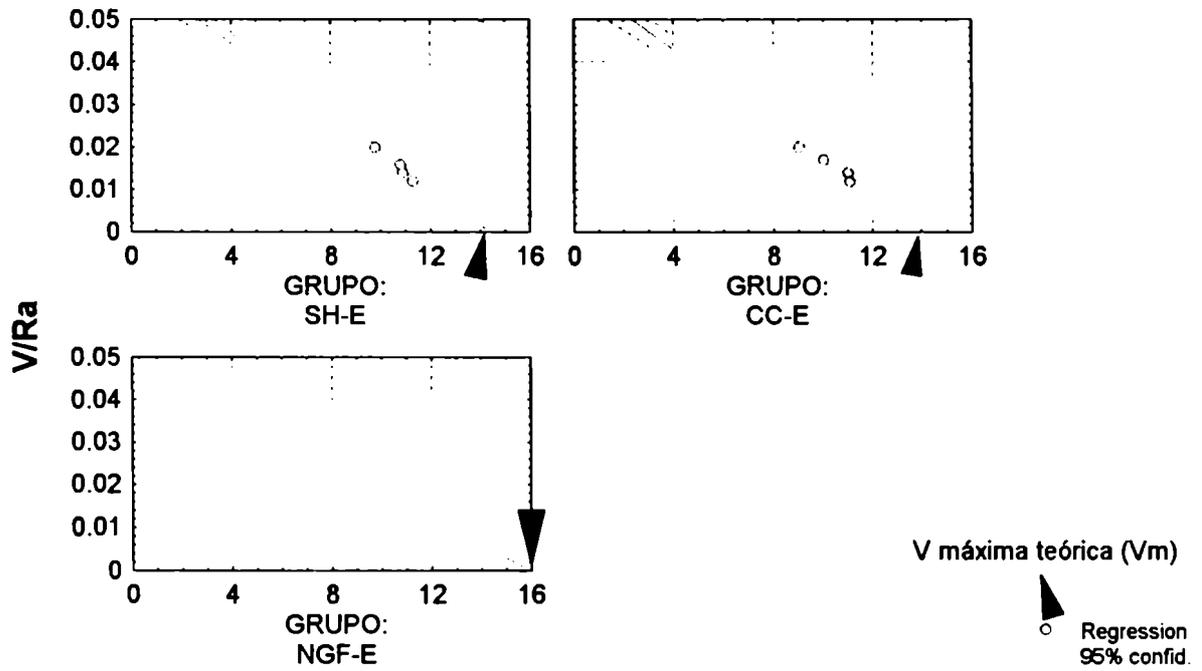


FIGURA 29. BINDING A (³H)QNB EN LOS ESTRIADOS PERFUNDIDOS CON NGF DURANTE EL ENTRENAMIENTO EN EL PCE

La figura muestra el binding específico a (³H)QNB en núcleos estriados provenientes de los grupos perfundidos y entrenados en el TEC en el período P30-37 (panel A) más los resultados de los animales perfundidos pero sólo habituados al TEC (panel B).

ANALISIS: MANOVA DE 2 FACTORES, 1. TRATAMIENTO QUIRURGICO-FARMACOL.,
2. CONDICION EN EL TEC

RESULTADOS MANOVA

EFECTO 1. $R(4,46)= 7.4, p<0.0002$

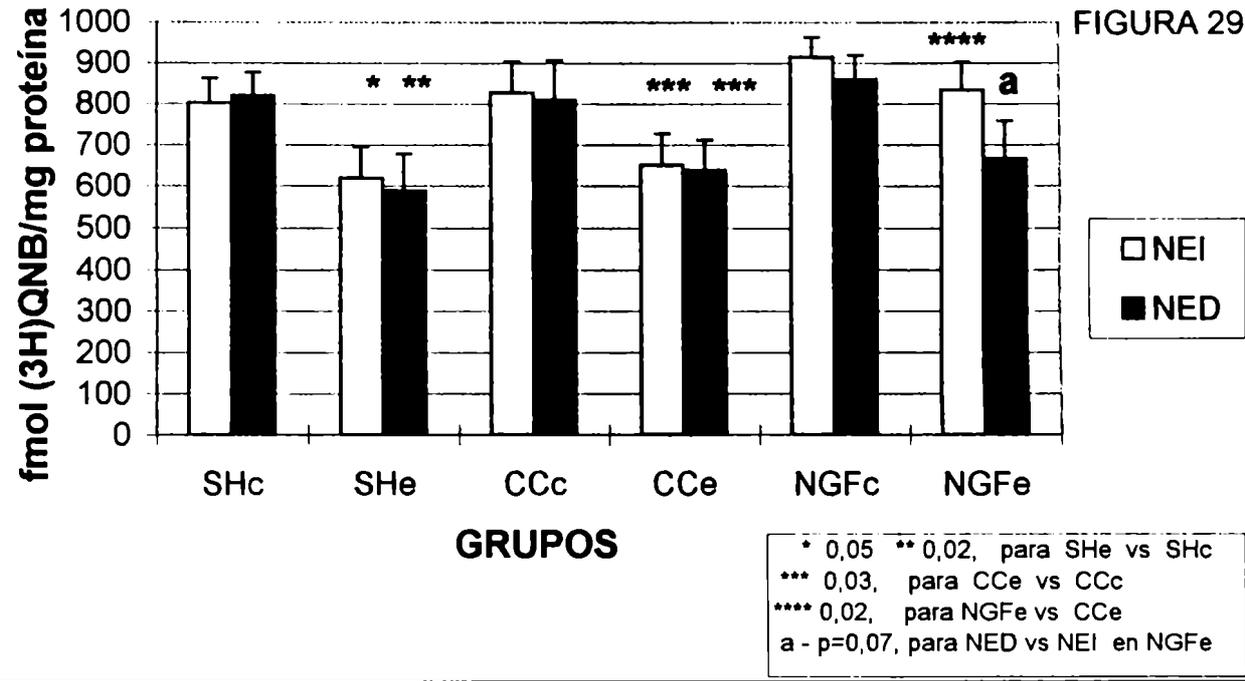
EFECTO 2. $R(2,23)= 27.8, p<0.0005$

INTERACCION 1 x 2. $R(4,46)= 1.0, p=0.42$

Post Hoc Scheffe F-Test

	NEI	NED
SH_C vs SH_E	p<0.05	p<0.02
CC_C vs CC_E	p<0.03	p<0.03
NGF_C vs NGF_E	p=0.99	p=0.59
CC_E vs NGF_E	p<0.02	p= 0.07

FIGURA 29



“ La percepción que la mayoría de las enfermedades estaban bajo control a través de terapias farmacológicas accesibles ha sido dramáticamente sacudida con la reaparición de Tuberculosis, Infecciones Virales tales como el Ebola y otras formas de fiebre hemorrágica y resistencia a antibióticos. Los sistemas de Salud futuros determinarán en gran parte el rol de los fármacos ”

Antezana Aranibar, F.S. Assistant Director General, WHO, Geneve. Presentación PL6.
VI World Conference on Clinical Pharmacology & Therapeutics, Buenos Aires, Aug. 1996

5. DISCUSION

Teniendo en cuenta antecedentes propios y de otros grupos, la intención de esta tesis fue iniciar una línea de investigación en el diseño de estrategias terapéuticas para atenuar o revertir neuroteratología funcional.

En los experimentos presentados se trató de diseñar las etapas de cría y administración de fármacos de tal forma como para atenuar artefactos experimentales. Por ejemplo, se trabajó con grupos experimentales integrados por individuos provenientes de distintas camadas. Spear & File (1996) recientemente alertaron a los neurobiólogos que trabajan sobre el neurodesarrollo sobre la importancia de no confundir efectos derivados de los tratamientos farmacológicos con aquellos relativos a la camada y sus particularidades.

Se realizó inducción de neuroteratogenia funcional utilizando al neuroléptico antipsicótico *Haloperidol* (HAL) y al anticonvulsivante *Difenilhidantoina* (DFH) como noxas, drogas que han repetidamente demostrado afectar el aprendizaje asociativo y la respuesta motora en modelos animales y, en algunos casos, también en humanos (ejemplos en pág. 29-36).

La actividad locomotora es usada por aproximadamente 80% de los laboratorios que realizan estudios comportamentales como parte de las rutinas de evaluación de la neurotoxicidad de compuestos farmacéuticos durante el desarrollo. Algo menor es la proporción de estudios del comportamiento espacial (Lochry et al., 1994). En esta tesis, la neuroteratogenia y la corrección funcional fueron detectadas y cuantificadas usando un paradigma comportamental (el *Test de Entrenamiento Circular*, TEC) con end point motor, el cual ya ha demostrado sensibilidad adecuada para detectar en ratas alteraciones motoras durante la preadolescencia las cuales habían sido inducidas mediante exposición a vitamina A o HAL durante la gestación. El TEC también había permitido discriminar diferencias en la respuesta funcional dependientes del sexo en animales controles y tratados (Brusés et al., 1991; Brusés, 1993; Brusés & Azcurra, 1993). El TEC tiene ciertas ventajas en cuanto a cantidad de variables analizadas automática y simultáneamente, sensibilidad, simpleza de procedimientos, etc. frente a otras alternativas como podrían ser los laberintos. En consecuencia, puede ser una alternativa como testeo funcional en estrategias terapéuticas comportamentales experimentales.

Como los animales controles (no tratados) presentaban ciertas diferencias en las respuestas motoras y espaciales dependiendo del período de maduración postnatal tardía que se elegía para realizar el testeo funcional en el TEC, el primer experimento fue diseñado para precisar esas particularidades de la maduración comportamental.

En los experimentos de esta tesis, en todos los casos la linealización de los datos y la obtención teórica de la máxima velocidad para cada grupo (V_m) confirmó los resultados de respuesta motora registrados automáticamente por el aparato de TEC durante las sesiones. En todos los casos que fue posible se estudiaron los componentes motores y espaciales durante los testeos funcionales.

En algunos casos se dispusieron animales de los distintos grupos experimentales para la realización de estudios de binding con radioligandos para detectar posibles correlaciones entre cambios neuroquímicos y alteraciones comportamentales, a distintas edades post-exposición neuroteratogénica. El principal blanco para los estudios neuroquímicos fue el núcleo estriado (NE) dado que existe acuerdo en que posee un lugar de privilegio dentro del sistema motor (Hikosaka, 1991).

Otro abordaje para alcanzar el mismo objetivo general fue tratar de utilizar el NGF como un agente modificador de la respuesta plástica muscarínica estriatal que es particular del PCE (Ibarra et al., 1995). Si durante el neurodesarrollo postnatal tardío se podía modificar con NGF la respuesta plástica del sistema estriatal a la actividad fisiológica inducida, entonces era teóricamente factible que el NE pretratado con NGF también responda distinto a la llegada de fármacos que afectan al sistema motor.

En parte de los experimentos se evaluó las diferencias asociadas al sexo, ya sea en la respuesta a neuroteratógenos como en el éxito alcanzado con las terapias farmacológicas correctoras.

En algunos experimentos de inducción prenatal de neuroteratología funcional con el neuroléptico HAL se evaluaron funcionalmente animales de aproximadamente seis meses de edad con el test de *rotarod* (TRR), luego de haber realizado un primer testeo con el TEC durante la adolescencia. La utilización de este segundo testeo perseguía 2 fines:

1. Aplicar una evaluación comportamental donde se exija que el animal haga equilibrio mientras recorre en forma transversal y en sentido opuesto al sentido de rotación una barra. Esta tarea requiere *a priori* una *coordinación motora mas fina* que la necesaria en el TEC. Hay que considerar que los animales evaluados con el TRR tenían como exigencia adicional que soportar su propio peso que promediaba los 380g. Clásicamente el TRR se aplica en animales en desarrollo (hasta 150-200g).
2. Ampliar la información y conclusiones derivadas del testeo previo con el TEC.

El test TRR ya ha sido propuesto como un testeo de elección para evaluar cuantitativamente deficiencias motoras en modelos animales experimentales. Rozas et al. (1997) concluyen que forzando al animal a correr sobre el eje en rotación a velocidades crecientes se puede cuantificar la respuesta motora en forma sencilla, objetiva y reproducible. En el modelo de terapéutica donde se aplicó esta modalidad para testear los animales el TRR permitió detectar alteraciones significativas motoras en el animal adulto, aproximadamente medio año después de los tratamientos. En estos mismos estudios la cuarta sesión incluyó el testeo de los efectos de la administración sistémica de *apomorfina* sobre los distintos grupos experimentales. Esta última intervención farmacológica persiguió dos objetivos:

1. Clásicamente se ha reportado que los desafíos farmacológicos deben ser parte de los protocolos de los modelos animales experimentales de neuroteratología funcional debido a que pueden incrementar la sensibilidad de los testeos comportamentales y la especificidad en la detección de un déficit funcional (Hannigan & Blanchard, 1988).
2. Existen antecedentes de que la administración de apomorfina a animales que previamente fueron sometidos a la exposición temprana crónica a haloperidol permite aumentar las diferencias funcionales de los grupos tratados respecto al control (Bernardi & Palermo Neto, 1983).

Pero como fue mencionado, lo primero que debíamos estudiar antes de diseñar experimentos en el campo de la neuroteratología funcional, eran los cambios en la respuesta motora y espacial que se presentan en las ratas en función de la maduración neural postnatal normal.

EXPERIMENTO ONTOGENESIS

5.1. ESTUDIO DE LA ONTOGENIA DEL APRENDIZAJE MOTOR Y ASOCIATIVO-ESPACIAL: EVALUACION SIMULTANEA CON EL TEC

La linealización de los datos de la respuesta motora en el TEC permite obtener la *velocidad máxima teórica* (V_m) como una extrapolación de la función obtenida al eje x cuando $y=0$. Esta coordenada representa el final teórico del plateau de la respuesta motora registrada en las últimas sesiones del TEC. Por otro lado, el valor de la pendiente obtenido para cada grupo experimental es directamente proporcional al progreso de las habilidades individuales para realizar la tarea de correr en una pista circular, representando así el aprendizaje de las tareas asociadas a entrenamiento en el TEC. El valor que se obtiene, el cual es inversamente proporcional al aprendizaje, es L (inversa de la pendiente) (Heyman & Beer, 1986; Brusés & Azcurra, 1993).

Para evaluar los efectos cognitivos y motores originados por la exposición a drogas durante el período perinatal, es necesario contar con estudios comportamentales que analicen, lo más objetivamente posible, los distintos aspectos afectados de la función cerebral. Un aspecto que hasta ahora no había sido estudiado era la sensibilidad del TEC para detectar cambios en el aprendizaje asociativo-espacial luego de la inducción perinatal de neuroteratogenia funcional inducida con fármacos neuroactivos.

Las clásicas alternativas para estudiar el aprendizaje asociativo-espacial son los laberintos con diversa complejidad. Los *mazes* (laberintos) son los paradigmas comportamentales de principal elección para evaluar aprendizaje asociativo en ratas (Spear & File, 1996). En nuestro laboratorio se ha descrito que animales controles entrenados en el TEC a partir de P30 tienen, aproximadamente, el mismo patrón de errores asociativos, sesión a sesión, que los observados en las sesiones de T-maze (Brusés, 1993). En las primeras 2 sesiones de entrenamiento se observa un pequeño aumento de errores/sesión y luego, se tiende asintóticamente al valor mínimo del lote de animales estudiado. Este mínimo en el TEC se alcanza entre las sesiones S4 y S5.

Por un análisis estadístico de ANOVA y testeo *a posteriori* de Tukey HSD, tomando a las distintas sesiones de cada grupo como variables a comparar de a pares, se puede mostrar que las diferencias entre sesiones dejan de ser estadísticamente significativas comparando S5 con S6 o S7. Por ejemplo, para el grupo P30, el Efecto Principal Sesión tuvo como resultado, $F(6, 147) = 54.3$, $p < 0.0001$, y la última comparación con significación estadística fue S4 vs S6 o S7, $p < 0.04$ o $p < 0.001$, mientras no hubo diferencias comparando S6 vs S5 o S7 ($p = 0.91$ y $p = 0.70$, respectiv.). Con un testeo *a posteriori* mas sensible como el Test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) parece llegar al límite de la diferencia aceptada como estadísticamente significativa la comparación entre S5 y S7, lo que sugiere que el comienzo del plateau de respuesta motora podría presentarse normalmente entre S5 y S6, dependiendo del lote de animales y el N experimental.

De este modo, en nuestro experimento y con el testeo *a posteriori* aplicado en todas las evaluaciones comportamentales de esta tesis, la respuesta motora también alcanza el plateau a partir de la sesión S5.

En acuerdo con los resultados antedichos, existen reportes que indican que a medida que el animal madura su sistema motor disminuye su máxima respuesta locomotora (Shaywitz et al., 1976), y por lo menos la actividad locomotora espontánea en el *open field* recién a partir de la quinta semana alcanzaría los valores de la respuesta adulta (Laviola et al., 1988).

En la Fig. 3 se pretendió determinar si el patrón de respuesta motora guardaba alguna covariación con el aprendizaje espacial. Por medio de un análisis de ANCOVA se encontraron coeficientes de correlación altos que indican que efectivamente el animal realiza un aprendizaje simultáneo. Sería interesante en el futuro estudiar mas profundamente esta relación viendo la posibilidad de discriminar con bloqueos farmacológicos selectivos un aprendizaje del otro. Esto podría ser útil para sacar mas provecho del TEC en estudios de desarrollo funcional del SNC normal y patológico.

Respecto a la sensibilidad del TEC para medir aprendizaje espacial, en el Exp. DFH /DFH (ver más adelante otros detalles), se observó mayor nivel de errores en los grupos tratados con DFH, ya sea en el período pre- o postnatal, con respecto al control. Este resultado guarda concordancia con los hallazgos de Vorhees (1986, 1987). Este autor estudió los errores cometidos por animales en *T-maze* luego de haber sido expuestos a DFH en un período prenatal de alta sensibilidad a esta droga.

Todos estos antecedentes sugieren que el TEC sería útil para detectar cambios en el aprendizaje asociativo por exposición temprana a fármacos neuroactivos, o agentes con propiedades neurotóxicas utilizados en la industria agropecuaria (plaguicidas, fertilizantes), y alimenticia (saborizantes, colorantes, conservadores, etc). La mayoría de estos agentes químicos a los cuales el hombre está expuesto rutinariamente no han sido sujetos aun a programas validados de evaluación de su potencialidad como neuroteratógeno funcional (ver tabla I en pág. 14). Una razón para este retraso podría ser la dificultad para ejecutar estudios funcionales múltiples, lo cual usualmente involucra cumplir con muchos requisitos (**). Los investigadores deben seleccionar un test después de analizar las propiedades de las distintas opciones y sopesar la relación costo/beneficio para cada una.

*** un relativamente alto N por grupo experimental, evaluaciones repetidas a través de diferentes paradigmas, un periodo de evaluación longitudinal relativamente extenso (meses a años, dependiendo de la especie animal utilizada como modelo experimental) diversa complejidad en los procedimientos y en el procesamiento de los registros y la interpretación de los resultados, necesidad de recursos técnicos especializados para supervisar el testeo, etc*

Considerando la facilidad de procedimientos y de procesamiento e interpretación de datos, la sensibilidad y la necesidad de un N relativamente bajo por grupo, alcanzando diferencias biológica y estadísticamente significativas con sólo 5-8 animales por grupo (ver validación en Brusés et al., 1991, 1993), los resultados aportan nuevas evidencias en favor de que el TEC es un paradigma útil para Neuroteratología Funcional y para discriminar los cambios naturales en las respuestas espaciales y motoras durante el desarrollo post-lactancia.

5.2. EVALUACION DE MARCADORES GENERALES DE NEUROTERATOLOGIA DURANTE Y DESPUES DE LOS TRATAMIENTOS

El fin último de esta tesis fue la inducción y atenuación posterior de neuroteratología funcional, en ambos casos caracterizando los cambios comportamentales y/o neuroquímicos a mediano y/o largo plazo. Una diferencia principal de este tipo de neurotoxicidad experimental con la teratología de tipo

estructural es la ausencia en la primera de cambios morfológicos macroscópicos en los niveles orgánico, sistémico y/o corporal en los animales tratados con neuroteratógenos durante los períodos perinatales de sensibilidad a los mismos. Los fármacos utilizados en esta tesis tienen antecedentes a favor y en contra respecto a su capacidad de inducir teratogenia estructural.

Para considerar esta posibilidad, antes de realizar otro tipo de determinaciones, se realizaron evaluaciones de distintos marcadores de teratología estructural o alteraciones groseras del desarrollo. Integrando todos los resultados presentados sobre evaluación de marcadores de teratología estructural hubo algunos indicios de cambios morfológicos en el NE al momento del sacrificio de los animales tratados con HAL durante el neurodesarrollo (cambios en el peso), como así también se detectaron algunos retrasos en la ganancia de peso postnatal en estos animales durante los tratamientos farmacológicos. Sin embargo, la observación de los animales tratados durante el experimento y su organización anatómica interna (para el SNC) y externa general al ser sacrificados (datos no mostrados) no fue modificada. En conclusión, como era deseado, se pudo obtener animales con signos de neuroteratología funcional (ver discusión mas adelante), en ausencia de anomalías somáticas persistentes evidentes.

5.3. INDUCCION DE NEUROTERATOLOGIA FUNCIONAL Y EVALUACION DE LA MISMA EN DISTINTOS PERIODOS DEL DESARROLLO POSTNATAL

Los hallazgos presentados en la figuras 13-15 confirman que:

1. Los efectos neuroteratológico-funcionales se producen en forma dependiente del período del neurodesarrollo expuesto al agente químico.
2. Existen varias revisiones que alertan sobre las diferencias en los hallazgos y en las conclusiones consecuentes cuando se testea un mismo grupo de animales donde se indujo neuroteratología funcional con un mismo testeo comportamental en distintos períodos del desarrollo postnatal. Por lo tanto, durante el desarrollo postnatal la detectabilidad de las alteraciones comportamentales persistentes inducidas durante la gestación o el período postnatal temprano es no sólo dependiente del

testeo aplicado sino también de las *edades que fueron seleccionadas para realizar las evaluaciones funcionales*, como fuera recientemente discutido en la revisión de Spear & File (1996).

3. Por otra parte, los resultados confirman el carácter neuroteratogénico funcional propuesto previamente en modelos animales experimentales por nuestro laboratorio y otros grupos (Brusés et al., 1991, 1993; Vorhees, 1983, 1986, 1987; Spear & Scalzo, 1986).

5.4. ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS

En los últimos 30 años se ha acumulado una cierta cantidad de trabajos en modelos animales experimentales sobre el efecto tóxico persistente de fármacos, pesticidas, metales pesados, etc. sobre el SNC en desarrollo.

A partir de la década pasada comenzaron a realizarse estudios longitudinales para evaluar si los resultados obtenidos en modelos animales eran transferibles a los hallazgos en humanos (Rogan, 1982; Werler et al., 1985; Yerby et al., 1992; Granstrom & Gaily, 1992; Maschover Reinisch et al., 1995). El diseño de estrategias terapéuticas es un campo que viene retrasado posiblemente debido al gran debate que se ha manifestado en la comunidad científica en los últimos años sobre el punto antedicho.

Respecto a las terapias propuestas en esta tesis se pueden citar unos pocos antecedentes.

1. Como un primer antecedente del efecto de fármacos neuroactivos sobre el SNC inmaduro podría citarse un trabajo de Rodríguez Echandía & Broitman (1983). Ellos expusieron ratas durante el período prenatal, postnatal temprano o en ambos períodos al antidepresivo *clorimipramina* (CI) y observaron en neonatos la presencia de teratogenia estructural y en la adultez temprana (a 2 o 4 meses de edad) la ocurrencia de alteraciones comportamentales. Los resultados indicaron que la administración postnatal de CI no sólo no prevenía la neuroteratología funcional hallada en los individuos expuestos durante la gestación, sino que en algunos casos potenciaba las alteraciones.

2. Por otro lado, Spear & File (1986) han reportado una revisión de los efectos a largo plazo sobre la rata expuesta al HAL en distintos períodos del neurodesarrollo. Estos autores integraron los

resultados de experimentos todos los cuales tenían como objetivo estudiar cambios neuroquímicos (principalmente en la densidad de receptores a dopamina del NE) y la respuesta del individuo adulto a la administración farmacológica de agonistas y antagonistas del sistema dopaminérgico luego de los bloqueos tempranos con HAL.

3. Mas recientemente, el grupo de Robinson (1996) evaluó en ratas si el retraso en el desarrollo colinérgico estriatal y las alteraciones dopaminérgicas presentes en los infantes que fueron expuestos a *metadona* durante la gestación era un efecto teratogénico directo del opiode sobre el SNC prenatal, o si las alteraciones eran una consecuencia de la abstinencia postnatal abrupta luego del nacimiento. Para esto expusieron a las ratas en el período prenatal, en el postnatal temprano o en ambos períodos, y concluyeron que en la mayoría de los marcadores colinérgicos y dopaminérgicos medidos la administración postnatal no revertía los efectos de la exposición prenatal.

No obstante, estos reportes no han enfocado el aprovechamiento de los períodos críticos de sensibilidad a fármacos para realizar terapias de neuroteratología funcional, sino que tuvieron como objetivo principal evaluar los efectos que se inducían en forma dependiente del período madurativo.

De cualquier forma, indirectamente estos reportes plantean que para las alteraciones neuroquímicas o funcionales de largo plazo, inducidas mediante la exposición prenatal a una droga neuroactiva, el período postnatal para realizar la terapia farmacológica debe ser seleccionado luego de realizar un estudio de la respuesta del SNC en distintas etapas de la maduración a partir de la lactancia.

4. Por último se puede citar un ejemplo de los trabajos del grupo de Druse. La exposición prenatal a *etanol* produce, entre otros efectos a mediano y largo plazo, alteraciones en la densidad de sitios de binding a receptores serotoninépticos y los sitios específicos de recaptación de *serotonina* en distintas áreas cerebrales sensibles a dicho neuroteratógeno. El grupo de Druse encontró que la administración prenatal de *bupiriona* prevenía la aparición postnatal de las alteraciones neuroquímicas asociadas a la exposición prenatal a *etanol* (Kim et al., 1997). Aunque este es de alguna forma un reporte de reversión de una alteración neuroquímica inducida durante la gestación -que podría estar asociada a cambios comportamentales persistentes- presenta una diferencia substancial con las alternativas terapéuticas propuestas en esta tesis: aquellos resultados corresponden a una terapia

paralela a la exposición neurotóxica, lo cual eventualmente impediría realizar una etapa diagnóstica y pronóstica que generalmente permite prescribir un tratamiento más específico.

Los experimentos de esta tesis presentan estrategias terapéuticas abordadas en el periodo postnatal temprano o tardío, suponiendo que, si fuera el caso en humanos, el efecto prenatal o neonatal de neuroteratógenos podría ser detectado y las consecuencias funcionales diagnosticadas y cuantificadas antes de finalizar la lactancia. Se podría operar entonces con terapias sobre la plasticidad postnatal tardía.

Considerando la bibliografía accesible por internet a través de los servicios clásicos (MEDLINE; PUBMED) sólo es posible encontrar un reporte que concretamente presenta una alternativa terapéutica postnatal para neuroteratología funcional. Yanai et al. (1996) revirtieron las alteraciones neuroquímicas y comportamentales inducidas (principalmente sobre la vía colinérgica septohipocampal) mediante la exposición prenatal a *heroína* o *fenobarbital*, transplantando neuronas colinérgicas fetales al hipocampo previamente afectado. Esta alternativa terapéutica quirúrgica, sería la única prueba experimental que puede ser encontrada en la bibliografía previa a las presentadas en esta tesis.

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 1

5.4.1. CORRECCION DE UNA NEUROTERATOLOGIA MOTORA INDUCIDA CON HALOPERIDOL DURANTE LA LACTANCIA

Exp. HAL/DEP

Mientras los animales deprivados (grupo DEP) no tuvieron diferencias significativas en los estudios comportamentales y neuroquímicos con respecto al grupo control C, el grupo tratado con HAL durante la lactancia sí presentó alteraciones motoras y espaciales junto a aumento en la densidad de sitios estriatales aparentes D2Rs en P90, los cuales pudieron ser corregidos con deprivación lo cual fue realizado en el grupo HALDEP (ver Fig. 8-12). No hubo diferencias entre los hallazgos de hembras y machos.

Respecto al aumento inicial de la respuesta motora en el grupo DEP existen antecedentes que el aislamiento físico y social causa diferentes cambios en el comportamiento como ser aumento de la actividad en el campo abierto ("*open field*") y otros paradigmas para la evaluación del comportamiento motor, alteración de las relaciones interindividuales, disminución de la exploración directa, entre otros (DaVanzo & Sydow, 1979; Hilakivi et al., 1989; Gentsch et al., 1982, 1983).

A priori podría interpretarse una oposición parcial de estos resultados a los de los otros autores mencionados. Debe considerarse que además de las distintas funciones neurales involucradas en el open field (y otros testeos de actividad locomotora espontánea) y en el TEC, los registros de respuesta motora en diferentes paradigmas experimentales son algunas veces contradictorios dado que estas respuestas dependen de la dosis y la vía de administración de la droga, las condiciones de aislamiento (ya sea físico o social), la duración de la exposición a la droga, el período del neurodesarrollo tratado, la especie animal, la edad al momento de la evaluación comportamental, la calidad del estrés asociado con el testeo funcional, etc.

En consecuencia, todas estas variables afectan el resultado final de este tipo de experimentos y no pueden ser excluidas del análisis e interpretación de los mismos. Por ejemplo, Barron et al. han reportado que mientras la droga canabinoide cocaína ha sido asociada con la producción de hiperactividad en el testeo en open field (Barron & Irvine, 1995), en un testeo de 30 min en una rueda giratoria la actividad locomotora de los animales tratados con el mismo agente fue similar a la de los controles (Barron et al., 1994).

No obstante, no existieron diferencias en las consecuencias del tratamiento de privación social-ambiental de este experimento (mayor actividad motora en el grupo DEP estadísticamente significativa en la sesión S₁) y la hiperactividad locomotora -en testeo de sesión única o pocas sesiones- reportada por el grupo de Gentsch (1982, 1983) y otros (Hilakivi et al., 1989).

Discusiones sobre la variabilidad de las consecuencias detectadas postnatalmente luego de la exposición temprana a neuroteratogenos (en particular *haloperidol*) según el diseño experimental seleccionado han sido ya publicadas (Spear & Scalzo, 1986; Spear & File, 1996).

Bajo una simplificación de los resultados, si la privación no hubiera interferido las consecuencias de la exposición temprana a HAL, el grupo HALDEP se habría comportado como el HAL.

Revisando la bibliografía existente sobre efectos del HAL sobre la neuroquímica y la función nerviosa de animales inmaduros y de adultos, se puede hallar una interpretación teórica a estos hallazgos.

La exposición postnatal temprana al HAL produce cambios de largo plazo como ser aumento de sitios aparentes D2Rs (detectable luego de meses) en el NE de rata (Rosengarten & Friedhoff, 1979; Spear & Scalzo, 1986; Miller & Friedhoff, 1988). El HAL afecta la atención, el comportamiento en el test de evitación pasiva, la habilidad espacial en el Y-maze y la actividad locomotora en el open field en forma dependiente de dosis (Kovacs & de Wied, 1978; Oades et al., 1985; Brockel & Fowler, 1995). En animales adultos estos hallazgos son reversibles con el tiempo (en el término de días a pocas semanas después de la exposición al HAL) (Spear & Scalzo, 1986).

Blanc et al. (1980) reportaron que el aislamiento disminuía la actividad dopaminérgica mesocorticofrontal que se expresaba como una baja relación DOPAC/DA en el cortex frontal, pero la situación era distinta (y casi opuesta) en el NE y en el núcleo acumbens (NA).

Bean & Lee (1991) también demostraron que los infantes de rata sometidos a condiciones de aislamiento crónico (meses) disminuían la expresión estriatal de D2Rs, y Rosengarten & Friedhoff (1979) encontraron en P35 el efecto opuesto exponiendo ratas a HAL durante la lactancia. Además, el bloqueo de los receptores D2Rs produce supersensibilidad dopaminérgica, un aumento posterior de la actividad de las neuronas colinérgicas estriatales y del turnover de acetilcolina (Ach) (Muller & Seeman, 1978; Dewey et al., 1990; Russi et al., 1993).

Ciertamente, en el caso del bloqueo por vía icv. con HAL se encuentra que el NE es el principal blanco del SNC para la acción de aumento de la síntesis de Ach (Buccafusco, 1982). Este hallazgo sugiere que en los resultados de este experimento y el siguiente (ver en Exp. HAL/HAL) las respuestas funcionales de cada uno de los grupos experimentales podría ser debidos en gran parte a cambios neuroquímicos en el NE.

Mas precisamente, los cambios funcionales persistentes del sistema motor inducidos por exposición temprana a drogas estaría en muchos casos relacionados a efectos neuroquímicos sobre el sistema dopaminérgico nigroestriatal en desarrollo. En este sentido, Middaugh & Zemp (1985) sugirieron que existen pruebas suficientes para relacionar a la exposición prenatal a *metadona*, *anfetamina* o *fenobarbital* con alteraciones motoras permanentes, produciéndose la neuroteratología funcional a través de modificaciones del patrón de desarrollo dopaminérgico normal.

Otras modificaciones del sistema colinérgico estriatal inducidas por bloqueantes del sistema dopaminérgico incluye la disminución del binding al antagonista muscarínico [N-¹¹C-metil]-benztropina hallada luego de la administración del antagonista de sitios D2Rs N-metil-spiperona, debido a probables respuestas compensatorias frente a un nivel endógeno más alto en la concentración de Ach (Inqvar et al., 1993).

Para una evaluación adicional del comportamiento de los animales tratados se estudiaron los errores en la elección del sentido de giro durante las sesiones del TEC, como un marcador representativo del aprendizaje asociativo-espacial.

La sesión S₁ del TEC es cuando el animal tendría el primer día de aprendizaje espacial sin ayuda en toda la sesión. Para evitar la variabilidad biológica asociada a la fatiga fisiológica durante el desarrollo del TEC, que podría ser más prominente en los animales deprivados (grupos DEP y HALDEP), se registraron los errores sólo en los primeros 5 min de las sesiones evaluadas.

Con los datos actuales es imposible definir si el HAL afectó directamente el aprendizaje espacial, o si el aumento de la respuesta motora (+28% en Vm del grupo HAL con respecto al grupo control) actuó como una interferencia para la adquisición del aprendizaje espacial asociado al TEC.

Teniendo en cuenta que el grupo HALDEP no mostró diferencias significativas en la respuesta espacial con respecto al C (para ninguna de las dos formas en que se registraron los errores), y que presentó una corrección del comportamiento motor alterado previamente por la HAL (todo esto evaluado simultáneamente), se podría argumentar en favor de la hipótesis de la hiperactividad como correlacionada al déficit espacial. Además, la correlación hallada en animales no tratados entrenados en el TEC a la misma edad que la seleccionada en este Exp. indica que alteraciones de la respuesta motora podría afectar el procesamiento de señales necesario para responder normalmente al desafío espacial (ver Fig. 3). No obstante, se ha reportado que habrían cambios funcionales en el sistema dopaminérgico que se correlacionan con síndromes cognitivos (Beninger, 1989; Murphy et al., 1996), y Cuomo (1981) demostró que dos meses después de la exposición temprana a HAL se hallaba un deterioro en la habilidad para presionar una palanca en el marco de un condicionamiento asociativo.

Estos resultados confirman trabajos preliminares de nuestro laboratorio y otros indicando que el tratamiento postnatal temprano con HAL produce cambios persistentes en la respuesta funcional los cuales pueden ser discriminados como mínimo hasta varias semanas después del bloqueo de la neurotransmisión dopaminérgica (Spear & Scalzo, 1986; Cuomo et al., 1987; Brusés, 1993).

Es conocido desde hace mas de 20 años que la especificidad en la interacción entre neurolépticos y otras drogas con el sistema de receptores a dopamina determina las propiedades farmacológicas y la eficacia clínica de estos agentes, y el tratamiento prolongado con drogas antipsicóticas incrementa el turnover de DA, lo cual podría ser un mecanismo compensatorio al bloqueo de neuroreceptores DARs centrales por el neuroléptico (Ljunberg & Ungerstedt, 1979; Creese et al., 1976). Al suspender estos tratamientos, permanece un aumento de D2Rs que es transitorio si los expuestos fueron adultos, y es persistente (tal vez permanente) si la exposición farmacológica se realizó durante la lactancia (Rosengarten & Friedhoff, 1979; Spear & Scalzo, 1986).

Los resultados neuroquímicos de este Exp. (ausencia de cambios en la densidad de receptores D2r en grupos tratados DEP y HALDEP con respecto al control) no se concilian directamente con los previamente citados, aunque si se encontró un aumento en los sitios a (³H)SPI en NE y en el CER de los animales del grupo HAL en el límite de la significación estadística ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente).

Sin embargo, en el mismo trabajo de Rosengarten & Friedhoff se reporta que el contacto prenatal con HAL produce una caída de sitios aparentes D2Rs, lo cual fue determinado a diferentes edades del desarrollo postnatal (de P21 a P60) luego de la exposición temprana al HAL, y una tendencia clara a una disminución gradual de esta diferencia con los animales controles fue evidente cuando los animales tratados eran sacrificados para el ensayo de binding al final del desarrollo postnatal (Rosengarten & Friedhoff, 1979).

Además, el efecto del aislamiento sobre la relación DOPAC/DOPA reportado por Blanc et al. (1980) en el cortex frontal, el NE y el NA fue parcialmente reversible con el tiempo. Reuniendo estos antecedentes y los resultados de este Exp. se puede concluir que las alteraciones inducidas por exposición prenatal ó postnatal temprana a HAL y los cambios que pudiera inducir el aislamiento social y ambiental podrían ser parcialmente o totalmente compensados por la plasticidad de los sistemas dependientes de DA en el SNC inmaduro. Ciertamente, existe acuerdo en que el sistema

dopaminérgico nigroestriatal poseería alta plasticidad y capacidad de compensación de déficits funcionales originados a nivel perinatal por lo cual las consecuencias de la exposición temprana a agentes activos en este sistema es detectable de acuerdo al área y la edad en que se evalúa el cambio neuroquímico (Hornyiewicz, 1985; Prosser et al., 1988), lo cual estaría de acuerdo con la dificultad para encontrar mayor significación estadística en los cambios en receptores dopaminérgicos en el NE del adulto luego de los tratamientos incluidos en este exp. (algo similar ocurrió en el experimento HAL/HAL).

Aparte, un rol plástico del HAL en el remodelamiento sináptico ha sido reportado (Klinzova et al., 1990). Castro et al. (1994), más concretamente, reportó que la exposición prenatal a HAL produce cambios persistentes en la modulación postnatal de la expresión de genes relacionados a la plasticidad. No obstante no se ha estudiado aun lo que ocurriría luego de la administración postnatal temprana.

Finalmente, existe un reporte que ya había sugerido indirectamente que las condiciones ambientales de cría podían ser moduladas para revertir respuestas farmacológicas a la exposición a drogas que actúan sobre el sistema dopaminérgico y que las consecuencias de la manipulación del ambiente podía interactuar con los efectos de la administración de HAL, aunque no fue el interés del trabajo presentar una terapéutica para neuroteratología funcional (Zis et al., 1974).

Es evidente que hará falta mas investigación sobre la respuesta plástica del sistema dopaminérgico estriatal a las manipulaciones físicas, químicas y sociales. Independientemente de estos estudios futuros, los resultados indican que la deprivación social-ambiental modifica respuestas comportamentales inducidas originalmente por acción de drogas sobre el SNC inmaduro. También agrega soporte a la postulación pionera de Young (1964) que la interacción de factores farmacológicos y ambientales durante la vida temprana determina cambios de largo plazo en el comportamiento (motor o cognitivo según el caso).

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 2

5.4.2. CORRECCION DE NEUROTERTOLOGIA MOTORA INDUCIDA CON HALOPERIDOL DURANTE LA GESTACION

Exp. HAL/HAL

Entre los agentes químicos demostrados como potencialmente peligrosos para el neurodesarrollo se encuentran drogas ampliamente usadas en la práctica clínica como el *Haloperidol* (HAL, ver clasificación farmacológica y aplicación clínica en Goodman & Gilman, 1990). Existe cierto acuerdo que el HAL, en las dosis, vías y períodos utilizados en la experiencia clínica humana de los últimos años difícilmente induciría neuroteratología estructural ya sea en modelos animales o en humanos (Briggs et al., 1998). Pero a juzgar por las evidencias de las investigaciones en modelos animales experimentales esta droga sería un neuroteratógeno funcional.

Diferentes autores han mostrado que la administración crónica de este bloqueante de receptores a dopamina tipo D2 (D2Rs) durante la vida postnatal temprana induce luego cambios persistentes en la ganancia de peso corporal, en el comportamiento motor y en la expresión de neurotransmisores y neuroreceptores centrales (Cuomo et al., 1981, 1983; Cuomo, 1987; Rosengarten & Friedhoff, 1979; Brusés et al., 1991). Como ejemplo de alteración funcional persistente se pueden citar la inducción de comportamiento estereotipado (Rosengarten & Friedhoff, 1979; Cuomo, 1983), y la reducción de la actividad locomotora espontánea y el deterioro de la etapa de adquisición de un condicionamiento por refuerzo diferencial de tipo "low-rate task" (protocolo DRL-15s) casi 2 meses luego de la exposición a HAL durante la lactancia (Cuomo et al., 1981).

Notablemente, los efectos neuroteratogénicos comportamentales inducidos por exposición temprana a HAL hallados en modelos animales son fuertemente dependientes del *período de tratamiento*. HAL induce incremento o descenso de largo plazo en la expresión de sitios de binding a receptores D2Rs dependiendo de si la exposición fue prenatal o postnatal temprana, respectivamente (Rosengarten &

Friedhoff, 1979; Spear & Scalzo, 1986). También se ha reportado alteraciones funcionales de largo plazo y opuestas en forma dependiente del período de exposición temprana a HAL (Cuomo et al., 1985). En paralelo a estos hallazgos nuestro laboratorio encontró previamente un déficit motor o leves oscilaciones sobre los valores controles en el TEC testeando animales entre P30-37 los cuales fueron expuestos a HAL durante la gestación o la lactancia, respectivamente (Brusés et al., 1991; Brusés, 1993; Brusés & Azcurra, 1993). Además, ya fue descrito que entrenando animales no tratados a distintas edades entre P20 y P60 en el TEC, se evidencia un período crítico estriatal (PCE) de plasticidad dependiente de actividad restringido en P30-37. La inducción de actividad motora durante el PCE produce cambios permanentes en receptores estriatales mAChRs y D2Rs (Ibarra et al., 1995; Azcurra et al., 1995; Ibarra et al., 1996).

Focalizando sobre aquellos cambios neuroquímicos y funcionales persistentes dependientes de período de exposición, diseñamos una estrategia farmacoterapéutica para neuroteratología funcional. De este modo, estudiamos si la neuroteratología motora inducida prenatalmente a través de la administración de HAL podía ser atenuada por una farmacoterapia con HAL aplicada durante la lactancia.

Considerando que existían leves diferencias dependientes del sexo en la caída permanente de neuroreceptores estriatales luego del entrenamiento motor durante el PCE (Ibarra et al., 1995; 1996), nos preguntamos si los resultados de la terapéutica con HAL dependerían o no de la modulación por factores hormonales asociados a la maduración sexual. Existe acuerdo en la presencia de modulación hormonal de procesos biológicos neurales propios de la maduración postnatal. Por ejemplo, en hembras la tasa de muerte neuronal programada postnatal temprana del ganglio cervical superior es mas alta que en machos. Esto podría ser planteado también para otras áreas neurales (Diana et al., 1993). De mayor interés para la terapéutica de neuroteratología funcional con HAL es que Arenas et al. (1995) encontraron que en ratón adulto, habría sensibilidad farmacológica diferencial para el HAL en cada sexo, relacionándolo a posibles dimorfismos sexuales en la modulación hormonal de los mecanismos de aprendizaje. Además, Ferretti et al. (1992) reportaron que el estradiol afecta la ontogénesis postnatal de los receptores dopaminérgicos estriatales tipo D1 y D2, con ciertos efectos diferenciales para machos y hembras, y ya se han planteado diferencias en las edades críticas para la

acción de las hormonas sexuales femeninas sobre el sistema dopaminérgico durante el neurodesarrollo (Fujii & Ikeda, 1982).

Estos antecedentes indicaban *a priori* la presencia de dimorfismo sexual para la probabilidad de detección de neuroteratogenia funcional luego de exposición temprana a HAL, y para la eficacia del HAL como agente corrector de la anterior. En los resultados de este experimento no se detectaron diferencias asociadas a sexo en las respuestas de los grupos tratados respecto a los controles respectivos en el TEC. Tampoco el grado de corrección funcional alcanzado en los animales tratados con HAL en ambos períodos dependió del sexo (comparar machos y hembras en Fig. 16-17).

Pese al tiempo transcurrido desde la publicación de los trabajos del grupo de Friedhoff sobre la dependencia de período para los efectos neuroquímicos y comportamentales producidos por exposición temprana a HAL, todavía no ha aparecido una explicación integral a que hace que las neuronas estriatales respondan a largo plazo de tal diferente forma en distintos períodos.

Se ha propuesto que la inmadurez puede hacer que el HAL provoque una acción farmacológica inhibitoria de la maduración dopaminérgica nigroestriatal especialmente cuando la exposición prenatal también abarca la última semana donde comienzan a llegar al NE las prolongaciones dopaminérgicas nigrales (Rosengarten & Friedhoff, 1979).

Por otra parte, hay que considerar que la neurogénesis estriatal se dispara al comienzo de la segunda mitad de la gestación, y que existen reportes sobre producción de muerte neuronal, inhibición de la mitosis en NE y deficiencia en la expresión de genes relacionados a la plasticidad temprana por exposición neurotóxica a neurolépticos como el HAL (Nielsen & Lyon, 1978; Castro et al., 1994). Es posible hipotetizar que, si sería aditiva la muerte prenatal por neurotoxicidad y la muerte apoptótica que normalmente se produce durante el desarrollo postnatal temprano, el NE de los animales del grupo HAL/S poseerían menos neuronas (gabaérgicas y/o interneuronas colinérgicas), lo cual a su vez podría repercutir en las capacidades estriatales de aprendizaje motor, como aquel necesario para cumplir normalmente con las tareas asociadas al TEC. Se podría anticipar también que una menor densidad neuronal estriatal podría luego representar en el individuo maduro un desvío del balance normal entre los mecanismos inhibitorios gabaérgicos estriatonigrales y los dopaminérgicos nigroestriatales.

En el grupo HAL/HAL, la exposición postnatal no pudo haber afectado la neurogénesis estriatal o nigral porque estos eventos son casi exclusivamente prenatales. Teóricamente, si pudo haber afectado el programa de apoptosis y la maduración fenotípica nigroestriatal (esta última hacia el final de la primera semana de vida se encontraría recién en un 15-30% de su desarrollo) (Coyle & Campochiaro, 1976).

A priori, a nivel postnatal es mas probable que el HAL bloquee y afecte el sistema dopaminérgico en una forma mas cercana al caso de la exposición y los efectos farmacológicos adultos. Esto incluye un aumento de los sitios aparentes D2Rs estriatales, una supersensibilidad dopaminérgica durante el tratamiento prolongado, y los otros efectos citados previamente (ver también discusión del Exp. HAL/DEP).

Como un correlato neuroquímico se seleccionó al receptor D2R dado que es un marcador clásico del estado del sistema motor ya sea en condiciones fisiológicas o patológicas.

Se determinó los niveles de expresión de D2R en el NE de machos en P90 porque en esta etapa de la vida de la rata, considerada adultez temprana, los cambios hallados significarían *alteraciones de tipo permanente*, lo cual confirmaría que *la exposición temprana a HAL fue neuroteratogénica*. Como en el TEC en animales no tratados la actividad funcional circular podría inducir cambios asimétricos en NE como sería el caso para la activación de TH (Yamamoto & Freed, 1982, 1984; Morgan et al., 1984), y no sabíamos *a priori* si estos cambios podían ser persistentes **, los procedimientos de disección y homogenización de los estriados se realizó manteniendo separadas las hemipartes izquierda y derecha.

Aunque los cambios encontrados fueron en parte análogos a los reportados por Rosengarten & Friedhoff (1979), en NE sólo se detectó un cambio (aumento) estadísticamente significativo de la concentración de sitios D2Rs en los animales expuestos a HAL durante la lactancia respecto a los controles (ver Fig. 18, para NEI y NED, $p < 0.04$ y $p < 0.09$, respectivamente). Como resultado no previsto, según la bibliografía clásica existente al respecto, en el CER aparecieron cambios dependientes del período de exposición a HAL siguiendo notablemente las mismas direcciones de

** considerando que los animales fueron entrenados en el PCE que afecta en forma persistente la densidad de sitios aparentes D2Rs

cambio vistas en el NE (Fig. 18, para grupo HAL/S, $p < 0.03$, para grupo S/HAL, $p < 0.04$, siempre con respecto al grupo C). También en el CER el grupo HAL/HAL presentó una densidad de D2Rs similar al grupo control. Los efectos neuroquímicos antedichos fueron derivados de las consecuencias de los tratamientos pre- o post-natales y no de la interacción de los mismos (para el efecto Interacción, $p = 0.35$).

En relación a estos últimos hallazgos, hasta hace pocos años se reportaba una relativamente pobre densidad de receptores dopaminérgicos y se buscaban roles funcionales de este sistema de neurotransmisión en el cerebelo, sin éxito.

En la actualidad se ha encontrado que también estarían representados en el cerebelo los receptores a dopamina de tipo D3 los cuales podrían tener un rol funcional, al estar involucrados en la respuesta locomotora, dado que la microinyección local de HAL en lóbulos del cerebelo adulto ricos en D3 y pobres en D2 ha demostrado afectar la actividad locomotora (Barik & Beaurepaire, 1996). De este modo, es posible sugerir que en la acción del HAL en los grupos tratados en uno u otro período y en el corregido el CER podría ser, además del NE, otro blanco de alteraciones dopaminérgicas afectando en el largo plazo post-exposición la respuesta locomotora en el TEC.

Desde hace décadas se reconoce que drogas antipsicóticas incrementan el turnover de DA y el número de D2Rs, lo cual probablemente representa una parte de las respuestas compensatorias al bloqueo de largo plazo de DARs centrales por antagonistas de tipo D2R. Otros hallazgos previos sobre los mecanismos compensatorios del sistema dopaminérgico durante el neurodesarrollo fueron abordados en la discusión de los resultados neuroquímicos del Exp. HAL/DEP (ver pág. 118-119).

En consecuencia, es posible hipotetizar que en los hallazgos funcionales y neuroquímicos persistentes de este experimento se ponen de manifiesto cambios en los niveles endógenos de Ach y DA y probables respuestas compensatorias propias del sistema motor inmaduro.

Finalmente, los reportes de otros autores y este experimento acuerdan que:

1. La exposición perinatal a HAL puede producir cambios persistentes de conducta.
2. Los cambios son críticamente dependientes del período expuesto.

3. Los cambios pueden ser tanto neuroquímicos como funcionales.
4. En algunos casos estos cambios pueden ser discriminados en la rata semanas o meses después de finalizar el contacto con el HAL, lo cual sugiere que podrían ser de tipo permanente.
- 5. La sensibilidad particular de distintas etapas del neurodesarrollo pueden ser aprovechadas con el fin de diseñar estrategias terapéuticas para neuroteratología funcional.**
6. Los procesos de modelamiento sináptico dependientes de actividad juegan un rol significativo en la maduración de las conexiones neuronales adultas durante el desarrollo del SNC, como es también el caso para el sistema motor. **La combinación de intervenciones farmacológicas y ambientales apropiadas podría proveer la actividad neural apropiada en los circuitos motores involucrados en las tareas realizadas en el TEC.**

Lo antedicho, tuvo en el Exp. HAL/HAL el potencial para modificar (mas precisamente, recuperar o compensar) patrones de redes sinápticas alterados tempranamente en forma dependiente del agente farmacológico seleccionado como corrector.

ESTRATEGIA TERAPEUTICA 3

5.4.3. CORRECCION DE UN DEFICIT ESPACIAL INDUCIDO CON DIFENILHIDANTOINA DURANTE LA GESTACION

EXP. DFH/DFH

La pregunta original que se quiso responder con este experimento fue:

Se puede realizar con DFH la misma estrategia experimental que la utilizada en el Exp. HAL y tener éxito en la corrección farmacológica de una alteración de conducta originada en la exposición in utero a la misma droga ?

A partir del éxito alcanzado en la corrección con HAL, creímos necesario validar el modelo animal de inducción y terapia de neuroteratología funcional aplicando otro agente químico. Si encontrábamos un agente neuroactivo que produzca cambios neuroquímicos y/o funcionales opuestos en distintos periodos del neurodesarrollo temprano, actuando a través de los mismos o distintos mecanismos que el HAL, podríamos sugerir que el modelo experimental propuesto era útil para un amplio espectro de disfunciones funcionales de origen temprano.

Los criterios de selección del agente inductor de neuroteratogenia a probar era que:

- Exista suficiente bibliografía sobre su carácter neuroteratogénico funcional en humanos, lo cual asignaría una prioridad respecto a la transferencia de los resultados a la salud pública
- Que los cambios comportamentales inducidos con el agente teratógeno o el corrector sean cuantificables con la mayor precisión posible con el testeo funcional que teníamos experiencia, el TEC

Así fue que seleccionamos al anticonvulsivante DFH. Esta droga cumplía con los requisitos enunciados

1. La población humana expuesta durante la gestación a DFH presenta un coeficiente intelectual IQ medio 2 SD menor al de la población control respectiva, entre otros hallazgos de déficit cognitivo persistente reportado hasta el presente (Granstrom & Gaily, 1992; Yerby et al., 1992; 1996; 1997).
2. En modelos animales, la DFH produce alteraciones cuantificables en una gran parte de los tests validados para evaluar el carácter neuroteratogénico de nuevos y viejos agentes de consumo humano, incluyendo tests motores y asociativos en *open field*, *running wheel*, *rotarod*, *T-maze*, *water maze*, etc. (ver efectos y referencias presentadas en páginas 29-37).
3. Como se muestra en la Fig. 19, la exposición durante la gestación o la lactancia a DFH induce neuroteratología motora evidenciada como aumento de la respuesta motora y de los errores espaciales en el TEC realizado en el período P40-47.

Además, a partir de un relevamiento de la bibliografía existente en cuanto a la sensibilidad perinatal a la DFH, seleccionamos los periodos prenatal G13-20 y postnatal temprano P13-23 como factibles de ser utilizados en un diseño experimental alternativo al del Exp.HAL/HAL. Galaguer & Mallorga (1980) obtuvieron respuestas neuroquímicas opuestas (en el N° de sitios benzodiazepínicos de binding

específico al (^{3H})Diazepam) en el mediano plazo, según se aplicara la DPH pre- o postnatalmente en los antedichos períodos. A su vez, en un capítulo de un libro dedicado al estudio de los efectos de la administración prenatal de anticonvulsivos (incluyendo las hidantoínas), se comunicó en 1986 que la aplicación de DFH prenatal producía hiperactividad locomotora en un circuito en 8 (testeo en "eight figure") y aumento de los errores en un laberinto en T ("T-maze"), con distinta significación estadística de acuerdo al subperíodo prenatal afectado (Vorhees, 1986).

Frente a la hipótesis de que el cambio neuroquímico en receptores reportado por Gallaguer precedería algún cambio funcional, considerando que los ajustes plásticos de los circuitos inhibitorios recién maduran hacia la cuarta semana de vida postnatal (Coyle & Campochiaro, 1976; Coyle & Enna, 1976; Spear & Scalzo, 1986) probamos el efecto de la DFH como corrector postnatal de la neuroteratología motora-asociativa inducida prenatalmente.

En trabajos preliminares también testeamos el efecto de DFH postnatal cuando administrada durante dos períodos postnatales más tardíos que el usado por Gallaguer & Mallorga: P18-28 y P25-35, en los cuales las consecuencias funcionales no diferían de las presentadas para el período P13-23 (datos no mostrados).

Como se muestra en las Fig. 19-20, la exposición a DHF ya sea prenatal o postnatal temprana induce distintos grados de hiperactividad en el testeo con TEC a la edad P40. Este hecho presentaba claras diferencias con el efecto de la exposición a HAL, el cual dependía críticamente del período de neurodesarrollo (ver Fig. 13-15). Pero dado que no debía tenerse como prejuicio una linealidad total en las combinaciones [*Tratamiento Neuroteratogénico Prenatal + Tratamiento Corrector Postnatal*], decidimos poner a prueba un esquema postnatal de atenuación con DFH de neuroteratología funcional prenatal inducida con DFH.

Como puede observarse en las Fig. 20, la administración postnatal de DFH no solo no corrigió la hiperactividad motora inducida con DFH durante la gestación sino que en algunos casos la potenció. Esto pudo detectarse ya sea en el TEC realizado en la adolescencia temprana (P40-47) como también en un segundo entrenamiento en el TEC en la adultez (P180-183, ver Fig. 23).

El análisis de los resultados de la respuesta motora de los grupos experimentales de este exp. permite entonces adelantar que el éxito terapéutico alcanzado en el Exp. HAL/HAL no es *a priori* directamente transferible a otros casos de drogas que producen respuestas neuroquímicas y/o comportamentales en forma dependiente de período de exposición

Pero pese al aparente fracaso en la corrección de la hiperactividad motora, y como un hecho notable, otra fue la situación con el registro de los errores asociativo-espaciales en la elección del sentido de giro durante las sesiones del TEC.

En los dos testeos antedichos, y por las dos formas en que se registraron los errores espaciales en el TEC, los grupos tratados con DFH en uno u otro período perinatal fueron deficitarios en su aprendizaje espacial mientras el grupo tratado con DFH en ambos períodos presentó una atenuación casi total de este déficit comportamental (ver Fig. 22-24). Es interesante que cuando se analizó la actividad motora como vueltas totales, correctas +incorrectas, por sesión en el segundo testeo en TEC ya no se evidenció una diferencia significativa con el grupo C (comparar la hiperactividad del grupo DFH/DFH respecto al control C en Fig. 20 y 23, y la atenuación de la misma cuando evaluada como actividad locomotora total en Fig. 23.B).

Este hallazgo puede ser explicado analizando los parámetros que se grafican en cada caso.

Mientras en las Fig. 20 y 23 lo que se registró automáticamente fue las velocidades (como vueltas correctas/min/ sesión) en el caso de la Fig. 23.B. se presenta el desplazamiento total de la rata durante las sesiones del segundo TEC. Con esta última forma de evaluar la actividad motora, se incluye las vueltas incorrectas que en el grupo DFH/DFH fueron menores que en los grupos DFH/S o S/DFH, como fue mostrado en Fig. 22 y 24). En consecuencia, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo C y el corregido DFH/DFH en la Fig. 23.B confirma la atenuación de las alteraciones espaciales inducidas con DFH durante el neurodesarrollo.

Según los procedimientos seguidos en la evaluación con el TEC, cada sesión tiene 2 criterios de finalización:

tiempo (30´) vueltas (100 o 150 según sesión)

por lo tanto si el animal sufre una hiperactividad motora que le disminuye la capacidad de atención a las señales ambientales e internas necesarias para elegir la dirección de giro correcta, en el tiempo evaluado haría una mayor cantidad de errores de tipo I en forma independiente de la hiperactividad y del tipo II en forma dependiente de la hiperactividad. Esta sería la consecuencia directa del registro de vueltas acumuladas incorrectas por sesión, después que un animal que se dispara hacia un blanco con hiperactividad motora se desplazar un recorrido mayor que un animal control hasta adquirir la señal de inaccesibilidad de la recompensa buscada.

En cambio, en el registro del error de tipo I, hay menor incidencia de la actividad motora sobre el instante en que el animal elige el sentido de giro. Por lo tanto, los hallazgos en estos últimos registros son mas representativos de la respuesta espacial manifestada en el TEC.

No debe descartarse el efecto secundario de la hiperactividad superpuesto al deterioro de la respuesta espacial inducido en los grupos S/DFH o DFH/S en el registro del error, como fue discutido para el Exp. HALDEP (pág. 117). En estos grupos hubo animales que comenzaron la sesión de TEC con casi doble de velocidad (tomando intervalos de 2 minutos en los primeros 4 min, datos no mostrados), que los controles, alcanzando registros de hasta 18-22 vueltas/min.

Otra aproximación para interpretar la disociación entre el fracaso en la corrección motora y el éxito en la corrección espacial es considerar que los circuitos neurales involucrados con la respuesta motora y asociativa son ciertamente distintos, lo cual no implica obligatoriamente que la lesión neuroquímica de uno no afecte la respuesta funcional del otro.

La función asociativa-espacial ha recaído según la bibliografía especializada en el Hipocampo, y las habilidades motoras y el aprendizaje procedural están directamente organizados en el NE.

Considerando este tipo de compartimentalización funcional no es raro el hallazgo de efectos sobre el sistema motor en un sentido y sobre el procesamiento de señales espaciales en otro. Por otra parte, aunque el NE ha sido largamente indicado como pieza clave del sistema motor, también está involucrado en otras respuestas conductuales (Hikosaka, 1991; Calabresi et al., 1996). Además, el efecto de la DFH debe ser explicado luego de considerar todos los caminos neuroquímicos activados en las neuronas blanco que directa o indirectamente puedan afectar el output motor.

Hasta aquí, sólo se puede concluir que el hallazgo de una reversión de un déficit espacial sin una concomitante atenuación de una alteración motora abre la posibilidad de diseñar politerapias que en forma integral sí puedan corregir una deficiencia polifuncional originada durante el neurodesarrollo perinatal por exposición a neuroteratógenos

Los resultados alcanzados con la estrategia de corrección farmacológica con HAL y DFH representan un ejemplo de las condiciones biológicas y experimentales que se deben considerar al diseñar una terapia para neuroteratología funcional.

En síntesis, estos diseños deberían incluir varias etapas:

- a) Cuantificación del éxito en la corrección terapéutica
- b) Evaluación si la corrección fue parcial o total
- c) Testeo comportamental y neuroquímico, en distintos períodos postnatales, incluyendo la adultez, para definir más precisamente la calidad de la corrección
- d) Estudio de dosis respuesta para evaluar cual es la menor dosis de agente corrector que produce la recuperación funcional buscada. Este ítem está estrechamente ligado a los estudios de efectos colaterales derivados del uso del agente corrector que serían realizados en una última etapa y no fue abordado en esta tesis.

5.4.4. MODULACION DE LA PLASTICIDAD ESTRIATAL

MODELO EXPERIMENTAL UTILIZADO

MODIFICACION DEL PERIODO CRITICO DE SENSIBILIDAD MUSCARINICA ESTRIATAL DEPENDIENTE DE ACTIVIDAD FISIOLÓGICA INDUCIDA

ANTECEDENTES DE LOS EXPERIMENTOS NGF 1 y NGF 2

Durante la maduración del SNC el NGF ha demostrado actuar sobre la supervivencia, el crecimiento y la diferenciación de las neuronas sensoriales y simpáticas (Levi-Montalcini & Angeletti, 1968; Cuello & Thoenen, 1995). Ciertamente, neuronas aferentes convergentes en áreas distintas o la misma región dependen de NGF para sobrevivir o diferenciarse en estadios distintos (Black, 1986; Mendell, 1995).

En consecuencia, la ocurrencia de una disminución natural o una deprivación experimental de NGF o cambios marcados en su concentración podrían inducir diferentes consecuencias en el cerebro adulto dependiendo del periodo de desarrollo afectado. Hasta el presente, esto ya ha sido sugerido para los modelos experimentales corticales y el hipocampo (Bonhoeffer, 1996).

La aplicación de NGF durante el periodo crítico de maduración de la vía visual retiene la capacidad de este sistema para responder, en forma plástica y dependiente de actividad, luego de la edad en la cual esta propiedad ya ha desaparecido en animales no tratados (Domeneci et al., 1991; Carmignoto et al., 1993). Mas recientemente, se ha reportado cambios en la fosforilación de GAP-43 como una de las consecuencias asociadas a la restauración de la plasticidad dependiente de actividad en el cortex visual adulto (Liu et al., 1996).

En nuestro laboratorio, previamente se encontró que durante la maduración del NE de rata, el *periodo P30-37* representa una ventana de sensibilidad colinérgica-muscarínica a la actividad motora inducida con el TEC (paradigma TEC descrito en: Brusés & Azcurra, 1993).

1. Sólo cuando el TEC se realiza en dicho *período crítico estriatal* (PCE) se observa una disminución *permanente* en sitios de binding al Quinuclidilbenzilato (\downarrow sitios específicos al 3H QNB) en NE (Ibarra et al., 1995 ; Azcurra et al., 1995).
2. A mayor número de sesiones de TEC (mayor actividad motora acumulada), menor expresión de sitios marcadores de mAChRs en el NE adulto (Ibarra et al., 1995; 1996).
3. La actividad fisiológica inducida con el TEC durante el PCE también reduce en forma persistente la expresión de sitios de binding al ligando Spiperona (como 3H SPI, lo cual indicaría una **correlación** entre la caída de **neurorreceptores estriatales muscarínicos y dopaminérgicos de tipo D2** (Ibarra et al., 1996).
4. Mas recientemente, he colaborado en trabajos que indicaron que 30 min luego de la sesión S₂ del TEC, o también luego de ejercitar ratas en la plataforma giratoria, PG, libre de condicionamiento asociativo-espacial, se detecta una caída de la fosforilación del marcador presináptico de plasticidad neuronal, *growth activating protein 43* (GAP-43), por la protein-kinasa C (PKC), en NE. Notablemente, el cambio ocurre en forma asimétrica, en el hemiestriado contralateral al sentido de giro ya sea en el TEC o la PG, pero desaparece a los 90 min. Simultáneamente, a los 60-90 min aparece una caída de la fosforilación de la GAP-43 en la porción del NE ipsilateral respecto al sentido de giro (Paratcha et al., 1998; Azcurra et al., 1998; Paratcha et al., en prensa). La ontogénesis de la actividad de PKC en las fracciones soluble y particulada también es modulada por actividad funcional en los modelos corticales de plasticidad de la vía visual y olfatoria (Elkabes et al., 1993), y podría estar implicada en la modulación de la expresión y la respuesta del sistema mAChR en el NE (El-Fakahani et al., 1988).

Además, existen antecedentes que indican que la actividad de locomoción circular produce cambios asimétricos en el sistema dopaminérgico nigroestriatal (Yamamoto & Freed, 1982, 1984).

Todos estos hallazgos sugieren la presencia de :

1. una **respuesta plástica, de tipo bifásica**, en el corto (quizás mediano) plazo en la transducción de señales disparada por el ejercicio motor en el TEC durante el PCE. Resultados preliminares indican que otras kinasas también serían moduladas en forma asimétrica en el corto plazo luego de la sesión S₂ del CT.

2. **una relación entre los eventos de fosforilación de corto plazo y los cambios permanentes de neuroreceptores estriatales** luego del entrenamiento en el TEC durante el PCE (*), dado que la GAP-43 está estrechamente involucrada en procesos de remodelamiento sináptico dependientes de actividad funcional o de injuria neural, ya sea durante el desarrollo o en la adultez.

Al presente, todavía no queda claro como cambios asimétricos en el corto y mediano plazo como los disparados por el ejercicio en el TEC y la PG durante el PCE, podrían setear el nivel de neuroreceptores estriatales en forma simétrica en el largo plazo.

El NGF ya tenía antecedentes como agente terapéutico para alteraciones tempranas del SNC en modelos animales experimentales y así fue propuesto por Calamandrei y col.(1993).

En adultos, el NGF ya había sido propuesto como terapéutica para patologías neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (Liberini & Cuello, 1994) y también como un factor principal en la maduración temprana y el refinamiento sináptico dependiente de actividad (Henderson, 1996). Pero todos estos trabajos postulaban al NGF como agente terapéutico *per se*, en general para restaurar o compensar déficits colinérgicos *a posteriori* de ablación, deafferenciación o neurointoxicación local aguda de un area cerebral (Cuello & Thoenen, 1995).

Estos hechos nos motivaron a preguntarnos si el NGF podría participar en este PCE.

EXP. NGF 1

Primero estudiamos la respuesta del sistema muscarínico a la actividad motora en animales no tratados entrenados durante o luego del PCE, para disponer de los controles positivo y negativo, respectivamente, del lote de animales del experimento para los cambios plásticos inducidos por el TEC. Como se muestra en la Fig. 26-27, encontramos un cambio en la expresión de sitios (³H)QNB en el grupo control positivo E₃₀ respecto al grupo C₃₀ de la misma naturaleza de los observados en los reportes previos del PCE, y del mismo orden de la caída hallada en los animales del grupo NGF_E

respecto a los del grupo CC_E (en animales no operados, -32% / -28% , o Fig. 25, en animales operados y perfundidos con la mayor dosis de NGF, -42% / -44% , para los hemiestriados NEI y NED, respectivamente). Mas aun, los datos a partir del grupo E_{40} (control negativo) y los controles de los procedimientos quirúrgicos (SH_C , SH_E) y de especificidad biológica del agente perfundido (CC_C , CC_E) indican que los efectos observados en los animales perfundidos con NGF (grupos NGF_E y ngf_E) no son una consecuencia del manipuleo, la anestesia o los procedimientos para la canulación de los animales. Por otra parte, no se detectaron diferencias ni entre los pesos corporales entre las sesiones del TEC o *a posteriori* del testeo, ni en los pesos de los NE de los grupos experimentales al momento del sacrificio de los animales (Fig. 24).

Segundo, el efecto encontrado sería específico, puesto que en la corteza motora no hubo diferencias en los sitios 3H QNB muscarínicos entre los distintos grupos experimentales (datos no mostrados). El dato de corteza motora sirve como control endógeno de sitio perfundido y selectividad de la actividad biológica del NGF (lamentablemente el cumplimiento estricto de los procedimientos de fraccionamiento subcelular no permitió analizar las cortezas motoras separando las hemipartes izquierda y derecha, lo cual hubiera permitido obtener información respecto a posibles asimetrías dependientes del sentido de giro del entrenamiento en el TEC y del lado perfundido con NGF).

Por la cercanía anatómica y los contactos funcionales de la corteza motora al NE (Hikosaka, 1991; Calabresi et al., 1996), aportaría un nuevo control para la actividad plástica del NGF encontrada en el estriado.

Un efecto de NGF *per se* puede ser excluido debido a que se hallaron cambios no significativos en la concentración de sitios mAChRs aparentes en el grupo NGF_C con respecto al CC_C (ver Fig.27. C). Además, la interacción de los efectos de la perfusión de NGF con los inducidos por el ejercicio en el TEC pudo ser mas ampliamente analizada en el Exp.2. Aplicando una MANOVA de dos factores y comparando *a posteriori* las condiciones $[NGF \times Training]$ y $[NGF \times No \ Training]$ (Scheffé F-test), los valores de p resultaron $p < 0.003$ y $p < 0.007$ para los hemiestriados NEI y NED, respectivamente.

Tercero, los cambios en los grupos tratados con NGF y entrenados respecto a los controles no puede explicarse a partir de diferencias en las respuestas motoras o espaciales en el TEC dado como muestran las Fig. 25, ninguna diferencia estadística hubo entre los grupos operados o entre los grupos operados y los controles positivos y negativos no operados.

Un punto de posible debate apareció en este exp. cuando se detectó una caída estadísticamente significativa en NED a pesar que el NGF fue perfundido sobre el lado izquierdo (ver grupo NGF_E en Fig. 27.A).

La infusión *in vivo* de neurotrofinas muestra que a 3 mm de distancia de la punta de la cánula la velocidad de perfusión real es aprox. 500 veces menor que la originalmente descargada (White & Schwartz, 1994), y la infusión intraestriatal de unos pocos ng de NGF es suficiente para afectar a marcadores específicos de neuronas de tipo colinérgico en el NE (Kordower et al., 1996).

De este modo, la concentración fisiológica que produce efectos biológicos estaría en el orden de los pg NGF/g de tejido. Además, la liberación y difusión de NGF por la vía intraparenquimal sería más eficiente que la alternativa intraventricular (Venero et al., 1996). En consecuencia, sólo 1.4 µg NGF/día permitiría una distribución biológicamente efectiva de la neurotrofina entre los dos hemisferios cerebrales.

Por otro lado existen antecedentes de efectos neuroquímicos bilaterales luego del tratamiento unilateral incluyendo al sistema nigroestriatal (Wilson et al., 1986; Normand et al., 1988)

Respecto a las propiedades biológicas del NGF se conoce hace varios años que influencia las neuronas colinérgicas por medio de mecanismos acoplados a un sistema receptor específico, que involucra al receptor para neurotrofinas de baja afinidad $p75^{NGFR}$ y un producto de un proto-oncogen relacionado a la familia trk designado *TrkA* (Chao, 1992; Chao & Hempstead, 1995). La presencia de *TrkA* durante el neurodesarrollo no sería sólo dependiente de la concentración local de NGF sino también de la actividad funcional que reciba el área a partir de las aferencias. Por ejemplo, se ha reportado que la deaferenciación temprana a la oliva inferior por eradicación de una población de neuronas cerebelares induce cambios persistentes en el patrón ontogenético postnatal de expresión del sistema Trk (Riva-Depaty et al., 1998).

La expresión de estos receptores en las vías colinérgicas del SNC respeta patrones espaciales y temporales particulares de área desde el desarrollo embrionario tardío hasta la adultez (Yan & Johnson Jr., 1988; Ringstedt et al., 1993; Steininger et al., 1993; Gibbs & Pfaff, 1994; Yu et al.,

1995). Durante el desarrollo estriatal de la rata, la inmunoreactividad a NGF alcanza un pico hacia P12-20 (aprox. 0.3 ng/g tejido) y, notablemente, a la edad P26 no sería detectable para luego llegar a los valores adultos relativamente bajos en forma gradual (Mobley et al., 1989). Además, el producto TrkA aumenta su actividad tirosin-kinasa en forma gradual desde la primera semana de vida hasta aprox. P30. En cambio, para otros miembros de la familia de neurotrofinas como el BDNF, NT-3 y NT-4/5 en el NE existe escasa respuesta tirosin-kinasa a la presencia del agonista específico luego de P14 (Knüsel et al., 1994).

Estos reportes y los hallazgos de esta tesis arguyen en favor de un rol del sistema NGF-TrkA en la maduración postnatal tardía del sistema colinérgico estriatal, particularmente durante el período de remodelamiento sináptico, como ya fuera sugerido por Altar (1991) y Fagan et al. (1997).

Esta es una diferencia substancial con los reportes derivados del modelo visual y el núcleo geniculado lateral (NGL) donde el receptor TrkA no pudo ser detectado, y la transducción de señales mediada por TrkB es un componente principal de la maduración de la dominancia ocular (Schoups et al., 1995; Cabelli et al., 1997).

Notablemente, entre los numerosos estudios de la plasticidad cortical dependiente de actividad, existe uno sobre el modelo de desarrollo de la vía visual donde se ha reportado que la ontogénesis colinérgica dentro de la corteza visual es afectada por la actividad fisiológica durante la maduración postnatal (Walch et al., 1989), y otro que refiere un patrón temporo-espacial de cambios en el sistema nigroestriatal a posteriori de la hemideprivación de vibrizas (Steiner et al., 1992). Si estos hallazgos en modelos corticales de plasticidad implican o no analogías con el modelo estriatal no es posible definirlo en esta instancia de las investigaciones.

Una diferencia entre los fenómenos plásticos que ocurren en el NE durante el período natural de refinamiento sináptico y los efectos farmacológicos presentados en este experimento es que, en el primer caso, el nivel de NGF disminuye a partir de P18 hasta hacerse indetectable en P26 (Mobley et al., 1989). En las condiciones de perfusión aplicadas en este experimento la desaparición de los niveles farmacológicos de NGF a partir de P39 sería mas abrupta.

Una semana después de la infusión intraparanquimal continua de NGF por dos semanas en el NE se encuentra hiperinervación colinérgica, reducción de la velocidad de descarga neuronal espontánea y una inducción de los RNA mensajeros para los receptores de NGF de baja y alta afinidad (Forander et al., 1996). Mas aun, el tratamiento con NGF induce aumento de la síntesis y liberación de Ach, principalmente en NE (Rylett et al., 1993; Maysinger et al., 1992). En consecuencia, es posible hipotetizar que un down regulación de los sitios mAChRs postsinápticos ocurrió en los animales perfundidos con NGF alrededor de P40. Esto podría verse potenciado mas ampliamente por medio de la hiperestimulación presináptica en respuesta a la activación de las neuronas colinérgicas y la up-regulación de la síntesis de NGF a través de la activación de receptores a Ach de tipo muscarínico (Lindholm et al., 1994) disparada durante la ejecución de las sesiones de TEC. Según el acuerdo actual, la activación funcional haría que las neuronas captaran mas NGF (Black, 1986; Cuello & Thoenen, 1995), generando así un feedback positivo.

Un efecto directo de NGF sobre la postsinapsis, aunque no puede ser excluido con argumentos experimentales, no estaría sustentado teóricamente si consideramos la conocida distribución de los receptores TrkA. Las neuronas colinérgicas estriatales constituyen el compartimento predominante en estudios de binding de NGF al sistema TrkA en el NE y, a partir de la bibliografía accesible al presente, los mecanismos por los cuales NGF afecta las vías colinérgicas de neurotransmisión han sido focalizados sobre la presinapsis (Riopelle et al., 1987; Lapchak et al., 1993; Berninger & Poo, 1996). Por otra parte, recientemente se ha reportado que las neuronas colinérgicas estriatales no expresan el receptor de neurotrofinas de baja afinidad p75 (Yeo et al., 1997) lo cual *a priori* disminuye el rol de esta parte del sistema receptor de NGF en los mecanismos estriatales involucrados en los experimentos NGF 1 y 2 de esta tesis.

No es posible descartar que otras neurotrofinas podrían estar involucradas en la modulación de la sensibilidad muscarínica en el PCE. Por ejemplo, recientemente, se ha reportado que el Glial Cell-line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) fue el único de 9 factores neurotróficos -previamente descritos como soportes del desarrollo embrionario del sistema dopaminérgico- que tuvo efectos tróficos relevantes específicamente sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN durante el desarrollo postnatal (Burke et al., 1998). Sin embargo, recientemente Fischer et al. (1998) encontraron que NGF

potencia la actividad colinérgica estriatal también en cultivos organotípicos aunque GDNF no tuvo el mismo efecto. Esto indicaría *a priori* que el aporte del GDNF a la plasticidad muscarínica estriatal sólo podría ser mediada a través de efectos sobre las propiedades de la vía dopaminérgica provenientes de SN y sus consecuencias en el sistema colinérgico estriatal en el PCE.

En este punto es pertinente indicar que los receptores tipo D2Rs serían necesarios para el procesamiento estriatal de señales motoras provenientes de la corteza. El grupo de Calabresi ha trabajado desde hace varios años sobre este tema. La interferencia de la función de los D2Rs resulta en un déficit motor, lo cual ya fue probado en roedores. Además, mientras la estimulación corticoestriatal en ratones normales produce depresión de largo plazo ("LTD") de los potenciales excitatorios postsinápticos, en ratones nulos para el sistema D2R, la misma estimulación produce la respuesta opuesta en el NE: potenciación de largo plazo (LTP). Este LTP pudo ser bloqueado mediante la suplementación simultánea de un antagonista de receptores glutamato tipo NMDA (Calabresi et al., 1997). Mas recientemente, el mismo grupo ha reportado que la determinación de estos cambios de largo plazo depende también de la activación de los receptores estriatales muscarínicos tipo m2 presinápticos que modularían la respuesta a la estimulación corticoestriatal funcional (Calabresi et al., 1998).

Florio (1993) también encontró que la neurotransmisión dopaminérgica nigroestriatal afecta la sensibilidad estriatal a estimulación prelímbica y sensoriomotora cortical. También existe un reporte que presenta a la dopamina como un agente modulador de la liberación y/o síntesis de NGF (Pardo et al., 1977).

Por otra parte durante el desarrollo postnatal del sistema nigroestriatal existiría una íntima interrelación entre los patrones de maduración de cada una de las partes del sistema (Arnauld et al., 1995). El soporte trófico principal que recibe la SN deriva de las neuronas estriatales, las cuales presentan un determinado patrón ontogenético de expresión para cada neurotrofina. Marti et al., recientemente encontraron que los trasplantes de neuronas fetales a la SN tienen su mayor viabilidad celular y funcional cuando son adicionados con BDNF. Pero lo más interesante es que mientras la supervivencia era pobre cuando se realizaba el tratamiento neurotrófico de las células a partir del momento que eran implantadas, aumentaba significativamente el éxito de la operación cuando se exponía previamente las células a BDNF por el mismo tiempo que precisa esta neurotrofina para

alcanzar su pico de expresión en el NE durante el neurodesarrollo postnatal natural (Marti et al., 1996).

Estos hallazgos sugieren que el sistema dopaminérgico nigroestriatal podría estar involucrado en la determinación del sentido de los cambios de largo plazo en los ajustes finos de la organización estructural y funcional sináptica del NE durante el neurodesarrollo postnatal tardío.

Otra posibilidad es un efecto indirecto de NGF mediado por alguno de los neuropéptidos involucrados en el remodelamiento sináptico dependiente de actividad funcional durante el neurodesarrollo postnatal, como podría ser el **precursor de péptidos secretorios VGF** el cual es presente en el NE (Snyder et al., 1998).

La transcripción del gen de VGF es rápidamente inducida por NGF en células PC12 en cultivo (Baybis & Salton, 1992). Además, VGF es modulado en el NGL por la actividad retiniana durante el período crítico de la maduración visual. Mas aun, una inducción persistente del RNA mensajero de VGF es producida en el NE después de la deafferenciación ipsilateral por medio de lesión cortical (Snyder et al., 1998).

Por otra parte, ha aparecido recientemente un reporte que considerando los resultados de este experimento podría sugerir que la dinorfina está involucrada en el PCE. Sivam estudió la relación entre la ontogénesis de la biosíntesis de este péptido opioide y la irrigación dopaminérgica nigroestriatal. Encontró que luego del nacimiento, los niveles de dinorfina en NE aumentaban gradualmente *hasta llegar a un pico entre la quinta y la sexta semana postnatal* y que el normal desarrollo de la síntesis de dinorfina podía ser afectado cuando se inducía una depleción cuasitotal de DA en NE (Waters et al., 1996).

Como un último antecedente que coloca al NGF en un rol principal en los cambios de corto y largo plazo activados durante el PCE y las consecuencias biológicas de la modulación del mismo, se puede citar al trabajo de Nye et al. (1992).

Este reporte mostró que *in vitro* la vía de fosforilación por PKC está implicada en la transducción de señales mediada por el receptor a NGF de alta afinidad TrkA. Las fosforilaciones inducidas en cultivo por agregado de NGF y posterior binding de este a TrkA eran bloqueadas con K252A y Staurosporina, potentes inhibidores de PKC. En cambio, si se activaba la fosforilación mediada por

otros factores de crecimiento como EGF y FGF, los inhibidores de PKC no producían efecto alguno, lo cual indicaba que la vía de fosforilación por PKC está específicamente ligada con la transducción de señales mediada por NGF. Considerando que, como fue mencionado anteriormente, la fosforilación de GAP-43 por PKC en el corto plazo post-ejercicio es alterada sólo si se entrenan animales en el TEC en el PCE (Paratcha et al., 1998; Azcurra et al., 1998; Paratcha et al., en prensa), se puede aportar otro argumento en favor de una relación entre los cambios en PKC encontrados en el corto plazo y la caída en mAChRs y D2Rs halladas en el largo plazo en animales entrenados en el TEC en el PCE. En este sentido, ya se ha terminado un primer experimento donde los resultados preliminares confirman la relación entre los eventos de fosforilación de corto plazo y la modulación de receptores mAChRs en NE en el largo plazo post-entrenamiento motor en el PCE (reunión de la *ASN*, Paratcha et al., 1999).

Si interrumpimos la actividad de neurotransmisión inmediatamente después de finalizadas las sesiones de TEC a partir de la sesión S_2 (que es cuando los animales recién alcanzan una actividad motora significativa), podríamos prevenir los eventos celulares y moleculares necesarios para disparar los cambios plásticos sobre receptores a largo plazo. Este bloqueo circuital estriatal podía ser hecho con un anestésico local como la Lidocaína (clásicamente usada en modelos de aprendizaje, ver ref. Floresco et al., 1997). La lidocaína *per se* no ha demostrado afectar el comportamiento locomotor luego de ser microinyectada en el núcleo accumbens y el NE (Delfs et al., 1990). Pese a una similitud en la actividad motora respecto a los grupos controles entrenados en el TEC, a la edad P70 los NEs de los animales entrenados del grupo LID mostraron una atenuación casi total de la caída de sitios (3H)QNB *-pese a que el entrenamiento fue realizado en el PCE--*, respecto a los controles de entrenamiento. Como esperado, los animales controles positivos para los cambios en la densidad estriatal de mAChRs inducidos durante el TEC, presentaron caídas promedio en los sitios de binding para cada hemiestriado de -25 % y -28% ($p < 0.02$), respecto a los animales no entrenados de estos grupos.

La eliminación sináptica debida a la competencia aguda cuando una neurotrofina es un factor limitante durante el neurodesarrollo y el mantenimiento de aquellos terminales previamente activos en la adultez es el mecanismo que tiene mas sustento a juzgar por los reportes especializados dentro del campo de la modulación de la diferenciación neuronal y el remodelamiento sináptico por neurotrofinas (Black,

1986; Mendell, 1995; Berninger & Poo, 1996). De cualquier forma, es posible que no alcance esta explicación para elucidar los mecanismos complejos que subyacen a los efectos plásticos del NGF sobre el sistema motor estriatal o en el caso de la vía visual.

Finalmente, es difícil en esta etapa de las investigaciones dilucidar la cuestión de cómo interactúa el pretratamiento estriatal con NGF farmacológico y la actividad fisiológica inducida con el TEC para poder producir una caída persistente de los niveles de mAChRs.

Cómo estos efectos de mediano plazo son estabilizados en el largo plazo y de qué manera los efectos neurotróficos están relacionados causalmente a la permanencia de las modificaciones sinápticas dependientes de la experiencia ya ha sido motivo de debate (Easter et al., 1985; Lohof et al., 1996) y deberá ser definido en futuras investigaciones. Por el momento y a juzgar por los efectos del NGF en los experimentos NGF 1 y el exp. NGF 2 que sigue, y los patrones naturales de expresión del NGF en NE, sí es posible llegar a un acuerdo con la bibliografía actual sobre que tanto el NGF endógeno como el exógeno afectan los programas de maduración del sistema colinérgico estriatal (Li et al., 1995; Altar et al., 1992). Los resultados de este Exp. permiten esbozar una terapia potencial a las disfunciones motoras tempranas al igual que fue propuesto en su momento en el modelo de la vía visual respecto a la ambliopía y el estrabismo (Gu, 1995).

EXP. NGF 2

Este experimento tuvo el objetivo de aumentar el conocimiento sobre la relación del NGF con el PCE considerando los resultados previos en el exp. NGF 1.

Nuevamente no hubo diferencias en el comportamiento motor en el TEC realizado en el PCE entre los distintos grupos experimentales (Fig. 28), lo cual excluye a la variable respuesta motora en el análisis y explicación de los resultados neuroquímicos. Nuevamente, a pesar de la similitud en la respuesta motora en el TEC, en el único grupo donde la diferencia en la densidad de los sitios de binding a

(³H)QNB en NEI y NED entre animales entrenados y controles de TEC fue no significativa fue en el perfundido con NGF durante el PCE (Fig. 29).

Como ya fue mencionado, en el PCE la presencia de NGF en el NE sería relativamente muy baja (Mobley et al., 1989), lo cual podría ser un elemento principal en la selección sináptica por competencia por neurotrofinas potenciada por la actividad funcional inducida con el TEC en ratas no tratadas. En este experimento, la administración de NGF exógeno durante el PCE podría presentar al NE de P30 como si fuera de P20, edad en la cual el entrenamiento en el TEC no induce cambios permanentes en los receptores estriatales mAChRs ni D2Rs (Ibarra et al., 1996).

De este modo, el NGF ya no sería un factor limitante, lo cual podría atenuar o anular la competencia sináptica por esta trofina ante la alta presión de selección que implica el entrenamiento motor en el TEC entre 12 y 30 minutos por día, siete días seguidos. Ciertamente ya se ha reportado que estos tiempos de actividad funcional son suficientes para producir cambios pasajeros o persistentes en la cantidad y la organización de sinapsis en el hipocampo (Chang & Greenough, 1984).

Existen antecedentes de que la exposición a NGF por semanas no produciría alteraciones comportamentales sensoriomotoras durante el período de infusión aunque sí podría modificar de tal forma la neuroquímica neural como para alterar la respuesta funcional cuando el NGF farmacológico ya no está presente (Frick et al., 1997).

Otros argumentos que permiten interpretar los resultados de este segundo experimento con NGF fueron vertidos en la discusión del Exp. NGF 1.

Respecto al significado para la fisiología adulta de la ocurrencia del PCE, sólo se pueden citar los resultados preliminares de un experimento de corrección de neuroteratología funcional, inducida con HAL durante la gestación, aplicando la terapéutica postnatal *antes* o *dentro del PCE*. En estos estudios se evaluaron los animales a largo plazo post-teratogenización en TEC en el período P75-83, y el TRR entre P180 y P210 (6-7 meses).

La respuesta motora en el TEC y la coordinación motora en el TRR, meses después del tratamiento temprano con HAL, *dependió del periodo de exposición y del sexo*. Mientras en ambos sexos el tratamiento prenatal con HAL disminuyó las habilidades motoras respecto al grupo control (como había sido previamente demostrado), sólo en las hembras se pudo corregir la hipoactividad con la administración postnatal de HAL o DFH (*) ya sea durante la lactancia (P5-21) o durante el PCE (P28-40). En los machos, la administración de HAL o DPH no sólo no corrigió la neuroteratología funcional inducida sino que *en algunos casos la potenció*. Este efecto particular de los machos pudo ser apreciado por medio de los dos testeos aplicados en distintas etapas de la adultez de la rata (datos no mostrados).

Como fue expuesto previamente, el periodo P30-37 representa una etapa de maduración donde la actividad fisiológica inducida con el TEC o la PG produce cambios plásticos en el corto y largo plazo en el CE (Ibarra et al., 1996, Paratcha et al., 1998). Aunque en ambos sexos se observaron caídas permanentes de los neuroreceptores estriatales y mAChR luego del TEC, en hembras se observó una particularidad: la caída de mAChRs en animales con entrenamiento completo con TEC (hasta S7) fue menor (\downarrow de sitios de binding a QNB en hembras=25% vs. 35% en machos).

La posibilidad de un dimorfismo sexual en cuanto al comienzo y fin precisos del PCE en rata será evaluada en el corto plazo como parte de los trabajos futuros de nuestro laboratorio.

(*) fue mas efectivo como terapéutica el HAL

CONSIDERACIONES FINALES

Todos los hallazgos de esta tesis plantean que:

1. La presencia de efectos comportamentales permanentes deben ser validados con distintos tipos de testeo, realizados a distintas edades. Lo mismo es válido para la evaluación comportamental en modelos experimentales de corrección de neuroteratología funcional.

Esto se basa en que:

Existen periodos críticos de remodelamiento sináptico dependientes de actividad funcional para las áreas cortico-sensoriales y para la vía motora. Dicha plasticidad sináptica permite la ocurrencia natural de mecanismos compensatorios para atenuar parcialmente neuroteratología funcional indicando que la ausencia de alteraciones inducidas por un neuroteratógeno de conducta potencial debe ser validada testeando grupos tratados en distintos periodos del neurodesarrollo postnatal.

La ausencia de alteraciones en el adulto joven no indica con certeza absoluta que durante un periodo previo del desarrollo postnatal no hubo cambios significativos en la misma función bajo las mismas condiciones experimentales.

Sin embargo, parece lógico pensar que mientras una deficiencia motora puede más tarde ser enmascarada por mecanismos compensatorios, durante el periodo donde la actividad neuronal no fue la apropiada para desarrollar la tarea evaluada, se puede haber afectado otras funciones dependientes o reguladas por la primera. Esta *deficiencia colateral* puede no ser detectada si se estudian animales sólo en el estado adulto y aplicando un único testeo.

La presencia de periodos críticos de plasticidad dependiente de actividad funcional y la sensibilidad farmacológica dependiente de periodo ontogenético -los cuales no serían totalmente homólogos entre distintas especies- indica que la transferencia de los resultados hallados en nuestro modelo animal experimental a la clínica humana no sería directa.

La recuperación de la respuesta motora normal en los animales sometidos a privación ambiental-social sólo permite confirmar que la actividad fisiológica de los sistemas sensoriales y motores es crucial durante el desarrollo postnatal para determinar el grado de maduración que alcanzará el SNC

en la adultez. Desde ningún punto de vista, podría ser aplicada esta estrategia terapéutica para casos de neuroteratología funcional leve o moderada en humanos, puesto que se contrapondría a los conceptos previamente vertidos sobre la necesidad obligatoria de la estimulación fisiológica para alcanzar un SNC maduro normal.

De existir un caso humano muy severo de, por ejemplo, neuroteratología del sistema motor, podría pensarse poner a punto una extrapolación parcial del diseño del experimento HAL/DEP.

Las estrategias farmacológicas mostradas en esta tesis (Exp. HAL/HAL y DFH/DFH) pueden aportar los elementos básicos de una estrategia terapéutica para este tipo de alteraciones funcionales.

En este sentido, los resultados pueden ser interpretados como un éxito terapéutico parcial, puesto que en esta tesis no se abordó los efectos colaterales que pudieran tener los agentes químicos seleccionados como correctores en la maduración de otras funciones del SNC, como ser la ansiedad, la emotividad, la actividad social, etc.

En síndromes comportamentales originados durante el desarrollo como los déficits atencionales DDA, se prescribe como terapia de elección el estimulante dopaminérgico *d-anfetamina* o el *metilfenidato*. Aparentemente, la clásica hiperactividad psicomotora es atenuada sin una relación costo/beneficio alta (considerando los años que lleva como terapéutica para este tipo de alteración) que impida su prescripción. En este punto es necesario resaltar que dichas terapias, al igual que las terapias de estimulación motora psicomotriz en niños con disfunción temprana del sistema motor, no siempre se basan totalmente en los resultados de estudios de la neuroquímica, períodos críticos de sensibilidad y plasticidad perinatal y postnatal tardía de modelos animales experimentales.

En muchos casos, los programas son aceptados, aplicados y difundidos en función del éxito alcanzado, en términos estadísticos, con una u otra alternativa empírica. No es claro aun que terapéuticas farmacológicas y que programas de estimulación son los mas adecuados (Nakano et al., 1997; Dahlstrom & Theorell, 1997).

En consecuencia, es altamente probable que las alternativas terapéuticas para este tipo de alteraciones funcionales se ampliarían significativamente con los aportes que pudieran derivar de modelos animales validados de inducción y atenuación posterior de neuroteratogenia funcional.

Uno de los agentes mas relacionados a la aparición y desaparición del Periodo Crítico (PC) visual en distintas condiciones experimentales son las neurotrofinas, en particular el NGF (Gu, 1995).

Hasta el presente la presencia de PCs era casi patrimonio exclusivo de distintos modelos animales pero siempre en areas corticales. Reportes de nuestro laboratorio han aportado una serie de resultados que sugieren fuertemente la presencia de un período crítico motor en la rata que involucra a un area subcortical como es el NE. La sensibilidad del PCE a la administración exógena de NGF dependió de si la actividad fisiológica fue inducida durante o despues del tratamiento farmacológico intraestriatal. A juzgar por los resultados el NGF sería necesario para modular la aparición del PCE. Aunque deben considerarse ciertas diferencias entre los modelos. Que el NGF haya prolongado tanto el PCE (resultados de esta tesis) como el PCV (Gu, 1995) de alguna forma agregaría otro argumento en favor de la presencia de plasticidad sináptica dependiente de actividad funcional.

Además, la atenuación por NGF en el Exp. NGF 2 de las respuestas plásticas de largo plazo inducidas por el TEC ejecutado en el PCE, arguyen en favor de la posibilidad de manipular artificialmente PCs.

Si la situación en el modelo estriatal presentado fuera analogable a aquella de los modelos corticales, entonces los resultados previos de nuestro laboratorio y los presentados en esta tesis representarían el punto de partida para profundizar estudios con el fin de abrir la posibilidad potencial de revertir alteraciones motoras originadas por disturbios de la maduración pre- o postnatal temprana conociendo como responde el sistema motor antes, durante y después del PCE. Considerando los hallazgos acumulados hasta el presente lo antedicho representa mas un estado de motivación actual y una ambición que un objetivo postulado luego de integrar los antecedentes científicos suficientes.

El éxito de la alternativa terapéutica que finalmente sea validada y aceptada dependerá seguramente de la detección y el diagnóstico, lo más temprano posible, de la presencia de neuroteratogenia funcional. Esto último también se encuentra en actual experimentación en nuestro laboratorio (Arndt et al., 1994, 1995), dado que las alternativas actuales de testeos motores y cognitivos validados son en su gran mayoría de aplicación relativamente tardía (luego de los 2 o 3 años), cuando la probabilidad de éxito terapéutico se reduce significativamente.

CONCLUSIONES FINALES

1. Se propuso un modelo animal experimental para la corrección postnatal de neuroteratología funcional inducida durante la gestación o la lactancia

Dicho modelo animal permitió detectar tanto la neuroteratología funcional en los animales expuestos a neuroteratógenos como la atenuación de la misma en los animales tratados post-teratogenización con el agente corrector seleccionado, en el mediano y/o largo plazo, según el caso.

En segundo término, se concluye que es necesario un testeo repetido a lo largo del desarrollo postnatal tardío y hasta la adultez para determinar con precisión la presencia de secuelas cognitivas o motoras luego de la exposición temprana a neuroteratógenos funcionales.

2. El modelo animal presentado tuvo éxito en la terapéutica farmacológica de neuroteratología motora en un caso (Exp. HAL/HAL), y de neuroteratología asociativa-espacial en otro (Exp. DFH/DFH).

4. El NGF está involucrado en la ocurrencia del PCE.

El NGF exógeno fue capaz de prolongar el PCE, lo cual soporta la posibilidad de aplicar nuevas estrategias farmacológicas al disponer de diferente sensibilidad estriatal fuera del período crítico *a posteriori* de tratar el NE con NGF.

La posibilidad de modular la ocurrencia del PCE con NGF agrega otro argumento en favor de la existencia de dicho período crítico de plasticidad sináptica

ANEXO I

MARCOS LEGALES E INSTITUCIONES IMPLICADOS EN LA BIOSEGURIDAD FARMACOLOGICA

A nivel mundial existen 2 redes de farmacovigilancia teratológica: la OTIS (USA) y la versión europea, European Network in Teratological Services.

Los países subscriptos a dichas redes poseen grupos de trabajo bajo la denominación Centro de Información Teratológica (sigla inglesa TIS). En nuestro país existe en el Hospital Italiano acceso a una base de datos toxicológica (Reprotox) y funciona un centro TIS, el cual desarrolla actividades de prevención primaria y farmacovigilancia de teratología estructural y funcional.

CATEGORIAS SEGUN EL RIESGO POR EXPOSICION A UN FARMACO DURANTE LA GESTACION

Por medio de la clasificación de las drogas de prescripción humana se informa sobre el nivel de riesgo para el feto y la magnitud de las precauciones que hay que tener durante su uso. La FDA ha establecido 5 categorías (A,B,C,D y X) para indicar el potencial teratogénico de una droga. Este criterio fue por primera vez anunciado en un boletín de la FDA para manejo de drogas de 1979. Luego de varias revisiones de la clasificación de las drogas preexistentes ahora es común el uso de este criterio. Un sistema alternativo fue adoptado por la Australian Drug Evaluation Committee (ADEC) desde 1989 (Batagol, 1993). Las 2 clasificaciones son detalladas:

**CATEGORIZACION DE FARMACOS APLICADOS DURANTE EL EMBARAZO
SEGUN LA PRINCIPAL INSTITUCION ESTADOUNIDENSE DE APROBACION DE
DROGAS DE CONSUMO HUMANO (FDA, USA)**

A - Estudios supervisados en mujeres fallan en demostrar un riesgo para el feto en el primer trimestre y la posibilidad de peligro fetal es remota.

B - a) Estudios en animales no indican un riesgo para el feto y no existen estudios controlados en humanos, o b) estudios en animales no demuestran efectos adversos sobre el feto y estudios validados en mujeres embarazadas no detectaron riesgo para el feto.

C - a) Los estudios han demostrado que la droga produce efectos teratogénicos en animales o embriones, pero no existen estudios controlados en mujeres, o b) no hay ningún estudio disponible ya sea en animales o mujeres.

D - Existe evidencia de riesgo fetal en humanos, pero los beneficios en ciertas situaciones (cuando hay peligro de muerte o cuando se trata de enfermedades serias donde no existe una droga mas segura o las que se encuentran disponibles son inefectivas) hacen que se pueda utilizar la droga a pesar de los peligros asociados.

X - Los estudios en animales o humanos han demostrado anomalías fetales o existe evidencia de riesgo fetal basada sobre la experiencia humana (o ambos casos) y el riesgo claramente sobrepasa al beneficio.

**CATEGORIZACION DE FARMACOS APLICADOS DURANTE EL EMBARAZO
SEGUN LA INSTITUCION AUSTRALIANA (ADEC) HOMOLOGA A LA FDA-USA**

A. - Drogas que han sido tomadas por un gran numero de mujeres embarazadas y madres de lactantes o niños, y no se ha demostrado un aumento reconocido de la frecuencia de malformaciones u otros efectos, directa o indirectamente peligrosos sobre el feto.

B - Drogas que han sido tomadas por un limitado numero de mujeres embarazadas o madres de lactantes o niños, sin un incremento en la frecuencia de malformaciones u otros efectos, directa o indirectamente peligrosos sobre el feto. Como la experiencia humana con drogas de esta categoria es limitada, los resultados de estudios toxicológicos (incluyendo estudios de reproducción en animales) son necesarios para asignar a la droga a uno de los 3 subgrupos que siguen:

B1 - Los estudios en animales (*)no han demostrado evidencia de un riesgo aumentado de peligro fetal.

B2 - Los estudios en animales(*) son inadecuados o defectivos, pero los datos disponibles no muestran evidencia de un aumento de la ocurrencia de peligro fetal.

B3 - Los estudios en animales(*) han mostrado un aumento de la ocurrencia de peligro fetal pero la significancia de los hallazgos en humanos es considerada como incierta.

C - Drogas que, de acuerdo con sus efectos farmacológicos, han causado (o puede existir sospecha de ser la causa de) peligro para el feto o neonato sin la producción de malformaciones. Estos efectos deben ser reversibles. Textos específicos del caso serían consultados para obtener mas detalles.

D - Drogas que han causado, son sospechosas de haber causado o son consideradas como causa potencial de una incidencia aumentada de malformaciones fetales en humanos o daños irreversibles. Estas drogas pueden tener también efectos farmacológicos adversos. Textos específicos del caso serían consultados para obtener mas detalles.

X - Drogas que poseen un riesgo tan alto de causar daño fetal permanente *que no serían usados durante el embarazo o cuando existe posibilidad de embarazo.*

(*) Los estudios en animales que sirven de evidencia de nuevas aplicaciones de una droga preexistente deben ajustarse a los lineamientos de clasificación para nuevas drogas

La clasificación de las drogas con uso reconocido durante el trabajo de parto o el parto, deriva de la información disponible respecto a los efectos sobre madre o feto, ya sea que la aplicación esté o no establecida en la sección INDICACIONES del prospecto (por ej., analgésicos).

Las drogas psicotrópicas no han sido testeadas o aprobadas por la FDA para su uso en la gestación (Cohen & Rosenbaum, 1998).

Luego de muchos años de servir la FDA como referencia mundial para este tipo de clasificaciones y directivas, recientemente el *Teratology Society Public Affairs Committee* ha señalado que la información que brinda la FDA es **muchas veces incompleta y algunas veces incorrecta**, especialmente para **psicofármacos**, y se propone que las categorías farmacológicas de riesgo durante la gestación (ver cuadro precedente en pág. 55) sean reemplazadas por textos informativos impresos en los prospectos de los productos farmacéuticos comercializados (Haakinson et al., 1996).

ANEXO II

CRITERIOS PARA DETERMINAR LA DOSIS TOXICA EQUIVALENTE EN HUMANOS A PARTIR DE LA INVESTIGACION EN MODELOS ANIMALES EXPERIMENTALES

Se acepta que un factor de 10 considera la variabilidad interespecífica hombre-modelo animal, un factor de 10 adicional considera la variabilidad interindividual en la respuesta orgánica a la exposición a agentes exógenos, y un factor de 5 es el margen de seguridad final. De este modo, la mínima dosis tóxica detectada en la investigación y desarrollo de nuevos agentes químicos debe ser 500 veces mayor a la dosis máxima permitida para consumo humano, aunque existen diferentes propuestas al respecto (Newman et al., 1993; otra isviski).

ANEXO III

INTERFERENCIAS ADICIONALES EN LA UTILIZACION DEL FARMACO EFICAZ, EN EL PACIENTE ADECUADO Y CON LA INDICACION PRECISA (DATOS REPRESENTATIVOS DE LA SITUACION NACIONAL)

El costo que implica la investigación, desarrollo y distribución masiva de nuevas moléculas oscila entre 300 y 500 mill. de dólares. Ante esta inversión, las empresas farmacéuticas han optado por trabajar para mercados de alto poder adquisitivo a partir de la década pasada. Hasta 1992, año en que comenzó a funcionar el ANMAT, el mayor problema que tenía nuestro país en materia de medicamentos era la falta de controles efectivos sobre la calidad de agentes medicinales. Desde entonces, el problema del control de calidad se ha diluido y creció el impacto del precio. En la Argentina, el principal componente del precio final del remedio no es ni los insumos ni los esfuerzos de investigación, sino los presupuestos de promoción, que como mínimo representan un 45%. Este %, traducido en dinero, es del mismo orden a lo que utilizan USA y Europa en investigación y desarrollo de nuevos productos. En parte, esta desproporción, se debe a las limitaciones de la legislación actual sobre patentes. La copia de medicamentos abarcaría en Argentina hasta un 10% del mercado. No sólo se afecta el precio final del fármaco, sino la eficacia del mismo. **Cuando las versiones patentadas tienen una eficacia terapéutica entre el 96 y 99%, las copias oscilan entre un 5-10% hasta 90-95%** (Tiopental sódico, ketaminas, fentanilos son ejemplos relevados y presentados el año pasado por la Asociac. Arg. de Anestesiol.).

Hay que tener en cuenta que gran parte de las compras masivas de medicamentos a nivel de instituciones nacionales y municipales se realiza por licitaciones donde en una mayoría de los casos decide el precio.

En Argentina se elaboran 7500 productos. Se distribuyen por 10.000 farmacias.

Considerando el mercado farmacéutico nacional, 50% de los productos comercializados deriva de laboratorios nacionales y 50% de los extranjeros. Hay 350 laboratorios.

En una encuesta a médicos, casi 40% de los mismos estimó que el precio es el primer factor condicionante a la hora de prescribir fármacos. Mas del 50% no supo contestar cual es la segunda consideración que los lleva a optar por tal o cual medicamento.

Los productos elaborados mas vendidos son :

Amoxidal : droga generica : amoxicilina--derivado sintetico de la penicilina (antibiotico)

Lotrial* : droga generica : lorazepam—derivado sintetico benzodiazepinico (ansiolitico)

Lexotanil* : droga generica : diazepam-benzodiazepina (ansiolitico)

Bayaspirina : droga generica : acido acetilsalicilico (analgesico). 20000000 unidades por año

(Ducrot, V.E., 1998).

* son drogas neuroactivas

DIVULGACION NACIONAL E INTERNACIONAL DE LOS RESULTADOS DE ESTA TESIS

Los experimentos presentados en esta tesis fueron comunicados por los siguientes medios:

I. CONGRESOS

Nacionales

1. **Wolansky, M.J., Rodriguez, J.A. & Azcurra, J.M.** (10/1994) Respuesta motora y del nivel de receptores D2 luego de la administración perinatal de haloperidol. XXX Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB). Iguazú, Misiones.
2. **Wolansky, M.J., Paratcha, G.C., Ibarra, G.R. & Azcurra, J.M.** (11/1995). Corrección funcional luego de la inducción prenatal de una alteración del comportamiento motor en ratas. Reunión anual de la Sociedad Argentina de Neuroquímica (SAN). Bahía Blanca. Buenos Aires.
3. **Paratcha, G.C., Ibarra, G.R., Wolansky, M.J. & Azcurra, J.M.** (11/1995). El entrenamiento rotatorio aumenta la fosforilación de GAP-43, mediado por PKC, en estriado de rata. Reunión anual SAN. Idem anterior

Internacionales

1. **Azcurra, J.M., Ibarra, G.R., Rodriguez, J.A., Paratcha, G.C. & Wolansky, M.J.** (1995). Plastic changes in rat striatal receptors after circling training during development. 26th annual meeting of the American Society of Neurochemistry (ASN). Santa Mónica. California. USA. Resumen en: J. Neurochem. 64 (Suppl.) S103B.
2. **Wolansky, M.J. & Azcurra, J.M.** (1996). Prolongation of rat striatum postnatal critical period by NGF. VI World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics. Buenos Aires. Resumen en: Acta Physiol. Pharmacol. Therap. Latinoam. P191-670, p.307.

3. **Azurra, J.M., Wolansky, M.J., Mongiat, L. & Paratcha, G.C.** (1998). Decreased phosphorylation of GAP-43/B-50 in synaptic membranes of rat striatum after circling motor activity during an activity-dependent NGF-sensitive critical period. 29th annual meeting of the ASN. Albuquerque, USA. Resumen en: J. Neurochem. 70 (Suppl.): S15A
4. **Azurra, J.M., Wolansky, M.J., Paratcha, G.C. & Mongiat, L.** (1998). Administration of Haloperidol to rat pups corrects neurochemical and motor behavior alterations induced by prenatal exposure to the same drug. 12th. Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience (ISDN). University of British Columbia (UBC). Vancouver, CANADA. Aug. 10-15.
5. **Wolansky, M.J., Paratcha, G.C., Ibarra, G.R. & Azurra, J.M.** (1998). Ontogenesis of motor and spatial responses in the circling training. 12th. Biennial Meeting of the ISDN. UBC, Vancouver, CANADA. Aug. 10-15
6. **Paratcha, G.C., Mongiat, L., Wolansky, M.J., Ibarra, G.R. & Azurra, J.M.** (1999). Is GAP-43 phosphorylation decrease after motor activity involved with the permanent fall of striatal muscarinic receptors ?. A presentarse en: 30th annual meeting of the ASN. California. USA.

II. PUBLICACIONES

1. **Ibarra, G.R., Paratcha, G.C., Wolansky, M.J. & Azurra, J.M.** (1996). Co-alteration of dopamine D2 receptor and muscarinic acetylcholine receptor binding in rat striatum after circling training. NeuroReport 7 (15-17): 2491-2494
2. **Wolansky, M.J., Paratcha, G.C. & Azurra, J.M.** (1998). Detección, Clasificación y Farmacovigilancia de Potenciales Teratogénos de Conducta. Rev. Arg. Farmacol. Clin. 5 (1): 1-14
3. **Wolansky, M.J., Paratcha, G.C., Ibarra, G.R. & Azurra, J.M.** (1999). Nerve Growth Factor preserves a critical motor period in rat striatum. J. Neurobiol. 38 (1): 129-136

4. **Paratcha, G.C., Ibarra, G.R., Wolansky, M.J. & Azcurra, J.M.** (1999). Decreased GAP-43/B-50 phosphorylation in striatal synaptic plasma membranes after circling training during development. *Molec. Brain Res.* (in press).

MANUSCRITOS EN PREPARACION (en estado avanzado o enviados)

1. **Wolansky, M.J., Cabrera, R.J. & Azcurra, J.M.**

Environmental manipulation corrects long-term behavioral effects induced by preweaning exposure to haloperidol

2. **Wolansky, M.J., Mongiat, L., Ibarra, G.R., Paratcha, G.C. & Azcurra, J.M.**

Enduring behavioral effects of Haloperidol on lactation exposure: dependence on age of testing
Recientemente Enviado a *Intl. J. Dev. Neurosci.*

3. **Wolansky, M.J., Cabrera, R.J., Ibarra, G.R., Paratcha, G.C. & Azcurra, J.M.**

Exogenous NGF attenuates a critical motor period in rat striatum.
Recientemente Enviado a *Neuroreport.*

4. **Wolansky, M.J., Mongiat, L., Paratcha, G., Ibarra, G. & Azcurra, J.M.**

Haloperidol corrects behavioral alterations induced with the same drug during gestation.

BIBLIOGRAFIA

- Abbey, H & Howard, E.** (1973). Statistical procedures in developmental studies on species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.* 6: 329-35.
- Abiru, Y. Nishio, C. & Hatanaka, H.** (1996). The survival of cholinergic neurons cultured from postnatal 2-week-old rats is promoted by neurotrophins. *Dev. Brain Res.* 91 (2): 260-267.
- Ahlskog, J.E., Richelson, E., Carmichael, S.W.** (1991). Reduced D2 dopamine and muscarinic cholinergic receptors densities in caudate specimens from fluctuating Parkinsonian patients. *Ann. Neurol.* 30 (2): 185-189.
- Alkon, D.** (1989). Memory storage and neural systems. *Sci. Am.*, vol. July: 26-34.
- Alkon, D.** (1988). *Memory traces in the brain.* Cambridge University Press.
- Altar, C.A.** (1991). Nerve Growth Factor and the neostriatum. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 15 (2): 157-169.
- Altar, C.A., Armamini, M., Dugich-Djordjevic, M., Bennett, G.L. y col.** (1992). Recovery of cholinergic phenotype in the injured rat neostriatum: roles for endogenous and exogenous nerve growth factor. *J. Neurochem.* 59 (6): 2167-77.
- Altshuler, L.L., Cohen, L., Szuba, M.P., Burt, V.K., Gitlin, M. & Mintz, J.** (1996). Pharmacological management of psychiatric illness during pregnancy: dilemmas and guidelines. *Am. J. Psychiatry* 153 (5): 592-606
- Annau, Z. & Cuomo, V.** (1988). Behavioral Teratology and Toxicology: A brief review. *Pharmacol. Res. Commun.* 20 (10): 841- 52.
- Anon** (1982). Pregnancy categories for prescription drugs. *FDA Drug Bulletin* 12: 24-25.
- Ansiman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J. & Merali, Z.** (1998). Do early life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors?. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16: 149-64.
- Aosaki, T., Tsubokawa, H., Ishida, A., Watanabe, K., Graybiel, A.M. & Kimura, M.** (1994). Responses of tonically active neurons in the primate striatum undergo systematic changes during behavioral sensorimotor conditioning. *J. Neurosci.* 14: 3969-84.
- Arenas, M.C., Parra, A. & Simon, V.M.** (1995). Gender differences in the effects of haloperidol on avoidance conditioning in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 51 (4): 601-9.
- Arnauld, E., Arsaut, J., Tafani, J.A. & Demotes-Mainard, J.** (1995). Dopaminergic control of gene transcription during striatal ontogeny: *c-fos* induction by D1 receptor activation in the developing striosome. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30 (2): 223-232.

- Arndt, E.A. & Azcurra, J.M.** (1995). Contribuciones para una herramienta de diagnóstico precoz. *Revista Diagnóstico*, Año 4 (6): 383-87.
- Arndt, E.A., Santa Cruz, G. & Azcurra, J.M.** (1994). El paradigma de procesamiento de información de percepción de modalidad cruzada (PPMC) en infantes de 1 y 2 años. *An. Neuroped. Latinoamer. IV*: 23-27.
- Aubert, I., Cecyre, D., Gauthier, S. & Quirion, R.** (1996). Comparative ontogenetic profile of cholinergic markers, including nicotinic and muscarinic receptors, in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 369 (1): 31-55.
- Azcurra, J.M., Arndt, E.A. & Donoli, A.** (1990). Alteraciones permanentes de conducta por efecto perinatal de drogas. Congreso Interdisciplinario de Psicofármacos- Presidencia de la Nación.
- Azcurra, J.M. Santa Cruz, G. & Arndt, E.A.** Motor response to retrieve a reward by infants: a comparison of two paradigms. *Studia Psychologica*, Institute of Experimental Psychology S.A.Sc, en prensa.
- Balduini, W., Murphy, S.D. & Costa, L.G.** (1987). Developmental changes in muscarinic receptor-stimulated phosphoinositide metabolism in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241 (2): 421-27
- Barik, S. & de Beurepaire, R.** (1996) Evidence for a functional role of the dopamine D3 receptors in the cerebellum. *Brain Res.* 737 (1-2): 347-50.
- Barkley, R.A** (1997) Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A handbook for diagnosis and treatment. 2nd. Edition. Guilford Press. New York, NY (USA).
- Barreiro, G.N., Martínez, A. & Cutrera, K.P** (1996). Uso de drogas durante el embarazo. *Rev. Arg. Far. Clin.* 3 (4): 145-56
- Barron, S. & Irvine, J.** (1995). Behavioral effects of neonatal cocaine exposure using a rodent model. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50: 107-14
- Barron, S., Kaiser, D.H. & Hansen, L.H.** (1994). Neonatal cocaine exposure, activity and responsivity to cocaine in a rodent model. *Neurotoxicol. Teratol.* 16: 401-9
- Batagol, R.** (Ed.).(1993). *Drugs in pregnancy*. The Royal Women's Hospital, CSL Limited, Victoria, Australia
- Batistatou, A., Volonté, C. & Greene, L. A.** (1992). Nerve Growth Factor employs multiple pathways to induce primary response genes in PC12 cells. *Molec. Biol. Cell* 3: 363-71.

- Baybis, M. & Salton, S.R.** (1992). Nerve growth factor rapidly regulates VGF gene transcription through cycloheximide sensitive and insensitive pathways. *FEBS Lett.* 308(2):202-6
- Bean, G. & Lee, T.** (1991). Social isolation and cohabitation with haloperidol-treated partners: Effect on density of striatal dopamine D₂ receptors in the developing rat brain. *Psychiat. Res.* 36: 307-17.
- Beninger, R.J.** (1989). Dissociating the effects of altered dopaminergic function on performance and learning. *Brain Res. Bul.* 23: 365-71.
- Bennet, P.N.** (1988). *The WHO working group: Drugs and human lactation.* Elsevier. Amsterdam. NY, Oxford, pp.331-332
- Bernardi, M.M. & Palermo, Neto, J.** (1983). Effects of apomorphine administration on locomotor activity of control and experimental rats withdrawn from long-term Haloperidol treatment. *Gen. Pharmacol.* 14 (5): 545-47.
- Berninger, B. & Poo, M-m.** (1996). Fast actions of neurotrophic factors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 324-30.
- Bhanot, R. & Wilkinson, M.** (1982). Treatment of pregnant rats with haloperidol delays the onset of sexual maturation in female offspring. *Experientia* 38: 137-39.
- Black, I.B.** (1986). Trophic Molecules and Evolution of the Nervous System. *PNAS (USA)* 85: 8249-52.
- Black, I.B.** (1993). Viktor Hamburger Award review. Environmental regulation of brain trophic interactions. *Int. J. Dev. Neurosci.* 11 (4): 403-410.
- Blanc, G., Herve, D., Simon, H., Lisoprawski, A., Glowinski, J. & Tassin, J.** (1980). Response to stress of mesocortical-frontal dopaminergic neurones in rats after long-term isolation. *Nature* 284: 265-67.
- Boer, G.J., Feenstra, M., Mirmiran, M., Swaab, D.F., Van Haaren, F. y col.** (1987). *Neurochemistry of Functional Neuroteratology: permanent effects of chemicals on the developing brain.* 15th. Intl. Summer School of Brain Research. Netherlands.
- Bonhoeffer, T.** (1996). Neurotrophins and activity-dependent development of the neocortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6(1): 119-26
- Bottjer, S.W. & Arnold, A.P.** (1997). Developmental plasticity in neural circuits for a learned behavior. *Ann. Rev. Neurosci.* 20: 459-81.
- Bradley, R.M. & Mistretta, C.M.** (1975). Fetal sensory receptors. *Physiol.Rev.*55 (3): 352-80
- Brain, P.** (1976). What does individual housing mean to a mouse? *Life Sci.* 16: 187-200

- Briggs, G.G., Freeman, R.K. & Yaffe, S. (1998).** Drugs in pregnancy and lactation. 5th.ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD (USA)
- Brockel, B.J. & Fowler, S.C. (1995).** Effects of chronic haloperidol on reaction time and errors in a sustained attention task: partial reversal by anticholinergic and by amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275 (3): 1090-8
- Brusés, J.L., Berninsone, P., Ojea, S.I. & Azcurra, J. M. (1991).** The circling training rat model as a behavioral teratology test. *Pharm. Biochem. Behav.*, 38: 739-45.
- Brusés, J.L. & Azcurra, J.M. (1993).** The Circling Training: A behavioral paradigm for functional teratology testing. En: *Paradigms for the study of behavior*, Meth. Neurosci. 14: 166-79, P.M. Conn, Ed., Acad. Press (USA).
- Brusés, J.L. (1993).** Desarrollo de un sistema para la detección de Teratología Funcional. Tesis de Doctorado en Medicina.
- Buccafusco, J.J. (1982).** Kinetics of (3H)choline and (3H)acetylcholine metabolism in several regions of rat brain following intracerebroventricular injection of (3H)choline. Effects of Haloperidol. *Biochem. Pharmacol.* 31 (8): 1599-1605.
- Buehler, B.A., Dick, D. and Delimont, D. (1993).** Prenatal prediction of risk of the fetal hydantoin syndrome. *N.Engl.J.Med* 329: 1660-61.
- Buist, A., Norman, T.R. & Dennerstein, L. (1990)** Breast feeding and the use of psychotropic medication. a review *J. Affect. Disord.* 19: 197-206.
- Burke, R.E., Antonelli, M. & Sulzer, D. (1998).** Glial cell-derived neurotrophic factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture. *J. Neurochem.* 71 (2): 517-25.
- Cabelli, R.J., Shelton, D.L., Segal, R.A. and Shatz, C.J.(1997)** Blockade of endogenous ligands of TrkB inhibits formation of ocular dominance columns. *Neuron* 19 (1): 63-76.
- Calabresi, P., Saiardi, A., Pisani, A., Baik, J-H., Centonze, D., Mercuri, N.B. y col. (1997).** Abnormal synaptic plasticity in the striatum of mice lacking dopamine D2 receptors. *J. Neurosci.* 17 (12): 4536-4544.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N.B. & Bernardi, G. (1996).** The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 19: 19-24.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A. & Bernrdi, G. (1998).** Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses. *Eur. J. Neurosci.* 10 (9): 3020-3.

- Calamandrei, G., Valanzano, A. & Alleva, E.** (1993). Growth factors in behavioral teratology. *Ann. Ist. Super. Sanita* 29(1): 185-96.
- Calamandrei, G. & Alleva, E.** (1989). EGF has growth-promoting and growth-inhibiting effect on physical and neurobehavioral development of neonatal mice. *Brain Res.* 477: 1-6.
- Calamandrei, G., Ricceri, L. & Valanzano, A.** (1996). Systemic administration of anti-NGF antibodies to neonatal mice impairs 24 h retention of an inhibitory avoidance task while increasing ChAT immunoreactivity in the medial septum. *Behav. Brain Res.* 78: 81-91.
- Carmignoto, G., Canella, R., Candeo, P., Comelli, M.C. & Maffei, L.** (1993). Effects of Nerve Growth Factor on neuronal plasticity of the kitten visual cortex. *J. Physiol. (London)* 464: 343-60
- Castro, R., Brito, B., Segovia, J., Martin-Trujillo, J.M. & Notario, V.** (1994). Prenatal haloperidol induces a selective reduction in the expression of plasticity-related genes in neonate rat forebrain. *Mol. Brain Res.* 26 (1-2): 74-80.
- Chanda, S.M. & Pope, C.N.** (1996). Neurochemical and neurobehavioral effects of repeated exposure to chlorpyrifos in maternal and developing rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53 (4): 771-6
- Chang, & Greenough, W.T.** (1984). Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res.* 309: 35-46.
- Chao, M.V.** (1992). Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* 9: 583-93.
- Chao, M.V. & Hempstead, B.L.** (1995). p75 and Trk: a two receptor system. *TINS* 18: 321-26.
- Clarke, P.G.H.** (1985). Neuronal death in the development of the vertebrate nervous system. *TINS* 345-49
- Cohen, L.S. & Rosenbaum, J.F.** (1998). Psychotropic drug use during pregnancy: weighing the risks. *J. Clin. Psychiatry* 59 (Suppl.2): 18-28.
- Committee of Drugs of the American Academy of Pediatrics.** Transfer of drugs and other chemicals into human milk (1989). *J. Pediatrics* 84 (5): 924-36.
- Conrad, P.** (1985). The meaning of medications: another look at compliance. *Social Sci. Medic* 20 (1) 29-37
- Coyle, J.T. & Campochiaro, P.** (1976). Ontogenesis of cholinergic-dopaminergic interactions in the rat striatum: A neurochemical study. *J. Neurochem.* 27: 673-78.
- Coyle, J.T. & Enna** (1976). Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the brain. *Brain Res.* 111 (1): 119-33.

- Coyle, J.T. & Yamamura, H.I.** (1976). Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. *Brain Res.* 118 (3): 429-40.
- Creese, I., Burt, D. & Snyder, S.H.** (1976). Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of anti-schizophrenic drugs. *Science* 192: 481-83.
- Cuello, A.C. & Thoenen, H.** (1995). The pharmacology of Neurotrophic factors. In: *Pharmacological sciences: perspectives for research and therapy in the late 1990s.* A. C. Cuello and B. Collier, Eds. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 241-254.
- Cuomo, V., Cagiano, R., Coen, E., Mocchetti, L., Cattabeni, F. & Racagni, G.** (1981). Enduring behavioural and biochemical effects in the adult rat after prolonged administration of Haloperidol. *Psychopharmacol.* 74: 166-69.
- Cuomo, V., Cattabeni, F. and Racagni, G.** (1983). The influence of early postnatal treatment with haloperidol on the effects induced by small and large doses of apomorphine on locomotion of adult rats. *Neuropharmacol.* 22 (9):1137-39.
- Cuomo, V., Cagiano, R., Renna, G., Serinelli, A., Brunello, N. & Racagni, G.** (1985). Comparative evaluation of the behavioral consequences of prenatal and early postnatal exposure to haloperidol in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7 (5): 489-92.
- Cuomo V. et al.** (1987). Perinatal neurotoxicology of psychotropic drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 346-50.
- Dahlstrom, K. & Theorell, K.** (1997). Lamotrigine treatment in attention deficit hyperactive disorder (ADHD). XVI World Congress of Neurology, Sept. 14-19, Buenos Aires. *En: Neurol. Sci.,* S152
- DaVanzo, J.P. & Sydow, M.** (1979). Inhibition of isolation-induced aggressive behavior with GABA-transaminase inhibitors. *Psychopharmacol.* 62: 23-7.
- Deckwerth, T.L. & Johnson Jr., E.M.** (1993) Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of Nerve Growth Factor. *J. Cell Biol.* 123 (5): 1207-22.
- De Koninck, P., Carbonetto, S. & Cooper, E.** (1993). NGF induces neonatal rat sensory neurons to extend dendrites in culture after removal of satellite cells. *J. Neurosci.* 13(2): 577-85.
- de la Cruz López, F. & Uriostegui-Santa María, T.** (1996). The differential Haloperidol effects on the immobility response elicited by clamping, grasping, bandaging and inversion in guinea pig, hamster and rat. *Behav Brain Res* 78: 195-99.

- Delfs, J.M., Schreiber, L. & Kelley, A.E.** (1991). Microinjection of cocaine into the nucleus accumbens elicits locomotor activation in the rat. *J. Neurosci.* 10 (1): 303-310
- Del Rio J., Montero D. & De Ceballos M.L.** (1987). Lasting changes after prenatal exposure to antidepressant drugs. 15th. Intl. Summer School of Brain Research Neurochemistry of Functional Neuroteratology: Permanent effects of chemicals on the developing brain. Institute for Brain Research and The University of Amsterdam. Netherlands
- Dewey, S.L., Brodie, J.D. & Fowler, J.S.** (1990). *Synapse* 6:321-27
- Diana, A., Setzu, M., Sirigu, S. & Diaz, G.** (1993). Nuclear patterns of apoptotic and developing neurons of superior cervical ganglion of newborn rat. *Int.J.Dev.Neurosci.* 11 (6): 773-80.
- Dieulangrard, P. et al.** (1966). Sur un cas d'phocomelia peutetre d'origine medicamenteuse. *Bull. Fed. Gynecol. Obstet.* 18: 85-87.
- Dieulangrard, P. et al.** (1969). Safety evaluation of haloperidol in the treatment of hyperemesis gravidarum. *J. Clin. Pharmacol.* 9: 224-27.
- Domenici, L., Berardi, N., Carmignoto, G., Vantini, G. and Maffei, L.** (1991). NGF prevents the amblyopic effects of monocular deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8811-8815.
- Ducrot, V.E.** (1998). *La Nacion* (7 de junio) sección 7: pag.5.
- Easter, S.S. Jr., Puerves, D., Rakic, P. & Spitzer, N.C.** (1985). The changing view of neural specificity. *230 (4725):* 507-11.
- Easton, R.M., Deckwerth, T.L., Parsadanian, A.S. and Johnson, Jr., E.M.** (1997). Analysis of the mechanism of loss of trophic factor dependence associated with neuronal maturation: a phenotype indistinguishable from *Bax* deletion. *J. Neurosci.* 17 (24): 9656-66.
- Einon, D.F. & Morgan, M.J.** (1977). A critical period for social isolation in the rat. *Dev. Psychobiol.* 10 (2): 123-32.
- El-Fakahany, E.E., Alger, D.E., Lai, W.S., Pitler, T.A., Worley, P.F. & Baraban, J.M.** (1988). Neuronal muscarinic responses: role of protein kinase C. *FASEB J.* 2: 2575-83.
- Elkabes, S., Cherry, J.A., Schoups, A.A. & Black, I.B.** (1993). Regulation of protein kinase C activity by sensory deprivation in the olfactory and visual systems. *J. Neurochem.* 60(5): 1835-42
- Ellison, G., Eison, M.S., Huberman, H.S. & Daniel, F.** (1978). Long-term changes in dopaminergic innervation of caudate nucleus after continuous amphetamine administration. *Science* 201(4352): 276-8

- Elmazar, M.M. & Sullivan, F.M.** (1981). Effect of prenatal phenytoin administration on postnatal development of the rat: a behavioral teratology study. *Teratology* 24 (2): 115-24.
- Elsner, J.** (1986). Testing strategies in behavioral teratology: III. Microanalysis of behavior. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8 (5): 573-84.
- Elsner, J, Hodel, B., Suter, KE et al.** (1988). Detection Limits of different approaches in Behavioral Teratology and correlation of effects with neurochemical parameters. *Neurotoxicol. Teratol.* 10 (2): 155-67.
- Eva, C., Fusco, M., Brusa, R., Schiavo, N. Ricci Gamalero, S. y col.** (1994). Intracerebroventricular administration of nerve growth factor affects muscarinic cholinergic receptors in the cerebral cortex of neonatal rats. *Neurochem. Int.* 24 (1): 57-65.
- Exner, M. & Clark, D.** (1993). Subtle variations in living conditions influence behavioural reponse to d-amphetamine *Neuroreport* 4 (8): 1059-62.
- Fabel, G.** (1988). Exogenous harmful substances in pregnancy and their effects on the embryo and fetus. *Zentralbl Gynakol.* 110 (24): 1566-55.
- Fagan, A.M., Garber, M., Barbacid, M. Silos-Santiago, Y. and Holtzman, D.M.** (1997). A role for TrkA during maturation of striatal and basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J. Neurosci.* 17(20): 7644-7654
- Feeney, D.M., Gonzalez, A. & Law, W.A.**(1982). Amphetamine, Haloperidol and Experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science* 217: 855-857.
- Feeney, D.M. & Hovda, D.A.** (1985). Reinstatement of binocular depth perception by amphetamine and visual experience after visual cortex ablation. *Brain Res.* 342 (2): 352-6.
- Fenwick, P.B.** (1992). Antiepileptic drugs and their psychotropic effects. *Epilepsia (USA)* 33 (Suppl. 6): S33-36.
- Fernández,E., Cuenca, N., Cerezo, J.R. & Juan, J.P.** (1993). Visual experience during postnatal development determines the size of optic nerve axons. *NeuroReport* 5: 365-68.
- Ferretti, C., Blengio, M., Vigna, I., Ghi, P. & Genazzani, E.** (1992). Effects of estradiol on the ontogenesis of striatal dopamine D1 and D2 receptor sites in male and female rats. *Brain Res.* 571 (2): 212-17.
- Fichtl, B., Fulgraff, G., Neumann, H.G. et al.** (1992). Allgemeine pharmakologie und toxikologie. En: Forth, W. Henschler, D., Rummel, W. & Starke, K., Eds., Allgemeine und spezielle pharmakologie und toxikologie. Mannheim, Leipzig, Wien, Zurich. BI-Wissenschaftsverlag, pp. 1-95.

- Fiedler, E.P., Marks, M.J. & Collins, A.C.** (1987). Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. *J. Neurochem.* 49 (3): 983-90.
- Finlay, B.L. & Slaterry, M.** (1983). Local differences in the amount of early cell death in neocortex predict adult local specializations. *Science* 219: 1349-51.
- Fischer, H.P., Marksteiner, J., Ransmayr, G., Saria, A. & Humpel, C.** (1998). NGF but not GDNF enhance acetylcholine tissue levels in striatal organotypic brain slices. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16 (5): 391-401.
- Fishel, (1991).** Pattern formation in the striatum: neurons with early projections to the substantia nigra survive the cell death period. *J. Comp. Neurol.* 312 (1): 33-42.
- Floresco, S.B., Seamans, J.K. & Phillips, A.G.** (1997). Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuitry in radial-arm maze tasks with or without a delay. *J. Neurosci.* 17 (5): 1880-90.
- Florio, T., Di Loreto, S., Cerrito, F. & Scarnati, E.** (1993). Influence of prelimbic and sensorimotor cortices on striatal neurons in the rat: electrophysiological evidence for converging inputs and the effects of 6-OHDA-induced degeneration of the substantia nigra. *Brain Res.* 619 (1-2): 180-8.
- Forander, P., Soderstrom, S., Humpel, C. & Stromberg, L.** (1996). Chronic infusion of nerve growth factor into rat striatum increases cholinergic markers and inhibits striatal neuronal discharge rate. *Eur. J. Neurosci.* 8 (9): 1822-32.
- Fox, K.** The cortical component of experience-dependent synaptic plasticity in the rat barrel cortex (1994). *J. Neurosci.* 14 (12): 7665-7679.
- Friedhoff, A.J. & Miller, J.C.** (1982). Clinical implications of receptor sensitivity modifications. *Ann. Rev. Neurosci.* 6: 121-48.
- Frick, K.M., Price, D.L., Koliatsos, V.E. & Markowska, A.L.** (1997). The effects of nerve growth factor on spatial recent memory in aged rats persist after discontinuation of treatment. *J. Neurosci.* 17 (7): 2543-50.
- Fujii, T. & Ikeda, H.** (1982). Sex difference in the development of hypersensitivity or tolerance to haloperidol in the rat. *Jpn.J. Pharmacol.* 32 (2): 247-54.
- Fujii, T., Ikeda, H. & Yamamoto, N.** (1982). Prenatal exposure of rats to phenytoin develops supersensitivity to haloperidol in adulthood. *Proceedings of the Japan Academy (Series B: Physical and Biological Sciences)* 58 (3): 78-82.

- Gabellini, N., Minozzi, M.C., Leon, A. & Dal Toso, R.** (1992). Nerve Growth Factor transcriptional control of c-fos promoter transfected in cultured spinal sensory neurons. *J. Cell Biol.* 118 (1): 131-38.
- Gaily E. et al.** Minor anomalies in offspring of epileptic mothers. *J. Pediatr.* 112: 520-529 (1988).
- Gaily E., et al.** Intelligence of children of epileptic mothers. *J. Pediatr.* 113: 677-684, 1988
- Galaguer, D.W. & Mallorga, P.** (1980). Diphenylhydantoin: Pre- and Postnatal administration alters diazepam binding in developing rat cerebral cortex. *Science* .208: 64-66.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M., Kraeuchi, K. & Feer, H.** (1982). Different reaction patterns in individually and socially reared rats during exposures to novel environments. *Behav. Brain Res.* 4 (1): 45-54.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M. & Feer, H.** (1982). Behavioral comparisons between individually- and group-housed male rats: effects of novel environments and diurnal rhythm. *Behav. Brain Res.* 6 (1): 93-100.
- Gentsch, C., Lichtsteiner, M. & Feer, H.** (1983). Individually-housed rats exceed group-housed animals in rotational movements when exposed to novel environment. *Experientia* 39 (12):1412-4
- Gibbs, R.B. and Pfaff, D.W.** (1994). In situ hybridization detection of TrkA mRNA in brain: distribution, colocalization with p75^{NGFR} and up regulation by nerve growth factor. *J. Comp. Neurol.* 341: 324-339.
- Gongora-Alfaro JL., Hernandez-Lopez, S., Martinez-Fong, D., Flores, G, and Aceves, J.** Circling behavior elicited by cholinergic transmission in the substantia nigra pars compacta: involvement of nicotinic and muscarinic receptors. *Neuroscience* 71 (3): 729-734, 1996.
- Goodman, LS & Gilman, A.** (1992). *The pharmacological basis of therapeutics.* 9th edition. Mcmillan Co. New York, USA.
- Granstrom.M-L. & Gaily, E.** (1992). Psychomotor development in children of mothers with epilepsy. *Neurology* 42 (suppl. 5): 144-48.
- Gray L.E., Jr. and Kelce W.R.** (1996). Latent effects of pesticides and toxic substances on sexual differentiation of rodents. *Toxicol. Ind. Health (USA)* 1996, 12 (3-4): 515-531
- Grenough, W.T., Black, J.E., Chang, F.L.F. & Sirevaag, A.M.** (1993). Pueden los diferentes procesos de almacenamiento cerebral de la información existentes en distintas edades evolutivas compensar las incapacidades precoces del desarrollo?. *Fonoaudiológica (Asociación Argentina de Logopedia, Foniatria y Audiología -ASALFA-)*, Tomo 38, N°2.

- Gu, Q.** (1995). Involment of nerve growth factor in visual cortex plasticity. *Rev. Neurosci.* 6 (4): 329-51.
- Gu, Q., Liu, Y. & Cynader, M.S.** (1994). Nerve growth factor-induced ocular dominance plasticity in adult cat visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8408-8412.
- Haakinson, M.L., Theesen, K.A. & Conover, E.A.** (1996). FDA pregnancy categories and psychopharmacological agents. *ASHP-Midyear Clinical Meeting* 31 (december): P-57D.
- Hannigan, J.H. & Blanchard, B.A.** (1988). Commentary: Psychopharmacological assessment in Neurobehavioral Teratology. *Neurotoxicol. Teratol.* 10 (2): 143-45.
- Hattig H. & Steinhausen H-Ch.** (1987). Children of epileptic parents: a prospective developmental study. In: Rauh, H. & Steinhausen, H-Ch., Eds. *Psychobiology and early development.* Elsevier. Amsterdam pp.155-169.
- Hattori, A., Luo, Y., Umegaki, H., Muñoz, J. & Roth, G.S.** (1998). Intrastriatal injection of dopamine results in DNA damage and apoptosis in rats. *Neuroreport* 9 (11): 2569-72.
- Hayashi, A., Nagaoka, M., Yamada, K., Ichitani, Y. Miake, Y. & Okado, N.** (1998). Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16 (3-4): 209-16.)
- Heimann, G.** (1982). Arzneimitteldosierung bei Kindern. *DAZ* 122: 893-98.
- Heyman, G.M. & Beer, B.** (1987). A new approach for evaluating the behavioral effects of antipsychotic drugs. *TIPS* 8: 388-93
- Henderson, C.E.** (1996). Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 64-70.
- Hikosaka, O.** (1991). Basal ganglia: possible role in motor coordination and learning. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1 (4): 638-43.
- Hilakivi, L.A., Ota, M. & Lister, R.G.** (1989). Effect of isolation on brain monoamines and the behavior of mice in tests of exploration, locomotion, anxiety and behavioral despair. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33: 371-74.
- Hill, H.F. & Engblom, J.** (1984). Effects of pre and postnatal haloperidol administration to pregnant and nursing rats on brain catecholamine levels in their offspring. *Develop. Pharmacol. Therap.* 7: 188-97.
- Hill, R.M., Verinaud, W.M., Rettig, C.M., Tennyson, L.M. & Craig, J.P.** (1982). Relationship between antiepileptic drug exposure of the infant and developmental potential. In: Janz D. et al., Eds., *Epilepsy, pregnancy and the child.* Raven Press, NY (USA), 409-17.

- Bolson, R.R., Webb, P.J., Grafton, T.F. and Hansen, D.K.** (1994). Prenatal neuroleptic exposure and growth stunting in the rat: an in vivo and in vitro examination of sensitive periods and possible mechanisms. *Teratology* 50 (2): 125-36.
- Horuykiewicz, O.** (1985). The life history of brain dopamine. *Wien. Klin. Wochenschr.* 97 (8): 350-54.
- Hull, E.M. et al.** (1984). Perinatal dopamine-related drugs demaculinize rats. *Science* 224: 1011-13.
- Ibarra, G.R., Rodríguez, J.A., Paratcha, G.C. and Azcurra, J.M.** (1995). Permanent alteration of muscarinic acetylcholine receptor binding in rat striatum after circling training during development. *Brain Res.* 705: 39-44.
- Inqvar, M., Stone-Elander, S., Rogers, G.A., Johansson, B., Eriksso, L. y col.** (1993). Striatal D2/acetylcholine interactions: PET studies of the vesamicol receptor. *Neuroreport* 4: 1311-14.
- Instituto Mexicano del Seguro Social, Subdirección General Médica-IMSS** (1991), en colaboración con el Grupos de Estudios al Nacimiento y el Grupo Interinstitucional de Atención Materno Infantil, OMS y OPS). Análisis del Riesgo-Beneficio en el uso de Medicamentos Administrados durante el Embarazo y la Lactancia.
- Iszviski, G.** (1998). Curso Nacional de Farmacovigilancia. ANMAT Buenos Aires.
- Jacobson, J.L. & Jacobson, S.W.** (1996). Dose-response in perinatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs): the Michigan and North-Carolina cohort studies. *Toxicol. Ind. Health (USA)* 12 (3-4): 435-445.
- Jahn, F., Kadiiska, M., Serbinova, E., Klinger, W. & Stoytchev, T.** (1989). The influence of acute phenytoin administration on biotransformation and lipid peroxidation in the liver of rats of different ages. *Biochem. Pharmacol.* 38 (22): 4148-51
- Jahn F., Reuter, A., Karge E., Danz M., Klinger W.** (1993). Age dependent different influence of carbon tetrachloride on biotransformation of xenobiotics, glutathione content, lipid peroxidation and histopathology of rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 45 (2-3): 101-07.
- Janssen PA. & Awouters, FH.** (1994). Is it possible to predict the clinical effects of neuroleptics from animal data? Part V: From haloperidol and pipamperone to risperidone. Janssen Research Council. Beerse. Belgium. *Arzneimittelforschung* 44 (3): 269-77.
- Jumblatt, J.E. & Tischler, AS.** (1982). Regulation of muscarinic ligand binding sites by NGF in PC12 pheochromocytoma cells. *Nature* 297: 152-54.

- Jenner, P. & Marsden, C.D.** (1986) Interactions between D-1 and D-2 receptors resulting from chronic neuroleptic action. *Clin. Neuropharmacol.* 9 (4), S 11: 26-28.
- Johanson, I.B. & Hall, W.G.** (1979) Appetitive learning in 1-day-old rat pups. *Science* 205: 419-21.
- Kaczmarek, L., Kossut, M. & Skangiel-Kramska, J.** (1997). Glutamate receptors in cortical plasticity: *Molec. Cell. Biol. Physiol. Rev.* 77 (1): 217-55.
- Khera, K.S.** (1987). Maternal toxicity in humans and animals: effects on fetal development and criteria for detection. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 7(3): 287-95.
- Kim, J.A., Gillespie, R.A. & Druse, M.J.** (1997). Effects of maternal ethanol consumption and buspirone treatment on 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in offspring. *Alcohol Clin Exp. Res.* 21 (7): 1169-78.
- Klawans Jr., H.L. & Rubovits, R.** (1972). Central cholinergic-anticholinergic antagonism in Huntington's chorea. *Neurology* 22 (2): 107-16.
- Klinger, W.** (1974). Pharmacological problems in perinatal medicine. *Med. Klin.* 69(6): 223-30.
- Klinger, W.** (1970). Toxicity, narcotic effect, blood level after awaking, elimination from the blood and biotransformation of hexobarbital in rats at different ages after induction with barbital and carbon tetrachloride poisoning. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 184 (1): 5-18.
- Klinger, W.** (1982). Biotransformation of drugs and other xenobiotics during postnatal development. *Pharmacol. Ther.* 16 (3): 377-29.
- Klinger, W.** (1989). Anticonvulsive therapy and complications of pregnancy in epileptic patients. *Psychiatr. Neurol. Med. Psychol. (Leipz.)* 41 (7): 400-05.
- Klinzova, A.J., Uranova, N.A., Haselhorst, U. & Schenk, H.** (1990). Synaptic plasticity in rat medial prefrontal cortex under chronic Haloperidol treatment produced behavioral sensitization. *J. Hirnforsch.* 31: 175-79.
- Knüsel, B., Rabin, S., Hefti, F. & Kaplan, D.R.** (1994). Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *J. Neurosci.* 14(3): 1542-54.
- Kobayashi, S., Ogren, S.O., Ebendal, T. & Olson, L.** (1997). Dopamine receptor antagonists block NGF-induced hyperactivity. *Eur. J. Pharmacol.* 326(1): 1-5.
- Kochhar, D.M., Penner, J.D. & Satre, M.A.** (1988). Derivation of retinoic acid and metabolites from a teratogenic dose of retinol (vitamin A) in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 96: 429-41.

- Kordower, J.H., Chen, E.Y., Mufson, E.J., Winn, S.R. & Emerich, D.F.** (1996). Intrastriatal implants of polymer encapsulated cells genetically modified to secrete hNGF: trophic effects upon cholinergic and non cholinergic striatal neurons. *Neuroscience* 72 (1): 63-77.
- Korsching, S., Auburger, G., Heumann, R., Scott, J. & Thoenen, H.** (1985). Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.* 4 (6): 1389-93.
- Kretschmar, M., Muller, D., Hubscher, J., Marin, E. & Klinger, W.** (1991). Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. *Int. J. Sports Med.* 12 (2): 218-22.
- Kovacs, G.L. & de Wied, D.** (1978). Effects of amphetamine and haloperidol on avoidance behavior and exploratory activity. *Eur. J. Pharmacol.* 53 (1): 103-7.
- Kudoh, A., Sakai, T., Ishihara, H. & Matsuki, A.** (1994). Emergency caesarean section for a patient with chronic schizophrenia. *Masui (JAPAN)* 43 (9): 1345-47.
- Lanczik, M., Knoche, M. & Fritze, J.** (1998). Psychopharmacotherapy during pregnancy and lactation. 1: Pregnancy. *Nervenarzt* 69 (1): 1-9.
- Lapchak, P.A., Araujo, D.M., and Hefti, F.** (1993). Regulation of hippocampal muscarinic receptor function by chronic NGF treatment in adult rats with fimbrial transections. *Neuroscience* 53: 379-394.
- Laviola, G., Renna, G., Bignami, G. & Cuomo, V.** (1988). Ontogenetic and pharmacological dissociation of various components of locomotor activity and habituation in the rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 6 (5): 431-8.
- Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P.U.** (1968). Nerve Growth Factor. *Physiol. Rev.* 48:534-69.
- Levin, B.E. & Dunn-Meynell, A.** (1993). Regulation of growth-associated protein 43 (GAP-43) messenger RNA associated with plastic change in the adult rat barrel receptor complex. *Mol. Brain Res.* 18(1): 59-70.
- Li, Y., Holtzman, D.M, Kromer, L.F., Kaplan, D.R., Chua-Couzens, J., Clary, D.O., Knusel, B. & Mobley, W.C.** (1995). Regulation of TrkA and ChAT expression in developing rat basal forebrain: evidence that both exogenous and endogenous NGF regulate differentiation of cholinergic neurons. *J. Neurosci.* 15: 2888-905.
- Lin, M.Y. & Walters, D.E.** (1994). The D2 autoreceptor agonists SND919 and PD128483 decrease stereotypy in developing rats. *Life Sci.* 54 (1): PL17-22.

(1986). Functional effects of maternal exposure to imipramine, chlorpromazine and haloperidol on the offspring over three generations in rats. Fourth Intl. Congress of Toxicology, Tokyo, Japan, July 21-25. Toxicology Letters 31 (Suppl.): 238.

Liberini, P., Reuben, M., Clarke, P.S. & Cuello, A.C. (1995). NGF treatment restaures [3H]QNB binding site density in adult rat subjected to cortical infarction. NeuroReport 6:419-20

Liberini, P. & Cuello, A.C. (1994). Effects of Nerve Growth Factor in primate models of neurodegeneration: potential relevance in clinical neurology. Rev. Neurosci. 5: 89-104.

Lindholm, D., Castrén, E., Berzaghi, M., Blöchl, A. & Thoenen, H. (1994). Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain: Implications for neuronal plasticity. J. Neurobiol. 25 (11): 1362-1372.

Liston, J. (1998). Breastfeeding and the use of recreational drugs: alcohol, caffeine, nicotine and marijuana. Breastfeed. Rev. 6 (2): 27-30.

Liu, Y., Meiri, K.F., Cynader, M.S. & Gu, Q. (1996). Nerve Growth Factor induced modification of presynaptic elements in adult visual cortex in vivo. Brain Res. 732(1-2): 36-42.

Ljunberg, T. & Ungerstedt, U. (1979). Evidence that the different properties of Haloperidol and Clozapine are not explained by differences in anticholinergic potency. Psychopharmacol. 60:303-7

Lochry, E.A., Johnson, C. & Wier, P.J. (1994). Behavioral evaluations in developmental toxicity testing: MARTA surveys results. Neurotoxicol. Teratol. 16 (1): 55-63.

Loggi, G., Laviola, G., Alleva, E. & Chiarotti, F. (1991). Morphine effects on mouse locomotor/exploratory activity: test dependency, test reliability, uni- and multi-variate analysis. Pharmacol. Biochem. Behav. 38 (4): 817-22.

Lohof, A.M., Delhaye-Bochaud, N. & Mariani, J. (1996). Synapse elimination in the central nervous system: functional significance and cellular mechanisms. Rev. Neurosci. 7 (2): 85-101.

Loughnan, P.M. et al. (1973). Phenytoin teratogenicity in man. Lancet 1: 70-2.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 158: 265-75.

Macaya, A., Munell, F., Gubits, R.M. & Burke, R.E. (1994). Apoptosis in substantia nigra following developmental striatal excitotoxic injury. PNAS (USA) 91 (17): 8117-21.

Maciejewska, B., Lipowska, M., Kowianski, P., Domaradzka-Pytel, B. & Morys, J. (1998). Postnatal development of the striatum : a study using *in situ* DNA end labeling technique. Acta Neurobiol. Exp. (Warsz) 58 (1) : 23-8

- Madhok, T.C. & Sharp, B.M.** (1992). NGF enhances [³H]Nicotine binding to a nicotinic cholinergic receptor on PC 12 cells. *Endocrinology* 130 (2): 825-30.
- Madsen, J.R., Campbell, A. & Baldessarini, R.J.** (1981). Effect of prenatal treatment of rats with haloperidol due to an altered drug distribution in neonatal brain. *Neuropharmacol.* 20: 931-9.
- Marchetti, F., Romero, M., Bonati, M. & Tognoni, G.** (1993). Use of psychotropic drugs during pregnancy. A report of the international co-operative drug use in pregnancy (DUP) study. Collaborative group on drug use in pregnancy (CGDUP). *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 45(6): 495-501.
- Markova, I.V.** (1990). The undesirable action of drugs on the embryo, fetus and newborn infant. *Farmakol. Toksikol.* 53(4): 82-86.
- Marsden, P.M., Smith, D.W., McDonald, M.J.** (1964) Congenital anomalies in the newborn infant, including minor variations. *J. Pediatr.* 64: 357
- Marti, M.J., James, Ch.J., Oo, T.F., Kelly, W.J. & Burke, R.E.** (1996). Early developmental destruction of terminals in the striatal target induces apoptosis in dopamine neurons of the substantia nigra. *J. Neurosci.* 17: 2030-39.
- Martin, D.P., Schmidt, R.E., Distefano, P.S., Lowry, O.H., Carter, J.G. & E.M. Johnson, Jr.** (1988). Inhibition of protein synthesis prevent neuronal death caused by NGF deprivation. *J. Cell Biol.* 106: 829-44.
- Maschover Reinisch, J. Sanders, S.A., Mortensen, E.L. & Rubin D.B.** (1995). In utero exposure to phenobarbital and intelligence deficits in adult men. *JAMA* 274 (19): 1518-25.
- Matsubara, K. & Matsushita, A.** (1984). Long-lasting reduction of amphetamine-induced hyperactivity in rats after combined administration of caerulein and haloperidol. *Eur. J. Pharmacol.* 101 (1-2): 157-8.
- Maurissen, J.P. & Vorhees, C.V.** (1989). Use of the coefficient of detection and sample size determination. *Neurotoxicol. Teratol.* 4: 377-79.
- Maysinger, D., Herrera-Marschitz, M., Goiny, M. Ungerstedt, U. & Cuello, A.C.** (1992). Effects of nerve growth factor on cortical and striatal acetylcholine and dopamine release in rats with cortical devascularizing lesions. *Brain Res.* 577: 300-305.
- McBride, W.G.** (1977). Thalidomide embryopathy. *Teratology* 16: 79-82.
- McCullar, F.W. & Heggeness, L.** (1975). Limb malformations following maternal use of haloperidol. *JAMA* 231 (1): 62-4.
- Meloni, R. & Gale, K.** (1995). Activation of tyrosine hydroxylase by haloperidol in fetal nigral transplants. *NeuroReport* 6(4): 666-68.

- Mendell, L.M.** (1995). Neurotrophic factors and the specification of neural function. *The Neuroscientist* 1 (1): 26-34.
- Meyer, J.F., Robinson, P. & Todtenkopf, M.S.** (1994). Prenatal cocaine treatment reduces haloperidol-induced catalepsy on postnatal day 10. *Neurotoxicol. Teratol.* 16 (2): 193-99.
- Middaugh, L.D. & Zemp, J.W.** (1985). Dopaminergic mediation of long-term behavioral effects of *in utero* drug exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7: 685-89.
- Middaugh, L.D.** (1986) Phenobarbital during pregnancy in mouse and man. *Neurotoxicol.* 7 (2) 287-301.
- Milberger, S., Biederman, J., Faraone, S.V., Guite, J. & Tsuang, M.T.** (1997). Pregnancy, Delivery and Infancy Complications and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Issues of gene-environment interaction. *Biol Psychiatry* 41 65-75
- Miller, J.C.** (1983). Sex differences in dopaminergic and cholinergic activity and function in the nigrostriatal system of the rat. *Psychoneuroendocrinol.* 8 (2): 225-36.
- Miller, J.C. & Friedhoff, A.J.** (1988) Prenatal neurotransmitter programming of postnatal receptor function. *Progr. Brain Res.* 73: 491-508. Eds.: Boer, G.J. et al. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
- Minck, D.R., Acuff-Smith, K.D. & Vorhees, C.V.** (1991). Comparison of the behavioral teratogenic potential of phenytoin, mephentoin, ethotoin and hydantoin in rats. *Teratology* 43 (4): 279-93.
- Mobley, W.C., Woo, J.E., Edwards, R.H., Riopelle, R.J., Longo, F.M. y col.** (1989). Developmental regulation of Nerve Growth Factor and its receptor in rat caudate-putamen. *Neuron* 3: 655-64.
- Morgan, M.E., Yamamoto, B.K. & Freed, C.R.** (1984). Unilateral activation of caudate tyrosine hydroxylase during voluntary circling behavior. *J. Neurochem.* 43: 737.
- Moss, H.B., Blackson, T.C., Martin, C.S. & Ralph, E.** (1992). Heightened motor activity level in male offspring of substance abuse fathers. *Biol. Psychiat.* 32: 1135-42.
- Muller, P. & Seeman, P.** (1978). Dopaminergic supersensitivity after neuroleptics: time course and specificity. *Psychopharmacol.* 60: 1-11.
- Murphy, B.L., Arnsten, A.F., Goldman-Rakic, P.S. & Roth, R.H.** (1996). Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *PNAS (USA)* 93 (3): 1325-29

- Murphy, B.L., Arnsten, A.F., Goldman-Rakic, P.S. & Roth, R.H.** (1996). Dopamine and spatial working memory in rats and monkeys: pharmacological reversal of stress-induced impairment. *J. Neurosci.* 16 (2): 7768-75.
- Nakano, J., Okita, M., Yosimura, T. & Kato, K.** (1997). The effect of treadmill and isometric exercises in MDX mice. XVI World Congress of Neurology, Sept. 14-19, Buenos Aires. *En: Neurol. Sci.* S264.
- Narotsky, M.G. & Kavlock, R.J.** (1995). A multidisciplinary approach to toxicological screening: II. Developmental toxicity. *J. Toxicol. Environ. Health (USA)* 45 (2): 145-171.
- Neeper, S.A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J. & Cotman, C.** (1996). Physical activity increases mRNA for BDNF and NGF in rat brain. *Brain Res.* 726: 49-56.
- Nelson, B.K.** (1991). Evidence for behavioral teratogenicity in humans. *J. Appl. Toxicol.* 11 (1): 33-7.
- Newman, L.M., Johnson, E.M. & Staples, R.E.** (1993). Assessment of the effectiveness of animal developmental toxicity. *Reprod. Toxicol.* 7 (4): 359-90.
- Nielsen, E.B. & Lyon, M.** (1978). Evidence for cell loss in corpus striatum after long-term treatment with a neuroleptic drug (flupenthixol) in rats. *Psychopharmacol.* 59 (1): 85-89.
- Niesink, R.J. & van Ree, J.M.** (1982). Short-term isolation increases social interactions of male rats: a parametric study. *Physiol. Behav.* 29 (5): 819-25.
- Norton, S.** (1973). Amphetamine as a model for hyperactivity in the rat. *Physiol. Beh.* 11(2): 181-6.
- Normand, E., Popovici, T., Onteniente, B., Fellmann, D., Piatier-Tonneau, D. y col.** (1988). Dopaminergic neurons of the substantia nigra modulate preproenkephalin A gene expression in rat striatal neurons. *Brain Res.* 439 (1): 39-46
- Nurnberg, H.G.**(1980). Treatment of mania in the last six months of pregnancy. *Hosp. Community Psychiatry* 31: 122-26.
- Nye, S.H., Squinto, S.P. & Yancopoulos, G.D.** (1992). K-252A and Staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin mediated responses. *Molec. Biol. Cell* 3: 677-86.
- Oades, R., Taghzouti, K., Simon, H. and Le Moal, M.** (1985). Dopamine-sensitive alternation and collateral behavior in a Y-maze: effects of d-amphetamine and haloperidol. *Psychopharmacol. (Berl.)* 85(1): 123-8.

- Oo, T.F. & Burke, R.E.** (1997). The time course of developmental cell death in phenotypically defined dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 98 (2): 191-6.
- Owen, F., Cross, J., Waddington, J.L. et al.** (1980). Dopamine-mediated behavior and ³H-Spiperone binding to striatal membranes in rats after nine months haloperidol administration. *Life Sci.* 26 (1): 55-59.
- Paratcha, G.C., Ibarra, G.R., Cabrera, R.J. & Azcurra, J.M.** (1998). Decreased phosphorylation of GAP-43/B-50 in striatal synaptic membranes after circling motor activity. *Neurochem. Res.* 23 (10): 1241-49.
- Pardo et al.** (1977). *Brain Res.* 125: 376-82.
- Pearson, D.E., Teicher, M.H., Shaywitz, B.A., Cohen, D.J. Young, G.J. & Anderson, G.M.** (1980). Environmental influences on body weight and behavior in developing rats after neonatal 6-Hydroxydopamine. *Science* 209: 715-17.
- Pfenninger, K.H., de la Houssaye, B.A., Helmke, S.M. & Quiroga, S.** (1991). Growth-regulated proteins and neuronal plasticity. A commentary. *Mol. Neurobiol.* 5 (2-4): 143-51.
- Pitlovic, S., Cocha, R., Fadjdetic, D. & Prvulovic, T.** (1997). The results of long term follow up of children with perinatal risk factors. XVI World Congress of Neurology, Sept. 14-19, Buenos Aires. *En: Neurol. Sci.* S16
- Phelan, M.C., Pellock, M.M. & Nance, W.E.** (1982). Discordant expression of fetal hydantoin syndrome in heteropaternal dizygotic twins. *N. Engl. J. Med.* 307: 99-102.
- Phillips, N.K. & Lockard, J.S.** (1996). Infant monkey hyperexcitability after prenatal exposure to antiepileptic compounds. *Epilepsia (USA)* 37 (10): 991-99.
- Ploeger, G.E., Spruijt, B.M. & Cools, A.R.** (1994). Spatial localization in the Morris water maze in rats: acquisition is affected by intra-accumbens injections of the dopaminergic antagonist Haloperidol. *Behav. Neurosci.* 108 (5): 927-34.
- Prosser, E.S., Csernansky, J.G. & Hollister, L.E.** (1988). Differences in the time course of haloperidol-induced up-regulation of rat striatal and mesolimbic dopamine receptors. *Life Sci.* 43 (8): 715-20.
- Qiang, Gu, Yulin, Liu & Cynader, M.S.** (1994). NGF-induced ocular dominance plasticity in adult cat visual cortex. *PNAS (USA)* 91: 8408-412.
- Raine, A., Brennan, P. & Mednick, S.A.** (1997) Interaction between birth complications and early maternal rejection in predisposing individuals to adult violence: specificity to serious, early-onset violence. *Am. J. Psychiatry* 154 (9): 1265-271.

- Ravikumar, B.V. and Sastry, P.S. (1985).** Cholinergic muscarinic receptors in human fetal brain: ontogeny of (3H)quinuclidyl benzilate binding sites in corpus striatum, brainstem and cerebellum. *J. Neurochem.* 45 (6): 1948-50.
- Ravikumar, B.V. & Sastry, P.S. (1992).** Dopamine receptors in human foetal brains: characterization, regulation and ontogeny of (3H)Spiperone binding sites in striatum. *Neurochem. Int.* 20 (4): 559-566
- Rees, D.C., Francis, E.Z., Kimmel, C.A. (1990).** Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicants: a workshop summary. *Neurotoxicol. (USA)* 11 (2): 257-69.
- Riley, E.P. & Vorhees, C.V. (1986).** Handbook of behavioral teratology. Plenum Press. New York. USA.
- Reinhardt, D. & Kusenbach, G. (1986).** Peculiarities of drug therapy in childhood. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 134 (11): 772-8.
- Ringstedt, T., Lagercrantz, H. & Persson, H. (1993).** Expression of members of the trk family in the developing postnatal rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 72 (1): 119-31.
- Riopelle, R.J., Richardson, P.M. & Verge, V.M.K. (1987).** Distribution and characteristics of nerve growth factor binding on cholinergic neurons of rat and monkey forebrain. *Neurochem. Res.* 12: 923-28.
- Riva-Depaty, L, Dubreuil, Y.L., Mariani, J. & Delhaye-Bouchaud, N. (1998).** Eradication of cerebellar granular cells alters the developmental expression of Trk receptors in the rat inferior olive. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16 (1): 49-62.
- Robinson, S.E., Hongzhi, Guo & Spencer, R.F. (1993).** Prenatal exposure to methadone delays the development of striatal cholinergic neurons. *Devel. Brain Res.* 76: 239-48.
- Robinson, S.E, Guo, H., Maher, J.R., McDowell, K.P. & Kunko, P.M. (1996).** Postnatal methadone exposure does not prevent prenatal methadone-induced changes in striatal cholinergic neurons. *Dev. Brain Res.* 95: 118-21
- Rodier, P.M. (1977).** Correlations between prenatally-induced alterations in CNS cell populations and postnatal function. *Teratology* 16: 235-46
- Rodríguez de Lores Arnaiz, G. & De Robertis, E. (1972).** Properties of isolated nerve endings. In: *Current Topics in Membrane Transport*, vol.3: 237. Acad. Press Inc., NY (USA).
- Rodríguez Echandía, E. L. & Broitman, S.T. (1983).** Effect of prenatal and postnatal exposure to therapeutic doses of chlorimipramine on emotionality in the rat. *Psychopharmacol.* 79: 236-41.

- Rogan, W.J.** (1982). Teratogen update: PCBs and cola colored babies: JAPAN, 1968, and Taiwan, 1979. *Teratology* 26: 259-61.
- Rose, F.D., Davey, M.J. & Attree, E.A.** (1993) How does the environmental enrichment aid performance following cortical injury in the rat? *NeuroReport*, 4: 163-66.
- Rosengarten, H. & Friedhoff, A.J.** (1979) Enduring changes in dopamine receptor cells of pups from drug administration to pregnant and nursing rats. *Science*, 203: 1133-35.
- Roush, W.** (1995). Arguing over why johnny can't read. *Science* 267: 1896-898.
- Rozas, G. Guerra, M.J. & Labandeira-García, J.L.** (1997). An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2 (1): 75-84.
- Russi, G., Girotti, P., Cadoni, P., Di Chiara, G. & Consolo, S.** (1993). Neuroleptics increase striatal acetylcholine release by a sequential D1 and D2 receptor mechanism. *Neuroreport* 4: 1335-38.
- Rylett, R.J., Goddard, S., Schmidt, B.M. & Williams, L.R.** (1993). Acetylcholine synthesis and release following continuous intracerebral administration of NGF in adult and aged Fischer-344 rats. *J. Neurosci* 13 (9): 3956-3963.
- Saillenfait, A.M. & Vannier, B.** (1988). Metodological proposal in Behavioral Teratogenicity Testing: Assessment of propoxyphene, chlorpromazine and vitamin A as positive controls. *Teratology* 37 (3): 185-99.
- Saporito, M.S., Wilcox, H.M., Hartpence, K.C., Lewis, M.E., Vaught, J.L. & Carswell, S.** (1993) Pharmacological induction of NGF mRNA in adult rat brain. *Exp. Neurol.* 123: 295-02.
- Scalzo, F.M. & Spear, L.P.** (1985). Chronic haloperidol during development attenuates dopamine autoreceptor function in striatal and mesolimbic regions of young and older adult rats. *Psychopharmacol.* 85: 271-76.
- Scatchard, G.** (1949). The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 51: 660-72.
- Schardein, J.L.** (1993). Chemically induced birth defects. 2nd. edition. Marcel Dekker Inc. New York (USA).
- Schoups, A.A., Elliot, R.C, Friedman, W.J. & Black, I.B.** (1995). NGF and BDNF are differentially modulated by visual experience in the developing geniculocortical pathway. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 86 (1-2): 326-334.

- Scolnik, D., Nulman, Y., Rovet, J. et al.** (1994). Neurodevelopment of children exposed in utero to phenytoin and carbamazepine monotherapy. *JAMA* 271: 767-70
- Seeman, P., Ulpian, C., Wreggett, K.A. et al.** (1984). *J. Neurochem.* 43 (1): 221-35.
- Seeman, P.** (1981). Brain dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 32: 229-13.
- Sharma, N., D'Arcangelo, G., Kleinklaus, A., Halegoua, S. & Trimmer, J.S.** (1993). NGF regulates the abundance and distribution of K⁺ channels in PC 12 cells. *J. Cell Biol.* 123 (6): 1835-43.
- Shaywitz, B.A. et al.** (1976). Selective brain dopamine depletion in developing rats: an experimental model of minimal brain dysfunction. *Science* 191: 305-308
- Shepard, T.H.** (1986). Human teratogens: How can we sort them out?. In: Mental retardation, research, education and technology transfer. Eds. Wisniewski H.M. & Snider D.A. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 477: 105-15
- Shughrue, P.J. & Dorsa, D.M.** (1993). Estrogen modulates the Growth-Associated Protein GAP-43 (neuromodulin) mRNA in the rat preoptic area and basal hypothalamus. *Neuroendocrinol.* 57: 439-47.
- Shuster, E.A.** (1996). Epilepsy in women. *Mayo Clin. Proc. (USA)* 71 (10): 991-99.
- Smithells, R.W.** (1973). Defects and disabilities of thalidomide children. *Br. Med. J.*, 1: 269-72.
- Snyder, S.E., Cheng, H.W., Murray, K.D., Isackson, P.J., McNeill, T.H. and Salton, S.R.** (1998). The messenger RNA encoding VGF, a neuronal peptide precursor, is rapidly regulated in the rat central nervous system by neuronal activity, seizure and lesion. *Neuroscience* 82 (1): 7-19.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J.** (1991). *Biometry*. 2nd edition. WH Freeman & Co., eds. NY (USA).
- Spear, L.P. & Scalzo, F.M.** (1986). Behavioral, psychopharmacological and neurochemical effects of chronic neuroleptic treatment during Development. In: *Handbook of behavioral teratology*. E.P. Riley and C.V. Vorhees, Eds. Plenum Press. New York. USA.
- Spear, L.P., Shalaby, I.A. & Brick, J.** (1980). Chronic administration of haloperidol during development: behavioral and psychopharmacological effects. *Psychopharmacol.* 70: 47-8
- Spear, L.P. & File, S.E.** (1996). Methodological considerations in neurobehavioral teratology. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 55 (4): 455-57.
- Spigset, O. & Hägg, S.** (1998). Excretion of psychotropic drugs into breast milk: pharmacological overview and therapeutic implications. *CNS drugs* 9 (2): 111-34.
- Spitz** (1946). *Anaclitic Depression, Psicoanalitic studies of Child II*, New York Inc., Univ. Press.

- Steiner, H., Weiler, H.T., Morgan, S. & Huston, J.P.** (1992). Time-dependent neuroplasticity in mesostriatal projections after unilateral removal of vibrissae in the adult rat: compartment-specific effects on horseradish peroxidase transport and cell size. *Neurosci.* 47 (4): 793-806.
- Steininger, T.L., Wainer, B.H., Klein, R., Barbacid, M. & Palfrey, H.C.** (1993). High-affinity nerve growth factor receptor (Trk) immunoreactivity is localized in cholinergic neurons of basal forebrain and striatum in the adult rat brain. *Brain Res.* 612: 330-335.
- Stewart, R.B. et al.** (1980). Haloperidol excretion in human milk. *Am. J. Psychiatry* 137: 849-50.
- Stowe, Z.N., Owens, M.J., Landry, J.C., Kilts, C.D., Ely, T. y col.** (1997). Sertraline and desmethylsertraline in human breast milk and nursing infants. *Am. J. Psychiatry* 154 (9): 1255-60.
- Streissguth, A.P., Treder, R.P., Barr, H.M., Shepard, T.H., Bleyer, W.A. y col.** (1987). Aspirin and acetoaminophen use by pregnant women and subsequent child IQ and attention decrements. *Teratology* 35 (2): 211-19.
- Strickler, S.M. et al.** (1985). Genetic predisposition to phenytoin-induced birth defects. *Lancet* 2: 746-49.
- Tachibana, T.** (1989). Behavioral Teratogenic insult of MetylMercury assess by using sex of measures: reanalysis of data from the Collaborative Behavioral Teratology Study of National Center for Toxicological Research. *Physiol.Behav.* 45: 1243-47.
- Tepper, J.M., Damlama, M. & Trent, F.** (1994). Postnatal changes in the distribution and morphology of rat substantia nigra dopaminergic neurons. *Neurosci.* 60 (2): 469-77.
- Tise, M.A., Hashemi, T., Taylor, L.A. & McQuade, R.D.** (1996). Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain from postnatal to old age. *Dev. Brain Res.* 92: 70-6.
- Trakas, D.J. & Sanz, E.** (1996). Childhood and medicine use in a cross cultural perspective: A european concerted action. European Commission, Directorate-General XIII. Science, Rsearch and Development. Luxembourg.
- Tuchmann-Duplessis, H. & Mercier-Parot, L.** (1971). Influence of neuroleptics on prenatal development in mammals. In: Tuchmann-Duplessis, H. et al., Eds. Malformations, Tumors and Mental Defects: Pathogenetic Correlations. Carlo Erba Foundation, Milan (Italy)
- Uylings, H.B., Kuypers, K., Diamond, M.C. & Veltman, W.A.** (1978). Effects of differential environments on plasticity of dendrites of cortical pyramidal neurons in adult rats. *Exp. Neurol.* 62: 658-77.
- Uylings, H.B.** (1994). What determines the specification of cortical areas?. *Trends Neurosci.* 17 (1): 1-2.

- Van Gelder, N.M.** (1994). The environment and intellectual development. In: Transactions of the 25th. Annual Meeting of the American Association of Neurochemistry (ASN), Albuquerque, New Mexico. vol. 25 (1): 121.
- Van Gent, C.M., Sandberg, L.B. & Boucek, R.J.** (1991). Haloperidol administration to rats during pregnancy induces permanent alterations in serum lipoprotein patterns of progeny. *J. Clin. Psychopharmacol.* 11 (2): 113-15.
- Van Vulpen, E.H. & van der Kooy, D.** (1998). Striatal cholinergic interneurons : birthdates predict compartmental localization. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 109 (1) : 51-8
- Vanoverloop, D., Schnell, R.R., Harvey, E.A. & Holmes, L.B.** (1992). The effects of prenatal exposure to phenytoin and other anticonvulsivants on intellectual function at 4 to 8 years of age. *Neurotoxicol. Teratol. (USA)* 14 (5): 329-35.
- Venero, J.L., Hefti, F. & Knusel, B.** (1996). Trophic effect of exogenous nerve growth factor on rat striatal cholinergic neurons: comparison between intraparenchymal and intraventricular administration. *Molec. Pharm.* 49: 1-9.
- Völgyi, B., Farkas, T. & Toldi, J.** (1993). Compensation of a sensory deficit inflicted upon newborn and adult animals. A behavioural study. *NeuroReport*, 4 (6): 827-29.
- Vorhees, C.V.** (1983). Fetal anticonvulsivant syndrome in rats: dose- and period-response relationships of prenatal diphenylhydantoin, trimethadione and phenobarbital exposure on the structural and functional development of the offspring. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 227 (2): 274-87.
- Vorhees, CV.** (1987). Fetal hydantoin syndrome in rats: dose-effect relationships of prenatal phenytoin on postnatal development and behavior. *Teratology* 35 (3): 287-03.
- Vorhees, C.V.** (1986). Fetal anticonvulsivant exposure: effects on behavioral and physical development. En: *Mental retardation: Research, Education and Technology Transfer*, H.M. Wisniewski & D.A. Snider, Eds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 477: 49-62.
- Vorhees, C.V.** (1989). Sample size determinations using examples drawn from the NCTR Collaborative Behavioral Teratology Study. *Neurotoxicol. Teratol.* 4: 381-83.
- Waddington, J.L. & Crow, T.J.** (1978). Methodological problems in the measurement of drug-induced rotational behavior: Continuous recording reveals time-course differences undetected by previous techniques. *Psychopharmacol.* 58: 153-55.
- Waeber, C., Sebben, M., Bockaert, J. and Dumuis, A.** (1996). Regional distribution and ontogeny of 5-HT₄ binding sites in rat brain. *Behav. Brain Res.* 73: 259-62.

- Walch, C., Schliebs, R. & Bigl, V.** (1989). Effect of early visual pattern deprivation on development and laminar distribution of cholinergic markers in rat visual cortex. *EXS* 57: 295-304.
- Wall, S.J., Yasuda, R.P., Li, M., Ciesla, W. and Wolfe, B.B.** (1992). The ontogeny of m1-m5 muscarinic receptor subtypes in rat forebrain. *Dev. Brain Res.* 66: 181-85.
- Wenzlik, R. & Klinger, W.** (1976). Sleeping time and awaking blood concentration of hexobarbital influenced by glucose and adrenaline in rats of both sexes. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 223 (1): 155-61.
- Wender, P.H.** (1995). Attention-Deficit Hyperactivity Disorders in adults. Oxford University Press. New York (USA).
- Werler, M.M., Pober, B.R. & Holmes, L.B.** (1985). Teartogen update: smoking and pregnancy. *Teratology* 32: 473-81.
- White, J.D. & Schwartz, M.W.** (1994). Using osmotic minipumps for intracranial delivery of aminoacids and peptides. In: Providing pharmacological access to the brain: alternate approaches. Flanagan, T.R., Emerich, D.F. and Winn, S.R., Eds., Acad. Press, NY. *Methods Neurosci.* 21: 187-99.
- Wiesel, T.N.** (1982). Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature* 299: 583-591.
- Williams, R., Ali, S.F., Scalzo, F.M., Soliman, K. & Holson, R.R.** (1992). Prenatal haloperidol exposure: effects on brain weights and caudate neurotransmitter levels in rats. *Brain Res. Bull.* 29 (3-4): 449-58.
- Wilson, R.L., Kamata, K., Wightman, R.M. & Rebec, G.V.** (1986). Unilateral, intranigral infusions of amphetamine produce differential, bilateral changes in unit activity and extracellular levels of ascorbate in the neostriatum of the rat. *Brain Res.* 384 (2): 342-7.
- Winsberg, B.G., Hurwic, M.J., Sverd, J. & Klutch, A.** (1976). Pharmacological management of children with hyperactive aggressive/inattentive behavior disorders: suggestions for the pediatrician. *Clin. Pediatrics* 15: 471-77.
- WHO** (1987). The rational use of drugs: review of major issues. In: The rational use of drugs. Report of the conference of experts. Nairobi, 25-29, november 1985. World Health Organization, Geneva, pg.78
- Yamada, S., Kagawa, Y., Isogai, M., Takayanagi, N. & Hayashi, E.** (1986). Ontogenesis of nicotinic acetylcholine receptors and presynaptic cholinergic neurons in mammalian brain. *Life Sci.* 38 (7): 637-44.

- Yamamoto, B.K. & Freed, C.R.** (1982). The trained circling rat: a model for inducing unilateral caudate dopamine metabolism. *Nature* 298 (5873): 467-8.
- Yamamoto, B.K. & Freed, C.R.** (1984). Asymmetric dopamine and serotonin metabolism in nigrostriatal and limbic structures of the trained circling rat. *Brain Res.* 297 (1): 115-9.
- Yamamoto, T., Araki, H., Lee, S.C., Ueki, S., Fujisaki, Y. & Watanabe, I.** (1981). Behavioral pharmacological studies on the offspring of rats treated with haloperidol during pregnancy. *Jap. J. Pharmacol.*: 245.
- Yamamura, H.L. & Snyder, S.H.** (1974). Muscarinic cholinergic binding in rat brain. *PNAS (USA)* 71: 1725-29.
- Yan, Q. & Johnson Jr., E.M.** (1988). An immunohistochemical study of the NGF receptor in developing rats. *J. Neurosci.* 8: 3481-3498.
- Yu, J., Pizzo, D.P., Hutton, L.A. & Perez-Polo, R.** (1995). Role of the cholinergic system in the regulation of neurotrophin synthesis. *Brain Res.* 705: 247-254.
- (1991). Circadian changes of acetylcholine, choline acetyltransferase,..... *Chung Kuo Yao Li Hsueh Pao* 12 (2): 148-151.
- Yanai, J., Abu-Roumi, M., Silverman, W.F. & Steingart, R.A.** (1996). Neural grafting as a tool for the study and reversal of neurobehavioral birth defects.
- Yeo, T.T., Couzens-Chua, J., Butcher, L.L., Bredesen, D.E., Cooper, J.D. y col.** (1997). Absence of p75^{NTR} causes increased basal forebrain cholinergic neuron size, cholinergic acetyltransferase activity, and target innervation. *J. Neurosci.* 17 (20): 7594-605.
- Yerby, M.S., Leavitt, A., Erickson, D.M., et al.** (1992). Antiepileptics and the development of congenital anomalies. *Neurology* 42 (Suppl. 5): 132-40.
- Yerby, M.S.** (1996). Contraception, pregnancy and lactation in women with epilepsy. *Baillieres Clin. Neurol.* 5 (4): 887-908.
- Yerby, M.S. & Collins, S.** (1997). Pregnancy and the mother. Chapter 192: 2027-2035. En: *Epilepsy: a comprehensive textbook*, Ed. Engel, J., Jr. & Pedley, T. Lippincott Raven Publishers.
- Young, R.D.** (1964). *Science* 143, 1055-57. **Zis, A.P. et al.** (1974). *Science* 185: 960-3.
- Zahalka, E.A., Seidler, F.J., Yanai, J. & T.A. Slotkin.** (1993). Fetal nicotine exposure alters ontogeny of M1-receptors and their link to G-proteins (1993). *Neurotoxicol. Teratol.* 15: 107-15.
- Zemp, J.W. and Middaugh, L.D.** (1975). Some effects of prenatal exposure to D-amphetamine sulfate and phenobarbital on developmental neurochemistry and on behavior. *J. Addict. Dis.* 2:307-331.