

Teratogénesis Conductual inducida por Acido Triiodotiroacético (TRIAC) en Ratones

RITA ZEICHEN DE SA*, RAQUEL ZORZER*, RONAN OSCAR CINTO**,
EDUARDO ARGANARAS* y EDITH BINDSTEIN*

Departamento de Farmacología y Departamento de Bioanálisis**,
Instituto Nacional de Farmacología y Bromatología,
Av. Caseros 2161, (1264) Buenos Aires, Argentina*

RESUMEN. Se administró p.o. TRIAC a ratones hembras desde el 6º al 15º días de preñez en dosis de 2 mg/kg/día. Se registró el desarrollo de los signos físicos y de los reflejos en cuatro crías de cada camada normalizada a ocho. Después del destete se evaluó el comportamiento de las mismas, en las siguientes pruebas: de la cuerda, habilidad natatoria y actividad en el campo abierto. Los restantes cuatro animales fueron sacrificados en el día 5º para la realización de estudios histopatológicos. La descendencia estudiada no evidenció malformaciones macroscópicas. La maduración fue en general normal. Respecto al desarrollo de los reflejos se encontraron diferencias significativas entre las F₁ de madres controles y tratadas. En el día 21º el tratamiento afectó el desempeño en la cuerda, la habilidad natatoria, la actividad exploratoria y el retroceso, medidos estos dos últimos en el campo abierto.

SUMMARY. "Behavioral Teratology induced by Triiodothyroacetic Acid (TRIAC) in Mice". TRIAC 2 mg/kg/day was administered p.o. to pregnant mice from days 6th. to 15th. of gestation. Each litter was normalized to eight pups. Four mice of each dame were examined for recording physical and reflex development. After weaning the same pups were tested for swimming ability, string test performance and activity in the open field. The resting pups were necropsied at 5th. day and histopathological examination were performed. There were not evidence neither prenatal nor postnatal gross injury of F₁. Generally physical development was unaffected, respect righting reflex development we found difference between F₁ of controls and treated mothers, but not in the time of appearance of cliff avoidance. At 21st. day treatment, decrease the string test score and the swimming ability. Respect to the open field we found differences from controls in the exploratory activity and backing.

INTRODUCCION

Ha sido ampliamente estudiado que la exposición pre-natal a ciertas drogas y agentes ambientales puede producir un desarrollo embrionario anormal dando

como resultado una malformación física (teratogénesis).

Recientemente se ha reconocido que la administración a la madre de ciertos agentes puede inducir anomalías en

PALABRAS CLAVE: Teratología conductual; ácido triiodotiroacético; reflejo de enderezamiento; campo abierto; habilidad natatoria; prueba de la cuerda.

KEY WORDS: Behavioral teratology; triiodothyroacetic acid; righting reflex; open field; swimming ability; string test.

la conducta de la descendencia^{1, 2}. Ejemplos de estas anormalidades son los síndromes fetales producidos por el alcohol, hidantoína y trimenadiona. Los agentes que causan estas patologías pueden ser clasificados como *teratógenos conductuales*³. En general las consecuencias de la exposición prenatal a los mismos sólo se reconocían cuando estaban acompañadas por anormalidades físicas, dada la dificultad de reconocer en humanos la acción de un teratógeno conductual puro cuando no hay una malformación evidente. Muchas alteraciones del comportamiento sólo se manifiestan en la edad escolar, cuando ya es tarde para establecer una causa relacionada con la administración de drogas antes del nacimiento.

El diseño de estudios clínicos controlados es de difícil realización⁴. Es por eso que numerosos toxicólogos han tratado de desarrollar modelos animales, que permitan detectar en forma temprana los efectos de las drogas o agentes ambientales sobre el desarrollo conductual⁵⁻⁷.

Estudios teratogénicos realizados con ácido triiodotiroacético (TRIAC) en ratones, si bien no mostraron malformaciones dieron indicios de una posible alteración en la maduración neurológica de la F₁, que no fue cuantificada por no estar incluida en el diseño experimental que se empleaba; en dichos estudios se observaron variaciones en la movilidad de las crías y en la respuesta a distintos estímulos, que indujeron a pensar que se estaba en presencia de un posible teratógeno conductual⁸. Por eso decidimos emplear un esquema experimental específico para verificar la hipótesis antedicha. Debemos recordar que la plasticidad del sistema nervioso es más evidente durante los períodos pre y neonatales, cuando el cerebro es susceptible de modificar su organi-

zación por la influencia de factores internos y externos^{9, 10}.

En mamíferos, cuando se administran drogas a hembras preñadas es importante diferenciar los efectos tóxicos prenatales (por acción de la droga sobre el feto o mal desarrollo placentario) de los efectos post-natales (debidos a la acción residual de la misma en la lactancia o por falta de atención materna). Teniendo en cuenta lo expuesto utilizamos el modelo experimental de amamantamiento por nodrizas^{11, 12}.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Ratones hembras de 8 a 10 semanas de edad, cepa CF₁ endocriadas de la colonia del INFyB, fueron apareadas individualmente en cajas de polipropileno con machos de la misma cepa y edad. Los animales tenían libre acceso a la comida Purina Labina N° 1 y al agua. La temperatura ambiental era 24 °C ± 2 °C, con ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El día 0 de preñez fue determinado por la presencia del tapón vaginal o de esperma en el lavado del conducto genital. Las hembras preñadas fueron divididas al azar en tres grupos: A y B con once hembras cada uno y C con trece hembras.

A partir del 6° y hasta el 15° día de preñez se les administró por sonda gástrica a las hembras del grupo A 2 mg/kg/día de TRIAC, usando como vehículo agua destilada con hidróxido de sodio 0,1 N hasta pH 7,5. (La solución se preparaba diariamente).

Se considera que el agregado de OHNa 0,1 N hasta ese pH no afecta la estabilidad de la droga, ya que ese es el pH empleado para la separación cromatográfica y electroforética de este tipo de compuestos¹³. Los grupos B y C recibieron durante el mismo período igual volumen

del solvente.

Al día siguiente de producido el parto natural, las camadas fueron normalizadas a ocho crías, cuatro de cada sexo. Simultáneamente se realizó el intercambio de nodrizas entre los grupos A y B.

Todos los neonatos fueron identificados mediante el tatuaje en las patas usando una inyección subcutánea de tinta china.

En esta experiencia dos hembras y dos machos de cada camada fueron seleccionados al azar para su posterior control del desarrollo físico y conductual. Las crías restantes fueron sacrificadas en el 5º día para su examen histológico.

Desarrollo físico

Se registró la edad en días en que se completaba: a) el desenrollamiento bilateral del pabellón auditivo; b) la erupción de los cuatro incisivos y c) la apertura bilateral de los ojos⁵.

El peso corporal de la descendencia se registró al nacimiento y posteriormente cada siete días hasta el destete.

Desarrollo conductual

1) *Reflejos*

Se tomaron diariamente desde el día 3º hasta la obtención de la respuesta. Se registró la edad en días en que aparecía la respuesta positiva.

a) *De enderezamiento*: Cada ratón fue colocado en posición supina sobre una superficie plana, dándosele dos oportunidades consecutivas para incorporarse sobre sus cuatro patas. La prueba se consideró positiva cuando el animal respondía en un tiempo menor o igual a 2 segundos en ambas oportunidades¹¹.

b) *Rechazo al ración*: El animal se co-

locaba sobre un pedestal con las patas delanteras y el hocico sobre el borde.

La respuesta se consideró positiva cuando mostraba retracción, retroceso y/o movimiento lateral dentro de los 30 segundos¹⁴.

2) *Movimientos espontáneos en un entorno desconocido*

Campo abierto: las observaciones fueron realizadas en el día 21º por un período de 2 minutos. El campo abierto era de modelo cuadrado similar al descrito por Spyker *et al*¹⁵.

Los animales sin entrenamiento previo eran colocados en el centro del cuadrado y cubiertos con una cámara oscura durante 15 segundos. Retirada la misma se registraban los siguientes parámetros conductuales: latencia central⁺, entrada a los cuadrados centrales y a los perifericos^{**} (con las cuatro patas), posición vertical ("rearing"), defecación, acicalamiento y retroceso (por lo menos 3 pasos).

3) *Movimientos forzados*

Todos los movimientos forzados de esta experiencia fueron evaluados el día 21º.

a) *Prueba de la cuerda*: El aparato consistía en dos barras metálicas de 60 cm de alto, separadas entre sí por una distancia de 50 cm, y una cuerda de 2 mm de diámetro sujeta a sus extremos superiores.

El animal, sujeto por la cola, se suspendía sobre la cuerda aproximadamente en el punto medio de la misma. Luego se lo soltaba, comenzándose a registrar el tiempo cuando se sostenía con las patas delanteras. La duración de la prueba era de 60 segundos, con un puntaje entre

* Tiempo en segundos que permanece inmóvil en el centro del campo abierto.

** Número de veces que entra en dichos cuadrados.

-3 y +10, basado en el esquema siguiente¹⁶:

- 1 punto: por cada pata que permanece en la cuerda por lo menos durante 5 segundos.
- 1 punto: cuando la cola permanece enrollada en la cuerda por lo menos durante 5 segundos.
- 3 puntos: si el ratón se desliza por lo menos durante 5 segundos.
- 2 puntos: si llega a uno de los extremos en menos de 25 segundos.
- 3 puntos: si se cae entre 0 y 15 segundos.
- 2 puntos: idem entre 16 y 30 segundos.
- 1 punto: idem entre 31 y 60 segundos.

b) *Habilidad natatoria*: Se realizó según el método de Vorhees *et al.*⁵ y Spyerker *et al.*¹⁵, con modificaciones en el sistema de puntaje. El animal se colocaba en un recipiente transparente con agua a 30 °C ± 0,5 °C y por un período de 15 segundos se registraban tres aspectos de su desempeño:

1. *Dirección*

- Si se hunde 0 puntos
- Si flota 1 "
- Si nada en círculos o arcos . . . 2 "
- Si nada en línea recta 3 "

2. *Angulo de flotación* (posición de la cabeza)

- Sumergida 0 puntos
- Hocico sobre la superficie 1 "
- Hocico y parte superior de la cabeza sobre la superficie pero las orejas debajo 2 "
- Idem, pero la línea de flotación por la mitad de las orejas 3 "

3. *Uso de las patas*

- Sin movimiento 0 puntos
- Movimiento de las 4 patas 1 "
- Patras traseras en movimiento y delanteras estacionarias 2 "

Sumando los puntajes correspondientes a 1, 2 y 3 se obtiene una calificación que varía entre 0 y 8.

La secuencia de las pruebas realizadas luego del destete se determinó en base al grado de stress o esfuerzo que implicaba cada una de ellas y fue la siguiente: campo abierto, prueba de la cuerda y habilidad natatoria.

Los animales se evaluaban desde las 9 a las 12 horas de acuerdo con los ciclos nictamerales de la especie. El observador realizaba las evaluaciones sin conocer el grupo experimental al que pertenecía el animal.

Estadística

Las siguientes variables se estudiaron conforme a un análisis de la varianza con dos criterios de clasificación (sexo y tratamiento), con medias no pesadas (debido a la desigualdad de las repeticiones en cada celda)¹⁷:

- 1) Desenrollamiento bilateral del pabellón auditivo.
- 2) Erupción de los incisivos.
- 3) Apertura bilateral de los ojos.
- 4) Reflejo de enderezamiento.
- 5) Rechazo al vacío.
- 6) Prueba de la cuerda.
- 7) Habilidad natatoria.
- 8) Campo abierto: a) latencia, b) cuadrados centrales, c) cuadrados periféricos, d) acicalamiento.

Cuando el test global F para tratamientos resultó significativo (P < 0,05), se estudiaron los contrastes individuales según el método de Scheffé.

Las variables siguientes se analizaron según un test χ^2 para tablas de contingencia:

- 1) Posición vertical ("rearing").
 - 2) Defecación.
 - 3) Retroceso.
- Cuando el χ^2 global resultó significativa

tivo ($P < 0,05$), se estudiaron los componentes dependientes, correspondientes a cada grupo tratado *versus* el grupo control¹⁸.

Las curvas de peso corporal del grupo control y ambos grupos tratados se compararon según un diseño factorial con medidas repetidas en uno de los factores y grupos de distinto tamaño¹⁷.

Histología

Se realizaron cortes laminares de neocortex, coloreados según técnica de Hematoxilina-Eosina y la especial de Kluver-Barrera, de los animales de los grupos A, B y C sacrificados al 5º día.

RESULTADOS

Durante el período estudiado no hubo diferencias significativas entre las curvas de peso de los grupos A, B y C (Fig. 1). No existieron cambios relacionados con los tratamientos en el desarrollo físico de las crías expuestas a TRIAC, exceptuando la erupción de incisivos en el grupo B ($P < 0,01$) indicando un leve retardo (Tabla 1).

Con respecto a los reflejos no se encontró diferencia significativa en la prueba del rechazo al vacío; pero sí un retardo en la aparición del reflejo de enderezamiento en el grupo A ($P < 0,05$, Tabla 2).

En relación a la conducta en el campo abierto no se hallaron diferencias significativas respecto al tiempo de latencia, posición vertical, acicalamiento y entrada en los cuadrados centrales (Tablas 3, 4 y 5).

La entrada en los cuadrados periféricos disminuyó significativamente en el grupo A ($P < 0,01$), y aunque no fue estadísticamente significativa observamos la misma tendencia en el grupo B. Se encontró diferencia entre sexos, atribuible

a los grupos tratados donde las hembras mostraron una menor actividad (Tabla 4).

También aumentó significativamente el retroceso para ambos sexos del grupo A ($P < 0,01$) y para las hembras del grupo B ($P < 0,05$). Respecto a la defecación sólo se detectó diferencia ($P < 0,05$) en las hembras del grupo A (Tabla 3).

En la prueba de la cuerda también hubo diferencias significativas entre los grupos tratados y el control ($P < 0,05$, Tabla 6).

En la prueba de habilidad natatoria los animales tratados tanto del grupo A como los del grupo B difirieron de los controles ($P < 0,01$, Tabla 7).

En los cortes histológicos de los grupos A y B se encontraron cambios de organización en la citoarquitectura evolutiva, especialmente en la capa granulosa interna de la corteza agranular (región paracentral y límbica). También se observó en estos grupos una disminución en el tamaño y número de las células oligodendrogliales.

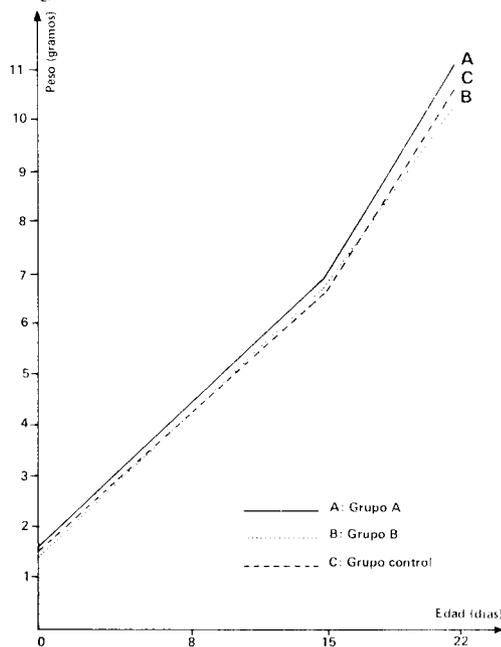


Figura 1. Curvas de peso.

	Desarrollo del pabellón auditivo				Apertura de los ojos				Erupción de los incisivos			
	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada
Machos	4,75 ± 0,22 (28)	5,00 ± 0,32 (22)	5,09 ± 0,29 (22)	4,95	14,04 ± 0,17 (28)	14,09 ± 0,27 (22)	14,23 ± 0,16 (22)	14,12	12,19 ± 0,22 (28)	12,55 ± 0,30 (22)	13,14 ± 0,21 (22)	12,63
Hembras	4,63 ± 0,21 (27)	5,10 ± 0,34 (20)	5,14 ± 0,28 (22)	4,96	13,96 ± 0,20 (27)	13,75 ± 0,23 (20)	14,09 ± 0,15 (22)	13,93	11,90 ± 0,36 (27)	12,45 ± 0,30 (20)	13,18 ± 0,17 (22)	12,51
Media no pesada	4,69	5,05	5,12		14,00	13,92	14,16		12,05	12,50	13,16*	

Los valores representan edad promedio en días ± ES. Entre parentesis se indica el número de animales observados.

* Diferente del control a un nivel del 1%.

Tabla 1. Desarrollo físico.

	Rechazo al vacío				Enderezamiento			
	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada
Machos	7,44 ± 0,24 (32)	8,23 ± 0,39 (22)	8,50 ± 0,27 (22)	8,06	7,38 ± 0,15 (32)	7,86 ± 0,30 (22)	7,41 ± 0,21 (22)	7,55
Hembras	7,87 ± 0,16 (31)	7,67 ± 0,36 (21)	7,91 ± 0,35 (22)	7,82	7,48 ± 0,12 (31)	8,15 ± 0,28 (20)	7,50 ± 0,24 (22)	7,71
Media no pesada	7,66	7,95	8,21		7,43	8,01*	7,45	

Los valores representan edad promedio en días ± ES. Entre parentesis se indica el número de animales observados.

* Diferente del control a un nivel del 5%.

Tabla 2. Reflejos.

	Posición vertical			Retroceso			Defecación		
	Control	Grupo A	Grupo B	Control	Grupo A	Grupo B	Control	Grupo A	Grupo B
Machos	17,9 (28)	22,7 (22)	18,2 (22)	0,0 (28)	31,8** (22)	13,6 (20)	10,7 (28)	9,1 (22)	22,7 (22)
Hembras	18,5 (27)	28,6 (21)	40,9 (22)	0,0 (27)	30,0** (20)	27,7* (22)	22,2 (27)	0,0* (21)	18,2 (22)

Porcentaje de animales que realizaron las pruebas indicadas. Entre paréntesis se indica el número de animales observados.
* Diferencia de control a un nivel del 5%. ** Diferencia de control a un nivel del 1%.

Tabla 3. Campo abierto.

	Entradas a cuadrados centrales						Entradas a cuadrados periféricos							
	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada	Control	Grupo B	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada
Machos	2,43 ± 0,48 (28)	2,32 ± 0,29 (22)	1,82 ± 0,24 (22)	2,19	14,25 ± 2,48 (28)	1,86 ± 0,23 (22)	14,00 ± 2,03 (27)	10,59 ± 2,33 (22)	11,18 ± 1,53 (22)	12,01*				
Hembras	2,22 ± 0,34 (27)	1,80 ± 0,28 (20)	1,86 ± 0,23 (22)	1,96	14,00 ± 2,03 (27)	1,84	14,13	3,60 ± 0,71 (20)	8,32 ± 1,57 (22)	8,64				
Media no pesada	2,33	2,06	1,84					7,10**	9,75					

Promedios de entrada a cuadrados ± ES. Entre paréntesis se indica el número de animales observados.

* Diferencia significativa entre sexos a un nivel del 5%. ** Diferente de control a un nivel del 1%.

Tabla 4. Campo abierto.

	Latencia						Acicalamiento							
	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada	Control	Grupo B	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada
Machos	3,36 ± 0,51 (28)	3,73 ± 0,56 (22)	3,50 ± 0,33 (22)	3,53	0,89 ± 0,17 (28)	3,27	0,70 ± 0,16 (27)	0,91 ± 0,20 (22)	0,91 ± 0,21 (22)	0,90				
Hembras	2,82 ± 0,24 (27)	3,70 ± 0,37 (20)	3,29 ± 0,22 (21)	3,27	0,70 ± 0,16 (27)	3,39	0,80	0,95 ± 0,12 (21)	0,95 ± 0,19 (22)	0,37				
Media no pesada	3,02	3,71	3,39					0,93	0,93					

Promedio en segundos ± ES.

Promedio de veces que se acicalaba ± ES.

Entre paréntesis se indica el número de animales observados.

Tabla 5. Campo abierto.

	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada
Machos	8,43 ± 0,43 (28)	7,09 ± 0,46 (22)	6,95 ± 0,74 (22)	7,49
Hembras	9,19 ± 0,20 (27)	7,25 ± 0,74 (20)	7,55 ± 0,62 (22)	7,99
Media no pesada	8,81	7,17*	7,25*	

Los valores representan puntaje promedio ± ES. Entre paréntesis se indica el número de animales observados.
* Diferente del control a un nivel del 5%.

Tabla 6. Prueba de la cuerda.

	Control	Grupo A	Grupo B	Media no pesada
Machos	7,35 ± 0,10 (34)	5,43 ± 0,43 (22)	6,14 ± 0,24 (22)	6,31
Hembras	7,21 ± 0,19 (34)	6,10 ± 0,28 (21)	6,14 ± 0,34 (22)	6,48
Media no pesada	7,28	5,77*	6,14	

Los valores representan calificación promedio ± ES. Entre paréntesis se indica el número de animales observados.
* Diferente del control a un nivel del 1%.

Tabla 7. Habilidad natatoria.

En los animales del grupo A y en menor proporción del B se reveló una menor densidad de ramas dendríticas, espinas y células gliales y cambios en la organización celular de la capa granular del cerebelo.

Se detectó sólo en animales del grupo A retardo en la mielinización de la circunvolución dentada del hipotálamo.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Si bien no es sencillo extrapolar los resultados de la experimentación animal a una situación humana, estudios clínicos han demostrado que la exposición crónica de la madre a analgésicos, tranquilizantes y barbitúricos durante la gestación produce trastornos de conducta

en los hijos; por eso pensamos que es importante el desarrollo de la teratología conductual, pues puede alertar sobre la relación entre el empleo de algunas drogas durante la gestación y/o lactancia y la aparición en niños de alteraciones en el comportamiento, muchas veces de etiología desconocida.

Por el momento no puede establecerse un modelo fijo de protocolo, pero sin embargo consideramos que las pruebas elegidas son reproducibles, cuantificables y de fácil normalización. Nos parece importante el uso de amamantamiento por nodrizas para diferenciar efectos pre y postnatales y, en lo posible, la corroboración de las presuntas lesiones mediante estudios histológicos y bioquímicos.

En el caso de nuestro estudio, trabajos previos con TRIAC nos indujeron a suponer una posible acción teratogénica a nivel conductual, que fue confirmada por las experiencias realizadas; encontramos un retardo en la aparición del reflejo de enderezamiento que se corresponde con el retardo en la mielinización hallada en la circunvolución dentada del hipotálamo¹⁹ (animales del grupo A, de 5 días de edad). También se observaron diferencias con respecto a los controles en el desempeño en la prueba de la cuerda y en la habilidad natatoria.

Estas dos últimas pruebas son indicadores muy sensibles de cambios conductuales por exposición a drogas y agentes ambientales^{15, 20}.

Los resultados podrían corresponderse con la disminución de ramas dendríticas, espinas y células gliales, teniendo en cuenta que estos cambios plásticos pueden tener un efecto en la capacidad funcional de la neurona.

El desarrollo de la habilidad natatoria es una combinación de adquisición e inhibición de conducta (desarrollo de la habilidad para nadar con las cuatro patas y aprendizaje para inhibir el movimiento de las delanteras)²¹. Nuestros datos indican que el TRIAC actuaría sobre alguno de estos mecanismos.

Se sabe que la placenta concentra los ioduros minerales inyectados a las ratas al final de la gestación²², la triiodotironina atraviesa la placenta con una velocidad mayor de la madre hacia el feto que en el sentido inverso. Probablemente lo mismo sucede con el TRIAC.

Hemos observado (aunque no se cuantificó) suministrando la misma dosis de TRIAC (2 mg/kg/día) durante toda la preñez, un incremento muy marcado del canibalismo, con desaparición a veces total de la camada.

Con el esquema actual de tratamiento notamos al 1º y 2º día de nacimiento una mayor presión de la madre al tomar la cría para su transporte al nido; este tipo de conducta era reconocido por la marca de los dientes y/o vocalización del neonato.

El canibalismo neonatal es importante en los roedores y puede estar relacionado con el manipuleo de las crías; sin embargo al no presentarse este fenómeno en animales controles y considerando que estudios de electrofisiología o ablación muestran que amplias áreas del sistema límbico participan en el control del tono afectivo, relacionado con la autopreservación y la de la especie²³, podemos inferir una posible acción de la droga a este nivel.

Con respecto al desempeño en el campo abierto lo más notable es en lo referente a la aparición del fenómeno de retroceso, que rara vez se observa en animales controles y se correlaciona también con problemas de la maduración cerebelar¹⁶. Este dato se corresponde con los cambios histológicos encontrados en la capa granular del cerebelo. Los otros dos parámetros afectados, actividad exploratoria y defecación implican la capacidad de reacción frente a un ambiente extraño, encontrándose diferencias significativas sólo en el grupo A.

Consideramos que sería de utilidad la continuación de estos estudios tratando de cubrir un período más amplio del desarrollo con el objeto de evaluar si los efectos encontrados son permanentes o reversibles.

AGRADECIMIENTOS: A la Srta. María del Pilar Muñoz por su asistencia técnica y a la Srta. Lydia Raquel Vignau por la mecanografía del trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Coyle, I. M.J. Wagner y G. Singer (1976) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4: 191-200
2. Hutchings, D.E. (1978) "Studies on the Development of Behavior and Nervous System. Vol. 4. Early Influence" (G. Gottlieb ed.). Academic Press, New York, pág. 7
3. Vorhees, Ch. V., R.L. Brunner y R.E. Butcher (1979) *Science* 205: 1220-5
4. Thornburg, J.E. y K.E. Moore (1976) en "Perinatal Pharmacology and Therapeutics" (B.L. Mirkin ed.). Academic Press, New York, págs. 269-354
5. Vorhees, Ch. V., R.E. Butcher, R.L. Brunner y T.J. Sobotka (1979) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50: 267-82
6. Robertson, R.T., J.A. Majka, C.P. Peter y D.L. Bokelman (1980) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 53: 541-9
7. Zbinden, G. (1981) *Archv. Toxicol.* 48: 69-88
8. Sá, R.I., R.A. Zorzer y E. Bindstein: *Resultados no publicados*
9. Patterson, P.H., D.D. Potter y E.J. Furshpan (1978) *Sci. Am.* 239: 50-9
10. Bunge, R., M. Johnson y D. Ross (1978) *Science* 199: 1409-16
11. Spyker, D.A. y J.M. Spyker (1977) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 40: 511-27
12. Spyker, J.M. (1975) en "Behavioral Teratology and Toxicology" (B. Neiss y V.G. Laties eds.) Plenum, New York, págs. 311-44
13. Green, W.L. y S.H. Ingbar (1961) *J. Clin. Endocr. Metab.* 21: 1548-65
14. Brunner, R.L., M. Mc Lean, C.V. Vorhees y R.E. Butcher (1978) *Teratology* 18: 379-84
15. Spyker, J., B. Sheldon, S. Parber y A.M. Goldberg (1972) *Science* 177: 621-3
16. Barclay, L.L., G.E. Gibson y J.P. Blass (1981) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14: 153-7
17. Winer, B.J. (1971) "Statistical Principles in Experimental Design" McGraw-Hill Book Company, New York
18. Steel, R.G.D. y J.H. Torrie (1960) "Principles and Procedures of Statistics", McGraw-Hill Book Company, New York
19. Scheibel, M.E. y A.B. Scheibel (1971) en "Brain Development and Behavior" (M.A. Serman, D.T. Mc Ginty and A.M. Adinolfi, eds.). Academic Press, New York, págs. 1-21
20. Olson, K.L., G.M. Boush y F. Matsumura (1978) *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* 20: 760-8
21. Shapiro, S., M. Salas y K. Vukovich (1970) *Science* 168: 147-51
22. Forberg, S., E. Odesland, R. Soremark y S. Ullberg (1964) *Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.* 4: 241-50
23. Albert, K y L. Hummel (1968) "The Limbic System Anatomy and Physiology" (Roche Scientific Service eds.). Switzerland, pág. 22