

*‘Tacta alea est’*

Vida de Cesar. Plutarco.

A Juan Pedro, a Ángela Grassi y a mis padres.

La presente tesis doctoral ha sido posible gracias a la ardua colaboración de un variado grupo de personas sin las cuales este proyecto no podría haber llegado a su fin.

En primer lugar debo expresar un especial agradecimiento a la Dra. Verónica Milesi, sin la cual no hubiera podido de ninguna manera colmar las enormes lagunas de mi conocimiento. Por su calidez humana y permitirme ser parte del GINFIV.

Al Dr. Alejandro Rebolledo por acompañarme en este trayecto, por su enseñanza continua, su paciencia.

Al Dr. Alfredo Gende por su gran ayuda, por estar presente en los actos de mi vida.

A la Dra. Ángela Grassi pues sin ella jamás hubiera llegado hasta aquí. Por acompañarme siempre y sostenerme en los momentos difíciles.

Agradezco a “los chicos del laboratorio”: Laura, Rocío, Nicolás, Jorge, Pedro, por las jornadas compartidas en un excelente clima de trabajo.

A mi compañera de escritorio y amiga, Silvia por los magníficos preparados histológicos del cordón umbilical.

A todos los integrantes del GINFIV por los almuerzos compartidos, por las largas discusiones de seminarios, por los cafés; en fin, por haber sido, en estos años parte de mi vida.

Al Instituto de Investigaciones pediátricas (IDIP) del Hospital de Niños Sup. Sor María Ludovica de La Plata, y especialmente al Dr. Horacio González por favorecer el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Al Servicio de Psicopatología y Salud Mental del Hospital de Niños de La Plata por permitirme realizar este trabajo durante mis años de residencia.

A la Dra. Silvina Morales y al Dr. Drut por su colaboración en este proyecto.

Al Dr. Enrique Triaca por su inmensa ayuda ya que sin ella este trabajo se hubiera obstaculizado.

A la Fundación Florencio Fiorini y a la Asociación Médica Argentina por haber financiado este último año de trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP por haberme brindado un lugar de trabajo para el desarrollo de esta tesis doctoral

Agradezco a mis padres por estimular en mí el deseo de saber, por acompañarme siempre en mis proyectos, por sus consejos.

A Juan Pedro por estar siempre ahí, firme.

Agradezco a mis hermanos, Pablo y Sebastián, por su apoyo y ayuda.

Agradezco a Felipe por fomentar en mí, con su mera presencia, el entusiasmo de emprender el camino hacia el futuro.

Esta Tesis Doctoral fue realizada en la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

Algunos de los resultados de la presente Tesis Doctoral forman parte de la publicación:

M. F. Iveli, S Morales, A. Rebolledo, V. Saviato, S. Salemme, M. Apezteguía, N. Cecotti, R. Drut, and V. Milesi. **Effects of light ethanol consumption during pregnancy: increased frequency of minor anomalies in the newborn and altered contractility of umbilical cord artery.** *Pediatric Research*, 61: 4, 2007.

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

---

1. Psicofármacos	
1.1 Bebidas alcohólicas: etanol	<b>10</b>
1.2 Antipsicóticos: risperidona	<b>15</b>
2. Psicofármacos, barrera placentaria y gestación	<b>18</b>
3. Estructura y función de la arteria umbilical	<b>21</b>

## OBJETIVOS

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

1. Obtención de la muestra de arteria umbilical	<b>33</b>
2. Determinación de fuerza isométrica en anillos vasculares intactos	<b>33</b>
3. Determinaciones electrofisiológicas mediante la técnica de patch clamp	<b>35</b>
4. Población y muestra utilizada en los experimentos donde se evaluaron los efectos del consumo materno de etanol.	<b>40</b>
5. Análisis estadísticos	<b>42</b>

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

1. Generalidades	
1.1 Tono Basal de la arteria umbilical humana (AUH)	<b>44</b>
1.2 Respuesta contráctil de la AUH a soluciones de alto potasio	<b>45</b>
1.3 Respuesta contráctil de la AUH a distintos agonistas vasoactivos	
1.3.1 Serotonina	<b>46</b>
1.3.2 Dopamina	<b>47</b>
1.3.3 Histamina	<b>47</b>
1.3.4 Acetilcolina	<b>48</b>

2. Risperidona	
2.1 Efecto de la risperidona sobre las respuestas contráctiles de la AUH.	
2.1.1 Serotonina	50
2.1.2 Histamina	52
2.1.3 Soluciones de alto potasio	55
2.2 Efecto de la risperidona sobre las corrientes de potasio activadas por voltaje.	57
3. Etanol	
3.1 Efecto del etanol sobre las respuestas contráctiles de la AUH	
3.1.1 Tono Basal	59
3.1.2 Solución de alto potasio	62
3.1.3 Serotonina	65
3.2 Efecto del etanol sobre las corrientes de Ca <sup>2+</sup>	68
3.3 Efecto de la exposición intrauterina al etanol. Evaluación de la salud de los neonatos al nacer y de las propiedades contráctiles de las arterias de sus cordones umbilicales.	69
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>86</b>



# *Introducción*

## **1. Psicofármacos**

El hábito de consumir sustancias psicoactivas, hunde sus raíces en la más profunda antigüedad y se mantiene hasta nuestros días.

Actualmente se considera psicofármacos a aquellas sustancias que ejercen sus efectos principales sobre el sistema nervioso central. Estas drogas son muy utilizadas ya sea con fines recreativos, como es el caso del etanol, o con fines terapéuticos como la risperidona. Si bien, los efectos que dichas sustancias tienen sobre el sistema nervioso son objeto de un amplio campo de estudio, el mecanismo de acción y posibles efectos que estas drogas producen sobre otros tejidos son menos difundidos. Nuestro interés fue estudiar el efecto de estas drogas sobre el músculo liso vascular y, en particular, sobre la arteria umbilical humana, ya que durante el embarazo el feto puede estar expuesto al efecto de las mismas como consecuencia del consumo materno.

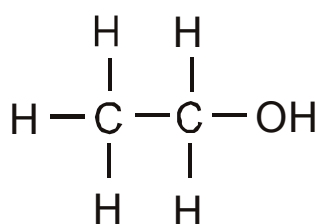
### **1.1 Bebidas alcohólicas: Etanol**

Civilizaciones tan antiguas como la babilónica o la egipcia, usaban el vino o la cerveza como tratamiento de enfermedades o para conectarse con el mundo espiritual. Los egipcios, hace seis mil años, bendecían a Osiris por el regalo de la cebada con la cual producían la cerveza. Los griegos adoraban a Dionisio por la creación de la vid, y el modo de ser dionisiaco, causado entre otras cosas por el etanol, quedó reflejado en la tragedia (1, 2). La escuela hipocrática usaba el etanol en innumerables tratamientos. En Roma, se adoraba a Baco como el dios del vino y también el etanol era usado con fines terapéuticos. Durante la Edad Media, el etanol se utilizó para el tratamiento de casi todas las enfermedades; de hecho en galés la palabra *whisky* significa "agua de vida". Sin embargo, hoy en día el etanol tiene un valor terapéutico extremadamente limitado. A pesar de esto, es uno de los componentes de las bebidas utilizadas por el hombre con fines recreativos de mayor difusión. Actualmente, el consumo de bebidas alcohólicas forma parte de la dieta de prácticamente todas las culturas. Su ingesta se ha masificado de forma tal que el noventa por ciento de las personas en las sociedades occidentales beben etanol durante algún período de sus vidas (3). Un bajo consumo de bebidas alcohólicas durante el embarazo se encuentra "socialmente aceptado" y difundido, a pesar de que distintas organizaciones sanitarias recomiendan la abstinencia de etanol durante la gestación debido a su reconocido efecto teratogénico.

Sin embargo, en los Estados Unidos, una de cada 29 mujeres consume etanol durante el embarazo (4).

Distintos estudios demostraron que en los últimos años el consumo de etanol ha aumentado y son cada vez más numerosas las bebidas que lo contienen. Argentina no ha permanecido ajena a esta tendencia mundial y en los últimos años ha aumentado significativamente el consumo de bebidas con contenido alcohólico. Según la Comisión Nacional de Alcoholismo de nuestro país, este aumento se debió al mayor consumo de cerveza por jóvenes y adolescentes, lo que llevó a quintuplicar el consumo de dicha bebida (5).

En cuanto a su estructura química, el etanol es una pequeña molécula orgánica constituida por un esqueleto de dos átomos de carbono. Contiene un grupo hidroxilo ( $C_2H_5OH$ ) que le confiere un grado polaridad (6).



**Figura 1.** Estructura química del etanol.

Luego de su ingesta, la absorción del etanol se inicia rápidamente en el estómago y se completa en el intestino delgado. Esta absorción puede retrasarse por la presencia de alimentos. La concentración máxima en sangre se logra entre los 30 a 60 minutos después de su ingesta, tras lo cual se distribuye con uniformidad por todos los tejidos (6) produciendo numerosos efectos sobre la función de los distintos órganos y sistemas:

1. Deprime el sistema nervioso central, aunque algunas pruebas sugieren que a bajas concentraciones puede incrementar la función de ciertas sinapsis neuronales excitadoras. Las alteraciones neurológicas que se observan en la intoxicación aguda están íntimamente relacionadas con la concentración en sangre: entre los 20 a 99 mg por ciento se altera la coordinación motora y hay euforia; entre los 100 a 199 mg por ciento predominan la ataxia motora, la alteración del pensamiento, el empobrecimiento del juicio y la labilidad afectiva. Entre los 200 a 299 mg por ciento los

signos anteriores se agudizan y hay manifestaciones gastrointestinales como náuseas y vómitos. Entre los 300 a 399 mg por ciento el paciente entra en un estado de anestesia; y a concentraciones iguales o mayores a 400 mg por ciento se evidencian falla respiratoria, coma y muerte. Por otro lado, la ingesta excesiva y crónica de etanol se asocia con trastornos neurológicos y mentales crónicos dentro de los cuales encontramos la encefalopatía de Wernicke y la psicosis de Korsacoff (6).

2. Sobre la actividad neuromuscular: a bajas dosis, disminuye la percepción de fatiga y facilita el trabajo muscular mientras que a dosis mayores, con la creciente depresión del sistema nervioso central, interfiere con la ejecución del trabajo muscular. La ingesta crónica produce el aumento de la creatinfosfoquinasa en plasma, lo que indica lesión celular (6).

3. La respuesta a la excitación sexual se encuentra disminuida en ambos sexos. La ingestión crónica en el varón puede causar impotencia, esterilidad, atrofia testicular y ginecomastia (6).

4. Disminuye la temperatura corporal por aumento del flujo sanguíneo cutáneo y depresión del sistema termorregulador hipotalámico (6).

5. A nivel gástrico, estimula la secreción de ácido clorhídrico y disminuye el espesor de la mucosa, predisponiendo así, al desarrollo de gastritis erosiva. Estas condiciones también dan lesiones frecuentes en esófago y duodeno (6).

6. Afecta la concentración de lipoproteínas aumentando las de baja densidad (LDL) y disminuyendo las de alta densidad (HDL) (6).

7. Altera el tejido hepático, pudiendo producir hígado graso, hepatitis alcohólica y cirrosis cuando su consumo es elevado y crónico (6).

8. Por su capacidad de inhibir la hormona antidiurética, produce un aumento en la eliminación diaria de orina (6).

9. En la ingesta crónica de etanol se pueden detectar distintos tipos de anemia y depresión de la migración leucocitaria (6).

10. El consumo excesivo y prolongado de etanol daña en forma irreversible el miocardio siendo uno de los agentes etiológicos más importantes de cardiomiopatía (6).

Todos estos efectos del etanol han sido descritos en edades donde su consumo es activo.

Nuestra investigación se focaliza tanto sobre los efectos agudos “in vitro” del etanol en el tejido vascular como sobre los que se producen por el “consumo” pasivo del feto durante su desarrollo y que corresponden a los denominados efectos teratogénicos.

Se entiende por sustancias teratogénicas a aquellas que tienen la capacidad de producir malformaciones en el embrión (7).

El etanol difunde rápidamente a través de la placenta y la concentración de esta sustancia en el plasma fetal puede ser mayor y persistir elevada por más tiempo que en el plasma materno (8). Los efectos del etanol sobre el feto están relacionados tanto con la edad de gestación en que ocurre la exposición, como con la dosis consumida y la susceptibilidad individual. En 1968, Lemoine de Nantes, en Francia, reconoció los efectos múltiples que el etanol puede tener en el desarrollo del feto, incluyendo la secuela más severa del espectro que es el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF) (9). En 1973 Jones y colaboradores definieron a este síndrome como el conjunto de defectos físicos y trastornos mentales, observados en los hijos de madres alcohólicas, como consecuencia de la exposición del embrión al etanol durante su desarrollo intrauterino (9). El SAF se caracteriza por retraso del crecimiento intrauterino, retraso mental en la vida postnatal (10,11) y anomalías craneofaciales, dentro de las que se encuentran la hendidura palpebral corta, la microcefalia, el filtrum liso, el labio superior delgado, la retrognatia y un variado grupo de alteraciones auriculares (12). La incidencia del síndrome en su expresión completa varía en un rango que va de 0,5 a 3 por cada 1000 nacidos vivos (13). Sin embargo, la expresión parcial del síndrome, conocido como Espectro Alcohólico Fetal (EAF), parecería ser más frecuente y estaría asociado a un consumo bajo de bebidas alcohólicas (14).

En cuanto al mecanismo de acción del etanol, se proponen diversos sitios de acción para producir los numerosos efectos que produce esta sustancia sobre el organismo. Se ha descrito una acción inespecífica del etanol que induce el desordenamiento de las membranas lipídicas de algunas neuronas, por lo que se le adjudica su propiedad anestésica sobre el sistema nervioso central (15). Por otro lado se han observado interacciones específicas del etanol con diferentes proteínas de membranas, entre las cuales se encuentran varios tipos de canales iónicos, intercambiadores iónicos y receptores. Así, por ejemplo, en células neuronales de *Aplysia* el etanol activa canales iónicos selectivos al ión  $K^+$  produciendo hiperpolarización del potencial de membrana

(15). En otros estudios, realizados en el mismo tipo neuronal, se ha observado un efecto inhibitorio del etanol sobre canales selectivos al  $\text{Na}^+$  produciendo también la hiperpolarización de la membrana celular (15).

También se ha descrito en distintos tipos celulares una acción inhibitoria del etanol sobre canales selectivos al  $\text{Ca}^{2+}$ . En neuronas de *Aplysia* la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  se reduce marcadamente con una dosis de etanol de 50 mM (15). En este trabajo presentaremos datos en relación a los efectos específicos del etanol sobre estructuras de membrana de la célula de músculo liso vascular.

Además de los efectos que el etanol posee sobre estructuras de membrana que permiten el flujo de iones, a nivel del sistema nervioso central se han descrito otros efectos mediados por su acción sobre receptores específicos. En cultivos de neuronas derivadas de médula espinal y vesículas de neuronas de sistema nervioso central de ratón, el etanol activa receptores para el neurotransmisor GABA (ácido amino gamma-butírico) de tipo A con la consecuente potenciación de los potenciales post-sinápticos inhibitorios que éste produce. Este hecho permitiría explicar el efecto potenciador que produce el etanol sobre la acción de los barbitúricos y las benzodiazepinas, fármacos agonistas de los receptores de GABA (15). Ensayos en modelos experimentales con ratas y conejos seleccionados en función de sus diferencias en la sensibilidad al etanol o al diazepam, demostraron una correlación positiva entre la sensibilidad a las benzodiazepinas y al etanol (16, 17). Estas observaciones son evidencias indirectas de que el mecanismo depresor del etanol sobre el sistema nervioso central involucra la activación de receptores GABA-A.

Se ha descrito también un efecto inhibitorio del etanol sobre los receptores de glutamato de tipo NMDA mediado por la acción que produce dicha droga al unirse al sitio de glicina de este receptor (15). Estudios en ratones demostraron que los agonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA reducen el tiempo de sueño mientras que los antagonistas lo aumentan (18). Estos datos son consistentes con la hipótesis de que la acción antagonista del etanol sobre los receptores NMDA sería la responsable del efecto inductor del sueño que se observa clínicamente tras la ingesta de etanol (15).

Otro tipo de receptor que se ve afectado por la acción del etanol es el receptor para serotonina de tipo 5-HT<sub>3</sub>, que se encuentra expresado preferentemente en interneuronas inhibitorias (15).

Es manifiesta la pluralidad de enfoques desde los que puede ser abordado el estudio de los efectos del etanol sobre la salud humana. Nuestra investigación se focaliza en los efectos de dicha molécula sobre las propiedades contráctiles de la arteria umbilical humana “in vitro” y sobre las características de los neonatos de madres que consumieron bebidas alcohólicas durante la gestación.

## **1.2 Antipsicóticos: Risperidona**

Los trastornos psiquiátricos han sido parte de las diferentes sociedades a lo largo de la historia. Así, por ejemplo, Honorato de Balzac en la novela autobiográfica Luis Lambert, publicada en 1832, muestra cómo su héroe homónimo se sumerge en la locura. Aunque en 1887 fue designada *dementia praecox* por Emil Kraepelin, durante más de medio siglo no fue plenamente reconocida. Eugene Bleuler fue quien en 1911 acuñó el neologismo *esquizofrenia* (del griego *schizein*, dividir y *phrenos*, relativo a la mente), para definir a esta patología perteneciente al grupo de las psicosis en la que el paciente se caracteriza por presentar síntomas como delirio, alucinaciones, aplanamiento afectivo y alteraciones cognitivas, entre otros (19).

Emil Kraepelin, en 1918, estableció el primer laboratorio de psicofarmacología clínica en Alemania y valoró los efectos psicológicos de los fármacos en el ser humano. En 1931, Sen y Bose publicaron el primer informe del uso de *Rauwolfia serpentina*, planta oriunda del Himalaya, para el tratamiento de la psicosis. Le siguieron el choque insulínico (1933), las convulsiones inducidas por pentilenotetrazol (1934) y el tratamiento electroconvulsivo (1937) (20). De este modo la medicina pudo contar con tratamientos para la esquizofrenia. La profundización en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad, permite postular, en la actualidad, que existirían alteraciones en las vías dopaminérgica y serotoninérgica a nivel del sistema nervioso central (SNC) (21).

Cuando a mediados del siglo XX el investigador francés Henri Laborit descubre la clorpromazina, es cuando se inicia una nueva y prometedora era en el tratamiento de las psicosis (20).

En 1952 Jean Delary y Pierre Deniker, comenzaron a ensayar la clorpromazina administrándola a algunos de sus pacientes, siendo los resultados calificados como extraordinarios. En 1958 Janssen descubrió las propiedades antipsicóticas del haloperidol (21).

Desde entonces fueron muchos los fármacos ensayados para el tratamiento de la psicosis. El desarrollo de la industria farmacéutica ha permitido disponer de drogas cada vez más selectivas y eficaces en modificar los síntomas de las enfermedades mentales (20). Este es, precisamente, el caso de la risperidona, droga perteneciente al grupo de los denominados antipsicóticos atípicos que se sintetizó en 1994.

Los antipsicóticos atípicos son un conjunto de fármacos que tienen diferentes estructuras químicas pero coinciden en sus mecanismos de acción y efectos clínicos, aunque se diferencian por presentar distintas potencias. Así, se caracterizan por:

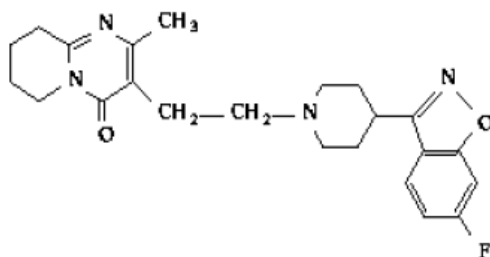
1. Presentar acción antipsicótica clínica especialmente sobre los síntomas negativos de la esquizofrenia
2. Tener pocos efectos extrapiramidales
3. Desarrollar mínima disquinesia tardía
4. Causar mínimo aumento de prolactina
5. Provocar poca o ninguna acción cataleptogénica
6. Ser eficaces en un alto número de pacientes resistentes a los antipsicóticos clásicos
7. Tener acción antagonista sobre los receptores de serotonina 2 ( $5Ht_2$ ) y de dopamina 1-2 ( $Da_{1/2}$ ), particularmente sobre el sistema mesolímbico
8. Ser posibles antagonistas débiles sobre otros receptores (21).

Con respecto a los efectos adversos más frecuentes, se incluyen: prurito, taquicardia, trastornos de la acomodación ocular, salivación, trastornos de la micción, diarrea, aumento de peso y alteraciones de la función sexual (21, 22).

La *risperidona* (figura 2) es un potente antagonista de los receptores de serotonina de tipo  $5Ht_2$ . También antagoniza receptores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos, receptores de histamina de tipo  $H_1$  y receptores de dopamina de tipo  $DA_{1-2}$ .



En su forma de administración oral, presenta una biodisponibilidad de un 68 % la cual puede descender con la ingesta de alimentos. Por esta vía, se absorbe en menos de 15 minutos y alcanza su pico plasmático en dos horas alcanzando la meseta plasmática en 1 a 7 días. La dosis terapéutica promedio oscila entre 4-8 mg/día para un adulto de 70 kilos de peso (21, 22).



**Figura 2.** Estructura química de la risperidona.

Es importante considerar que el pico de desencadenamiento de la esquizofrenia en mujeres oscila entre los 25 y 35 años (23), lo cual coincide con la tasa de máxima fecundidad. Esto determina que la elección de una droga antipsicótica en una paciente embarazada que padece esquizofrenia, sea una de las dificultades con la que se encuentran los médicos psiquiatras. La risperidona es uno de los antipsicóticos atípicos que se usan para el tratamiento de la esquizofrenia en mujeres embarazadas, sin embargo su seguridad durante la gestación aún no ha sido establecida. La US Food and Drug Administration la clasifica en la categoría C durante el embarazo, es decir que falta su investigación en humanos (24).

Son pocos los estudios realizados durante la gestación. Estos coinciden en que la *risperidona* presenta poco riesgo teratogénico. Sin embargo, un estudio prospectivo menciona el aumento en el riesgo de abortos terapéuticos y bajo peso al nacer en los neonatos expuestos a dosis terapéuticas de dicha sustancia durante su gestación, aunque poco se sabe sobre los mecanismos involucrados en estos efectos (25).

## **2. Psicofármacos, barrera placentaria y gestación**

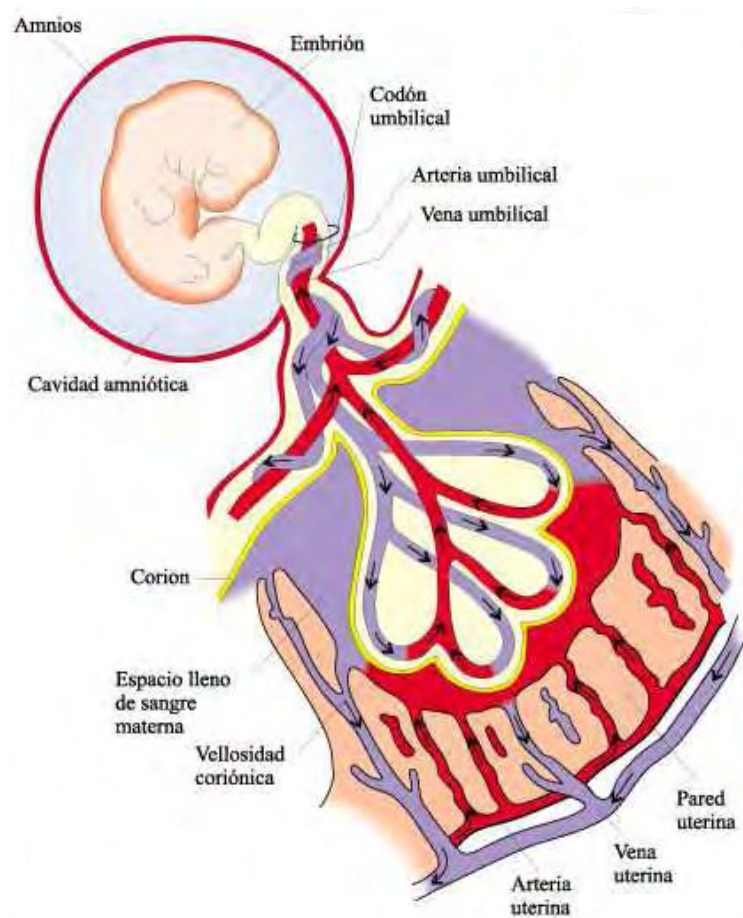
Durante la fase embrionaria temprana comienza el desarrollo del aparato circulatorio extraembrionario formado por las vellosidades coriónicas y el cordón umbilical. Este último posee dos arterias y una vena las cuales se caracterizan por carecer de vasa vasorum o linfáticos así como de inervación autónoma (26). Los vasos umbilicales se encuentran inmersos en una matriz extracelular, un tejido conectivo peculiar derivado del mesénquima extraembrionario, denominado gelatina de Wharton. Este tejido presenta miofibroblastos, mastocitos y una alta concentración de colágeno, ácido hialurónico y glucosaminoglicano (27). Funciona no sólo como soporte, sino que también es un lugar de almacenamiento y estabilización de las concentraciones de distintos factores de crecimiento en la vecindad de las células vasculares (28). Estas estructuras son fundamentales para la supervivencia del embrión, su normal desarrollo y crecimiento ya que aseguran la nutrición del feto hasta el nacimiento.

El sistema cardiovascular embrionario se origina del mesodermo embrionario, es el primero que se desarrolla durante el período organogénico, e influenciará el desarrollo de los demás órganos. En ambos casos las condiciones metabólicas del medio en el cual evolucionan los sistemas circulatorios extra e intraembrionarios, así como la presencia de sustancias exógenas serán sin duda factores importantes de influencia sobre el desarrollo de su estructura y función.

En 1937, Mossman definió a la placenta como una superposición o fusión de membranas fetales a la mucosa uterina con la finalidad del intercambio fisiológico de gases, nutrientes y desechos fetales (28). El intercambio gaseoso se produce entonces a través de la membrana placentaria entre la sangre oxigenada materna que llega por las arterias espirales del útero y baña las vellosidades coriónicas, y la sangre fetal que circula por las arterias umbilicales que terminan en asas capilares largas y dilatadas dentro de las vellosidades coriónicas. Una vez realizado el intercambio gaseoso, la sangre materna de los senos retorna a la circulación materna por las venas uterinas y la fetal retorna al feto por la vena umbilical (29).

La membrana placentaria está compuesta por tejidos extrafetales que separan la sangre materna de la fetal. Está constituida, aproximadamente a la semana 20, por cuatro capas superpuestas: sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, tejido conjuntivo de la

vellosidad coriónica y el endotelio de los capilares fetales. A partir de la semana 20 ocurren cambios histológicos en las vellosidades ramificadas que originan atenuación del citotrofoblasto que llega a desaparecer en algunas zonas, quedando sólo placas delgadas de sincitiotrofoblasto. Esto da como resultado que en la mayor parte de la membrana placentaria quedan tres capas, siendo en algunas zonas la membrana tan delgada que el sincitiotrofoblasto entra en contacto directo con el endotelio de los capilares fetales para formar lo que se denomina la membrana placentaria vasculosincicial (30,31).



**Figura 3.** Esquema de la circulación feto-placentaria.

Aunque la membrana placentaria suele denominarse barrera placentaria, esta expresión no es del todo adecuada debido a que son muy pocos los compuestos, endógenos o exógenos, que no pueden atravesarla en cantidades detectables. El transporte bidireccional de sustancias entre la placenta y la sangre materna se produce

en una amplia superficie de intercambio y utiliza cuatro mecanismos básicos como son la difusión simple, la difusión facilitada, el transporte activo y la pinocitosis (30). De esta forma, el feto quedará expuesto a aquellas sustancias que circulan en el torrente sanguíneo materno y que poseen la capacidad de atravesar la membrana placentaria. Este es el caso del etanol y la risperidona, sustancias liposolubles con capacidad de difusión a través de las membranas celulares, las cuales al atravesar la barrera placentaria, pueden pasar al torrente sanguíneo fetal y también concentrarse en el líquido amniótico tal como se demuestra en diferentes publicaciones (6, 25).

En un estudio realizado en seis mujeres embarazadas con 16 y 18 semanas de gestación, se realizó un seguimiento en la distribución del etanol tras su ingesta (0.3 g/Kg) observándose que el pico de concentración máxima en el líquido amniótico era posterior al plasmático materno y persiste por horas, inclusive cuando ya no es detectable en el plasma materno, siendo la tasa de depuración del etanol en el líquido amniótico del 50% con respecto a la plasmática. Estos datos sugieren que el líquido amniótico funcionaría como reservorio del etanol luego de su ingesta por lo que el feto quedaría expuesto por tiempos prolongados a dicha sustancia (32).

Con respecto a la risperidona, estudios realizados con la finalidad de determinar la permeabilidad de la placenta a esta droga demuestran que en embarazos de término, su concentración en sangre fetal fue de un 49,2% en comparación con la concentración plasmática materna (33).

La composición del líquido amniótico es dinámica y varía con la edad gestacional. Se encuentra compuesto por un 98-99% de agua. En la primera mitad de la gestación la concentración de los electrolitos es muy cercana a la del suero fetal, y puede suponerse que el mismo forma parte del espacio extracelular del feto (28, 30). Especialmente en la primera mitad del embarazo, el agua y el sodio pasan a través de la piel fetal debido a que no ha ocurrido la queratinización de la misma (34), por lo cual durante ese período la llegada al feto de etanol o de risperidona a través de su piel desde el líquido amniótico puede constituir otra vía posible de pasaje de sustancias exógenas tóxicas para el desarrollo normal del feto.

Otro posible mecanismo de pasaje de sustancias recononocido recientemente, es el flujo de agua e iones entre el líquido amniótico y la sangre fetal lo que se conoce como el camino intramembranoso mientras que el movimiento de agua y soluto entre el

líquido amniótico y la sangre materna dentro de la pared uterina es un intercambio de transmembrana (34).

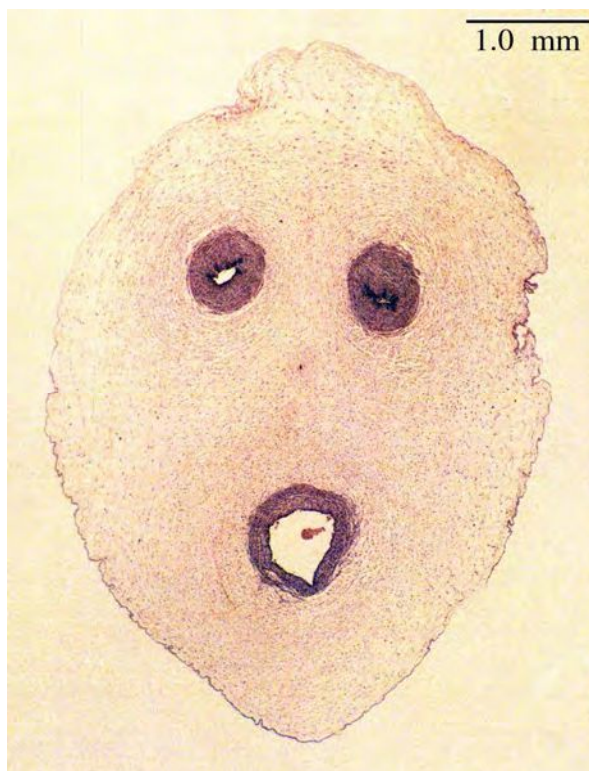
Teniendo en cuenta estas vías de pasaje de sustancias es claro que el feto puede quedar expuesto a sustancias tóxicas que alteren su desarrollo en forma directa y/o a través del efecto de estas sustancias sobre la estructura y función del sistema circulatorio feto-placentario que lo nutre.

Las arterias umbilicales tienen la función en la circulación fetoplacentaria de transportar sangre pobremente oxigenada ( $PO_2 = 21$  mm de Hg) hacia los senos venosos placentarios. Estos vasos, mantienen una baja resistencia para lograr recibir alrededor del 40% del volumen minuto cardíaco fetal que se oxigenará circulando por la placenta. Por lo tanto, la regulación del tono vasomotor de las arterias umbilicales juega un rol fundamental como causante de la disminución en la oxigenación fetal que ha sido asociada con el retardo severo de crecimiento fetal intrauterino (29).

De lo expuesto, se desprende que será de suma importancia detectar en las arterias umbilicales, los mecanismos involucrados en la activación o inhibición de estructuras celulares sensibles a las drogas psicoactivas.

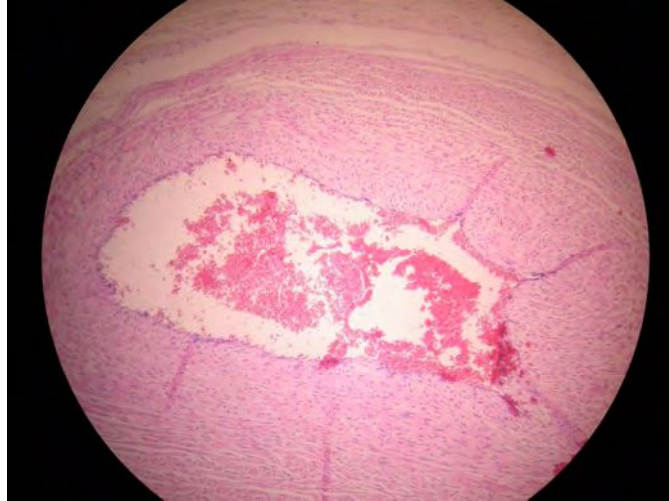
### **3. Estructura y función de la arteria umbilical.**

Las arterias umbilicales se presentan de forma espiralada manteniendo un promedio de 2,1 vueltas cada 10 cm de cordón en el embarazo a término. Ambas arterias se encuentran comunicadas por la anastomosis de Hirtlyl cerca de su decusación en el extremo de la placa coriónica lo que permite un balance del flujo entre ambas (30, 31, 35).



**Figura 4.** Fotografía de un corte transversal del cordón umbilical humano.

La pared de la arteria umbilical humana presenta una organización histológica formada por dos túnicas, la íntima y la media. Carece de lámina elástica y adventicia típica de otros lechos arteriales. La túnica íntima se ubica internamente (hacia la luz del vaso). Es una estructura compuesta por largas microvellosidades que se proyectan al lumen la cual está formada por una capa de células endoteliales ricas en retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y ribosomas (35). El borde entre la túnica íntima y la media contiene un segundo tipo celular con características semejantes a las células musculares lisas aunque más ricas en retículo endoplasmático rugoso y organelas (35). La túnica media esta formada por células musculares lisas que se disponen internamente, longitudinales al eje del vaso en forma espiralada, y externamente forman una capa circular compacta. Como se observa en la siguiente fotografía.

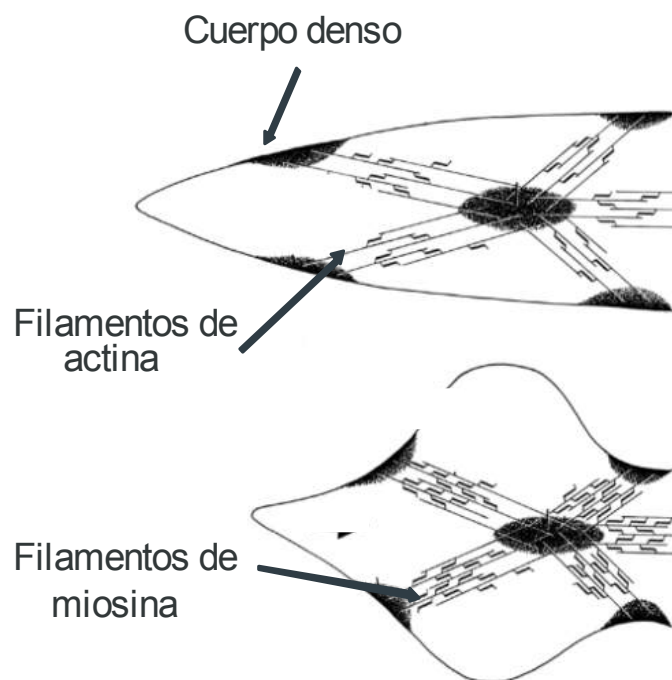


**Figura 5.** Fotografía tomada en nuestro laboratorio en la que se observa la estructura histológica de la arteria del cordón umbilical humano.

Las células musculares lisas de la túnica media son células fusiformes de unos 100 a 500  $\mu\text{m}$  de largo y 2 a 6  $\mu\text{m}$  de diámetro con una gran proporción superficie/volumen. Esta relación, se debe, en parte a las invaginaciones que presenta la membrana denominadas caveolas (36, 37). Presentan actividad contráctil debido a la presencia de proteínas específicas organizadas en filamentos finos formados por polímeros de actina globular y filamentos gruesos compuestos por miosina (dos subunidades proteicas pesadas y dos pares de subunidades livianas). Las cadenas pesadas de la miosina están enrolladas entre sí, constituyendo el núcleo del filamento, y terminan en dos porciones de naturaleza globular capaces de hidrolizar ATP, las cuales sobresalen del mismo a intervalos regulares. Sobre cada cabeza de miosina se disponen dos tipos de cadenas livianas. Una de ellas, se denomina cadena liviana reguladora o MLC20 (del inglés "myosine light chain 20 Kda) y posee un sitio de fosforilación, en el aminoácido serina 19, fundamental para la regulación de la contracción. La actina formada por monómeros regulares de G-actina forma un polímero filamentoso helicoidal de doble cadena de 1-2  $\mu\text{m}$  de longitud denominado F-actina y en el surco de la doble cadena se ubican las moléculas de una proteína fibrilar denominada tropomiosina la cual se ubica de manera continua a lo largo de todo el filamento fino (36, 37, 38). Estos filamentos se organizan en unidades de tres a cinco filamentos gruesos rodeados de varios filamentos finos y se fijan a estructuras proteicas denominadas cuerpos densos que están anclados a proteínas del citoesqueleto celular (39, 40). De esta manera, se forma



la maquinaria contráctil, la cual modificará su longitud dependiendo de la concentración de calcio intracelular.

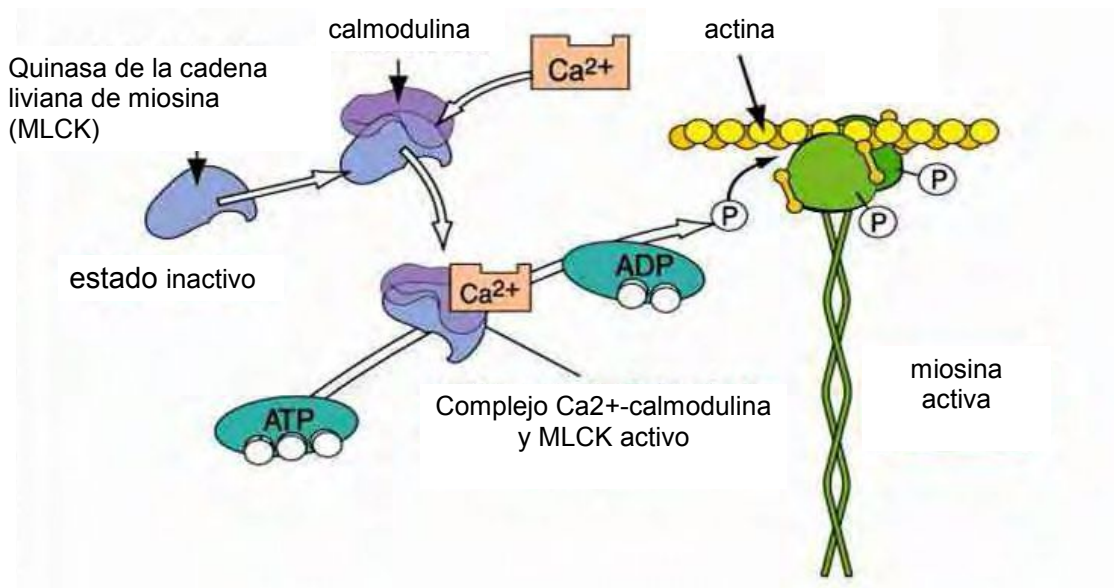


**Figura 6.** Esquema en el que se muestra la disposición de los filamentos contráctiles y los cuerpos densos.

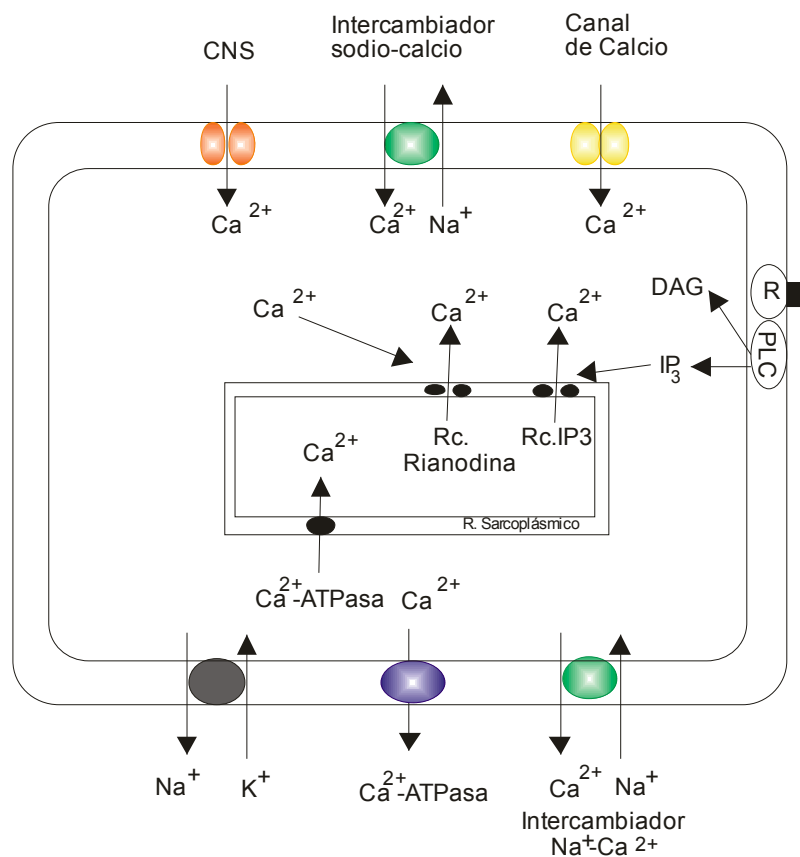
En estado de reposo, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol de la célula muscular lisa está comprendida en el rango de valores de 120 a 170 nM, y tiene un rol fundamental en la regulación del estado contráctil celular (41). Un aumento global en la concentración intracelular del ion  $\text{Ca}^{2+}$  a valores de 500 a 700 nM activa el aparato contráctil celular mediante el mecanismo que se esquematiza en la figura 7 A.



**A**



**B**



**Figura 7. A)** Esquema del acoplamiento excito-contráctil. **B)** Esquema de las estructuras involucradas en los flujos de calcio en las células del músculo liso vascular.

(CNS: canal catiónico no selectivo, PLC: fosfolipasa C, DAG: diacilglicerol, R: receptor)

Un aumento global de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular puede estar mediado por los siguientes mecanismos (figura 7B):

1. Activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por voltaje, de los cuales han sido identificados distintos subtipos en el músculo liso (L, T, R).
2. Activación de canales catiónicos no selectivos (CNS) permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y al  $\text{Na}^+$  que pueden activarse mediante un número importante de estímulos (agonistas, estiramiento mecánico, depleción del retículo sarcoplásmico, estímulos despolarizantes de la membrana celular, entre otros).
3. Activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en su modo inverso de acción (entra  $\text{Ca}^{2+}$  y saca  $\text{Na}^+$ ).
4. Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  o por segundos mensajeros).
5. Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  de las mitocondrias (40)

El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a una proteína citoplasmática denominada calmodulina que posee cuatro sitios de unión para iones  $\text{Ca}^{2+}$ . El complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (cuatro iones  $\text{Ca}^{2+}$  unidos a una molécula de calmodulina) activa a la proteína quinasa de la cadena liviana de miosina o MLCK (del inglés "Miosine Light Chain Kinase"). Esta quinasa puede estar ligada a los filamentos finos a través de su extremo N terminal y cuando es activada, por el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, fosforila a la MLC20 (42, 43, 44). Esta reacción desencadena un ciclo, durante el cual ocurre el corrimiento de las cabezas de miosina desplazando los filamentos de actina mediante el gasto de energía metabólica a través de la actividad ATPasica del complejo actomiosínico. Este mecanismo conduce al acortamiento de la estructura contráctil y el consiguiente desarrollo de fuerza. Por lo tanto, en respuesta a distintos estímulos que produzcan un aumento en la concentración global de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, se activa este mecanismo contráctil produciéndose un acortamiento celular que puede llegar hasta dos terceras partes de la longitud de la célula de músculo liso (45).

Luego de que el estímulo contráctil ha cesado, el  $\text{Ca}^{2+}$  es removido del citoplasma hasta alcanzar nuevamente la concentración de reposo. Esto implica la inactivación de la MLCK con la consecuente interrupción de la fosforilación de la miosina a lo que se

suma la actividad de fosfatasas que la defosforilan. La extrusión del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana celular y su secuestro hacia compartimentos intracelulares explica el descenso en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. La célula puede extruir el  $\text{Ca}^{2+}$  a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  actuando en su modo directo y/o por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicada en la membrana plasmática (PMCA del inglés plasma membrana calcium ATPase). Por otro lado, la recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ubicada en la membrana del retículo sarcoplasmático (SERCA del inglés sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase) constituye un mecanismo importante que permite reinstaurar las concentraciones intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  de reposo.

El estado contráctil de las células de músculo liso incluidas en la pared de las arterias determina el radio del vaso lo cual tiene una implicancia directa sobre la regulación del flujo sanguíneo. Es de destacar que pequeñas variaciones en el radio del vaso producirán cambios significativos en el flujo ya que el mismo es inversamente proporcional a la cuarta potencia del valor del radio (45, 46).

Diversos estímulos fisiológicos endógenos y agentes exógenos (agonistas, iones, fármacos etc.) pueden alterar el estado contráctil de las células de músculo liso vascular actuando sobre las estructuras celulares que intervienen en la regulación de la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este es el caso de la interacción de distintos agonistas endógenos con sus receptores específicos. En las células del músculo liso de la arteria umbilical se han descrito los siguientes receptores metabotrópicos específicos:

1. Receptores para dopamina de tipo  $\text{D}_1$  caracterizados en las células de músculo liso que forman la pared del vaso mediante técnicas de radioinmunoensayo, observándose una mayor expresión de dichos receptores en regiones cercanas a la placenta (47). La propuesta de que estos receptores participarían en la regulación del flujo placentario se basa en el hecho de que el feto produce dopamina circulante la cual, induciendo vasodilatación, podría estar regulando el flujo fetoplacentario (48).
2. Receptores para serotonina de tipo  $5\text{HT}_{1\text{A}}$  y  $5\text{HT}_{2\text{B}}$  hallados usando “primers” específicos que revelaron la presencia de ARNm para la expresión de dichos receptores en la arteria umbilical. Estos receptores median los efectos vasoconstrictores de la serotonina en dicho vaso (49).

3. Receptores para acetilcolina de tipo muscarínico (M) y presencia de acetilcolinesterasa intersticial identificados en células del músculo liso de la arteria umbilical humana mediante técnicas de radioinmunoensayo (50). Se han descrito en la arteria umbilical humana efectos vasoconstrictores mediados por la acción directa de la acetilcolina sobre el músculo liso (51).
4. Receptores para histamina de tipo H<sub>1</sub>, caracterizados farmacológicamente como responsable del efecto contráctil que produce la histamina sobre la arteria umbilical humana (52, 53).
5. Receptores para noradrenalina de tipo  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  caracterizados farmacológicamente en la arteria umbilical humana como mediadores de respuestas vasoconstrictoras a la noradrenalina (54).

En las arterias umbilicales el endotelio tiene un rol parácrino importante en la regulación del flujo feto-placentario (35, 55, 56). Numerosos estudios han demostrado que el mismo sintetiza y libera mediadores vasoactivos en respuesta a distintos estímulos fisiológicos como pueden ser sustancias circulantes como serotonina, angiotensina II, adrenalina, bradiquinina, o sustancias liberadas por las plaquetas o por las células del sistema inmune, cambios en la presión de O<sub>2</sub> sanguínea, alteraciones ácido base, así como cambios en el flujo sanguíneo que generan un esfuerzo de corte (del inglés “shear stress”) sobre la superficie celular. Los factores liberados por las células endoteliales pueden difundir y actuar sobre las células del músculo liso regulando su estado contráctil.

Entre los factores con efecto vasodilatador derivados del endotelio, la prostaglandina PG<sub>I2</sub> o prostaciclina (57) fue el primero en ser descrito. Esta sustancia se sintetiza en las células endoteliales a partir del ácido araquidónico y relaja el músculo liso mediante su unión a receptores específicos acoplados a proteínas G que activan la enzima adenilato ciclasa de las células musculares con el consiguiente aumento de los niveles de AMP<sub>c</sub> y activación de proteína quinasa A (PKA). Es esta última la que mediante la fosforilación de proteínas involucradas en la relajación muscular aumenta el diámetro del vaso (58). Otro de los factores relajantes liberado por el endotelio es el óxido nítrico o NO (“nitric oxide”), gas sintetizado a partir de la L-arginina por la enzima NO-sintasa (59, 60). El NO difunde a través de la membrana plasmática y del espacio mioendotelial, ingresa a los células del músculo liso por difusión simple y en el citoplasma de las células

musculares activa una guanilato ciclasa soluble, la cual aumenta la concentración de  $GMP_c$  en las células, activando a la proteína quinasa G (PKG) que inicia una cascada de fosforilación y produce relajación del vaso (61, 62).

En la arteria umbilical humana se ha estudiado la actividad vasodilatadora de  $PGI_2$  y NO endógenos, encontrándose que ambos factores relajan anillos vasculares de AUH precontraídos con serotonina (5-HT) o bradiquinina; sin embargo los autores de este trabajo muestran que los anillos son más sensibles a los inhibidores de la síntesis de  $PGI_2$  que a los de la síntesis de NO, sugiriendo que la liberación de  $PGI_2$  sería más potente en este vaso (63).

# *Objetivos*

El consumo de sustancias psicoactivas durante el embarazo aumenta el riesgo de desarrollo de un amplio espectro de enfermedades asociadas al período perinatal y que, en algunos casos, acompañarán al neonato de por vida.

Si bien los efectos que los psicofármacos tienen sobre el sistema nervioso son objeto de un amplio campo de estudio, el mecanismo de acción y posibles efectos que estas sustancias producen sobre otros tejidos son menos difundidos.

El objetivo general de este trabajo de tesis fue estudiar el efecto de drogas psicoactivas, en particular el etanol de consumo masivo, y la risperidona utilizada en el tratamiento de la psicosis, sobre las propiedades contráctiles del músculo liso vascular humano. Utilizamos para ello la arteria umbilical, vaso de fundamental importancia en la regulación del flujo fetoplacentario durante el período de gestación.

Los objetivos particulares abordaron,

1. el estudio “in vitro” de los efectos agudos que el etanol y la risperidona producen sobre la arteria umbilical profundizando sobre sus mecanismos de acción en la célula de músculo liso.
2. el análisis de las propiedades contráctiles de las arterias umbilicales de los neonatos expuestos al etanol durante su gestación.
3. la valoración del estado de salud y la presencia de malformaciones relacionadas con el síndrome alcohólico fetal en neonatos de madres consumidoras de bebidas alcohólicas durante la gestación.

# *Materiales y métodos*



### 1. Obtención de la muestra de arteria umbilical

Inmediatamente luego del alumbramiento, se tomaron muestras de aproximadamente 10 cm del cordón umbilical provenientes de nacimientos normales a término por partos vaginales o cesáreas. Los cordones umbilicales fueron mantenidos a 4 °C en una solución salina cuya composición, en mM, es la siguiente: 130 ClNa, 4,7 ClK, 1,6 MgSO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 1,7 NaHPO<sub>4</sub>, 2,5 Cl<sub>2</sub>Ca desde su obtención hasta su análisis, el cual fue dentro de las 24 horas posteriores a la obtención de la muestra.



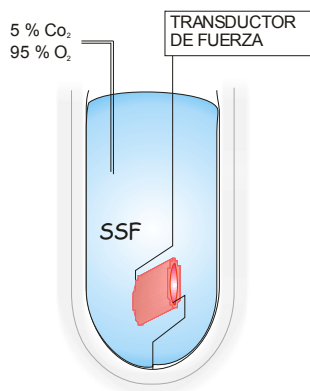
**Figura 8.** Fotografías del cordón umbilical en el momento de la extracción.

### 1. Determinación de fuerza isométrica en anillos vasculares intactos

Las arterias umbilicales fueron en primer lugar cuidadosamente aisladas del tejido conectivo que las recubre (gelatina de Warthon del cordón umbilical). A partir de segmentos vasculares aislados de AUH se obtuvieron anillos de 3 mm de largo, tomándose cuatro anillos por muestra. Los anillos vasculares fueron suspendidos entre dos alambres rígidos, uno fijo a un soporte de acrílico y otro vinculado en forma móvil a un transductor de fuerza, y colocados en cámaras termostatzadas a 37 °C de 20 ml de capacidad conteniendo solución Krebs Ringer bicarbonato (KRB) burbujeada con una mezcla de 95% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub> para mantener el pH estable en un valor de 7,4.

El transductor de fuerza (Letica TRI 201, Letica Scientific Instruments, Barcelona, España) convierte la fuerza isométrica ejercida por el anillo vascular en una señal eléctrica que es digitalizada mediante una placa convertora A/D (DT 16 EZ o DT302, Data Translation Inc., Marlboro, MA) y visualizada en tiempo real en una computadora

mediante un programa adecuado (Labtech Notebook Pro Laboratory Technology Corp., Wilmington, MA)



**Figura 9.** Esquema de la cámara isométrica utilizada en los experimentos de determinación de fuerza isométrica en anillos vasculares aislados.

Los registros obtenidos fueron grabados en el disco rígido de la computadora para su posterior análisis. La recuperación de los mismos y las mediciones de fuerza de contracción y relajación se realizaron con un programa de cálculo adecuado (Origin 7.0). La fuerza desarrollada se normalizó por el peso del anillo y se expresó como la fuerza desarrollada en gramos fuerza por gramo de tejido (gF/gP).

En cada experimento los anillos vasculares se estiraron inicialmente hasta una señal de fuerza de 2 gF. En esas condiciones se estabilizaron durante 60 minutos con cambios sucesivos de la solución KRB cada 20 minutos.

#### **Composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de determinación de fuerza isométrica**

- **Krebs-Ringer Bicarbonato (KRB):** (en mM) 130 NaCl, 4,7 ClK, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 1,17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,16 Mg SO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 6 glucosa.
- **KRB-K80:** (en mM) 54,7 NaCl, 80 ClK, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 1,17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,16 Mg SO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 6 glucosa.
- **KRB-K40:** (en mM) 94,7 NaCl, 40 ClK, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 1,17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,16 Mg SO<sub>4</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 6 glucosa.
- **KRB cero calcio:** (en mM) 130 NaCl, 4,7 ClK, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 1,17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,16 Mg SO<sub>4</sub>, 6 glucosa.

## **Drogas y reactivos utilizados en los experimentos de determinación de fuerza isométrica**

- Serotonina, histamina, acetilcolina, dopamina, risperidona, etanol, N (G)-nitro-L-arginina  $\omega$  metil ester (L-NAME), indometacina, cloruro de tetraetilamonio (TEA), manitol. Todas estas drogas fueron adquiridas en SIGMA chemical company, a excepción de la risperidona que fue provista por Droguería Todofarma SA.

## **2. Determinaciones electrofisiológicas mediante la técnica de patch clamp**

### **Disociación celular de músculo liso de la AUH**

La obtención de los miocitos lisos aislados enzimáticamente se realizó partir de segmentos de la AUH mediante un protocolo de disociación celular con enzimas. En un tubo de ensayo conteniendo 1 ml de solución de disociación (SD) adicionada de 2 a 4 g de colagenasa tipo 1, se colocó un segmento del vaso (20-40mg) cortado en porciones de aproximadamente 2 x 2 mm. El tubo con el tejido permaneció en un baño termostatzado a 30 °C durante 25 minutos con agitación suave. Cada 15 minutos se separó el tejido del medio de disociación que contiene las células que se fueron aislando y se centrifugó para obtener las células aisladas, las cuales se suspendieron en medio SD. Esta suspensión de células se colocó en una cámara donde se realizaron los registros electrofisiológicos. Se seleccionaron las células por su aspecto relajado para intentar el logro de sellos con microelectrodos adecuados.

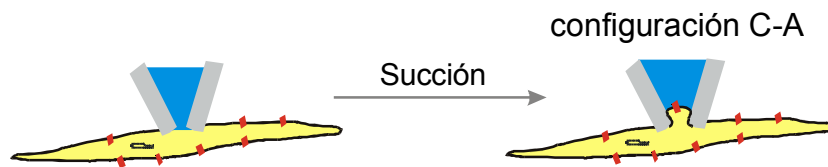
### **Registro de corrientes iónicas en células aisladas**

#### **Consideraciones generales**

Mediante la aplicación de la técnica de patch-clamp se registraron corrientes totales en la configuración de célula entera o W-C (del inglés "whole-cell"), en las células de músculo liso de AUH aisladas enzimáticamente.

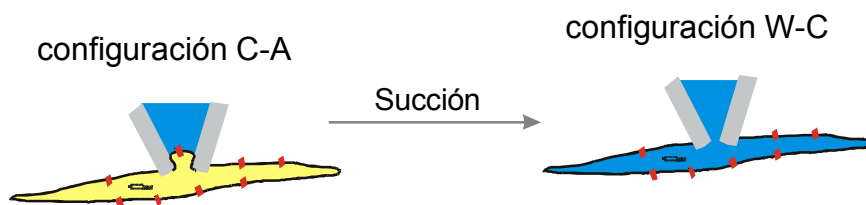
La técnica de patch-clamp, desarrollada por los investigadores Hamill, Martin, Neher, Sakmann y Sigworth del Instituto Max-Planck de Alemania (64), consiste brevemente en la aproximación de una micropipeta de "patch" a la superficie de la membrana de la célula aislada elegida y en el establecimiento de un sello de alta resistencia eléctrica (aproximadamente 10 G $\Omega$ ) entre la punta de la pipeta y la membrana celular. Esto se

logra cuando la superficie de la membrana y el vidrio de la micropipeta se ponen en contacto y se aplica una leve presión negativa (por tracción del embolo de una jeringa o por succión suave) a través de una cánula conectada con el interior de la micropipeta. A partir de esta configuración, a la que se denomina C-A (del inglés "cell-attached"), se pueden obtener el resto de las configuraciones posibles.



**Figura 10.** Esquema de la configuración de cell-attached.

Para obtener la configuración W-C, se aplica mayor presión negativa a través de la micropipeta lo cual rompe el sector de membrana por debajo de la micropipeta y permite la conexión eléctrica entre el electrodo y el interior celular como se muestra en el siguiente esquema.



**Figura 11.** Esquema de la configuración de whole-cell.

A continuación, se detallan las características de esta última configuración ya que fue la utilizada en este trabajo de tesis doctoral.

### **Registro de corrientes totales en configuración de Whole-Cell**

Como se puede observar en el esquema de la figura 11 de la sección anterior, en configuración W-C, la solución salina de la micropipeta difunde hacia el interior celular. Mediante la aplicación de un protocolo de fijación de voltaje es posible registrar la corriente macroscópica total que fluye a través de la sumatoria de canales presentes en toda la superficie de la membrana celular (modo "voltage-clamp" o fijación de

voltaje). En esta configuración es también posible registrar el valor de potencial de membrana de reposo o en respuesta a un estímulo fijo de corriente (modo “current-clamp” o fijación de corriente).

En este trabajo se realizaron registros de corrientes activadas por pulsos de voltaje en configuración W-C en células musculares lisas de AUH.

**Protocolo de voltaje en pulso:** consiste en realizar un cambio discreto instantáneo del valor de potencial desde un valor determinado (potencial de mantenimiento) al valor preestablecido manteniéndolo durante un tiempo y luego fijarlo nuevamente, también en forma instantánea al valor inicial:



**Figura 12.** Esquema del protocolo de voltaje en pulso.

Este protocolo se genera con el programa Clampex (pClamp 6) y se aplica en forma automática según las necesidades experimentales.

Las corrientes obtenidas en esta configuración fueron filtradas a 2 kHz y digitalizadas a una frecuencia de muestreo de 40 kHz. Los valores de resistencia en serie estuvieron en el rango de 10 a 15 M $\Omega$  y fue compensada electrónicamente al 70 % en la mayoría de los experimentos.

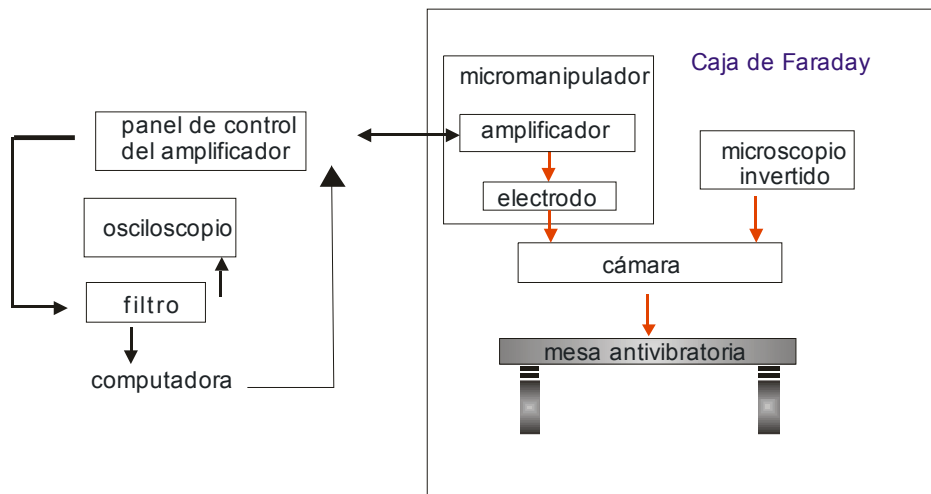
El análisis de los datos obtenidos fue realizado empleando el programa Clampfit (pClamp 6) que permite en primer lugar visualizar, luego del experimento, el archivo de corriente en función del tiempo y realizar el tratamiento de los datos que se considere necesario. En este trabajo, utilizando este programa, se realizaron las curvas que relacionan los valores de corriente en función del valor de los diferentes pulso de voltaje aplicado (curvas I-V) en condiciones control y luego del agregado de las sustancias de interés.

Las células, se observaron con un microscopio invertido equipado con una lente objetivo de 40 X (Telaval 3; Zeiss, Jena, Alemania) estabilizado mecánicamente sobre una mesa antivibratoria (Newport) recubierto con una caja de Faraday para filtrar ruidos eléctricos del ambiente. La cámara experimental que contiene las células fue perfundida con una solución extracelular normal a una velocidad constante de 0,5 ml/min mediante un sistema multivía de perfusión continua. En este sistema las soluciones alcanzan la cámara por gravedad desde varios reservorios conectados mediante cánulas flexibles a una pipeta multivía que se moviliza mediante un micromanipulador (Leitz). El líquido fue retirado de la cámara mediante succión por una bomba de vacío. La pipeta de perfusión se posicionó muy cerca de la célula a ensayar y la cámara fue perfundida durante 5 minutos con la solución control de cada experimento antes de comenzar con los registros eléctricos. Luego de cada experimento la cámara conteniendo la célula ensayada se reemplazó por otra con células nuevas. Para realizar los registros eléctricos se seleccionaron las células que estuvieran relajadas (aspecto liso), con forma ahusada y pegadas al vidrio de la cámara. Los datos se obtuvieron entre 4 y 6 horas luego de la disociación celular. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente ( $\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Las micropipetas fueron realizadas con capilares de vidrio WPI PG52165-4 en un sistema de estirado ("Puller") vertical con dos fases de estirado (PP-83, Narishige Scientific Instrument Laboratories, Tokio, Japon) y la resistencia de las mismas estuvo en el rango de 2 a 4  $\text{M}\Omega$  medida en solución extracelular normal (ver más adelante). La micropipeta se movilizó mediante un micromanipulador de precisión (Huxley-Style precisión MX310R, Newport). El electrodo de referencia, adecuadamente clorurado, se colocó dentro de la solución del baño.

La señal de corriente eléctrica o de potencial en función del tiempo se observó con un osciloscopio PS-200 (Pintek), se filtró adecuadamente con un filtro tipo Bessel de 8 polos y se registró con un amplificador Axopatch 200A (Axon Instruments, Foster City, CA). Los datos fueron convertidos mediante una placa conversora A/D - D/A (DIGIDATA 1200 - Axon Instruments) y almacenados en el disco duro de una computadora para su análisis posterior con un programa apropiado. Todos los componentes del equipo se conectaron a tierra adecuadamente con el fin de disminuir

el ruido eléctrico durante los experimentos. En la siguiente figura se esquematizan las conexiones entre los componentes de la unidad de “patch-clamp”.



**Figura 13.** Esquema de la unidad de “patch clamp”.

#### **Composición de las soluciones utilizadas en los experimentos de “patch clamp”**

- **Solución extracelular normal (SEN):** Composición en mM: 150 NaCl, 5,4 KCl, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 6 glucosa y 5 HEPES; el pH fue ajustado a 7,4 con una solución concentrada de NaOH.
- **Solución de K40:** Composición en mM: 115,4 NaCl, 40 KCl, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 6 glucosa y 5 HEPES; el pH fue ajustado a 7,4 con una solución concentrada de NaOH.

### **3. Población y muestra utilizada en los experimentos donde se evaluaron los efectos del consumo materno de etanol.**

La población para este estudio se obtuvo entre las embarazadas que concurren al servicio de Maternidad del hospital HIGA San Martín de La Plata. Como estábamos interesados sólo en los efectos del bajo consumo de etanol, establecimos un límite superior de ingesta. Sin embargo, no existe un consenso en la literatura sobre qué debería considerarse como bajo consumo. Se sugieren menos de 9 ml/día (810 ml por trimestre) de etanol (Sood B, et al<sup>1</sup>) o menos de tres vasos de bebidas alcohólicas promedio por semana, lo que corresponde a 6,5 ml/día (585 ml/trimestre) de etanol, considerando un contenido de 14,7 ml de etanol absoluto en una bebida alcohólica promedio (Moore K, et al<sup>2</sup>). Tomando en consideración estos datos decidimos que un consumo de 700 ml de etanol por trimestre sería el límite superior para considerar a una mujer perteneciente al grupo expuesto (E).

En el momento del parto se tomó una muestra de aproximadamente 10 cm del segmento medio del cordón umbilical. Se conservó en solución KRB en heladera para ser utilizado dentro de las 24 horas en experimentos donde se determina la reactividad de la arteria umbilical.

Se obtuvieron muestras de cordones umbilicales provenientes de neonatos de madres que no consumieron bebidas alcohólicas durante el embarazo (población control) y muestras de cordones umbilicales de niños nacidos de madres que consumieron alcohol durante alguna etapa del embarazo (población expuesta al alcohol). En ambos casos los neonatos de los cuales se obtuvieron las muestras de cordón nacieron por parto natural.

Para la evaluación histológica del tejido vascular de las arterias umbilicales, de ambas poblaciones fueron tomadas muestras de aproximadamente 5 cm del cordón umbilical y fijadas con una solución de formol al 10%. Luego, en el laboratorio, las muestras se embebieron en parafina y fueron analizadas mediante estudios histológicos por la

---

<sup>1</sup> Sood B, Delaney-Black V, Covington C, Nordstrom-Klee B, Ager J, Templin T, Janisse J, Martier S, Sokol RJ. Prenatal alcohol exposure and childhood behavior at age 6 to 7 years: I. dose-response effect. *Pediatrics* 108:E34, 2001.

<sup>2</sup> Moore CA, Khoury MJ, Liu Y. Does light to moderate alcohol consumption during pregnancy increase the risk for renal anomalies among offspring? *Pediatrics* 99:E11, 1997.



técnica de tinción con hematoxilina y eosina. Se numeraron las muestras de manera que el operador desconociera el origen de las mismas.

Además, a las madres de los neonatos que conformaron ambas poblaciones se les realizó una encuesta de recolección de datos. A posteriori se procedió a realizar una evaluación clínica detallada de los niños nacidos de las madres que habían consumido alcohol y de aquellas que no habían consumido incluidos en las poblaciones control.

**Resguardos éticos:** Resolución Nº 5330 de la ANMAT

Se obtuvo el consentimiento informado por parte de los padres de los recién nacidos a partir de los cuales se tomaron las muestras.

El Comité de Ética de la Investigación del HIGA Gral. San Martín de La Plata autorizó la obtención de muestras de cordones umbilicales siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki y sus modificaciones, las normas de las Buenas Prácticas Clínicas y las Normas internas vigentes en el HIGA Gral. San Martín de La Plata para el análisis de los protocolos de Investigación con fecha 29/10/04.

**Encuesta:**

**Datos maternos:** Nombre y Apellido, Documento de Identidad, Edad, Nacionalidad, Domicilio, Teléfono, Estado Civil, Nivel educacional, Nº de gesta, Nº paridad, Cesáreas y Abortos previos.

**Datos Paternos:** Estado Civil, Edad, Nacionalidad, Domicilio, Consumo de alcohol, drogas de abuso y tabaco.

**Datos del embarazo:** Control del embarazo (número de controles por trimestre).

Antecedentes de: hemorragias, infecciones, diabetes, hipertensión arterial, otras enfermedades previas durante el embarazo. Consumo de alcohol - drogas de abuso y tabaco tres meses previos al embarazo y/o durante todo el embarazo. Incremento ponderal y talla.

**Diagnóstico prenatal:** de defectos congénitos.

**Consumo materno de:**

**Alcohol:** se preguntó sobre el consumo de etanol. Se consideró como madre expuesta al etanol a aquellas que consumieron bebidas alcohólicas más de tres veces en todo el embarazo. El consumo de etanol se estimó como ml diarios aproximados de consumo de bebida alcohólica extrapolados a ml de etanol.

**Cocaína:** consumo de cocaína en cada trimestre del embarazo y cantidad consumida.

**Tabaco:** se consideró madre fumadora a aquellas que hubieron consumido uno o más de un cigarrillo por día en todo el embarazo y en cada trimestre en particular.

**Antecedentes familiares:** Se consultó sobre antecedentes de defectos congénitos en familiares y consanguinidad familiar.

**Datos del recién nacido:** Fecha de nacimiento, sexo, edad gestacional, peso, talla, perímetro cefálico, vitalidad al nacer mediante el Test de APGAR.

Los niños fueron evaluados mediante un minucioso examen físico al nacer y a las 48 horas de vida realizando una exploración metódica de piel, faneras, tejido celular subcutáneo, cabeza, cuello, tórax, abdomen, aparato genitourinario y sistema osteo-articular con el objetivo de detectar malformaciones mayores y menores.

#### **4. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron expresados como el valor medio  $\pm$  un error estándar de la media. Se utilizó la base de datos Access, los programas estadísticos SPSS 11,5 y Sigma Stat. Las diferencias entre promedios y porcentajes se analizaron mediante ANOVA seguido del test de Tukey o el test de t de Student según corresponda. Se estableció un valor de  $p < 0,05$  para considerar diferencia significativa.

Para el análisis de correlación entre defectos congénitos y los distintos factores de riesgo se utilizó la razón de productos cruzados (odds ratio, OR) y test de Fisher unilateral, informándose el odds ratio (OR) y el intervalo de confianza (IC).

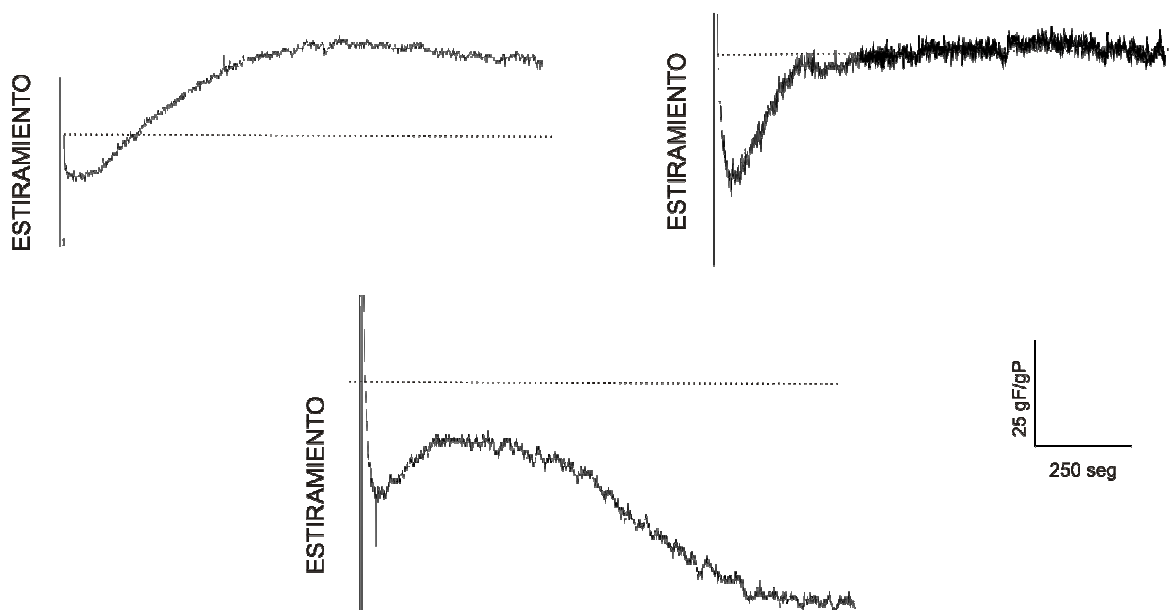
# *Resultados y Discusión*

## 1. Generalidades

En esta sección se describirán las respuestas contráctiles isométricas típicas que se obtienen cuando los anillos vasculares de la arteria umbilical humana son expuestos a distintos tipos de estímulos vasoactivos. Sobre estas respuestas fueron ensayadas posteriormente, las sustancias psicoactivas, etanol y risperidona, objeto de este trabajo de tesis.

### 1.1 Tono basal

Una vez que los anillos vasculares fueron vinculados al transductor de fuerza, se sometieron a un estiramiento de aproximadamente 2 gramos fuerza (gF), lo que constituye un procedimiento estándar ampliamente utilizado en este tipo de experimentos con segmentos vasculares. Este estímulo produjo, en el 80 % de las muestras, una respuesta contráctil caracterizada por una relajación rápida y transitoria seguida de una contracción de desarrollo más lento que se estabilizó, en el término de 60 minutos. Luego de este período de estabilización se observaron valores de fuerza mayores, iguales o menores a los 2 gramos fuerza aplicados inicialmente. En la siguiente figura se observan respuestas típicas de cada caso.



**Figura 14.** Registros típicos de la fuerza desarrollada en función del tiempo tras el estiramiento inicial.

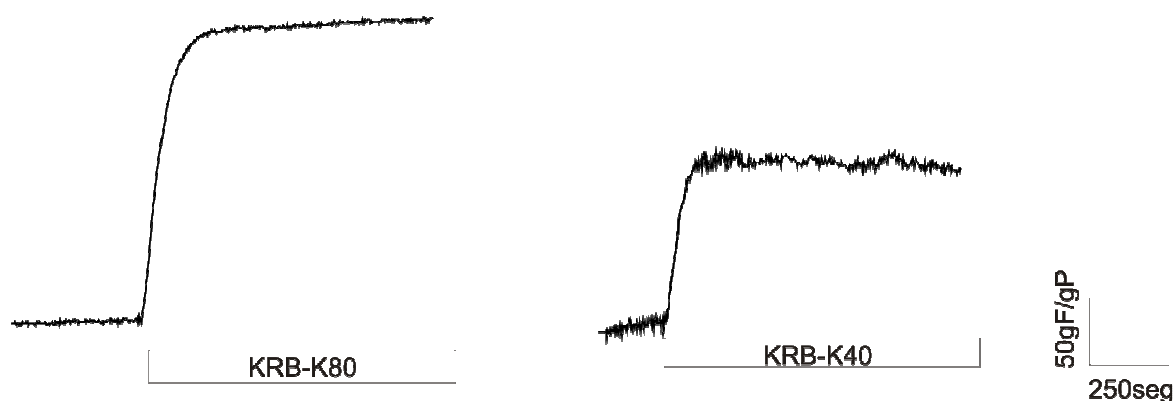
Esta respuesta constituye lo que denominamos tono basal. Es una respuesta activa dependiente de la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio extracelular como hemos descrito en otros trabajos, en el mantenimiento de esta respuesta participa un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  que involucra canales catiónicos no selectivos (65) y al intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  actuando en el modo reverso (66).

## **1.2 Soluciones despolarizantes de alto potasio**

Evaluamos las respuestas contráctiles de los anillos vasculares de la arteria umbilical humana a soluciones extracelulares con una alta concentración de cloruro de potasio (KCl).

El cambio de la solución de Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) normal, que contiene 4,5 mM de KCl, por soluciones KRB con una alta concentración (40 mM o 80 mM) de KCl (KRB-K40 y KRB-K80, respectivamente) produce una contracción de desarrollo rápido y sostenido en el tiempo como se puede observar en el registro típico de la figura 15.

Estas contracciones se producen debido a que el aumento de la concentración extracelular del ión  $\text{K}^+$  genera una despolarización de la membrana de la célula de músculo liso con la consecuente activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a las variaciones en el potencial de membrana. La activación de estos canales permite un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  que aumenta la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induciendo la contracción del anillo vascular. El desarrollo de fuerza que produce la solución despolarizante KRB-K40 es menor que la generada por la solución KRB-K80 ya que la amplitud de la contracción depende del grado de despolarización inducido en las células del músculo liso.



**Figura 15.** Registro típico en el que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo tras el agregado de las soluciones despolarizantes de alto  $K^+$  (KRBK-80 y KRBK-K40).

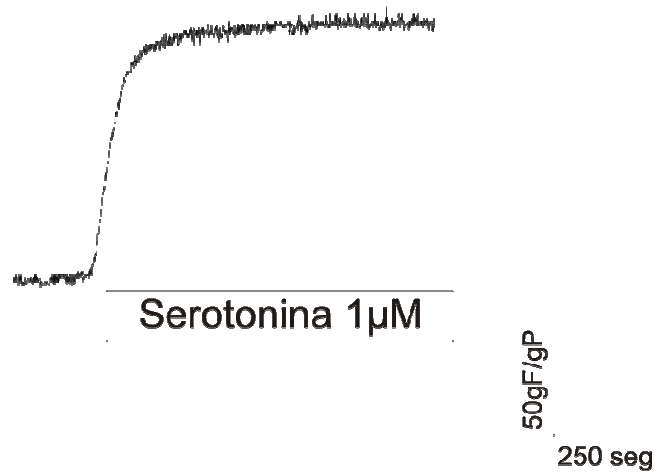
### 1.3 Respuesta a distintos agonistas vasoactivos.

Como ya hemos mencionado en la introducción de este trabajo, en las células de músculo liso de la arteria umbilical se han descrito receptores con afinidad a distintos agonistas vasoactivos que tienen un rol en la regulación vasomotora de la misma. Ensayamos entonces en nuestras muestras la respuesta contráctil de la arteria umbilical a los distintos agonistas fisiológicos de dichos receptores. Posteriormente, fueron estudiados el efecto del etanol y de la risperidona sobre dichas respuestas.

#### 1.3.1 Serotonina

La serotonina es un potente agente vasoconstrictor de la arteria umbilical. Su efecto es mediado por receptores de tipo  $5-HT_{2A}$  y  $5-HT_{1B}$ . El efecto aislado mediado por este último subtipo puede observarse “in vitro” solo luego de haber estimulado la arteria con otro vasoconstrictor como por ejemplo el tromboxano  $A_2$  (49).

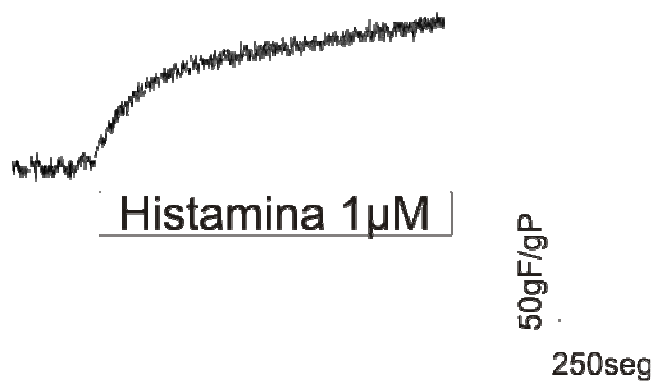
La activación de dichos receptores producida por el agregado de serotonina al medio extracelular induce en los anillos de la arteria umbilical una contracción de desarrollo rápido y sostenida en el tiempo. La siguiente figura muestra un registro típico de la respuesta del anillo vascular a la serotonina  $1 \mu M$ .



**Figura 16.** Registro típico en el que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo, tras el agregado de serotonina 1  $\mu\text{M}$  al medio extracelular.

### 1.3.2 Histamina

La histamina es otro de los agonistas que son vasoactivos en la arteria umbilical y su efecto es mediado por receptores de tipo  $H_1$  (67, 68). En nuestros experimentos observamos que la histamina produce una respuesta contráctil de desarrollo rápido y estable en el tiempo como la que se puede observar en el siguiente registro de fuerza típico.



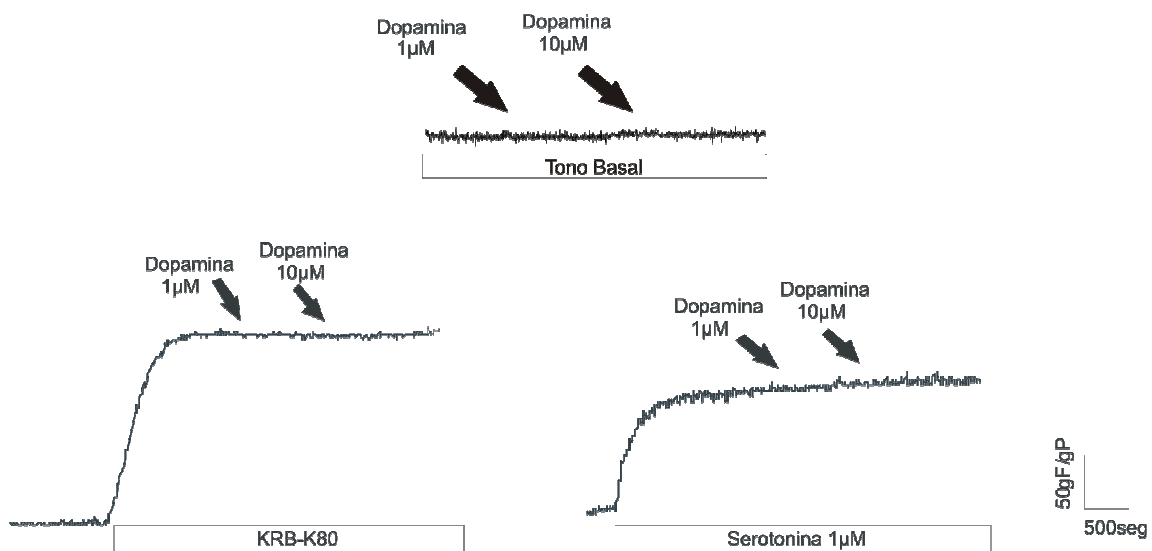
**Figura 17.** Registro típico en el que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo tras el agregado de histamina 1  $\mu\text{M}$  al medio extracelular.

### 1.3.3 Dopamina

Se han descrito receptores  $D_1$  en el músculo liso de la arteria umbilical humana (47), postulándose que la activación de los mismos por dopamina endógena de origen fetal podría disminuir el tono de dicha arteria. Sin embargo en nuestros ensayos “in vitro” no hemos observado efectos significativos de la dopamina sobre el estado contráctil de la arteria umbilical.

El agregado de dopamina (1-10  $\mu\text{M}$ ) sobre el tono basal no produjo ningún efecto contráctil.

Las mismas dosis de dopamina ensayadas sobre anillos precontraídos con una solución despolarizante de KRB-K80 o sobre contracciones inducidas por serotonina 1  $\mu\text{M}$  tampoco modificaron significativamente el grado de contracción de la arteria.



**Figura 18.** Registros típicos en los que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo luego del agregado de dopamina 1 y 10  $\mu\text{M}$  al medio extracelular.

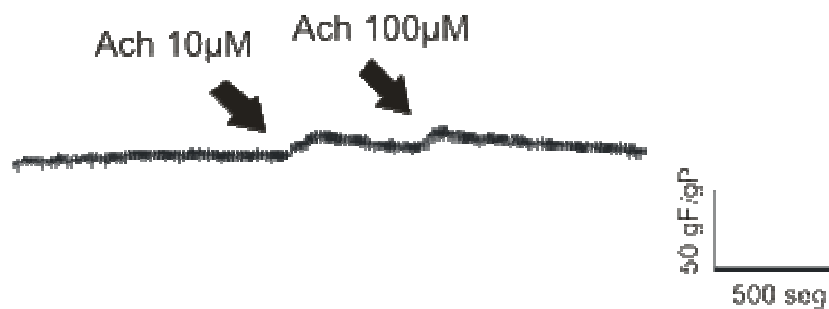
### 1.3.4 Acetilcolina

Por último ensayamos los efectos de acetilcolina (Ach) sobre esta arteria. En la mayoría de los lechos vasculares la Ach produce un efecto vasorelajante dependiente del endotelio y mediado por el óxido nítrico. En particular en la arteria umbilical este



efecto no ha sido comprobado, aunque sí se han observado efectos contráctiles inducidos por la activación de receptores muscarínicos presentes en el músculo liso arterial (50).

Ensayamos la Ach a una dosis de 10 y 100  $\mu\text{M}$ . Como se observa en la figura 19, el agregado de dicha sustancia sobre el tono basal de los anillos vasculares produce, en el caso de ambas dosis, una pequeña contracción transitoria estadísticamente no significativa.



**Figura 19.** Registro típico en el que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo tras el agregado de distintas dosis de acetilcolina.

## 2. Risperidona

### 2.1 Efecto de la risperidona sobre las respuestas contráctiles de la AUH

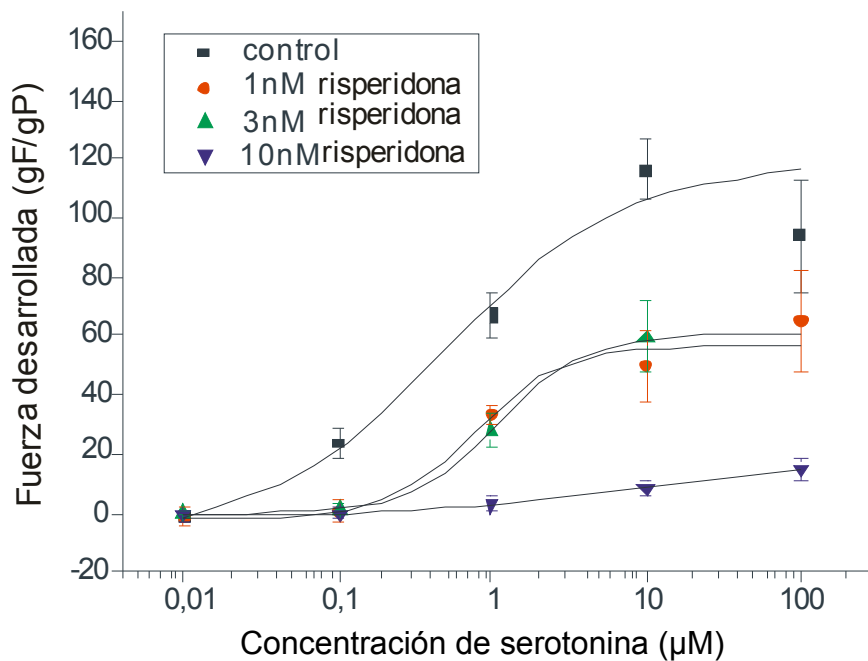
#### 2.1.1 Serotonina

La concentración plasmática de risperidona correspondiente a una dosis terapéutica de mantenimiento es de 50-100 nM (69). Por lo tanto se eligió ensayar en los anillos vasculares un rango de concentraciones de risperidona que incluyera las dosis antes mencionadas.

Teniendo en cuenta que la risperidona posee un efecto inhibitor de los receptores de serotonina a nivel del sistema nervioso, se estudió si este efecto también se observaba en tejidos periféricos como es el músculo liso vascular.

En experimentos preliminares se observó que distintas dosis de risperidona (en nM: 0,003, 1, 3, 10, 30 y 300) no modificaron el tono basal de la arteria.

Cuando se agregó serotonina 1  $\mu$ M sobre el anillo de AUH preincubado con risperidona, se observó una inhibición completa de la contracción a partir de la dosis de 10 nM.



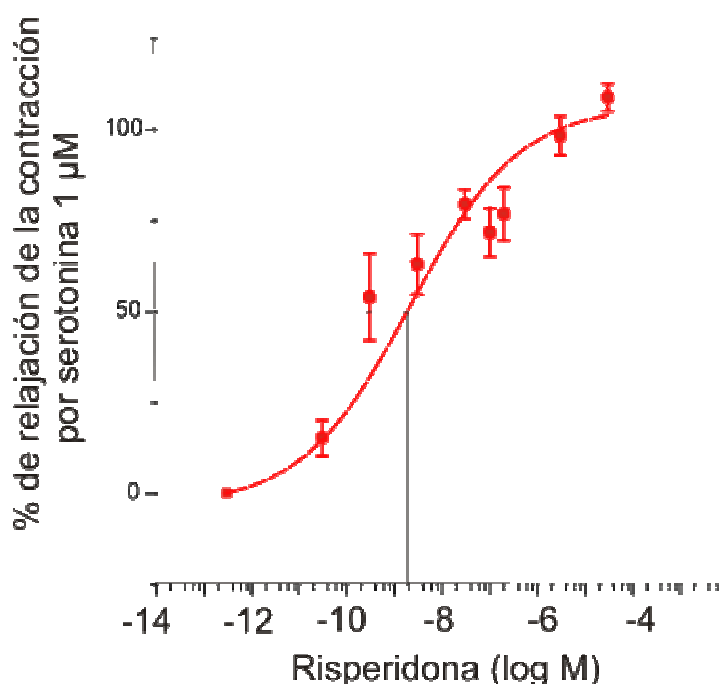
**Figura 20.** Curva dosis respuesta. Cada punto representa el promedio de al menos siete anillos.

Se analizaron las curvas dosis-respuesta para la serotonina en presencia de distintas dosis de risperidona observándose que la risperidona produjo un desplazamiento de la curva hacia la derecha y una disminución del valor máximo alcanzado. (Figura 20)

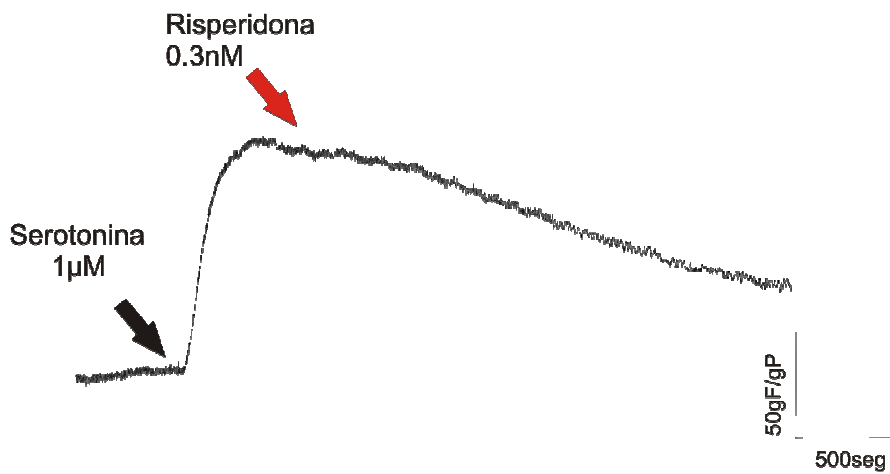
Este resultado indica que la risperidona inhibe los efectos de la serotonina mediante un mecanismo de acción no competitivo.

Con el objetivo de analizar si la risperidona producía su efecto independientemente de que fuese agregada antes o después del desarrollo de fuerza que produce la serotonina sobre el anillo vascular, se evaluó el efecto de las distintas dosis de risperidona sobre una contracción estable de este agonista. En este protocolo, cada anillo vascular se utilizó para ensayar sólo una concentración de la droga. La serotonina 1  $\mu\text{M}$  produjo una contracción cuyo valor promedio fue de  $75,8 \pm 6,4$  gF/gP (n=83). La risperidona mostró un efecto relajante de dicha contracción a partir de la dosis de 0,03 nM.

En la figura 21 A se muestra la relación dosis-respuesta obtenida a partir de los valores medios de porcentaje de relajación de la fuerza máxima obtenidos para cada concentración de risperidona. La figura 21 B muestra un ejemplo representativo del registro de fuerza donde se puede observar el efecto relajante que produce la risperidona a una dosis cercana a la dosis efectiva media ( $\text{EC}_{50}$ : 1 nM).



**Figura 21 A:** Curva dosis-respuesta cada punto es el promedio de entre 6-9 anillos vasculares.

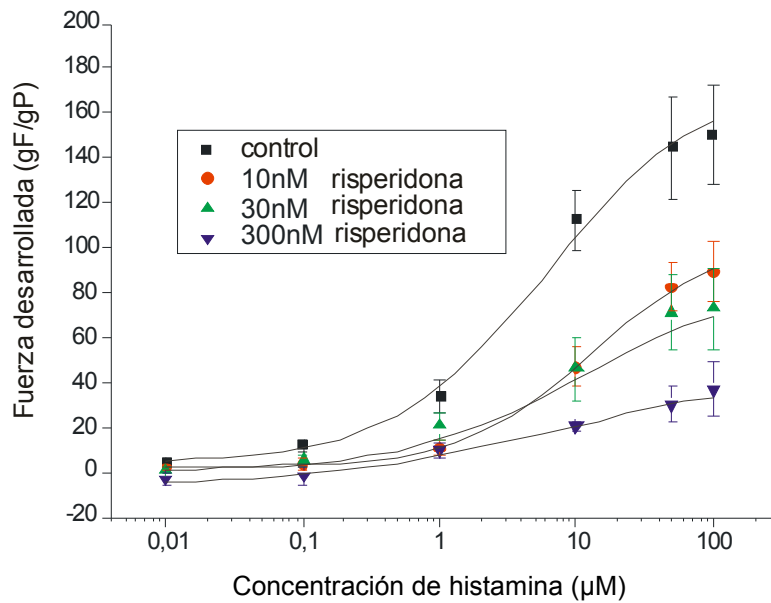


**Figura 21 B.** Registro de fuerza en función del tiempo de la acción de risperidona sobre una contracción inducida por serotonina 1 µM.

### 2.1.2 Histamina

Como ya hemos mencionado, la risperidona posee a nivel del sistema nervioso, además de su acción sobre receptores de serotonina, un efecto inhibitorio de los receptores de histamina. Fue por este motivo que se decidió estudiar si este efecto se verificaba en el músculo liso vascular de la arteria umbilical humana.

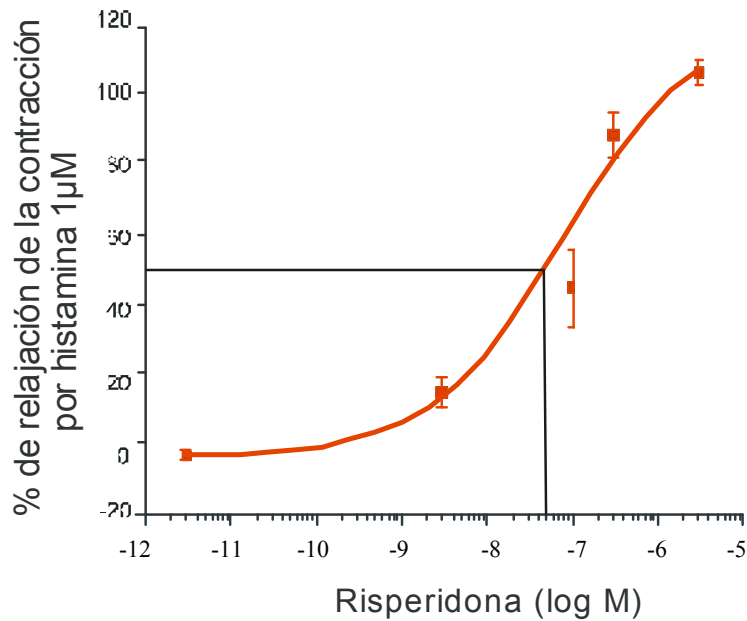
Se preincubaron los anillos vasculares con distintas dosis de risperidona (10, 30 y 300 nM) agregando luego distintas concentraciones de histamina. Se realizaron las curvas dosis-respuesta (figura 22), observándose que la risperidona produce un desplazamiento de la curva hacia la derecha y una disminución del valor máximo alcanzado. Este resultado es indicativo de que la risperidona inhibe los efectos de la histamina mediante un mecanismo de acción no competitivo.



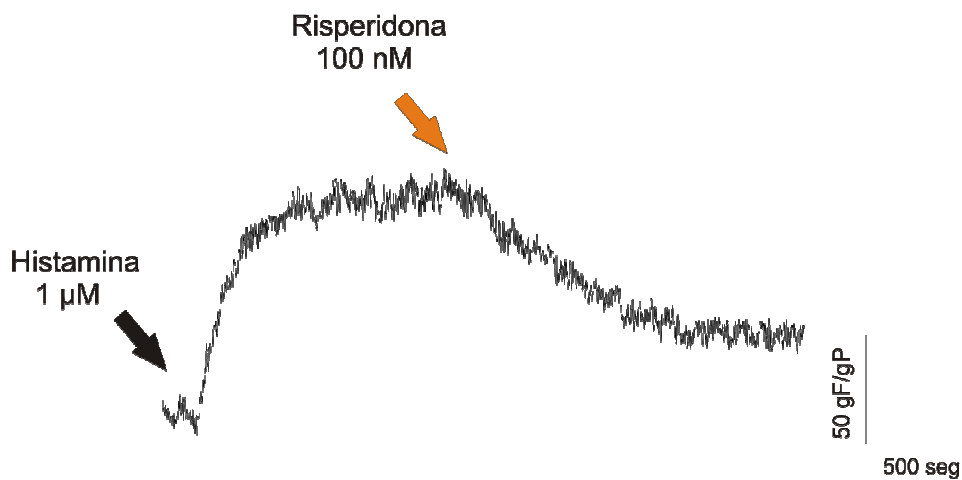
**Figura 22.** Curva dosis respuesta. Cada punto representa el promedio de al menos siete anillos.

También quisimos analizar para este agonista el efecto de distintas dosis de risperidona (0,003 nM, 30nM, 100 nM, 300nM y 3 µM) sobre contracciones estables producidas por histamina. El valor promedio de la contracción estable producida por una concentración 1 µM de dicho agonista fue de  $44,93 \pm 5,9$  gF/gP (n=40).

La dosis de risperidona 0,003 nM no tuvo un efecto significativo, mientras que dosis iguales y superiores a 3 nM produjeron relajaciones de las contracciones producidas por histamina 1 µM como se puede observar en la figura 23, en la cual se muestra la relación dosis-respuesta obtenida a partir de los valores medios de porcentaje de relajación de la fuerza máxima obtenidos para cada concentración de risperidona. La figura 24 muestra un ejemplo representativo de un registro de fuerza donde puede observarse la relajación inducida por risperidona a una dosis cercana a la dosis efectiva media ( $EC_{50}=72$  nM).



**Figura 23.** Curva dosis-respuesta cada punto es el promedio de entre 6-14 anillos vasculares.

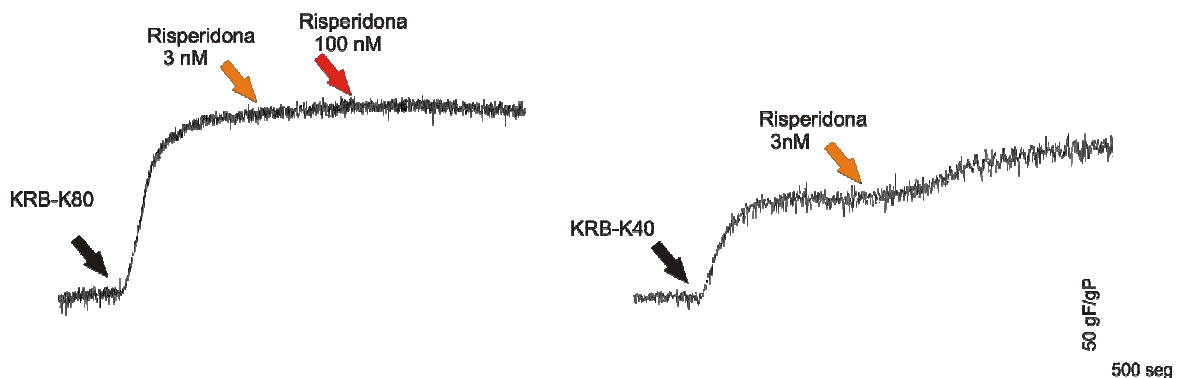


**Figura 24.** Registro típico en el que se muestra el efecto relajante de la risperidona 100 nM sobre una contracción estable de histamina 1 μM.

Los datos obtenidos en los ensayos precedentes sugieren un mecanismo de acción no competitivo para la acción inhibitoria de la risperidona sobre contracciones inducidas por histamina, así como observamos previamente en el caso de la serotonina.

### 2.1.3 Soluciones de alto potasio

Se ensayó la risperidona sobre la contracción estable que producen las soluciones despolarizantes de alto  $K^+$  extracelular. Ejemplos de trazados de fuerza en función del tiempo representativos de estos protocolos se muestran en la figura 25, observándose que la risperidona a la dosis de 3 nM no produce ningún efecto sobre la contracción inducida por la solución despolarizante en la que la concentración extracelular aumentó de 4,5 a 80 mM (KRB-K80 mM). Sin embargo sobre la contracción inducida por la solución despolarizante KRB-K40 (donde la concentración de  $K^+$  es aumentada a 40 mM) risperidona 3 nM produce un efecto contráctil significativo,  $30,03 \pm 6,05 \%$  ( $n=6$ ) de aumento de la contracción.



**Figura 25.** Se observa el efecto de la risperidona 3nM sobre contracciones evocadas por soluciones de KRB-K40 y KRB-K80

Estas dos soluciones despolarizantes difieren en el grado de despolarización que producen en el potencial de membrana celular. El aumento de la concentración extracelular de  $K^+$  hace que disminuya la fuerza del gradiente de concentración (o potencial electroquímico) que existe entre el interior celular (aproximadamente 140 mM) y el exterior celular (4,5 mM) para este ion. Cuanto mayor es la concentración extracelular de  $K^+$  menor es el gradiente y más se aleja de su valor normal de aproximadamente -80 mV. Como consecuencia, el potencial de membrana celular se despolariza.

La solución KRB-K80 produce una despolarización mayor que la solución KRB-K40, con lo cual la población de canales iónicos dependientes del voltaje que se encuentran activos, en cada caso, es diferente. La despolarización de la membrana produce

activación de canales de calcio sensibles al voltaje permitiendo un influjo de calcio responsable de un desarrollo de fuerza en el anillo vascular proporcional al grado de despolarización.

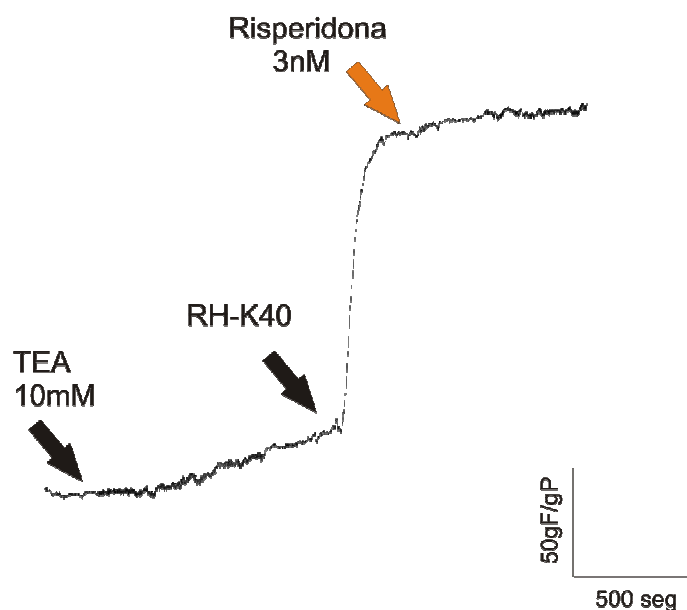
Es importante señalar que la exposición de los anillos vasculares a las soluciones despolarizantes de alto  $K^+$  (en particular a valores iguales o mayores a 80 mM) genera un estado de despolarización celular en donde la activación o inhibición de los canales de  $K^+$  no produce un efecto significativo en el potencial de membrana y por lo tanto en el desarrollo de fuerza celular.

En la situación donde el  $K^+$  se aumentó a 40 mM, si bien se ha modificado el gradiente de concentración, la actividad de los canales de  $K^+$  puede aún modificar el valor del potencial de membrana, y su activación e inhibición pueden contribuir a repolarizar o despolarizar parcialmente la membrana induciendo relajación o contracción, respectivamente.

Los experimentos mostrados en la figura 25 pueden ser interpretados teniendo en cuenta estos mecanismos, por lo cual un efecto inhibitorio de risperidona sobre los canales de  $K^+$  podría explicar el efecto contráctil observado sobre la contracción estable producida por la solución de KRB-K40 y la falta de respuesta contráctil sobre la contracción inducida por la solución de KRB-K80. Datos recientes de la bibliografía indican que la risperidona es capaz de inhibir las corrientes de  $K^+$  del tipo rectificadora tardía ( $I_{K_{dr}}$ ) en células de músculo papilar de cobayo (70), en células de músculo ventricular de conejo (71) y en miocitos ventriculares de perro (72). Sin embargo, no hay hasta la fecha datos de sus efectos sobre estas corrientes en músculo liso vascular humano.

Con el objetivo de indagar este posible mecanismo en la arteria umbilical humana, se ensayó el mismo protocolo descrito en los experimentos de la figura 25 preincubando los anillos vasculares con un inhibidor de canales de  $K^+$  (TEA 10 mM). En estas condiciones la risperidona no produce su efecto contráctil sobre la contracción inducida por la solución de KRB-K40 (figura 26). Este resultado sugiere que dicho mecanismo estaría mediado por la inhibición de canales de  $K^+$ .



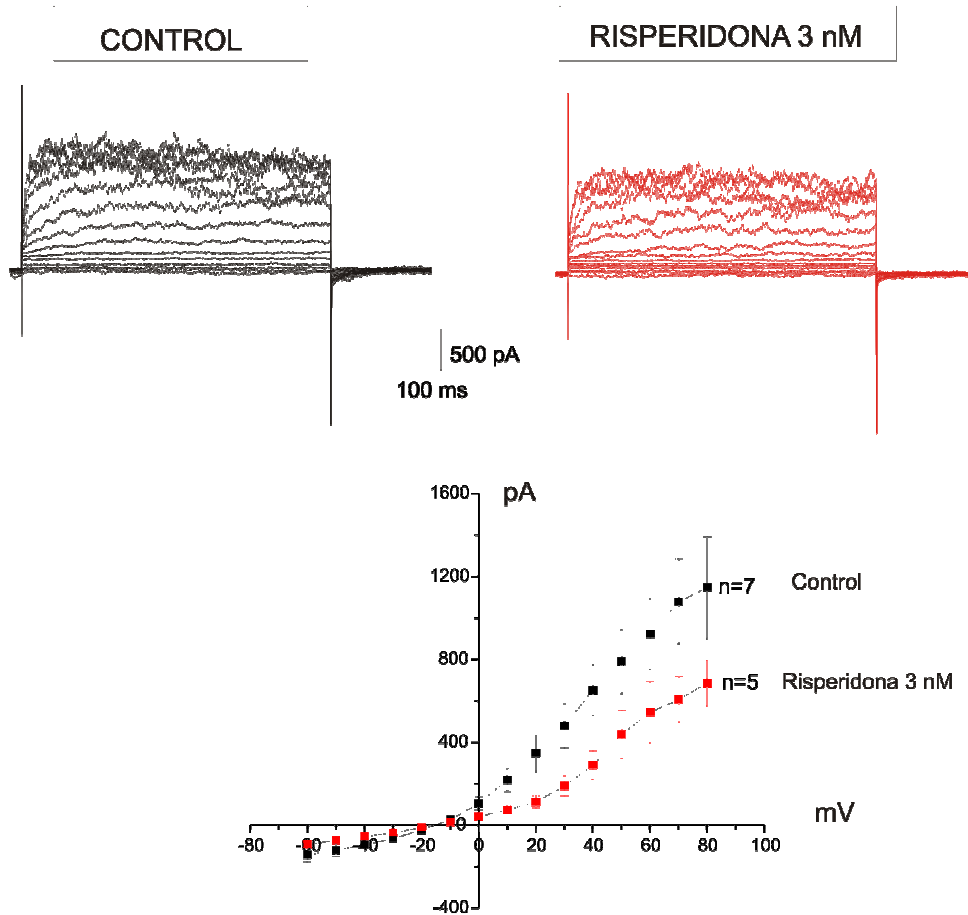


**Figura 26.** Registro típico en el que se observa el efecto de la risperidona 3nM sobre una contracción inducida por KRB-K40 en presencia de TEA 10 mM.

## 2.2 Efecto de la risperidona sobre las corrientes de potasio activadas por voltaje

Con el objetivo de aportar evidencia experimental directa que demuestre el efecto inhibitorio de risperidona sobre canales de  $K^+$ , se realizaron experimentos de patch-clamp donde se ensayó la risperidona 3 nM sobre las corrientes de  $K^+$  que previamente hemos caracterizado en las células aisladas de músculo liso vascular de la AUH (73).

En estos experimentos se evocaron las corrientes de  $K^+$  totales activadas por voltaje en células aisladas, expuestas a una solución despolarizante de alto  $K^+$  (40 mM). Se registraron las corrientes control en ausencia de la droga y luego tras el agregado de risperidona 3 nM, observándose un efecto inhibitorio significativo de la corriente a potenciales mayores de 0 mV. En la figura 27 se muestran estos resultados.



**Figura 27.** Registros típicos de corrientes de  $K^+$  en configuración de whole-cell (con 40 mM de  $K^+$  externo). Relación corriente-voltaje (I-V) promedio correspondiente a dichas corrientes.

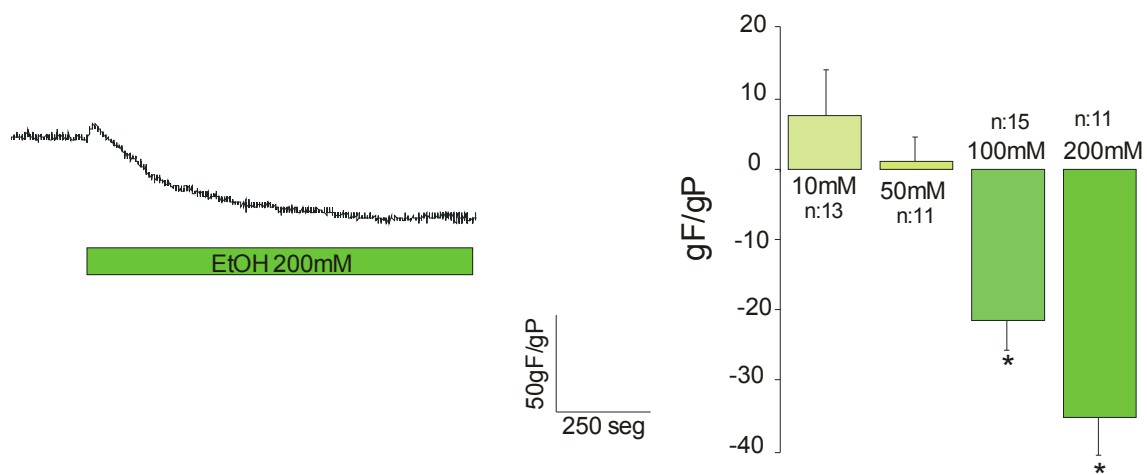
### 3. Etanol

#### 3.1 Efectos del etanol sobre las respuestas contráctiles de la AUH.

Los siguientes datos muestran los resultados obtenidos cuando se ensayó el etanol sobre los distintos tipos de respuestas contráctiles detalladas anteriormente.

##### 3.1.1 Tono basal

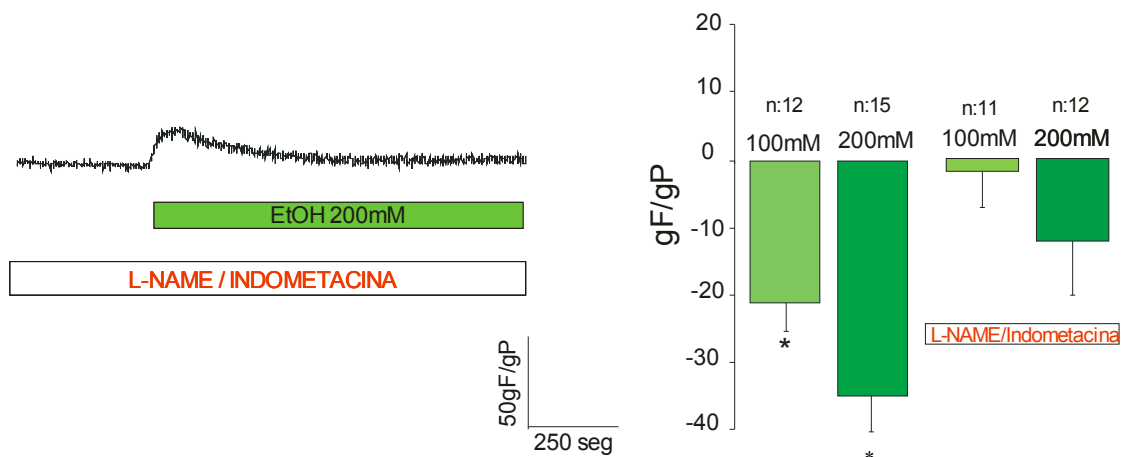
Se ensayó en distintos anillos vasculares el efecto agudo de diferentes concentraciones (10, 50, 100 y 200 mM) de etanol (EtOH). Las concentraciones menores de EtOH ensayadas no modificaron el tono basal y sí pudo observarse una respuesta bifásica significativa a concentraciones iguales o mayores a 100 mM, como se observa en la figura 28. Luego de un aumento inicial de fuerza, el EtOH a una concentración de 100 y 200 mM produjo un efecto vasorelajante estable, estadísticamente significativo.



**Figura 28:** Izq.: Registro típico en el que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo. Der: Valores promedio  $\pm$  ESM de la fuerza desarrollada luego del agregado del EtOH a distintas concentraciones sobre el tono basal. \* Estadísticamente distinto de cero,  $p < 0,05$ .

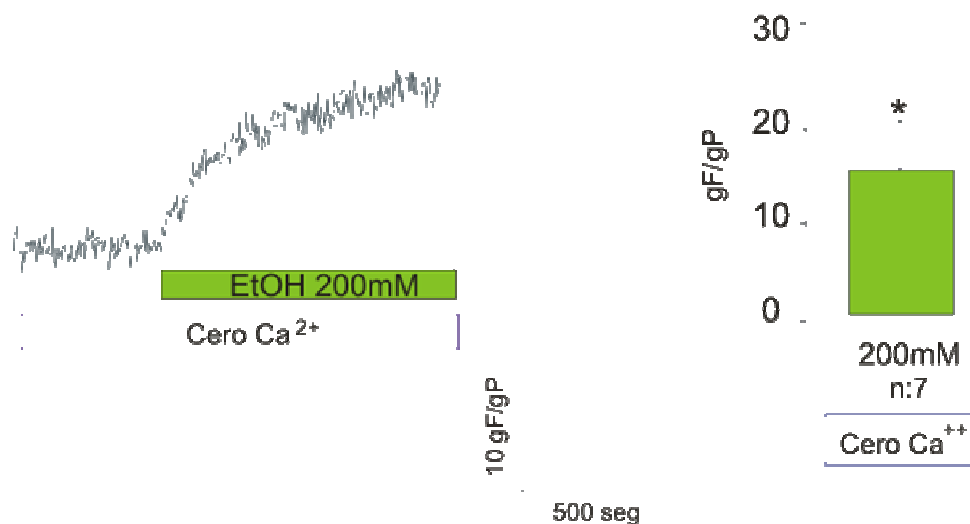
Con la finalidad de determinar si la liberación de factores endoteliales como la prostaciclina ( $PGI_2$ ) y el óxido nítrico (NO) estaban implicados en esta respuesta vasorelajante del EtOH, el ensayo fue también realizado en anillos preincubados durante 20 minutos con L-NAME e indometacina inhibidores de la síntesis de NO y

prostaglandinas, respectivamente. La figura 29 muestra un registro típico de esta respuesta donde se observa que el agregado de EtOH 200 mM al medio extracelular en presencia de L-NAME e indometacina, produce una primera respuesta contráctil transitoria con un valor medio de fuerza al pico de  $19,90 \pm 3,46$  n=8,  $p<0,05$ , la cual no se diferencia de la obtenida en las condiciones control (en ausencia de los inhibidores, dicha contracción alcanzó un valor medio de  $13,19 \pm 1,70$  n=28,  $p<0,05$ ). Sin embargo, el efecto vasodilatador del EtOH desaparece en presencia de L-NAME e indometacina. Este resultado sugiere que este efecto relajante dependería de la liberación de factores relajantes de liberación endotelial como son el NO y la PGI<sub>2</sub>.



**Figura 29.** Valores promedio  $\pm$  ESM de la fuerza desarrollada tras el agregado de EtOH (100 y 200 mM) sobre el tono basal en anillos preincubados con L-NAME e indometacina y sus controles. \* Estadísticamente distinto de cero,  $p<0,05$ .

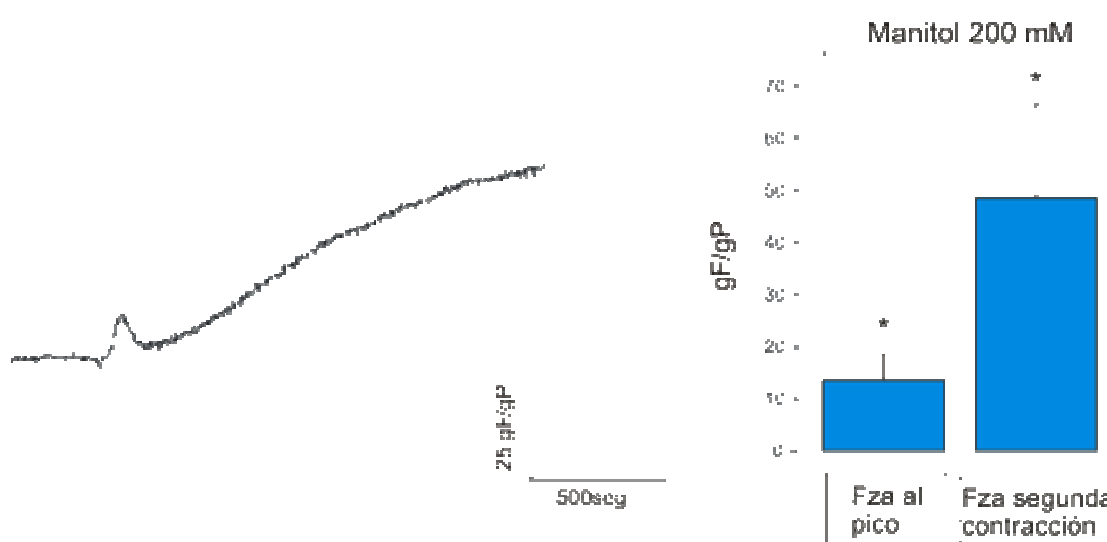
En cuanto a la contracción inicial indagamos, en primer lugar, su dependencia del Ca<sup>2+</sup> externo, para lo cual se ensayó el etanol sobre el tono basal de los segmentos arteriales incubados con una solución extracelular KRB sin calcio. Observamos que en estas condiciones el EtOH produce sólo una contracción que se mantiene en el tiempo con una amplitud media de  $16,45 \pm 6,38$  gF/gP, n=7,  $p<0,05$  (figura 30).



**Figura 30.** Registro típico en el que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo luego del agregado del EtOH 200 mM en ausencia de Ca<sup>2+</sup> en el medio extracelular. Valor promedio  $\pm$  ESM de la fuerza desarrollada, tras el agregado de EtOH sobre el tono basal en ausencia de Ca<sup>2+</sup> externo. \* Estadísticamente distinto de cero,  $p < 0,05$ .

Estos resultados indican que la contracción inicial es independiente del influjo de calcio y probablemente involucra al retículo sarcoplasmático como fuente de calcio para el desarrollo de la fuerza. La ausencia del efecto relajante del EtOH en estas condiciones nos permite postular que el calcio extracelular es necesario para la liberación de los factores endoteliales responsables de dicha respuesta como se describió en el párrafo anterior.

Para valorar si la respuesta contráctil evocada por el EtOH sobre el segmento arterial era debida a la hiperosmolaridad que presenta la solución extracelular luego del agregado del EtOH, se realizó un protocolo control agregando manitol 200 mM sobre el tono basal de anillos preincubados en soluciones libres de Ca<sup>2+</sup>. Esta sustancia indujo una primera contracción transitoria cuya fuerza al pico fue de magnitud similar a la obtenida con el EtOH ( $13,81 \pm 5,00$  gF/gP,  $n=10$ ,  $p < 0,05$ ), seguida de una segunda contracción mayor que se estabilizó en el tiempo en un valor promedio de  $48,76 \pm 18,53$ ,  $n=10$ ,  $p < 0,05$  (figura 31).



**Figura 31.** Registro típico en el que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo luego del agregado de manitol 200 mM al medio extracelular en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . Valores promedio  $\pm$  ESM de fuerza desarrollada tras el agregado de manitol sobre el tono basal (n=10). \* Estadísticamente distinto de cero,  $p < 0,05$ .

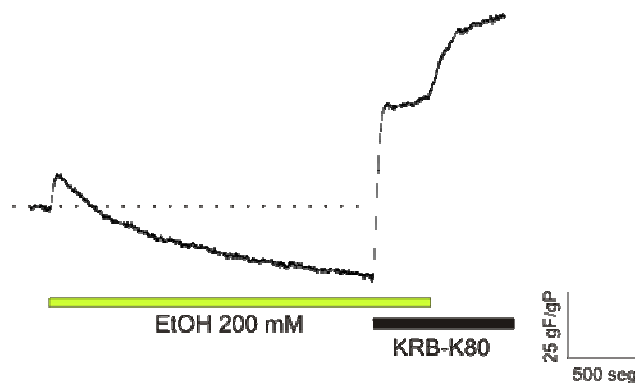
Este mismo protocolo se ensayó preincubando los anillos en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  (KRB), arrojando resultados similares (Fuerza al pico:  $13,00 \pm 3,7$  n=6 y la fuerza de la contracción estable:  $46,83 \pm 12,00$  n: 6).

El conjunto de estos resultados sugieren que la contracción inicial observada tras el agregado del etanol podría ser producida por liberación de calcio del retículo sarcoplasmático como respuesta al estímulo hiperosmolar de la solución extracelular. Por otro lado, el efecto relajante del etanol sería dependiente de la liberación de NO y/o  $\text{PGI}_2$  y del calcio externo e independiente del estímulo hiperosmolar, ya que dicho efecto no se observa en los experimentos donde se agrega manitol ni en aquellos donde se trabaja con una solución extracelular libre de calcio.

### 3.1.2 Soluciones despolarizantes de alto potasio

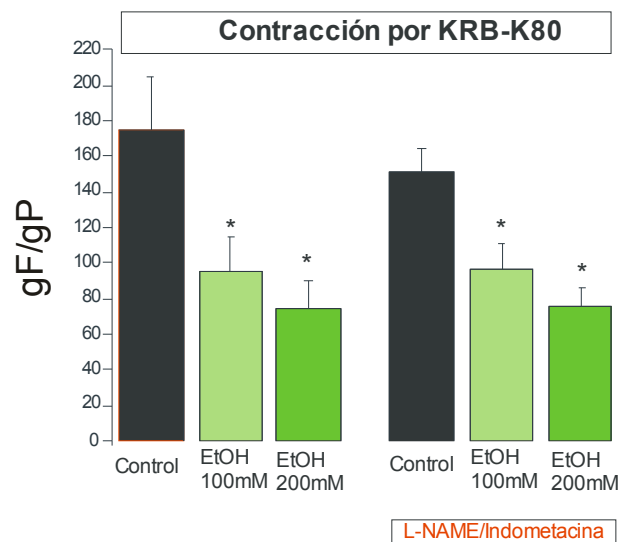
En las mismas condiciones experimentales descritas en la sección anterior (en presencia o ausencia de L-NAME e indometacina), una vez estabilizada la respuesta vasorelajante del etanol 100 o 200 mM sobre el tono basal, se agregó una solución despolarizante de KRB-K80, la cual indujo una contracción que aumenta cuando se lava

el EtOH, tal como se puede observar en un registro típico de fuerza que se presenta en la siguiente figura.



**Figura 32.** Registro típico en el que se observa el desarrollo de fuerza en función del tiempo tras el agregado de EtOH 200 mM y luego KRB-K80 al medio extracelular, con posterior lavado del EtOH.

A continuación se presentan los valores medios de fuerza evocados, en ambas condiciones, por la solución despolarizante de alto potasio (KRB-K80) en ausencia de EtOH (control) y en presencia de 100 y 200 mM de EtOH.

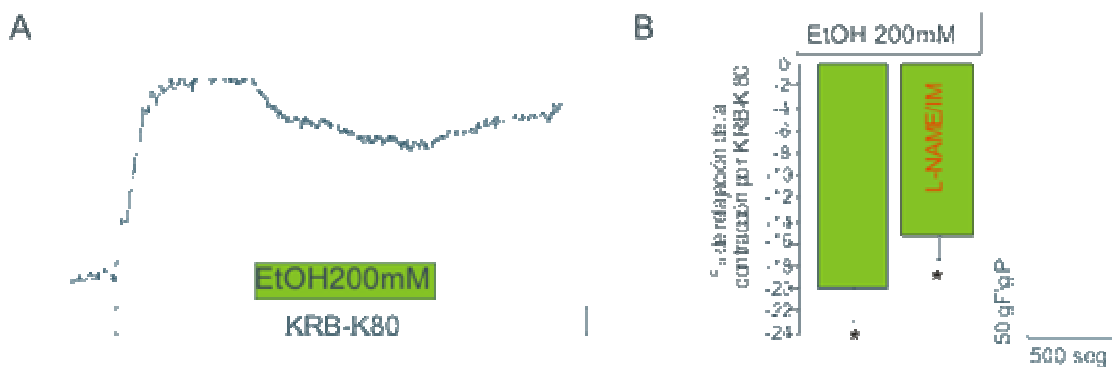


**Figura 33.** Valores promedio de la contracción producida por KRB-K80 con y sin preincubación con L-NAME e indometacina (n=10) en presencia de EtOH en el medio extracelular y sus controles. \*Estadísticamente diferente del control por ANOVA y posterior test de Tukey  $p < 0,05$ .

Estos resultados muestran que la contracción inducida por KRB-K80 no se modifica por la inhibición de la liberación de NO y PGI<sub>2</sub> (control: 175,30 ± 29,10 gF/gP y en presencia de L-NAME e indometacina: 150,91 ± 13,20 gF/gP, NS n=9). El EtOH produce un efecto inhibitorio de la fuerza desarrollada por la solución despolarizante, el cual se observa también en los anillos preincubados con L-NAME e indometacina, sugiriendo en este caso que el EtOH deprime la contracción evocada por una solución despolarizante de alto K<sup>+</sup> en forma independiente de la liberación de factores endoteliales vasorelajantes como el NO y/o la PGI<sub>2</sub>.

El efecto depresor observado es reversible ya que el lavado del etanol produce un aumento de la contracción por supresión del efecto inhibitorio que expresando su valor promedio en porcentaje de la contracción de KRB-K80 antes mencionada fue de 23,56 ± 9,28% para el lavado del EtOH 100 mM y de 71,71 ± 10,03% para el lavado del EtOH 200mM. En la figura 32 se puede observar el curso temporal de este efecto.

Luego, se ensayó el efecto del EtOH 200 mM sobre una contracción estable evocada por KRB-K80 en presencia o ausencia de L-NAME e indometacina. En ambos casos el EtOH produjo una relajación parcial de la respuesta inducida por la solución despolarizante de alto K<sup>+</sup> (control: 20,02 % ± 2,80 (n=6), en presencia de L-NAME e indometacina: 15,14 ± 2,17 % n=6, NS con respecto al control). El efecto relajante del EtOH sobre la contracción inducida por KRB-K80 fue parcialmente reversible tras el lavado del EtOH en ambas condiciones (control: 53,15 ± 12,66 %, en presencia de L-NAME e indometacina: 55,21 ± 18,90 %, n=6). Se presentan en la figura 34 los resultados de este grupo de experimentos.



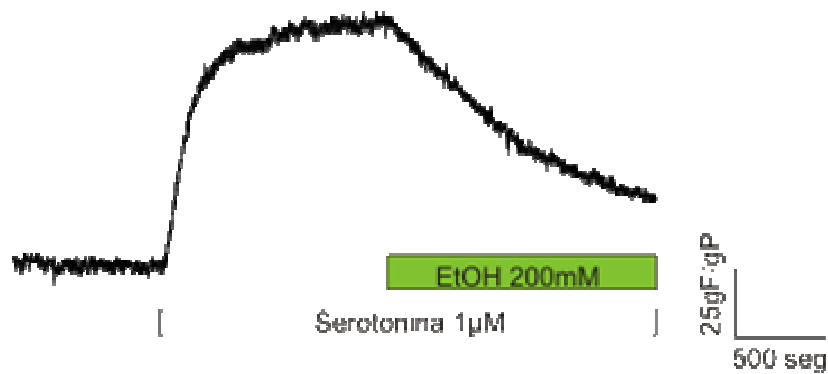


**Figura 34.** A: Registro típico en el que se observa el efecto relajante observado tras el agregado del EtOH 200 mM al medio extracelular sobre una contracción estable de KRB-K80, y su lavado. B: Valores promedio del efecto relajante mostrado en A, con y sin L-NAME e indometacina (n=6 en cada caso). \* Estadísticamente distinto de cero,  $p < 0,05$ .

Del análisis del conjunto de esta serie de resultados surge que el EtOH relaja el tono basal de los anillos arteriales en forma dependiente de la liberación NO y  $PGI_2$  y del calcio extracelular, mientras que la acción del mismo sobre anillos estimulados con soluciones despolarizantes resulta en una depresión de la contracción mediante un mecanismo independiente de dichos factores. La inhibición que produjo el EtOH sobre la contracción evocada por la solución despolarizante no podría explicarse mediante la activación de canales de  $K^+$  ya que este mecanismo está desfavorecido en estas condiciones por lo que el EtOH podría tener un efecto directo sobre el músculo liso arterial, siendo una posibilidad la inhibición de los canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje presentes en la membrana de la célula de músculo liso. Más adelante se presentan resultados electrofisiológicos a favor de esta hipótesis.

### 3.1.3 Serotonina

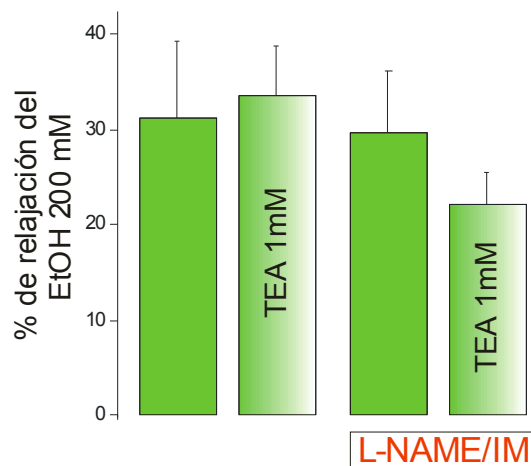
En primer lugar, se ensayó el efecto del EtOH 200 mM sobre una contracción estable de serotonina  $1\mu M$  en presencia o ausencia de L-NAME e indometacina (control:  $92,52 \pm 7,90$  gF/gP n=27, con L-NAME e indometacina:  $96,61$  gF/gP  $\pm 11,6$  n=23, NS). El agregado al medio extracelular de EtOH 200 mM produjo una relajación de la contracción del  $41,46 \pm 5,80$  % (n=27) en ausencia de L-NAME e indometacina y del  $29,74 \pm 4,8$  % (n=23), en presencia de dichos inhibidores (NS entre ambos grupos).



**Figura 35.** Registro típico de fuerza en función del tiempo luego del agregado de EtOH 200mM sobre la contracción estable de serotonina 1µM.

Estos resultados muestran que la contracción evocada por serotonina no está influenciada por la liberación de factores endoteliales como el NO y la PGI<sub>2</sub>, como ya ha sido reportada por otros autores, y que el EtOH relaja parcialmente la contracción inducida por serotonina de manera independiente de dichos factores.

Con la finalidad de dilucidar si el efecto relajante del EtOH 200 mM sobre la contracción de serotonina involucra la activación de canales de K<sup>+</sup>, se repitieron los protocolos anteriores en presencia y ausencia de tetraetilamonio (TEA) 1 mM, un inhibidor de dichos canales.



**Figura 36.** Valores promedio del efecto relajante de una contracción de serotonina inducido por el etanol 200 mM expresado como por ciento de la contracción para los distintos protocolos ensayados, (n=20 en cada caso).

Estos resultados muestran que el efecto relajante del EtOH sobre la contracción de serotonina es independiente de la activación de canales de  $K^+$  inhibibles por una concentración de TEA 1 mM.

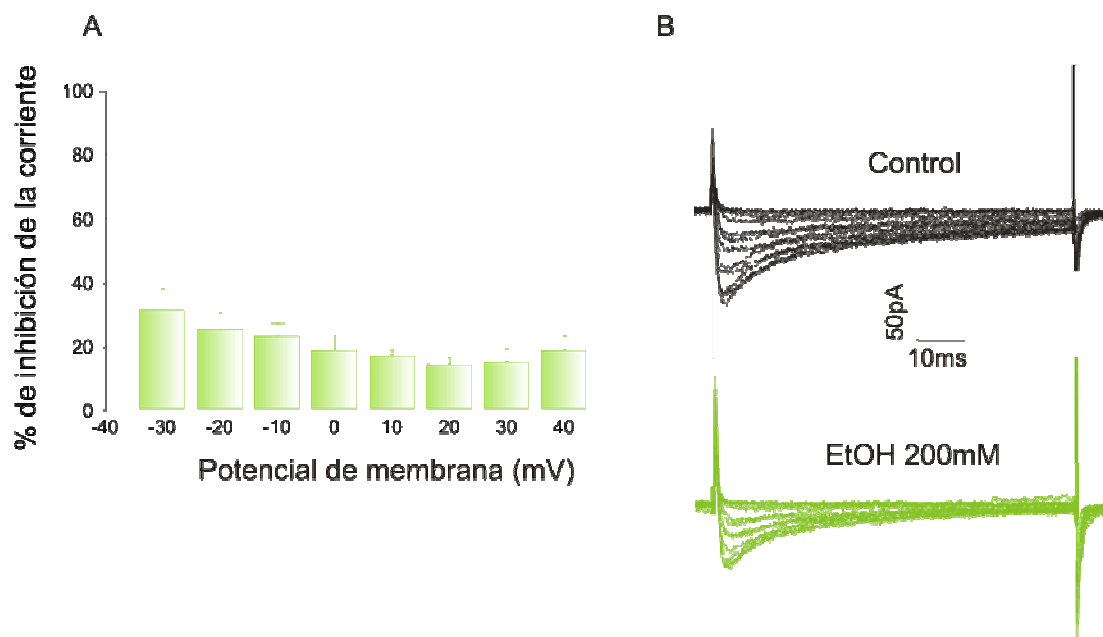
El análisis de los resultados del efecto del etanol sobre dos tipos de contracciones, una evocada por una solución despolarizante de alto  $K^+$  y otra por serotonina, nos permiten proponer a la inhibición de los canales de calcio como mecanismo de acción vasorelajante del EtOH en esta arteria. Profundizamos sobre esta hipótesis evaluando el efecto del etanol sobre la corriente de  $Ca^{2+}$  medida mediante la técnica de patch-clamp.

### **3.2 Efecto del etanol sobre las corrientes de $Ca^{2+}$**

Trabajando con células de músculo liso aisladas es posible registrar, con la técnica de patch-clamp, la corriente macroscópica selectiva al ion calcio que permea a través de la población entera de canales de calcio que presenta este tipo celular (ver metodología para mayor detalle). De esta manera es posible ensayar los efectos directos de una sustancia, en este caso el EtOH, sobre la actividad de dichos canales iónicos. Así, se puede comprobar si efectivamente el EtOH inhibe este tipo de canal iónico tal como sugieren los resultados obtenidos con protocolos de mecánica vascular.

En trabajos precedentes hemos caracterizado la corriente de calcio en la célula del músculo liso vascular de la arteria umbilical humana lo que nos ha permitido conocer las propiedades de la misma (73).

Para ensayar entonces, los efectos del etanol, se registraron las corrientes iónicas de  $Ca^{2+}$  evocadas por pulsos de voltaje en condiciones de control y luego del agregado de 200 mM de EtOH. En la siguiente figura se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 37.** (A) Valores promedio del % de inhibición de la amplitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  medida en su valor máximo, producida por el agregado de EtOH 200 mM al medio extracelular. (B) Corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  evocada por pulsos de voltaje desde -50 a +60 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. \* Estadísticamente distinto de cero,  $p < 0,05$ .

Estos resultados muestran que efectivamente el EtOH inhibe canales de calcio voltaje dependientes en este tipo celular, y corroboran la hipótesis de que la inhibición de las contracciones inducidas por soluciones despolarizantes de alto potasio (KRB-K80) y por serotonina estaría mediada, total o parcialmente, por el bloqueo de canales de calcio dependientes del voltaje.

### **2.3 Efecto de la exposición intrauterina al etanol. Evaluación de la salud de los neonatos al nacer y de las propiedades contráctiles de las arterias de sus cordones umbilicales.**

El consumo crónico y excesivo de etanol durante el embarazo se asocia con el desarrollo del Síndrome Alcohólico Fetal (FAS) (9, 10, 11). Sin embargo, en la literatura, existen pocos datos que hagan referencia a los efectos del bajo consumo de etanol durante el embarazo. Actualmente, se encuentra en consideración la influencia de la dosis, la edad gestacional en la que se produce la exposición y la sensibilidad de los distintos órganos o sistemas fetales afectados (74, 75, 76, 77).

Nuestro objetivo fue evaluar el efecto del bajo consumo de etanol durante el embarazo, sobre la salud de los neonatos al nacer y sobre las propiedades contráctiles de las arterias del cordón umbilical. Por este motivo las mujeres que reportaban un consumo moderado o elevado de etanol fueron excluidas del estudio. Por otro lado, y con la finalidad de evitar otros factores de confusión, también excluimos a aquellas madres que fumaron durante el embarazo, que consumieron drogas de abuso o por prescripción médica (por ejemplo drogas psicoactivas), que hayan presentado alguna enfermedad preexistente o de desencadenamiento durante el embarazo y aquellas mujeres que tenían historia familiar de malformaciones.

Fueron entrevistadas un total de 324 madres, de las cuales 121 fueron excluidas por presentar posibles variables de confusión (descriptas en el párrafo anterior). De las madres restantes, 21 fueron excluidas por exceder el límite superior del rango de consumo de etanol considerado como bajo consumo ya definido en la descripción de la metodología. Por este motivo trabajamos con 79 madres consumidoras de bajas cantidades de etanol (E) y tomamos como grupo control 100 madres que durante la entrevista declararon no haber consumido etanol durante el embarazo (NE).

A continuación se describen las cantidades de etanol consumidas por las madres del grupo E.

De acuerdo al criterio de exclusión utilizado, ninguna de las madres del grupo E consumió más de 700 ml de etanol por trimestre.

Los valores promedio de etanol consumido en cada trimestre se presentan en la siguiente tabla:

**Tabla 1**

	Grupo expuesto al etanol (E) N = 79	Grupo no expuesto al etanol (NE) N = 100
Número de madres que consumieron alcohol durante	1 <sup>er</sup> trimestre: 65 2 <sup>do</sup> trimestre: 29 3 <sup>er</sup> trimestre: 29	-
Cantidad de etanol consumido (ml) por cada madre en cada trimestre	1 <sup>er</sup> trimestre: 202 ± 24 2 <sup>do</sup> trimestre: 231 ± 40 3 <sup>er</sup> trimestre: 236 ± 41	-
Pareja masculina (si hay) que consumió etanol durante el embarazo	62% *	22%
Pareja masculina (si hay) que fumó durante el embarazo	32%	44%

\* Estadísticamente diferente del grupo no expuesto,  $p=0,0000$ ,  $OR=5,79$ ,  $CI= (3,00; 11,16)$ .

Cuando se compararon los parámetros poblacionales no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos NE y E. Respecto a la procedencia geográfica, edad, estado civil, nivel de educación, historia de abortos, control obstétrico durante el embarazo en curso, ganancia de peso durante el embarazo y sexo de los recién nacidos. La tabla 2 muestra los valores medios obtenidos.

**Tabla 2.** Datos de las madres obtenidos mediante un cuestionario realizado a las madres de ambos grupos.

	Grupo expuesto al etanol (E) N = 79	Grupo no expuesto al etanol (NE) N = 100
<b>Edad</b>	25,0 ± 0,7 años	26,9 ± 0,7 años
<b>Estado civil</b>	Casada: 12% En concubinato: 73% Soltera: 15%	Casada: 14% En concubinato: 74% Soltera: 10%
<b>Nivel educativo completo</b>	Primario: 80% Secundario: 29% Terciario: 3%	Primario: 83% Secundario: 34% Terciario: 3%
<b>Abortos previos</b>	32%	31%
<b>Controles obstétricos</b>	Suficientes: 62% Insuficientes: 28% Sin control: 10%	Suficientes: 70% Insuficientes: 18% Sin control: 12%
<b>Ganancia de peso durante el embarazo</b>	13,6 ± 0,5 kg	12,3 ± 0,6 kg

En ninguno de los dos grupos hubo muertes de los neonatos al nacer. Los nacimientos se realizaron en un 75% por vía vaginal y un 25% por cesárea en ambos grupos (E y NE).

Cuando se analizaron las características de los recién nacidos, se observó que no presentaban diferencias en parámetros tales como el peso, talla y perímetro cefálico (tabla 3). Sin embargo cuando se analizó al nacer, la presencia de malformaciones menores en los neonatos, se observó que en el grupo de nacidos de las madres del grupo E la presencia de al menos una malformación menor alcanzó un porcentaje del 66 % versus el 16 % en el grupo NE ( $p < 0,0000$ ). También se observó que un porcentaje significativamente mayor de neonatos del grupo E presentaban un índice Apgar < a 7 a los 5 min. En la siguiente tabla se resumen estos resultados.

**Tabla 3.** Características de los recién nacidos

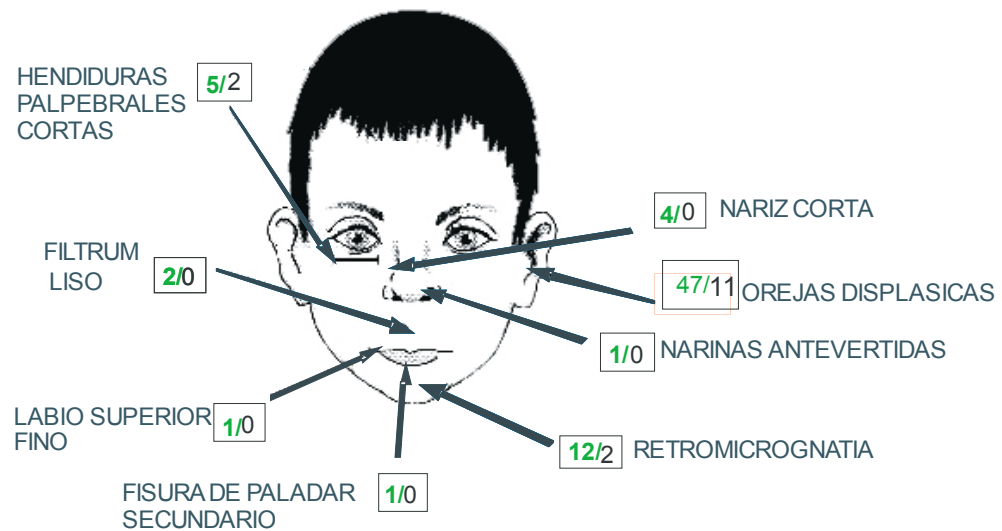
Recién nacido	Grupo expuesto al etanol (E) N = 79	Grupo no expuesto al etanol (NE) N = 100
Peso al nacer	3250 ± 57 g	3292 ± 63 g
Sexo del recién nacido	Masculino: 63% Femenino: 37%	Masculino: 51% Femenino: 49%
Longitud	48,9 ± 0,3 cm	49,3 ± 0,3 cm
Perímetro cefálico	34,4 ± 0,2 cm	34,1 ± 0,2 cm
Escala de Apgar < 7 a los 5 min	11 % *	2 %
Presencia de al menos una malformación menor	66 % **	16 %

\* Estadísticamente diferente del grupo no expuesto,  $p=0,0119$ , OR= 6,3, (IC: 1,32; 30,06).

\*\* Estadísticamente diferente del grupo no expuesto,  $p=0,0000$ , OR= 10,11, (IC: 4,98; 20,54).

Dentro de las malformaciones menores encontradas, las más frecuentes fueron las dismorfias faciales (ver figura 38) halladas mediante un minucioso análisis de las características morfométricas cráneo-faciales de los recién nacidos de ambos grupos. De estas, se observó un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de presentación de retromicrognatia, de nariz chata y de anomalías menores en la región auricular y preauricular como implantación baja de las orejas, hélix poco desarrollado, pits preauriculares y tragos accesorios.





**Figura 38.** Frecuencia de presentación de las dismorfias faciales observadas en neonatos pertenecientes al grupo de madres expuestas (verde) y en neonatos pertenecientes al grupo de madres no expuestas (negro).

**Tabla 4.** Dismorfias faciales menores halladas en los neonatos (\*).

Tipo de dismorfia facial	Grupo expuesto al etanol N = 79	Grupo no expuesto al etanol N = 100	p	OR ( IC)
Hendiduras palpebrales cortas	5	2	N.S.	
Filtrum liso	2	0	N.S.	
Labio superior fino	1	0	N.S.	
Paladar hendido	1	0	N.S.	
Retromicrognatia	12	2	0,0011	8,78 (1,90 ; 40,48)
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>11</b>	<b>0,0000</b>	<b>13,22 (5,98; 29,21)</b>
<b>Anomalías auriculares y preauriculares</b>				
Orejas inclinadas	6	0	0,0066	17,77 (0,99 ; 320,54)
Pabellón auricular grande	6	1	0,0450	8,14 (0,96 ; 69,06)
Orejas de implantación baja	10	3	0,0134	4,69 (1,24 ; 17,66)
Hoyuelos preauriculares	2	0	N.S.	

Helix poco desarrollado	11	5	0,0377	3,07 (1,02 ; 9,25)
Orejas asimétricas	9	1	0,0056	12,73 (1,58 ; 102,76)
Trago accesorio	3	1	N.S.	
Nariz chata	4	0	0,0363	11,98 (0,63 ; 225,9)

(\*) Algunos de los recién nacidos presentaron más de una anomalía.



**Figura 39.** Ejemplos típicos de asimetría auricular hallada en los neonatos. A, B ambos neonatos pertenecientes al grupo E.



**Figura 40.** Ejemplos típicos de las dismorfias halladas en los neonatos. (Izq.) Neonato con retromicrognatia, implantación baja de las orejas y helix poco desarrollado. (Der) Neonato con retromicrognatia. Ambos pertenecientes al grupo E.

En el grupo E, de un total de 79 neonatos, 27 no presentaron anomalías menores. Sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa en el cantidad de ml de etanol consumidos por las madres de este subgrupo con respecto al consumo de las madres del grupo E cuyos neonatos sí las presentaron (52/79). Se detallan los valores en la siguiente tabla.

**Tabla 5.** Valores promedio de la cantidad de etanol consumida por las madres pertenecientes al grupo expuesto (E) en relación a los hallazgos en los recién nacidos pertenecientes a este grupo

Cantidad de etanol consumida (en ml) por trimestre en madres cuyos neonatos presentaron:	1 <sup>er</sup> trimestre	2 <sup>do</sup> trimestre	3 <sup>er</sup> trimester
Ninguna anomalía N = 27	200 ± 40 N = 22	265 ± 69 N = 12	233 ± 66 N = 11
Alguna anomalía N = 52	207 ± 30 N = 42	207 ± 49 N = 17	237 ± 54 N = 18

Se analizó también en el grupo E la aparición de anomalías en función del trimestre en el cual fue consumido el etanol. En un subgrupo de madres (n=36) que consumieron etanol sólo en el primer trimestre, (época de fundamental importancia en el desarrollo

embrionario) pero no lo hicieron durante el resto del embarazo, el 75% de los neonatos presentó al menos una malformación menor ( $p=0,0000$ ,  $OR=15,75$ ,  $IC: 6,25-39,70$ ), siendo la retromicrognatia ( $n=6$ ) y las anomalías preauriculares y auriculares ( $n=31$ ) los hallazgos más frecuentes. Por otro lado, estos neonatos presentaron un porcentaje significativamente mayor de bajo índice de APGAR al nacer (19%) comparado con el grupo NE ( $p=0,001$ ,  $OR=11,83$ ,  $IC: 2,33-60,08$ ). Estos parámetros obtenidos de este subgrupo, sin embargo, no difirieron estadísticamente de los obtenidos del grupo E total.

El análisis de los recién nacidos de madres que no consumieron etanol durante el primer trimestre pero sí lo hicieron durante el segundo o tercer trimestre no pudo ser realizado por el bajo número de casos ( $n=8$ ) en esta categoría.

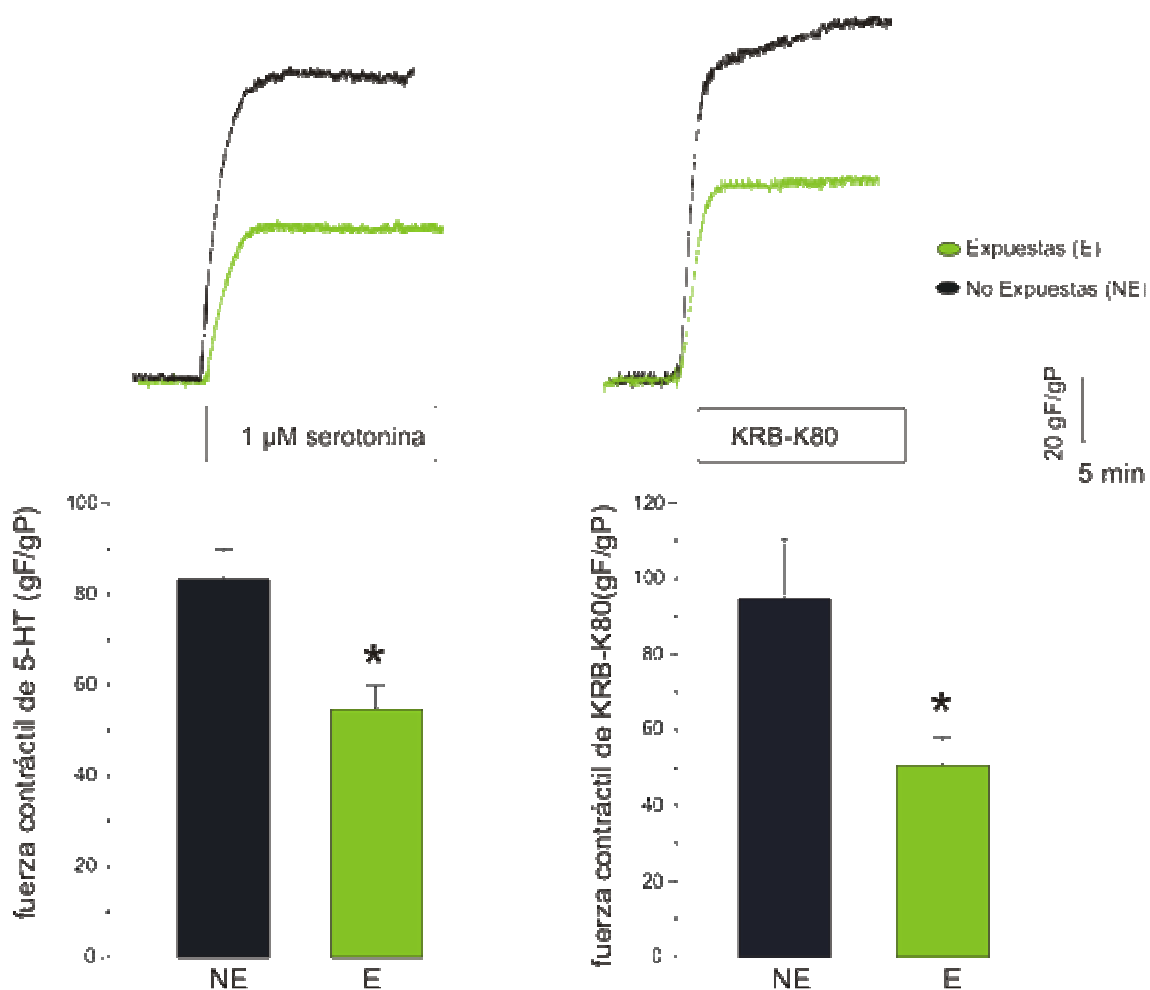
A continuación presentamos los resultados del estudio de la contractilidad de la arteria umbilical obtenida de los cordones de los neonatos de ambos grupos E y NE.

#### **Registros de fuerza isométrica en anillos de AUH.**

Se analizó "in vitro" la reactividad de la arteria de los cordones de los neonatos pertenecientes a los grupos E y NE. Con la finalidad de tener una muestra homogénea, se analizaron sólo las AUH provenientes de nacimientos por parto vaginal. A continuación se detallan los protocolos realizados y los resultados obtenidos en ambos grupos experimentales (E y NE).

Se obtuvieron anillos vasculares de AUH de cada grupo los cuales se estimularon con  $1\mu M$  de serotonina, o con una solución despolarizante de alto potasio KRB-K80, dos agonistas vasoactivos que poseen diferente mecanismo de acción en el desarrollo de la contracción del tejido vascular. Para ambos agonistas se midió la amplitud de la contracción evocada.

Los resultados mostraron que las contracciones de las arterias del grupo E eran significativamente menores que las del grupo NE para ambos agonistas contráctiles. En la figura 41 se muestran ejemplos típicos de dichas respuestas y en las barras los valores medios obtenidos.



**Figura 41.** Registros típicos en los que se observa el desarrollo de fuerza de los anillos vasculares en función del tiempo. Valores promedio de fuerza para los distintos protocolos (5-HT: grupo NE, n= 41 y grupo E, n=20 y KRB-K80: grupo NE, n=31 y grupo E, n=26). \* Estadísticamente diferente del grupo NE ( $p < 0,05$ ).

Evaluamos si la disminución observada en las respuestas contráctiles de los anillos vasculares del grupo E estaba mediada totalmente o en parte por la liberación de factores endoteliales vasorelajantes como el NO y la  $PGE_2$ . Realizamos los mismos protocolos experimentales detallados anteriormente pero en presencia de L-NAME 0,1 mM e indometacina 10 μM, inhibidores de la liberación de NO y prostaciclina respectivamente. Esta inhibición no modificó los resultados anteriores ya que los anillos de arteria pertenecientes al grupo E continuaron presentando un desarrollo de fuerza menor que el grupo NE cuando se los estimuló con serotonina (grupo E:  $67,7 \text{ gP} \pm 8,5 \text{ gF/}$ , n=29; versus NE:  $97,2 \pm 8,2 \text{ gF/gP}$ , n=39;  $p < 0,005$ ) y con una solución KBB-K80 (grupo E:  $78,4 \pm 7,1 \text{ gF/gP}$ , N=30; versus grupo NE:  $123,6 \pm 9,4 \text{ gF/gP}$ , n=33;  $p <$

0,05). Estos resultados sugieren que en la disminución de la respuesta contráctil de los anillos del grupo E no participarían factores de liberación endotelial como el NO y la PGI<sub>2</sub>.

El análisis de estos experimentos “in vitro” nos permite sugerir en primer lugar que hay una asociación entre el consumo de EtOH materno y una disminución en la reactividad de la arteria umbilical y que este efecto es independiente de la liberación de NO y PGE<sub>2</sub>.

Resultados similares fueron descritos por Turcotte et al. (78). En un estudio realizado en ratas, encontraron que las aortas de ratas nacidas de madres expuestas al EtOH durante la preñez presentaban menor respuesta a la norepinefrina y al KRB-K80. También observaron una menor vasorelajación producida por un análogo de la acetilcolina.

### **Estudio histológico**

Realizamos una evaluación histológica de muestras de arteria umbilical de ambos grupos E y NE.

Con el objetivo de analizar si la menor respuesta contráctil estaba asociada a cambios histológicos en la estructura del vaso se realizó la evaluación microscópica de segmentos de arteria umbilical de ambos grupos experimentales (E y NE) mediante tinción con hematoxilina y eosina. Los resultados no mostraron diferencias histológicas significativas entre ambos grupos.

# *Conclusiones*

## **RISPERIDONA**

La evaluación del efecto de la risperidona sobre las propiedades contráctiles de la arteria umbilical humana realizada en este trabajo, nos ha permitido arribar a las siguientes conclusiones finales.

La risperidona, no produce ningún efecto sobre el tono basal cuando la misma es aplicada sobre la arteria en condiciones basales. Sin embargo, la risperidona en concentraciones terapéuticas, mostró un importante efecto vasorelajante cuando la arteria se encuentra precontraída con agonistas como la serotonina o la histamina. Las curvas dosis-respuesta correspondientes a cada agonista sugieren que en ambos casos la risperidona ejerce su acción inhibitoria mediante un mecanismo de acción no competitivo sobre el receptor. Queda por elucidar cuál es el punto de la cascada de señalización del receptor en el cual podría estar actuando la risperidona.

Por otro lado, hemos observado que la risperidona produce un efecto contráctil cuando las células de músculo liso se hallan parcialmente despolarizadas. Los resultados obtenidos con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción de este efecto nos permiten concluir que el mismo involucra la inhibición de canales de  $K^+$  sensibles al voltaje.

Es importante destacar en estas conclusiones finales que ha sido reportado que las mujeres con esquizofrenia presentan un mayor riesgo de presentar dificultades obstétricas entre las que se destacan los partos de pretérmino, neonatos con bajo peso al nacer, con retardo del crecimiento intrauterino, mortinatos y abortos (79, 80, 81). Sin embargo, la escasa bibliografía no permite aseverar hasta la fecha si esto se debe a la enfermedad en sí misma, o a los efectos de la medicación antipsicótica utilizada durante la gestación. Los datos que aporta este trabajo contribuyen al avance en el conocimiento de este problema ya que, como hemos descrito, la risperidona atraviesa la barrera fetoplacentaria y de esta manera, actuando sobre sitios específicos, podría modificar, entre otros factores, el estado contráctil de la arteria umbilical e interferir en la regulación del flujo fetoplacentario.



## **ETANOL**

El etanol, otra de las sustancias psicoactivas utilizadas en el desarrollo de este trabajo, también mostró efectos significativos sobre las propiedades contráctiles de la arteria umbilical humana. A continuación presentamos las conclusiones finales del estudio.

El etanol modifica el tono basal de los anillos vasculares. Se observó una respuesta bifásica caracterizada por una primera contracción transitoria que se debería a el estímulo osmótico que produce el agregado de EtOH y dependiente de la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, seguida de una relajación sostenida dependiente de la liberación de NO y/o PGI<sub>2</sub> y del calcio externo. Esta última respuesta es independiente del estímulo hiperosmolar.

Sobre contracciones del anillo vascular inducidas por un agonista como la serotonina el etanol produce un efecto relajante independiente de la liberación de NO y PGI<sub>2</sub> por el endotelio y de la activación de canales de K<sup>+</sup> inhibibles con TEA 1 mM. Asimismo, disminuye el desarrollo de fuerza producido por una solución despolarizante de alto potasio en forma independiente de la liberación de NO y PGI<sub>2</sub>.

En las células aisladas de músculo liso de la arteria umbilical humana demostramos mediante la técnica de patch-clamp que el etanol produce un efecto inhibitorio parcial de los canales de Ca<sup>2+</sup> sensibles al voltaje, presentes en la membrana celular.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la inhibición de los canales de calcio podría ser uno de los mecanismos involucrados en la acción vasorelajante que el etanol produce sobre la arteria del cordón umbilical humano.

### **Exposición intrauterina al etanol**

Uno de los hallazgos más importantes que surgen de este trabajo son los potenciales efectos nocivos del consumo materno de bajas concentraciones de etanol durante el embarazo. Observamos que el 66% de los neonatos nacidos de las madres del grupo que consumieron bajas cantidades de etanol durante algún período de la gestación presentó al menos una malformación menor comparado con la aparición de anomalías sólo en el 16% de los neonatos del grupo control. La microrretrognatia y las alteraciones auriculares y preauriculares fueron los hallazgos más frecuentemente observados. Esto se correlaciona con el hecho de que en el Síndrome Alcohólico Fetal las malformaciones craneales y faciales son las más frecuentes (11).

Este hallazgo probablemente se encuentre enmarcado dentro de lo que actualmente se denomina Espectro Alcohólico Fetal el cual se asocia con un bajo consumo de etanol. Sin embargo, poco se conoce sobre cuánto debe ser la cantidad de etanol ingerida por la madre para que se manifiesten los efectos dañinos sobre el embrión, y además ésta cantidad podría ser variable en los distintos individuos. En este estudio se observó que en el grupo E, la dosis media de etanol ingerida por las madres cuyos neonatos no presentaron anomalías (un 34%) no fue significativamente menor que la de las madres cuyos neonatos sí las presentaron. Este trabajo no tiene la aspiración de especular detalladamente sobre las causas de este hallazgo, pero reportes en la literatura mencionan que los efectos de la exposición intrauterina al etanol podrían estar vinculados a diversos factores entre los que se destacan los antecedentes genéticos (82) entre otros.

Estudios realizados en primates y en otras especies, mostraron que las alteraciones craneofaciales asociadas al FAS podrían resultar de una exposición crónica al etanol en un estadio temprano de la embriogénesis (12). Este es el período en el que las mujeres pueden desconocer el estar embarazadas y por lo tanto no han considerado el cambio de hábitos. En nuestro estudio observamos que de las madres que declararon haber bebido sólo durante el primer trimestre del embarazo, el 75% de los neonatos presentaron al menos una anomalía.

Es de importancia destacar al respecto que además de la asociación encontrada entre el consumo de etanol y la aparición de dismorfias faciales, el etanol puede afectar el desarrollo de estructuras neuronales, en particular cerebro y sistema ocular (83,84). Así, este daño neuronal podría estar presente incluso en aquellos casos en los cuales la apariencia craneofacial es considerada normal (12). Por consiguiente, estudios como el nuestro podrían ser complementados con otros en los que los niños expuestos in utero al etanol y que no presentan anomalías craneofaciales sean evaluados con la finalidad de explorar un posible daño cerebral manifestado como dificultades cognitivas o del desarrollo (85, 86, 87), si bien estos estudios podrían estar sesgados por otros factores de suma importancia en el desarrollo cognitivo del niño, tales como el estímulo familiar, entorno social o síntomas psicopatológicos asociados, entre otros.

Por otro lado, una disminución de la vitalidad al nacer, evidenciada por una baja puntuación de APGAR de los neonatos (87) es otro parámetro que hemos hallado

asociado al consumo de etanol materno, como se describió en los resultados de este trabajo.

Es de destacar que también se ha demostrado que la exposición intrauterina al etanol puede producir daños en el sistema cardiovascular fetal (88,89). Nosotros evaluamos la arteria del cordón umbilical humano ya que es un tejido vascular de origen fetal, de fácil obtención y fundamental en la regulación del flujo fetoplacentario.

El estudio histológico de las arterias umbilicales sometidas a la tinción con hematoxilina y eosina no reveló diferencias entre las muestras provenientes de los grupos E y NE. Sin embargo, encontramos que las arterias umbilicales provenientes del grupo E presentaron una menor respuesta contráctil cuando se las estimuló con una solución despolarizante de alto potasio y con serotonina. Alteraciones en la liberación de NO y PGI<sub>2</sub> no parecerían estar involucrados en este efecto ya que la inhibición de su liberación no modificó las respuestas.

Nuestro estudio, realizado en modelos de tejido humano, mostró resultados análogos a los hallados en modelos animales (76). Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de que la exposición intrauterina al etanol podría tener un efecto dañino sobre las células de la arteria umbilical humana.

Finalmente, es importante remarcar que ninguna de las madres incluidas en este estudio podrían ser llamadas alcohólicas ya que el consumo estuvo en un rango de 200-250 ml/trimestre, lo que en la literatura es considerado como un bajo consumo, y es socialmente aceptado y considerado de bajo riesgo (8,84). Sin embargo, pensamos que estudios como el nuestro y otros (78) cuyos resultados son semejantes, contribuyen a establecer criterios y normas de salud que alerten a las mujeres gestantes de los potenciales peligros de la ingesta de etanol durante el embarazo, especialmente en los primeros estadios. Consideramos importante remarcar que la ingesta de etanol durante el embarazo es una causa de daño fetal evitable cuyas consecuencias podrían acompañar al neonato de por vida.

# *Bibliografía*

1. Escotado A, en Escotado A, "Historia general de las drogas". Editorial Alianza, 1995.
2. Nietzsche F en Nietzsche, "El nacimiento de la tragedia", Editorial Biblioteca nueva, 2007.
3. Suarez Richards. Cap. 11 en Suarez Richards, "Introducción a la psiquiatría". Editorial Salerno, 2000.
4. Larry W, Duck-Hee, David Coombs. Fetal alcohol syndrome: a growing concern for health care professionals. JOGNN 32:215-221, 2003.
5. Schaffer C, Arizaga V, Haseitel B. Alcoholismo en la adolescencia. Revista de posgrado de la VI Cátedra de Medicina 139: 24-28,2007.
6. Hobbs William, Rall Theodore, Verdoorn Todd. Cap 17 en Goodman y Gilman, "Las bases farmacológicas de la terapéutica", Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 1996.
7. Bennington. "Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico", Editorial Panamericana, 1991.
8. Erskine RL, Retchie JW. The effect of maternal consumption of alcohol on human umbilical artery blood flow. Am J Obstet Gynecol 154:318-321, 1986.
9. Jones KL, Smith DW 1973 Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. Lancet 2(7836):999-1001.
10. Abel EL, Sokol RJ. Fetal alcohol syndrome is now leading cause of mental retardation. Lancet 2(8517):1222, 1986.
11. Eustace LW, Kang DH, Coombs D. Fetal Alcohol Syndrome: A Growing Concern for Health Care Professionals. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs 32:215-221, 2003.
12. Sulik KK. Genesis of Alcohol-Induced Craniofacial Dysmorphism. Exp Biol Med 230:366-375, 2005.
13. Stratton K, Howe C, Battaglia F. Fetal alcohol syndrome: diagnosis, epidemiology, prevention, and treatment. National Academy Press, Washington, DC, USA. pp 82-89, 1996.
14. Hoyme HE, May PA, Kalberg WO, Kodituwakku P, Gossage JP, Trujillo PM, Buckley DG, Miller JH, Aragon AS, Khaole N, Viljoen DL, Jones KL, Robinson LK. A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 institute of medicine criteria. Pediatrics 115:39-47, 2005.
15. Deitrich R, Dunwiddie T, Harris A, Erwin G. Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. Pharmacological Reviews. 41. 489-537, 1989.

16. Hellevuo K, Khanmaa K, Juhakoski A, Kim C. Intoxicating effects of lorazepam and barbital in rat lines selected for differential sensitivity to ethanol. *Psychopharmacology* 91:263-267, 1987.
17. Gallaher E, Gionet S. Initial sensitivity and tolerance to ethanol in mice genetically selected for diazepam sensitivity. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 12: 77-80, 1988.
18. Weisner J., and Ruth J. NMDA receptors are involved in the acute response to ethanol in LS and SS mice. *Soc. Neurosci. Abstr* 14: 942, 1988.
19. Garrabé J., Cap. 1 en Garrabé J., "La noche oscura del ser". Editorial Fondo de cultura, 1996.
20. Baledessarini R. Cap 18 en Goodman y Gilman, "Las bases farmacológicas de la terapéutica", Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, 1996.
21. Jufre Gabriela. Cap 3 en Jufe, "Neuropsicofarmacología clínica", Edit. Colección de farmacología, Bs. As., 1997.
22. Moizeszowicz J. Cap 3 en Moizeszowicz, "Psicofarmacología psicodinámica", Edit. Paidos, 2000.
23. Häfner H, Riecher A, Maurer K, Löffler W, Munk-Jørgensen P, Strömberg E. How does gender influence age at first hospitalization for schizophrenia? A transnational case register study. *Psychol Med.* 19(4):903-18; 1989.
24. The Physician's Desk Reference. Edición 59. Montvale NJ, Editorial Thompson PDR, 2005.
25. McKenna K, Koren G, Tetelbaum M, Wilton L, Shakir S, Diav-Citrin O, Levinson A, Zipursky RB, Einarson A. Pregnancy outcome of women using atypical antipsychotic drugs: a prospective comparative study. *J Clin Psychiatry* 66(4):444-9, 2005
26. Spivak M. The anatomic peculiarities of the human umbilical cord and their clinical significance. *Am J Obstet Gynecol* 52:387-401, 1946.
27. Frederick, Raymond. Cap 6 en Frederick R Anatomy, "Placental pathology", 2004.
28. Todros T, Adamson S, Guiot C, Bankowski E, Raio L, Di Naro E, Schneider H. Umbilical cord and fetal grew-aworkshop report. *Placenta* 16:130-132, 2002.
29. Grassi de Gende, AO. Cap 29 en Cingolani HE, Houssay AB, "Fisiología Humana", Editorial El Ateneo, 2000.
30. Hib J. Cap 9 en Hib J, "Embriología Médica", Editorial Interamericana- Mc Graw Hill, 1994.
31. Moore K, Persaud T. Cap 7 en Moore K, Persaud T, "Embriología clínica", Editorial Mc Graw Hill-Interamericana 1999.
32. Brien JF, Loomis CW, Tranmer J, McGrath M. Disposition of ethanol in human maternal venous blood and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 15; 146(2):181-6, 1983.

33. Newport DJ, Calamaras MR, DeVane CL, Donovan J, Beach AJ, Winn S, Knight BT, Gibson BB, Viguera AC, Owens MJ, Nemeroff CB, Stowe ZN. Atypical antipsychotic administration during late pregnancy: placental passage and obstetrical outcomes. *Am J Psychiatry* 164(8):1214-20, 2007.
34. Bacchi Madena A, Fieni S. Amniotic fluid dynamics. *Acta Bio Medica Ateneo Parmense* 75(1):11-13, 2004.
35. Sexton AJ, Turmarine M, Cai W, Burnstock G. A study of the ultrastructure of developing human umbilical vessels. *J Anat* 188: 75-85, 1996.
36. Watras J. Cap 12 en Berne RM, Levy MN, Knoepfen BM, Stanton BA, "Physiology", Editorial Mosby, 2004.
37. Somlyo AP, Somlyo AV. "Smooth muscle structure and function.", en Fozard HA, "The heart and cardiovascular System", Ed. Raven Press, 1986.
38. Lehman W, Criag R, Vibert P, Bárány M. Cap 4 en Bárány M "Biochemistry of smooth muscle contraction", Editorial Academic Press, 1996.
39. Allen BG, Walsh MP. The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem Sci* 19:362-368, 1994.
40. Stull JT, Gallagher PJ, Herring BP, Kamm KE. Vascular smooth muscle contractile elements. Cellular regulation. *Hypertension* 17:723-732, 1991.
41. Jiang H, Stephens NL. Calcium and smooth muscle contraction. *Mol Cell Biochem* 135:1-9, 1994.
42. Kanoh S, Ito M, Niwa E, Kawano Y, Hartshorne DJ. Actin-binding peptide from smooth muscle myosin light chain kinase. *Biochemistry* 32:8902-8907, 1993.
43. Lin P, Luby-Phelps K, Stull JT. Properties of filament-bound myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 274:5987-5994, 1999.
44. Smith L, Su X, Lin P, Zhi G, Stull JT. Identification of a novel actin binding motif in smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 274:29433-29438, 1999.
45. Apkon M. Cap 9 en Boron W, Boulpaep E. "Medical Physiology", Editorial Saunders, 2003.
46. Berne R, Levy M. Cap 5 en Berne R, Levy. "Physiology", Editorial Mosby, 1993.
47. Ferreira-de-Almeida JA, Pereira-Leite L, Cavallotti C, Ricci A, Amenta F. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine D1 receptors in the human umbilical artery. *Eur J Pharmacol* 234(2-3):209-14, 1993.
48. Yamamoto K, Shirai T, Katoh S, Yasuda A, Kitao M. Plasma levels of dihydroxyphenylalanine, dopamine and norepinephrine in the fetoplacental unit and maternal circulation at delivery. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 40(12):1894-8, 1998.

49. Lovren F, Li XF, Lytton J, Triggle Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. *Br J Pharmacol.* 127(5):1247-55, 1999.
50. Tayebati SK, Giannella M, Indraccolo SR, Pigini M, Sabbatini M, Zaccheo D, Amenta F. Muscarinic cholinergic receptors and acetylcholinesterase activity in umbilical artery and vein in pregnancy-induced hypertension (pre-eclampsia). *Clin Exp Hypertens.* 19(8):1205-17, 1997.
51. Yoshikawa F, Chiba S. Pharmacological analysis of vasoconstrictor responses of isolated and perfused human umbilical arteries. *Heart Vessels* 6 (4):197-202, 1991.
52. Clyman RI, Sandler JA, Manganiello VC, Vaughan M. Guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate content of human umbilical artery. *J Clin Invest* 55(5):1020-5, 1975.
53. Bertrand C, St-Louis J. Reactivities to serotonin and histamine in umbilical and placental vessels during the third trimester after normotensive pregnancies and pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 180(3 Pt 1):650-9, 1999.
54. Bodelsson G, Stjernquist M. Characterization of contractile adrenoceptors in the human umbilical artery. *Eur J Pharmacol.* 25; 282(1-3):95-101,1995.
55. Reilly FD, Russel PT. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *Anat Rec.*188,277-86, 1977.
56. Yoshika S, et al. Altered sensitivity to a novel vasoconstrictor endothelin -1 (1-31) in myometrium and umbilical artery of whoman whith severe preeclampsia. *Biomedical and biophysical research communications* 286: 964-967, 2001.
57. Haynes WG, Webb DJ. Endothelium-dependent modulation of responses to endothelin-I in human veins. *Clin Sci (Lond)* 84:427-433, 1993.
58. Pearson PJ, Vanhoutte PM. Vasodilator and vasoconstrictor substances produced by the endothelium. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 122:1-67, 1993.
59. Fleming I, Gray GA, Stoclet JC. Influence of endothelium on induction of the L-arginine-nitric oxide pathway in rat aortas. *Am J Physiol* 264:H1200-1207, 1993.
60. Paya D, Maupoil V, Schott C, Rochette L, Stoclet JC. Temporal relationships between levels of circulating NO derivatives, vascular NO production and hyporeactivity to noradrenaline induced by endotoxin in rats. *Cardiovasc Res* 30:952-959, 1995.
61. Lee MR, Li L, Kitazawa T. Cyclic GMP causes Ca<sup>2+</sup> desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J Biol Chem* 272:5063-5068, 1997.



62. Brophy CM, Whitney EG, Lamb S, Beall A. Cellular mechanisms of cyclic nucleotide-induced vasorelaxation. *J Vasc Surg* 25:390-397, 1997.
63. Klockenbusch W, Braun MS, Schroder H, Heckenberger RE, Strobach H, Schror K. Prostacyclin rather than nitric oxide lowers human umbilical artery tone in vitro. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 47:109-115, 1992.
64. Hamill O, Marty A, Neher E. Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Plungers Archiv European Journal of Physiology* 391 (2): 85-100, 1981.
65. Raingo J, Rebolledo A, Iveli MF, Grassi de Gende AO, Milesi V. Non-selective cationic channels (NSCC) in smooth muscle cells from human umbilical arteries. *Placenta* 25: 723-729, 2004.
66. Rebolledo A, Speroni F, Raingo J, Salemme S, Tanzi F, Munin V, Añon C, Milesi V. The  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -activated  $\text{K}^+$  channels ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) in human internal mammary artery smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339: 840-845, 2006.
67. Izumi H, Garfield RE, Makino Y, Shirakawa K, Itoh T. Gestational changes in endothelium-dependent vasorelaxation in human umbilical artery. *Am J Obstet Gynecol.* 170( 1 pt 1) :236-45, 1994.
68. Izumi H, Makino Y, Shirakawa K, Garfield RE. Role of nitric oxide on vasorelaxation in human umbilical artery. *Am J Obstet Gynecol.* 172 (5): 1477-84,1995.
69. Grant S, Fitton A. Risperidone. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the treatment of schizophrenia. *Drugs.* Aug; 48(2):253-73, 1994.
70. Christ T., Wettwer E., Ravens U. Risperidone-induced action potential prolongation is attenuated by increase repolarization reserve due to concomitant block of  $\text{I}_{\text{CaL}}$ . *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 371(5):393-400, 2005.
71. Gluais P, Bastide M, Caron J, Adamantidis M. Risperidone prolongs cardiac action potential through reduction of  $\text{K}^+$  currents in rabbit myocytes. *Eur J Pharmacol.* 444(3):123-32, 2002.
72. Magyar J, Banyasz T, Pacher P, Szentandrassy N, Fulop L, Kecskemeti V, Nanasi PP. Electrophysiological effects of risperidone in mammalian cardiac cells. *Naunyn schimiedebergs Arch Pharmacol.* 366 (4): 350-6, 2002.
73. Salemme S, Rebolledo A, Speroni F, Milesi V, L, P/Q T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in smooth muscle cells from human umbilical artery. *Cellular Physiology and Biochemistry* 20: 55-64, 2007.
74. Cudd TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp Biol Med* 230:389-393, 2005.

75. Cook JL, Zhang Y, Davidge ST. Vascular function in alcohol-treated pregnant and nonpregnant mice. *Am J Physiol* 281:R1449-R1455, 2001.
76. Daft PA, Johnston MC, Sulik KK. Abnormal heart and great vessel development following acute ethanol exposure in mice. *Teratology* 33:93-104, 1986.
77. Fang TT, Bruyere HJ Jr, Kargas SA, Nishikawa T, Takagi Y, Gilbert EF. Ethyl alcohol-induced cardiovascular malformations in the chick embryo. *Teratology* 35:95-103, 1987.
78. Turcotte LA, Aberle NS, Norby FL, Wang G-J, Ren J. Influence of prenatal ethanol exposure on vascular contractile response in rat thoracic aorta. *Alcohol* 26:75-81, 2002.
79. Olesen OV, Licht RW, Thomsen E, Bruun T, Viftrup JE, Linnet K. Serum concentrations and side effects in psychiatric patients during risperidone therapy. *Ther Drug Monit.* 20(4):380-4, 1998
80. Bennedsen BE, Mortensen PB, Olsen AV, Henriksen TB. Preterm birth and intra-uterine growth retardation among children of women with schizophrenia. *Br. J. Psychiatry.* Sep 175: 239-245, 1999.
81. Patton SW, Misri S, Corral MR, Perry KF, Kuan AJ. Antipsychotic medication during pregnancy and lactation in women with schizophrenia: evaluating the risk. 47 (10): 959-65, 2002.
82. Dunty WC Jr, Zucker RM, Sulik KK. Hindbrain and cranial nerve dysmorphogenesis result from acute maternal ethanol administration. *Dev Neurosci* 24:328-342, 2002.
83. Parnell SE, Dehart DB, Wills TA, Chen SY, Hodge CW, Besheer J, Waage-Baudet HG, Charness ME, Sulik KK . Maternal oral intake mouse model for fetal alcohol spectrum disorders: ocular defects as a measure of effect. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1791-1798, 2006.
84. Sood B, Delaney-Black V, Covington C, Nordstrom-Klee B, Ager J, Templin T, Janisse J, Martier S, Sokol RJ. Prenatal alcohol exposure and childhood behavior at age 6 to 7 years: I. dose-response effect. *Pediatrics* 108:E34, 2001.
85. Mattson SN, Riley EP, Gramling L, Delis DC, Jones KL. Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology* 12:146-153, 1998.
86. Cavieres MF, Smith SM. Genetic and developmental modulation of cardiac deficits in prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 24:102-109, 2000.
87. Bagheri MM, Burd L, Martsolf JT, Klug MG. Fetal alcohol syndrome: maternal and neonatal characteristics. *J Perinat Med* 26:263-269, 1998.
88. Daft PA, Johnston MC, Sulik KK. Abnormal heart and great vessel development following acute ethanol exposure in mice. *Teratology* 33:93-104, 1986.

89. Fang TT, Bruyere HJ Jr, Kargas SA, Nishikawa T, Takagi Y, Gilbert EF. Ethyl alcohol-induced cardiovascular malformations in the chick embryo. *Teratology* 35:95-103, 1987.