Noviembre-Diciembre
Volumen 16, Año 2015 Número 6

Revista Mexicana de Neurociencia

Publicación oficial de la Academia Mexicana de Neurología A.C.

Revista Mexicana de Neurociencia 2015; 16(6): 28-40

Órgano Oficial de Difusión de la AMN

Academia Mexicana de Neurología, A.C.

www.revmexneuroci.com / ISSN 1665-5044

Contribución Original

M.C. Ángel Alberto Puig-Lagunes[1]
M.V.Z. Eliseo Velazco-Cercas[1]
Q.F.B. Issac Zamora-Bello Issac[1]
Dr. Luis Beltrán-Parrazal [2]
Dra. Consuelo Morgado-Valle [2]
Dr. Jorge Manzo [2]
Dra. María Leonor López-Meraz [2]

[1]*Doctorado en Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, México. Médico y Odontólogos, Col. Unidad del Bosque C.P. 91010, Xalapa, Veracruz, México.*
[2]*Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, México. Médicos y Odontólogos s/n, Col. Unidad del Bosque, Cp. 91010, Xalapa, Veracruz, México.*

Malformaciones congénitas en ratas expuestas prenatalmente al ácido valproico y su relación con el número de células de Purkinje

Congenital malformations in rats prenatally exposed to valproic acid and their relationship with Purkinje cells counts

Resumen

Introducción: El ácido valproico (AVP) es un fármaco comúnmente empleado para el tratamiento de la epilepsia, las manías agudas y el trastorno bipolar. A partir de su uso como antiepiléptico se identificó que su empleo durante el embarazo puede producir malformaciones congénitas, el síndrome fetal del valproato y aumenta el riesgo de padecer autismo. Existe un modelo experimental en ratas para reproducir estos trastornos aplicando el AVP durante la etapa embrionaria, en el que también se producen cambios en la anatomía cerebelar observados en pacientes con autismo.

Objetivo: Describir algunas malformaciones detectadas en ratas después de la exposición prenatal al AVP y su correlación con alteraciones en el número de células de Purkinje en el vermis cerebelar.

Métodos: El AVP (600mg/kg) se aplicó a las ratas gestantes durante el día embrionario 12; ratas control se administraron con solución salina. Las ratas con malformaciones y sus respectivos controles se eutanizaron al día 40 posnatal, y el número de células Purkinje se determinó en secciones sagitales del vermis teñidas con la tinción de Nissl.

Resultados: Las ratas tratadas prenatalmente con AVP presentaron diferente grado de malformación en la cola e incluso polidactilia en las patas traseras. A nivel histológico se identificó una disminución de las células de Purkinje en los lóbulos VI, VII, VIII y X del vermis. Existió una correlación lineal positiva entre el número de células de Purkinje en el lóbulo VIII-B y la severidad de la malformación observada; no se identificó correlación entre los dos parámetros en ningún otro lóbulo cerebelar analizado.

Conclusión: no existe correlación entre el grado de severidad causado por el AVP en ratas y la disminución en el número de células de Purkinje. Estos hallazgos son de relevancia para el mejor entendimiento del modelo experimental del AVP en la rata.

Palabras clave.

Ácido valproico, malformaciones congénitas, cerebelo, células de Purkinje.

Abstract

Introduction: Valproic acid (VPA) is a commonly used drug for the treatment of epilepsy, acute manias and bipolar disorder. It is known that the use of AVP during pregnancy an produce congenital malformations, the fetal valproate syndrome and augment the risk for autism. This disorders haven been modeled in the laboratory by injecting VPA during the embryonic period rats, inducing additionally modifications in the cerebellar anatomy similar to those detected in people with autism.

Objective: The goal of this study was to describe some congenital malformations observed in rats exposed prenatally to VPA and its correlation with the number of Purkinje cells from the cerebellar vermis.

Methods: VPA (600mg/kg) was applied to pregnant rats during the 12th embrionic day; control rats were injected with saline during the same day. Rats with malformations and control rats were euthanized during the postnatal day 40 and the number of Purkinje cells was determined in sagittal sections from the medial vermis stained with Nissl technique.

Results: The prenatal exposure to AVP produced different severity of tail malformations and toe polydactyly, as well as a decrease in the number of Purkinje cells in the lobules VI, VII, VIII y X. A lineal positive correlation between the malformation severity and the number of Purkinje cells was observed in the lobule VIII-B; however, no correlation was detected between those parameters in any additional lobe.

Conclusion: There is not correlation between the severity of the malformations produced by VPA and the decrease in the number of Purkinje cells. These findings are relevant for a better understanding of the VPA experimental model in the rat.

Keywords

Valproic acid, congenital malformations, cerebellum, Purkinje cells

Correspondencia:
Dra. María Leonor López-Meraz
Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana.
Unidad de Ciencias de la Salud, Médicos y Odontólogos s/n, Col. Unidad del Bosque, Cp. 91010, Xalapa, Veracruz, México.
Tel: + 52 (228) 8418900 Ext. 16305
Correo-e: leonorlopez@uv.mx

Introducción

El ácido 2-propil-pentanoico mejor conocido como ácido valproico (AVP), es un acido graso simple que ha demostrado su eficacia en el tratamiento de manías agudas, trastorno bipolar, migraña y epilepsia1-3. El AVP es uno de los fármacos más empleados para el tratamiento de la epilepsia, y debido a su amplio uso en mujeres embarazadas3-5, se identificó que produce malformaciones en el producto en mayor proporción que otros fármacos antiepilépticos como la fenitoína y la carbamacepina6. Actualmente, la agencia de drogas y alimentos de los E.U.A. contempla al AVP como un fármaco categoría D, lo que implica que existe evidencia de riesgo en el feto humano, pero los beneficios potenciales pueden justificar su uso durante el embarazo[1].

El AVP también se asocia con defectos del nacimiento, déficits cognitivos y con un mayor riesgo de padecer autismo[7-9]. Los estudios clínicos realizados en los últimos 40 años han demostrado que la exposición al AVP durante el embarazo, se asocia con un aumento de aproximadamente tres veces en la tasa de anomalías que incluyen defectos del cierre del tubo neural (espina bífida, anencefalia), defectos cardíacos, craneofaciales, esqueléticos, musculoesqueleticos, labio leporino y de las extremidades, entre otros[6-8,10]. En el 2005, Rasalam y colaboradores[9] con datos obtenidos entre 1981 y 2001 en Grampian, Escocia, reportaron una prevalencia de 4.6% de los trastornos del espectro autista (TEA) asociada con la exposición prenatal al AVP. En este mismo trabajo se y, señala que dentro de esta cohorte algunos de los niños presentaban algún tipo de malformación[9].

En sujetos con TEA, una de las áreas cerebrales que frecuentemente presenta anomalías es el cerebelo. En estudios postmortem se identificó que el 95% de los pacientes examinados presentaban anomalías en esta área cerebral[11]. Estudios de resonancia magnética realizados en pacientes con TEA, permitieron identificar una reducción de la materia gris cerebelar en comparación con sujetos control; este efecto se observó en la región anterior a nivel de los lóbulos VI y VIIa[12]. Estudios similares, han identificado una reducción en el tamaño del vermis cerebelar[13-14]. Algunos autores sugieren que esta reducción en el volumen cerebelar se debe a una disminución del área sagital medial del vermis, debido a una hipoplasia estructural de los lóbulos posteriores VI-VII del vermis y de los hemisferios cerebelosos; estos cambios se relacionarían con una pérdida severa de neuronas Purkinje[11-12,15]. Las células de Purkinje están involucradas en la coordinación motora, la memoria de trabajo y la exploración mental[16-17] y se ha propuesto que la pérdida de estas células puede ser responsable del comportamiento observado en pacientes con TEA[18]. De hecho, el análisis postmortem del cerebelo de individuos con TEA permitió corroborar una reducción en el número de células de Purkinje[19-20], específicamente en lóbulos II-V y IX-X del vermis[20]. Sin embargo, el uso de técnicas estereológicas modernas ha comprobado que la reducción en el número de células de Purkinje no se encuentra en todos los casos con TEA[21]. Este hallazgo fue replicado por Fatemi y colaboradores[22], quienes reportaron una densidad normal de células de Purkinje en tejido de pacientes con TEA, pero resaltan una reducción en su tamaño.

El uso de modelos animales ha permitido esclarecer el papel teratógeno del AVP. La administración de diferentes dosis de AVP (200-800mg/kg) en diferentes periodos embrionarios (E7-E17) de ratas y ratones, produce una disminución de su peso y crecimiento intrauterino, un descenso en la tasa de natalidad, malformaciones congénitas, alteraciones en el desarrollo neurológico y efectos en el comportamiento similares a lo observado en humanos con TEA[23-28]. Ratas expuestas al AVP durante el día embrionario [12] muestran malformaciones en la cola que incluyen: colas cortas y deformes, colas con una o más torceduras a distintos niveles (punta, zona medial y/o base)[27,29]. Así mismo, se ha observado que ratas expuestas al AVP durante el día embrionario [11-12.5] presentan una disminución del diámetro lateral y longitudinal del cerebelo[30], una disminución en el tamaño de los lóbulos cerebelares, así como en el número de células de Purkinje en los lóbulos VI-VIII y IX del vermis (pero no en los lóbulos anteriores IV y V del vermis)[31] y en los hemisferios cerebelares[23]. El

objetivo del presente estudio preliminar es describir algunas de las malformaciones que se detectan en ratas debido a la exposición al AVP in utero y relacionarlas con cambios en la anatomía cerebelar y con el número de células de Purkinje en los lóbulos VI, III y IX y sus respectivos sublóbulos del vermis cerebelar. Los hallazgos resultan de interés debido al amplio uso que este modelo experimental tiene hoy en día para el estudio de trastornos del desarrollo y particularmente del autismo.

Materiales y métodos

Animales.

Para realizar las cruzas se emplearon ratas hembras y machos adultas de la cepa Wistar que se obtuvieron de la compañía Rismart México. Las ratas se alojaron en cajas colectivas de acrílico (43 X 53 X 20 cm) en el bioterio del Centro de Investigaciones Cerebrales de la Universidad Veracruzana, en condiciones ambientales de temperatura y humedad con libre acceso a agua y alimento (Rismart®) y con ciclos normales luz-oscuridad de 12 h (08:00-20:00 h). Posterior a las cruzas, las madres gestantes y las madres con sus crías, se mantuvieron en las mismas condiciones de bioterio pero en cajas de alojamiento individuales (27 X 37 X 15 cm). Las crías se destetaron el día posnatal 21 y se alojaron en cajas colectivas con individuos del mismo sexo hasta el día posnatal 40 cuando se eutanizaron. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a las regulaciones vigentes para el uso y cuidado de animales de investigación de México (NOM-062-ZOO-1999).

Administración de ácido valproico.

Para las cruzas, se emplearon ratas hembras que se encontraban en la fase de estro y proestro, mismas que se colocaron con un macho sexualmente experto durante toda una noche en cajas de acrílico transparente (43 X 53 X 20 cm). Al día siguiente, se realizaron frotis vaginales para identificar la presencia de espermatozoides y entonces considerar que las hembras estaban preñadas. Este día se consideró como el día embrionario 1 (E1). Cada hembra preñada se alojó en una caja individual con libre acceso a agua y alimento. El valproato de sodio (Sigma) se disolvió en solución salina fisiológica y se aplicó una dosis de 600 mg/kg, i.p. a las hembras gestantes durante día de embrionario 12 (E12), siguiendo el protocolo descrito por Ingram y colaboradores[23]. Las ratas control recibieron una inyección de solución salina durante el día E12.

Procesamiento del tejido.

El día posnatal 40 se seleccionaron las ratas control (n=3) y las ratas expuestas al AVP que presentaron malformaciones en diferente grado de severidad (n=4) y se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (50 mg/Kg; i.p.). Posteriormente, se decapitaron y se extrajeron los cerebelos, para después fijarlos por inmersión durante 7 días en paraformaldehído (Sigma) al 4% preparado en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M. Al cabo de la fijación, el tejido cerebral se crioprotegió en una solución de sacarosa al 30% y se cortó en un criostato (Leica) para obtener rebanadas sagitales de 40 µm de grosor a nivel del vermis medial. Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se almacenaron a -70ºC hasta su procesamiento.

Tinción de Nissl y conteo celular.

Las secciones cerebelares se tiñeron con la tinción de Nissl. Para este fin, las secciones se hidrataron en aguda destilada y posteriormente se colocaron en una solución de violeta de cresilo (Sigma, 5%, pH 2.8) durante 5 min. Transcurrido este tiempo, los cortes se lavaron con agua, se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, se aclararon con xileno y se montaron con un medio no acuoso (Permount; Fisher Scientific) para su posterior análisis. Para el conteo celular, se emplearon 3 secciones sagitales por cada animal que incluyeran los 10 lóbulos cerebelares. Con un microscopio óptico (Leica) se tomaron fotografías con un aumento del 40X en la porción apical de los lóbulos VI (sublóbulos VI-A, VI-B, y VI-C), VII (sublóbulo VII-A), VIII (sublóbulos VIII-A y VIII-B) y IX (sublóbulos IX-A, y IX-B). Se contabilizó el número de células de Purkinje presentes en 78505 µm2

en cada sublóbulo para posteriormente expresar los conteos por mm2 *(Figura 1)*. Se seleccionaron estos lóbulos ya que son los que a priori mostraban una mayor variación en su morfología gruesa y que previamente han mostrado cambios en el conteo celular.

Análisis estadístico.

Para identificar las diferencias entre el número de células de Purkinje en el grupo control y el grupo de ratas expuestas prenatalmente con AVP se realizo una prueba t de Student para cada lóbulo. La correlación entre los diferentes grados de deformidad por la exposición al AVP y el número de células de Purkinje se calculó por el método de correlación de rango de Spearman. En ambos casos se utilizó el programa Graphpad Prism versión 6 para el análisis estadístico y para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas se consideró un nivel alfa de $p < 0.05$.

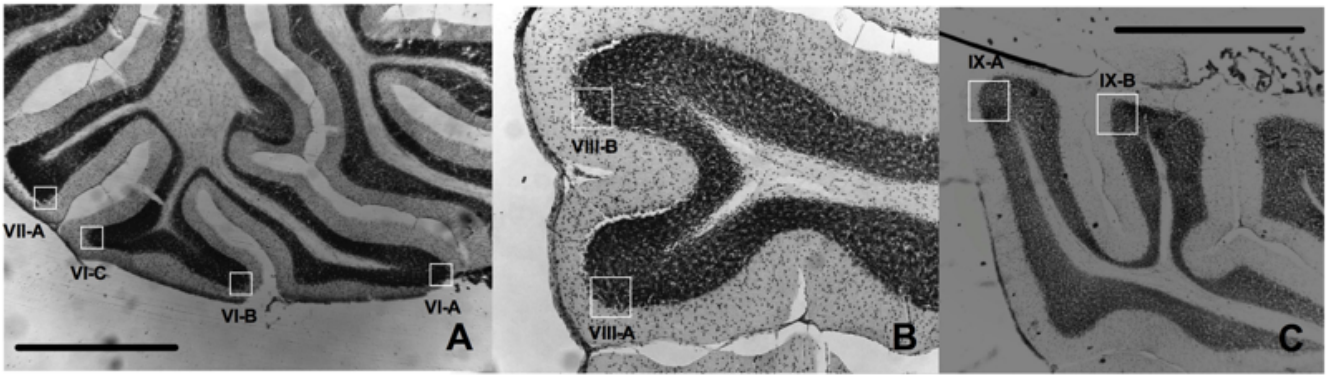

Figura 1. Fotomicrografías del cerebelo de ratas de 40 días de edad a nivel de los lóbulos VI, VII (panel A), VIII (panel B) y IX (panel C) y sus correspondientes sublóbulos. Los recuadros señalan las áreas contempladas para el conteo de las células de Purkinje. La barra de calibración corresponde a 1 mm (A) y 500 µm (B y C).

Resultados

Malformaciones congénitas identificadas

En este estudio se identificó que no todas las ratas expuestas prenatalmente al AVP presentan malformaciones congénitas externas. Aproximadamente el 70% de las ratas presentaron algún grado malformación al nacer, principalmente en la cola. Para este estudio se seleccionaron 4 ratas que mostraron diferente grado de malformación de la cola y una que adicionalmente presentó polidactilia; este grupo estuvo conformado por dos hembras y dos machos Las ratas cuya madre recibió solución salina no presentaron malformaciones externas de ningún tipo y se seleccionaron 3 machos para el estudio.

Las ratas expuestas prenatalmente al AVP mostraron malformaciones congénitas externas en distintos grado, mismas que se clasificaron como se describe a continuación: Categoría 1, correspondió al menor grado de malformación, en este caso la rata mostró dos torceduras leves en la cola, una cerca de la base y la otra en cerca de la punta, sin afectarse el tamaño ni la dirección de la misma; categoría 2, la rata presentó dos torceduras prolongadas en la cola, lo cual modificó su dirección y tamaño; categoría 3, la rata mostró un mayor grado de malformación en la cola, presentando múltiples torceduras, ensanchamiento y disminución del tamaño de la cola (65% comparado con el tamaño promedio en las ratas control); categoría 4, la rata presentó un grado de deformidad en la cola similar a la rata de la categoría 1 y además polidactilia (siete dedos) en ambos miembros posteriores *(Figura 2)*.

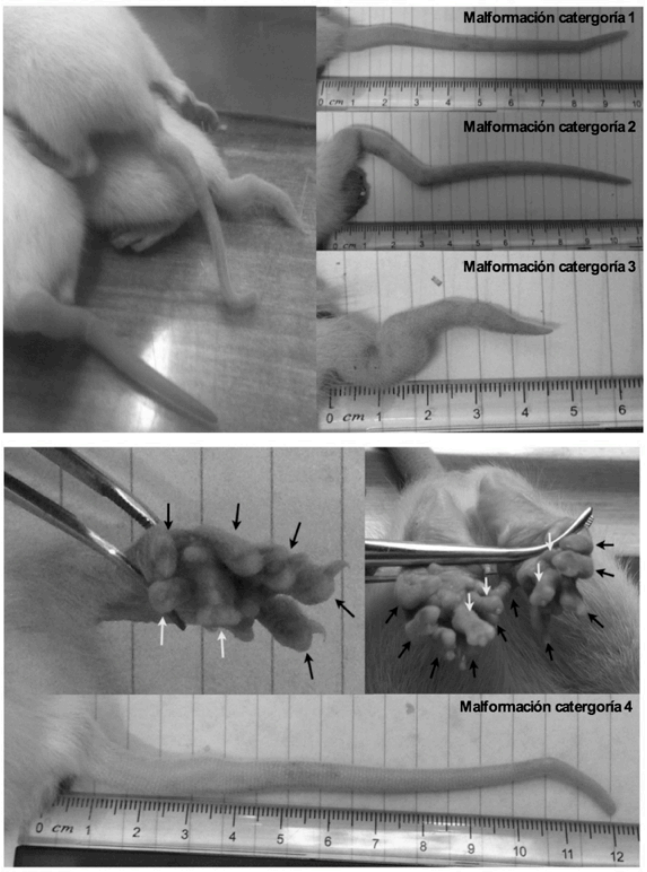

Figura 2. Fotografías de las malformaciones observadas en las ratas expuestas prenatalmente al ácido valproico. En el panel superior se muestra en orden descendente la cola de las ratas clasificadas como malformaciones severidad 1, 2 y 3. Nótese que la rata con la malformación severidad 2 presenta una torcedura mas evidente que la rata de la categoría 1, mientras que la rata de la categoría 3 presenta además un engrosamiento de la cola. En el panel inferior se muestra la cola y extremidades posteriores de la rata con malformación categoría 4. En estas fotografías puede notarse que la cola presenta una ligera torcedura, pero las extremidades presentan polidactilia. Las flechas negras señalan los dedos "normales" y las flechas amarillas los dedos adicionales.

Conteo de las células de Purkinje

La exposición prenatal al AVP modificó el número de células de Purkinje, observándose un menor número de células en la mayoría de los lóbulos evaluados con respecto a los animales control. En el lóbulo VI las ratas AVP mostraron un menor número de células de Purkinje en los sublóbulos VI-A (180±6 células/mm2; p=0.02), VI-B (172± 7 células/mm2; p=0.02), y VI-C (175±20 células/mm2; p=0.03) en comparación con el grupo control (236±22 células/mm2, 246±13 células/mm2 y 253±14 células/mm2; respectivamente). En el lóbulo VII-A los animales con AVP mostraron un menor número de células de Purkinje (167 ± 15 células/mm2) con respecto al grupo control (219 ± 11.3 células/mm2 ; p=0.044). De manera similar, el número de células de Purkinje fue menor después de la exposición al AVP en los sublóbulos VIII-A (151±16 células/mm2; p=0.009) y VIII-B (157±8 células/mm2; p=0.01) en comparación al grupo control (229±4 células/mm2 y 225±18 células/mm2; respectivamente). En el lóbulo IX también se identificó un menor el número de células de Purkinje en las ratas expuestas al AVP en los sublóbulos IX-A (156±6 células/mm2; p=0.05) y IX-B (143± 5células/mm2; p=0.001) al compararlas con el grupo control (194±12 células/mm2 y 218±9 células/mm2, respectivamente) *(Figura 3)*.

Correlación entre grado de malformación y el número de células de Purkinje

Para determinar si existía alguna relación entre los diferentes grados de malformación que presentaron las ratas expuestas prenatalmente AVP y el número de células de Purkinje se realizó una correlación. Se identificó que el sublóbulo VIII-B presenta una correlación lineal positiva (r=0.98, p=0.01), la cual indica que a mayor grado de malformación mayor es el número de células de Purkinje. En el resto de los lóbulos evaluados no existió correlación entre el grado de malformación y el conteo de las células de Purkinje *(Figura 4)*.

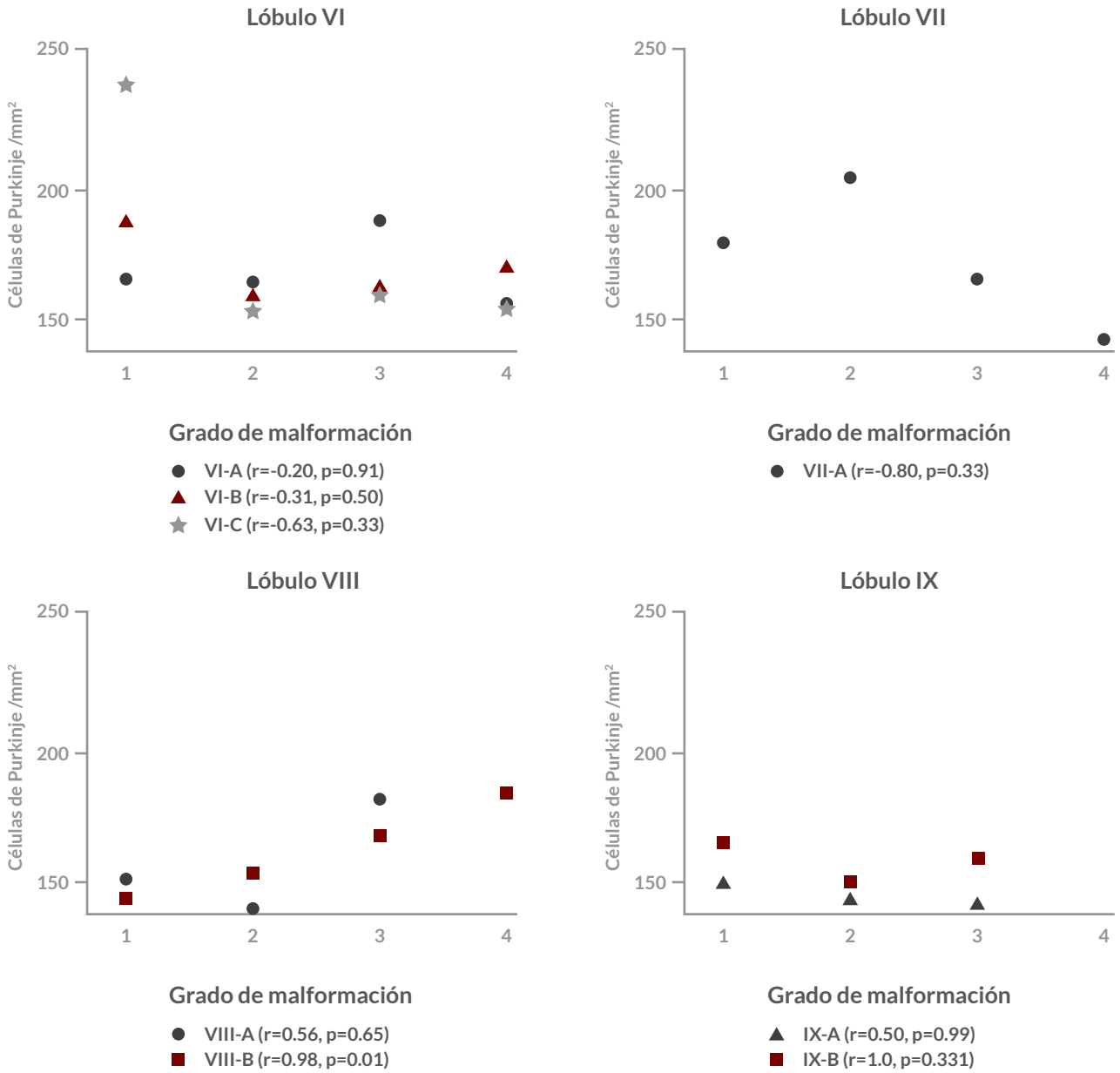

*Figura 4. Correlación entre el grado de malformación de las ratas y el número de células de Purkinje identificadas en los lóbulos VI, VII, VIII y IX del vermis cerebelar. Existió una correlación lineal positiva entre los dos parámetros en el lóbulo VIII-B (*p<0.05), en el resto de los lóbulos analizados no se identificaron diferencias. La correlación se analizó con la prueba de Spearman.*

Anormalidades en la morfología gruesa de los lóbulos cerebelares.

Al realizar el conteo de las células de Purkinje en las ratas AVP con diferente grado de malformación, se identificó que la morfología de los lóbulos posteriores VI y IX mostraron claras anormalidades en comparación con las ratas control. Todas las ratas AVP presentaron anormalidad en la dirección y en forma la del lóbulo VI. La rata AVP categoría 4, la cual presento polidactilia, se caracterizó por que el sublóbulo IX-A presentó un alargamiento *(Figura 5)*.

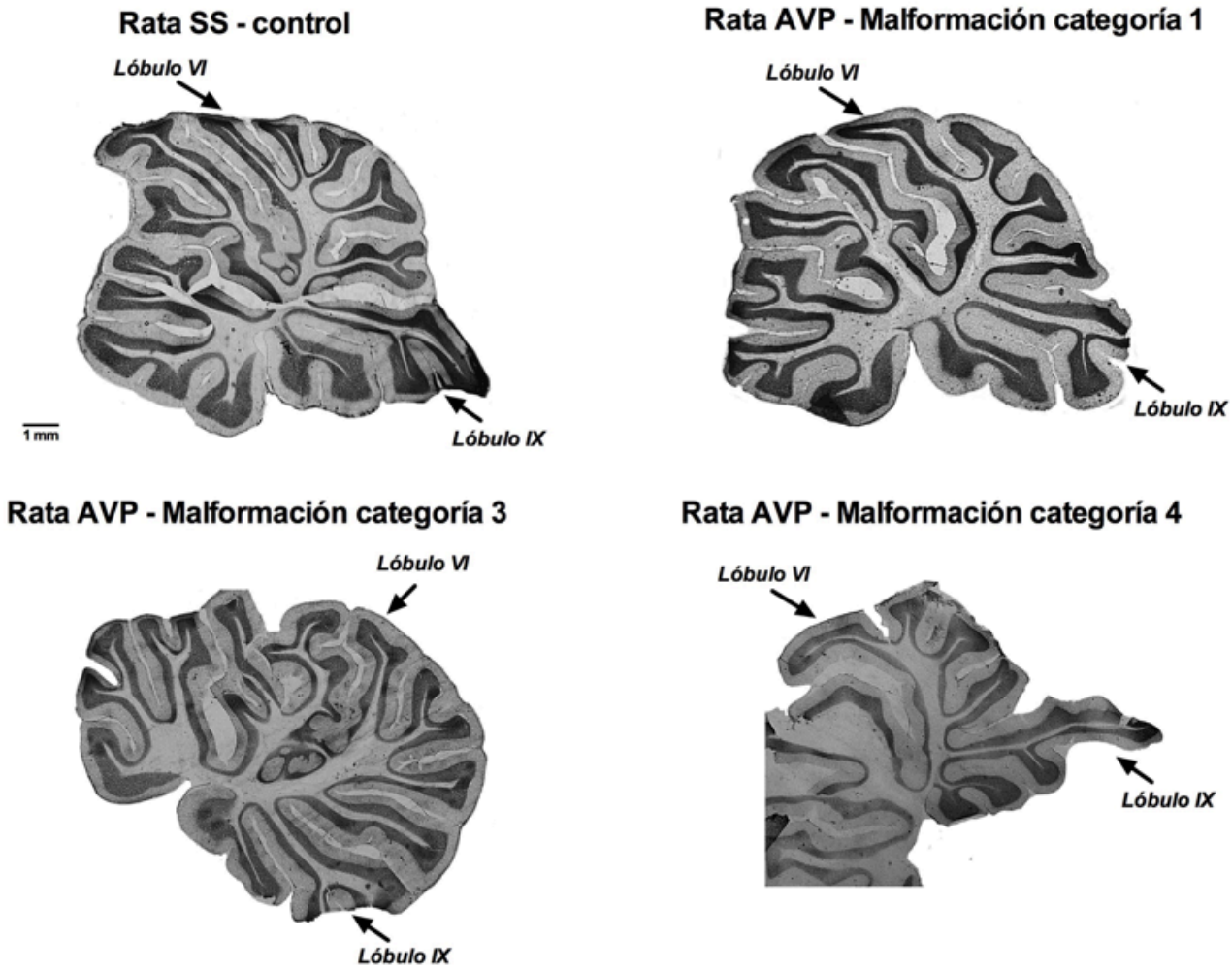

Figura 5. Fotomicrografías del cerebelo de ratas de 40 días de edad a nivel del vermis medial de una rata tratada con solución salina (SS) y de ratas pretratadas con ácido valproico (AVP) con diferentes grados de malformación. Note que la morfología macroscópica expone la existencia de un alargamiento principalmente de los lóbulos VI y IX cerebelares en las ratas expuestas al AVP. La barra de calibración corresponde a 1 mm.

Discusión

Los resultados del presente estudio corroboran que la exposición prenatal de ratas al AVP produce diferentes tipos de malformaciones externas en la cola y polidactilia, así como una reducción en el número de células de Purkinje en los lóbulos de VI, VII XIII y XIV del vermis cerebelar, efecto que se conserva en los sublóbulos presentes en cada uno de ellos. Los datos también denotan que existe una limitada correlación entre la severidad de la malformación observada y la disminución en el número de células de Purkinje. Este es el primer estudio que reporta estos hallazgos.

Se sabe que el AVP en periodos embrionarios es un potente teratógeno que tiene numerosos efectos bioquímicos, especialmente como inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC, por sus siglas en inglés), un regulador clave de la estructura de la cromatina y la transcripción. No obstante, análisis genéticos muestran que el AVP induce alteraciones en los genes HOX (genes encargados de la planificación del embrión a lo largo del eje anterior-posterior), principalmente Hoxd10 y Hoxd112. El AVP interfiere también con el factor de actividad de transcripción AP1, la fosforilación de GSK3β, y la translocación de β-catenina en el núcleo[32-33]. También se ha demostrado el AVP promueve la pérdida de expresión de N-cadherina, la cual es necesaria para que las células de la cresta neural migren de la línea media de forma individual, y su ausencia hace que estas células migren como láminas epiteliales[34]. Lo anterior sugiere que el AVP interfiere con la correcta migración neuronal en momentos clave del desarrollo embrionario, lo cual puede contribuir a los defectos del tubo neural[34]. Estudios previos han mostrado que los animales tratados con AVP muestran diferentes grados de malformaciones en la cola[27,29,35]. En el presente estudio se identificó además polidactilia en los miembros posteriores en una rata. En ratones expuestos prenatalmente al AVP (400mg AVP/kg) se han observado defectos esqueléticos (fusión de costillas y en cuerpos vertebrales, espina bífida oculta), anomalías craneales y defectos en las extremidades (sindactilia, oligodactilia, displacia de la cuarta falange)2. Lo anterior resulta importante considerando que este modelo experimental produce anomalías que también se han observado en humanos. Por ejemplo en cuanto a defectos en las extremidades, se ha reportado que el riesgo de presentar displasia de la cuarta falange, sindactilia, oligodactilia, mano dividida, polidactilia postaxial y polidactilia preaxial es 0.42% más alta en humanos expuestos in utero al AVP que en la población normal[4,28,36].

Estudios postmortem y de resonancia magnética nuclear en pacientes con TEA, han identificado casos con hipoplasia cerebelar con afectación del volumen del cerebelo, debido a un número de células inadecuado o por debajo de lo normal[11-14,37]. De hecho se sabe que uno de los tipos celulares más vulnerable a insultos químicos en periodos tempranos del desarrollo son las células de Purkinje, mismas que se encuentran disminuidas en cantidad y tamaño en los pacientes con TEA a nivel del vermis[22,38-39]. Utilizando el modelo de AVP en ratas, Ingram y colaboradores[23] detectaron una reducción en el volumen total del cerebelo, del vermis y los hemisferios; estos autores también reportaron un menor número de células de Purkinje en el vermis y los hemisferios cerebelares. En el presente estudio se identificó una reducción en el número de células de Purkinje en el vermis medial, identificada en los sublóbulos VI-A, VI-B, VI-C, VII, VIII-A, VIII-B, IX-A, y IX-B. En conjunto, estos hallazgos son similares a lo reportado previamente por el grupo de Rodier y colaboradores[31], quienes identificaron un menor número de células de Purkinje en los lóbulos VI-VIII y IX en ratas expuestas al AVP, sin existir cambio en el número de células granulares. Sin embargo, este grupo de investigadores analizaron en conjunto los lóbulos VI y VIII y no analizaron a detalle cambios en los sublóbulos31. Por lo tanto, los datos del presente trabajo corroboran que la disminución en el número de células de Purkinje en los lóbulos VI, VIII y IX se detecta en sublóbulos cerebelares específicos. Aunado a esto, los hallazgos muestran que existen diferentes anormalidades en el tamaño y forma de los lóbulos VI, VII, VIII y IX de los animales expuesto al AVP en comparación del grupo control.

La hipoplasia cerebelar es una patología frecuentemente observada en los pacientes con TEA, aunque no todos la presentan[21,38]. Se sugiere que las anomalías cerebelosas en los pacientes autistas pueden ser peri o prenatales, ya que han sido encontradas desde la infancia y son persistentes durante el desarrollo posterior[37,40]. Distintos estudios realizados en ratas muestran que la exposición al AVP durante el periodo embrionario, modifica la estructura del cerebelo y este a su vez puede estar implicado en algunas de las deficiencias conductuales observadas en este modelo [23,31]. De hecho, algunos de los comportamientos claramente observados en estos abordajes experimentales incluyen ansiedad, déficit de interacción social y comunicación, aumento de los comportamientos estereotipados y repetitivos, así como actividad exploratoria escasa[6,23-28]. Aunque el autismo es un trastorno del neurodesarrollo de etiología diversa[41], es posible que la hipoplasia cerebelar, aunada con otras anomalías estructurales y funcionales en otras regiones del cerebro como el lóbulo parietal, pueden afectar la capacidad del paciente con TAE para interaccionar socialmente e incluso para aprender, realizar y resolver situaciones básicas de la vida cotidiana de carácter no social[15,42]. Así mismo, anomalías en la estructura del cerebelo pueden ocasionar alteraciones de otros circuitos dentro y fuera del mismo, afectando conexiones con otras regiones cerebrales[15-17,37,40,42].

Un hallazgo adicional que se presenta en este trabajo es que las ratas con una mayor severidad de la malformación externa observada no presentan un menor número de células de Purkinje como podría esperarse. De hecho, únicamente en el sublóbulo VIII-B se observó una correlación lineal positiva entre el grado de malformación y el conteo celular. Esta relación indica que a mayor grado de malformación se presenta un mayor número de células de Purkinje, lo cual resultó inesperado. Este hecho, resulta importante ya que pone de manifiesto que la exposición prenatal al AVP afecta la viabilidad de la células de Purkinje de la rata, ya sea en ausencia o presencia de malformaciones congénitas severas. Además, evidencia el hecho de que aquellos animales con mayor defectos externos no necesariamente presentan una afectación cerebelar mayor y expone la heterogeneidad que se presenta en este modelo. Estudios previos mostraron que no todas las crías expuestas prenatalmente al AVP presentan este tipo de deformidades[27,29,35]. Lo anterior, hace preguntarse si las malformaciones externas observadas en estos animales podrían ser un indicador de anormalidades en la anotomía cerebelar y por ende en su comportamiento. Sin embargo, nuestros datos no apoyan esta propuesta pero si la heterogeneidad del modelo experimental. Hasta el momento no se ha evaluado si la cantidad de AVP que cada feto absorbe in utero está implicada directamente con las deformidades externas como internos que presentará al nacer.

Conclusión

Los resultado indican que la exposición prenatal al AVP disminuye el número de células de Purkinje en los lóbulos VI, VIII y IX del vermis cerebelar, efecto que no se relaciona con la severidad de la anormalidad externa que se presenta. Lo anterior resalta la importancia de continuar la caracterización de este modelo experimental de autismo, que permita entender mejor las diferencias que pueden existir entre las ratas que presentan malformaciones congénitas de aquellas que no las presentan, y si estas pueden ser un indicador fiable de anormalidades en la anatomía y fisiología del cerebelo, así como alteraciones en el comportamiento similares a las observadas en el autismo.

Declaración de conflictos de interés

Los autores declaran que en este estudio no existen conflictos de interés relevantes.

Fuentes de financiamiento

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por la beca de estudios de doctorado otorgada a AAPL (212825) y por el donativo de Investigación Básica otorgado a MLLM (CB-2008-106402).

Referencias

1. Dufour-Rainfray D, Vourc'h P, Tourlet S, Guilloteau D, Chalon S, Andres CR. Fetal exposure to teratogens: Evidence of genes involved in autism. Neurosci Biobehav Rev 2011; 35:1254–1265.
2. Faiella A, Wernig M, Consalez GG. et al.. A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. Hum Mol Genet 2000; 9:227-236.
3. Lagace DC, O'Brien WT, Gurvich N, Nachtigal MW, Klein PS. Valproic acid: how it works. Or not. Clin Neurosci Res 2004;4: 215–225.
4. Kini U. Fetal valproate syndrome: a review. Paediatr Perinat Drug Ther 2006;7:123-130.
5. Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Llovd DJ, Montgomerv Dean JCS. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. J Med Genet 2000; 37:489-497.
6. Meador K, Reynolds MW, Crean S, Fahrbach K, Probst C. Pregnancy outcomes in women with epilepsy: A systematic review and meta-analysis of published pregnancy registries and cohorts. Epilepsy 2008; 8:1–13.
7. Bromley RL, Mawer RL, Clayton-Smith J, Baker GA. Autism spectrum disorders following in utero exposure to antiepileptic drugs. Neurology 2008; 71:1923-1924.
8. Clayton-Smith J, Donnai D. Fetal valproate syndrome. J Med Genet 1995; 32:724-727
9. Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, Lloyd DJ. et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. Dev. Med. Child Neurol 2005; 47:551–555.
10. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? Reprod Toxicol 2009; 28:1–10.
11. Allen G. The cerebellum in autism. Clinical Neuropsychiatry. 2005; 6:321-337.
12. Allen G and Courchesne E. Differential Effects of Developmental Cerebellar Abnormality on Cognitive and Motor Functions in the Cerebellum: An fMRI Study of Autism. Am J Psychiatry 2003; 160:262–273.
13. Courchesne E, Karns C, Davis H, Ziccardi R, Carper R, Tigue Z, Chisum H, et al. Unusual brain growth patterns in early life in patients with autistic disorder: An MRI study. Neurology 2001; 57:245-254.
14. Hashimoto T, Tayama M, Murakawa K, Yoshimoto T, Miyazaki M, Harada M. et al. Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients. J Autism Dev Disord 1995; 25:1–18.
15. Courchesne E, Townsend J, Saitoh O et al. The brain in infantile autism: posterior fossa structures are abnormal. Neurology 1994; 44:214– 223.
16. Courchesne E, Chisum H, Towsend J. Activity-dependent brain changes in development. Implications for psychopathology. Dev Psychopathol 1994b; 6:697-722.
17. Courchesne E, Towsend J, Chase C. Neurodevelopmental principles guide research on developmental psychopathologies. En: Cicchetti D y Cohen D, eds. A manual of developmental Psychopathology. New York: John Wiley. 1994c: 195-226.
18. Rout UK, Dhossche DM. A pathogenetic model of autism involving Purkinje cell loss through anti-GAD antibodies. Med Hypotheses 2008; 71:218–221.
19. Bailey A, Luthert P, Dean A, Harding B, Janota I, Montgomery M, Rutter M, Lantos PA. Clinicopathological study of autism. Brain 1998; 121:889–905.
20. Lee M, Martin-Ruiz C, Graham A, Court J, Jaros E, Perry R et al. Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. Brain 2002; 15:1483–1495.
21. Whitney ER, Kemper TL, Bauman ML, Rosene DL, Blatt GJ. Cerebellar Purkinje Cells are Reduced in a Subpopulation of Autistic Brains: A Stereological Experiment Using Calbindin-D28k. Cerebellum 2008; 7:406–416.
22. Fatemi SH, Halt AR, Realmuto G, Earle J, Kist DA, Thuras P, Merz A. Purkinje Cell Size Is Reduced in Cerebellum of Patients with Autism. Celular and Molecular Neurobiology 2002; 22:171-175.
23. Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. Neurotoxicol Teratol 2000; 22:319–324.
24. Schneider T, Przewlocki R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. Neuropsychopharmacology 2005; 30:80–9.
25. Schneider T, Roman A, Basta-Kaim A, Kubera M, Budziszewska B, Schneider K et al. Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. Psychoneuroendocrinology 2008; 33:728–40.

26. Bambini-Junior V, Rodrigues L, Behr GA, Fonseca Moreira JC, Riesgo R, Gottfried C. Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters. Brain Res 2011; 1408:8–16.
27. Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Yang SI, Cheong JH, Shin CY, Ko KH. The critical period of valproate exposure to induce autistic symptoms in Sprague-Dawley rats. Toxicol Lett 2011; 201:137–142.
28. Roullet FI, Lai JKY, Foster JA. In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. Neurotoxicol and Teratol 2013; 36: 47–56.
29. Saft P, Toledo-Cardenas R, Coria-Avila GA, Perez-Pouchoulen M, Brug B, Hernandez ME et al. Characterization of four types of tail abnormalities in rats treated prenatally with valproic acid. Revista eNeurobiología 2014; 5:1-6.
30. Ogawa T, Kuwagata M, Hori Y, Shioda S. Valproate-induced developmental neurotoxicity is affected by maternal conditions including shipping stress and environmental change during early pregnancy. Toxicol Lett 2007; 174:18–24.
31. Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Croog VJ. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. Reprod Toxicol 1997; 11:417-22.
32. Chen G, Yuan PX, Jiang YM, Huang LD, Manji HK. Valproate robustly enhances AP-1 mediated gene expression. Brain Res Mol Brain Res 1999; 64:52–58.
33. Chen B, Wang JF, Hill BC, Young LT. Lithium and valproate differentially regulate brain regional expression of phosphorylated CREB and c-FOS. Brain Res Mol Brain Res 1999; 70:45–53.
34. Fuller LC, Cornelius SK, Murphy CW, Wiens DJ. Neural crest cell motility in valproic acid. Reprod Toxicol 2002; 16:825–39.
35. Kim KC, Kim P, Go HS, Choi CS, Park JH, Kim HJ et al. Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder. J. Neurochem 2013; 124:832-843.
36. Lindhout D, Omtzigt JG. Pregnancy and the risk of teratogenicity. Epilepsia 1992;33:41–48.
37. Courchesne E. Brainstem, cerebellar and limbic neuroanatomical abnormalities in autism. Curr Opin Neurobiol 1995; 7:269–278.
38. Courchesne E, Redcay E, Kennedy DP. The autistic brain: birth through adulthood. Curr Opin Neurol 2004; 17:489-496.
39. Skefos J, Cummings C, Enzer K, Holiday J, Weed K. et al. Regional Alterations in Purkinje Cell Density in Patients with Autism. PLoS ONE 2014; 9:1255-1255.
40. Courchesne E. Infante autism part 2. A new neuro-developmental model. Pediatr Int 1995; 10:141-154.
41. Rapin I. Autism in search of a home in the brain. Neurology 1999; 52:902-904.
42. Courchesne E. New evidence of cerebellar and brainstem hypoplasia in autistic infants, children and adolescents. J Autism Dev Disord 1995; 25:19-22.

Revista Mexicana de Neurociencia, 2015; 16(5): 28-40

www.revmexneuroci.com