



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUACIÓN DEL ROL DE LA VITAMINA E PARA  
PREVENIR LOS EFECTOS ADVERSOS DEL ÁCIDO  
VALPROICO EN EL EMBRIÓN DE *MUS MUSCULUS***

**FERNANDO ANTONIO ROJAS GONZÁLEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Clínicas

**PROFESOR GUÍA: DRA. ESTEFANÍA FLORES PAVÉZ**

SANTIAGO, CHILE  
2007



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**EVALUAR EL ROL DE LA VITAMINA E PARA PREVENIR  
LOS EFECTOS ADVERSOS DEL ÁCIDO VALPROICO EN  
EL EMBRIÓN DE *MUS MUSCULUS***

**FERNANDO ANTONIO ROJAS GONZÁLEZ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Ciencias  
Clínicas

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ESTEFANIA FLORES PAVEZ	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: MARIANA ROJAS RAUCO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DANIELA IRAGUEN CONTRERAS	.....	.....

**SANTIAGO, CHILE**  
2007

## **Agradecimientos**

Le agradezco especialmente a la Dra. Mariana Rojas, profesora responsable del laboratorio de embriología comparada de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por abrir las puertas de su laboratorio para poder realizar este proyecto, le agradezco la orientación y apoyo entregado para este fin, a la Dra. Estefanía Flores por su ayuda tanto en el anteproyecto como en la elaboración de la tesis misma, a la Dra. Daniela Iraguen por su disposición, ayuda y entrega de información.

A la profesora Paula Muñoz por su colaboración en la búsqueda de información. Al Sr. Francisco Cortés por su colaboración y enseñanza en técnicas histológicas y manejo de equipos, a mis compañeros de laboratorio Rodrigo Castro y Claudia Villegas por su cordialidad y buena disposición, al Sr. Humberto Coloma por su colaboración con el manejo de los animales de laboratorio.

Agradecimientos especiales a las doctoras María Angélica Morales y Valeria Rojas por su colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

Finalmente agradecer a los alumnos pertenecientes a la Facultad de Medicina quienes a lo largo de este proyecto realizaban su unidad de investigación: Marjorie Sepúlveda, Carolina Tapia, Mariela Yáñez, Noemí Aguirre, Oscar Aravena y Andrés Briones por su colaboración con este trabajo.

## Índice

Resumen.....	5
Abstract.....	7
Introducción.....	9
Revisión Bibliográfica.....	11
Especie en Estudio.....	11
Bases Embriológicas.....	12
Ácido valproico.....	13
Ácido valproico y epilepsia.....	14
Ácido valproico y su potencial teratogénico.....	16
Mecanismo Teratogénico del Ácido Valproico.....	20
Moduladores de Teratogenicidad.....	22
Ácido fólico:.....	23
Vitamina E:.....	24
Hipótesis.....	26
Objetivos.....	26
Material y Metodología.....	27
Resultados.....	31
Tamaño camada.....	31
Longitudápico-caudal.....	32
Análisis Morfológico de los Fetos.....	34
Preparaciones Histológicas.....	41
Discusión.....	45
Conclusiones.....	49
Bibliografía.....	50
Anexos.....	59
Anexo 1: Método de Hanken y Wassersug.....	59
Anexo 2: Técnica Histológica Corriente (Hematoxilina – Eosina – Azul De Alcían).....	60
Anexo 3: Tinción Von Kossa.....	61

## Resumen

El ácido valproico es un fármaco muy utilizado en el tratamiento de la epilepsia, sin embargo, este fármaco posee reconocidos efectos teratogénicos si se administra durante las primeras semanas del embarazo, aumentando el riesgo de defectos del tubo neural. Una de las hipótesis para explicar estos efectos es que el ácido valproico disminuye las concentraciones de antioxidantes, como la vitamina E, induciendo un estrés oxidativo afectando la embriogénesis.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el rol de la vitamina E (alfa-tocoferol), en hembras gestantes (*Mus musculus*) tratadas con ácido valproico para visualizar los efectos adversos de este fármaco al ser utilizado como terapia antiepiléptica.

El modelo experimental utilizado consistió en 24 hembras, de 8 días de gestación, las cuales fueron separadas en 4 grupos de 6 hembras cada uno a los que se les administró los siguientes fármacos: Grupo 1: control suero fisiológico 0,3 ml; grupo 2: ácido valproico 400mg/kg/peso; grupo 3: vitamina E 200 UI y grupo 4: ácido valproico 400 mg/kg/peso, previa administración de vitamina E 200 UI 1 hora antes. Al día 17 de gestación las hembras fueron sacrificadas, los fetos fueron extraídos, examinados, cuantificados y medidos. La mitad de cada camada fue tratada mediante la técnica de Hanken y Wassersug, el resto fue destinado a técnicas histológicas (hematoxilina - eosina - azul de alcian, Von Kossa).

Los animales del Grupo 2 mostraron defectos en el esqueleto axial tales como: costillas supernumerarias o lumbares, costillas fusionadas, costillas onduladas y espina bífida. Además, algunos presentaron excencefalia, fetos amorfos y cuerpos vertebrales amorfos. El número de casos de dichas malformaciones congénitas disminuyeron en forma significativa tras la coadministración de vitamina E previo al tratamiento con ácido valproico (Grupo 4).

Estos hallazgos apoyan la hipótesis que las malformaciones del esqueleto axil son menos frecuentes cuando la vitamina E es administrada. Además la administración de vitamina E en el día 8 de preñez no tiene efectos tóxicos en el desarrollo de esta estructura.

Estos resultados constituyen un aporte importante en los estudios de biología del desarrollo debido a que demuestra que el ácido valproico podría comportarse de manera similar al ácido retinoico alterando la expresión de genes Hox, produciendo malformaciones congénitas. Finalmente la coadministración de vitamina E contribuye a evitar estos defectos.

## Abstract

Valproic acid is a drug commonly used in the treatment of epilepsy; nevertheless, this drug has recognized teratogenic effects when administered during the first weeks of pregnancy, increasing the risk of neural tube defects. One of the hypotheses to explain these effects is related to the fact that valproic acid causes oxidative stress by diminishing antioxidants concentrations, such as vitamin E. Thus, its administration in early pregnancy affects the embryogenesis.

In order to evaluate the protective effects of vitamin E (alpha-tocopherol) in pregnant females (*Mus musculus*) receiving valproic acid, the following experimental design was performed. Eight-day pregnant females (n=24) were randomly allocated into 4 experimental groups and received one of the following treatments: Group 1: control saline solution (NaCl 0,9%) 0,3 ml; Group 2: valproic acid 400 mg/kg/bw; Group 3: vitamin E 200 UI and Group 4: valproic acid 400 mg/kg/bw, previous administration of vitamin E 200 UI 1 hour earlier. On day 17 of gestation, females were slaughtered and fetuses were extracted, examined, quantified and measured. Half of each litter was analyzed by the technique of Hanken and Wassersug. The remaining fetuses were used for histological techniques (hematoxilin - eosin - alcian blue and Von Kossa).

Animals in Group 2 showed defects in the axial skeleton, such as supernumerary or lumbar ribs, fused ribs, waved ribs and spina bifida. Additionally exencephaly, amorphous fetuses and amorphous vertebral bodies were present in some of the fetuses. The occurrence of these congenital malformations diminished significantly when valproic acid and vitamin E were coadministered (Group 4).

These findings support the hypothesis that when exogenous Vitamin E is administered, malformations of the axial skeleton are less frequent. In addition, vitamin E administered on day 8 of pregnancy, does not have toxic effects in the development of the axial skeleton.

These results are a meaningful contribution to developmental biology. They demonstrate that valproic acid may act in a way similar to retinoic acid, altering the Hox genes expression and consequently causing congenital malformations. Finally, vitamin E co-administration can diminish the risk of these defects.



## Introducción

Aproximadamente un 3 a 5% de los niños nacidos en Estados Unidos de Norteamérica tienen defectos en el desarrollo. El costo anual aproximado de las 18 alteraciones del desarrollo más comunes es de 8 billones de dólares. Hoy en ese país, existen aproximadamente 3 millones de personas viviendo con las consecuencias de los defectos causados por la exposición *in utero* a teratógenos (Finell, 1999).

La exposición *in utero* a drogas antiepilépticas, en especial al ácido valproico, está asociada a un incremento en el riesgo de malformaciones en el feto, principalmente aquellas relacionadas con defectos del tubo neural. Esto, sumado a que la epilepsia corresponde a la segunda enfermedad neurológica más frecuente en el embarazo, después de la migraña, lo que corresponde a un 0.5% de todas las embarazadas (Richmond, 2004), sitúa a la mujer afectada en un escenario bastante complejo.

Por lo descrito anteriormente, el médico tratante de la mujer embarazada debe ponderar el riesgo potencial que su tratamiento antiepiléptico significa para la salud de su hijo, versus el daño generado al feto producto de crisis convulsivas no controladas.

En Chile, la frecuencia y severidad de las malformaciones fetales, en especial aquellas relativas al tubo neural, han determinado la formulación de estrategias de prevención primaria como lo es la fortificación de harinas con ácido fólico a partir de enero del año 2000 (Nazer, 2006) y secundaria como la garantía de acceso al plan AUGE (Ministerio de Salud, 2005). Con respecto a la investigación en esta área y sus proyecciones, los esfuerzos se han centrado en la formulación de terapias coadyuvantes, que reduzcan o eliminen totalmente los efectos teratogénicos de los anticonvulsivantes sobre el embrión, centrándose en especial en el rol protector del ácido fólico.

La literatura actual da cuenta que el efecto teratogénico de las drogas antiepilépticas se ha asociado a una disminución del ácido fólico plasmático. Para el caso puntual del ácido valproico, se ha postulado además que su uso crónico provocaría una disminución de los

niveles plasmáticos de antioxidantes, como la vitamina E, lo que sugiere el rol del estrés oxidativo en las alteraciones embrionarias (Graf *et al.*, 1998).

En el área de la medicina veterinaria, específicamente en el área de la medicina de animales pequeños, la posibilidad de engendrar animales malformados, producto de gestaciones en las cuales las madres han debido recibir una droga teratogénica, ha determinado que se opte en general por su esterilización. En estos casos, el contar con una terapia protectora de embriones permitiría obtener individuos potencialmente sanos, en gestaciones de alto riesgo.

A la fecha, pese a la amplia difusión de la actividad antioxidante de la vitamina E, son escasos los estudios que han intentado aproximarse a ella como potencial protector teratogénico; siendo ésta una de las principales razones que motivaron este estudio; lo que abre por tanto, una nueva ventana de investigación en esta línea.

Es importante destacar que, en el diseño experimental propuesto, la administración de ácido valproico se realiza en una etapa crítica como es el día 8 de gestación en las hembras *Mus musculus*, que si hacemos una analogía con la especie humana sería entre la segunda y tercera semana de gestación, período de alta sensibilidad a anomalías estructurales mayores (Gilbert, 2005), siendo este período también en donde la mayoría de las mujeres se da cuenta de su embarazo y el hecho de estar bajo tratamiento con ácido valproico sería altamente riesgoso, por esto buscar un protector embrionario de consumo periconcepcional es de suma importancia.

Es por esto que este estudio se realizará en fecha homóloga a la especie humana, con en objetivo de visualizar eventuales alteraciones morfológicas durante el desarrollo de fetos provenientes de madres bajo tratamiento con este fármaco.

## Revisión Bibliográfica

### Especie en Estudio

La experimentación con animales desempeña un papel primordial en áreas prioritarias de investigación como la biotecnología. Gracias a ella se han hecho grandes avances en salud como el desarrollo de métodos para el diagnóstico de enfermedades y el refinamiento de sistemas para la obtención de vacunas (Cardozo de Martínez *et al.*, 2007).

El animal experimental se considera como un reactivo biológico, se trata de un animal cuya calidad genética y ambiental ha sido controlada y asegurada, por lo tanto, es capaz de dar una respuesta fiable y reproducible a la pregunta experimental. Se suman a ello todas las consideraciones de cuidado para el bienestar de cada uno según especie y sus requerimientos etológicos, de manera que no se generen alteraciones o adaptaciones que modifiquen el modelo animal, alterando la respuesta investigativa (Cardozo de Martínez *et al.*, 2007).

*Mus musculus* tiene una vida media de 1 a 2 años, pero la útil es de 6 a 9 meses. La pubertad ocurre entre las 6 a 9 semanas de edad y las hembras generalmente se cruzan entre las 6 a 8 semanas de vida.

La gestación dura entre 19 a 21 días y el rango de tamaño de la camada es de 5 a 10 crías. Hay un estro post parto y si la fecundación ocurre en este celo puede suceder una implantación retardada o diapausa facultativa, en este caso la gestación se alarga a 25 días y aún puede aumentar a 31 días. Algunas hembras pueden resultar pseudopreñadas, si se encuentran en grupos, esto se conoce con el nombre de efecto “Lee-Boot”. El efecto “Bruce” es otra respuesta interesante, si una hembra preñada se coloca con un macho extraño durante los primeros 4 días de gestación, la preñez se bloquea (Montenegro y Mena, 1985).

Entre los métodos para diagnosticar tiempos de gestación, se pueden realizar frotis vaginales sólo a aquellas hembras en celo. El ratón se puede examinar diariamente para

pesquisar la presencia de tapón vaginal (método recomendado cuando se requiere conocer con mayor exactitud la edad de las crías), después del cruzamiento que generalmente ocurre en la noche, el tapón se puede encontrar a la mañana siguiente y se cuenta como día 0 (Montenegro y Mena, 1985).

Dada la similitud que existe en el desarrollo embrionario, y particularmente en los mecanismos que regulan la osteogénesis, entre humanos y ratones (*Mus Musculus*), se ha elegido esta especie como modelo experimental (Faiella *et al.*, 2000).

### **Bases Embriológicas**

A nivel embriológico, el esqueleto axil deriva de la porción ventromedial del somito, conocido como esclerotomo. Su formación, tanto a escala espacial como temporal, está controlado por un número determinado de genes propios del desarrollo, llamados Homeobox (Eames *et al.*, 2003). El ácido valproico es capaz de alterar la expresión de estos genes de desarrollo (Baran *et al.*, 2006a).

A lo largo del eje antero posterior del esqueleto existiría, por otro lado, un código de expresión de genes Hox, el cual determina el tipo de vértebra formada (Gilbert, 2005). El ácido retinoico es capaz de modificar su expresión, y al parecer, el ácido valproico tendría también esta capacidad.

En el caso de las extremidades, éstas provienen de células de la lámina del mesodermo lateral. Sus células secretan un factor paracrino capaz de iniciar las interacciones formadoras de músculo entre ectodermo y mesodermo (Gilbert, 2005). Los genes del desarrollo responsables del esqueleto apendicular son principalmente: Sonic hedgehog (desarrollo anteroposterior), FGF8 (desarrollo proximodistal), Wnt-1, En-1 (desarrollo dorsoventral).

En el desarrollo embrionario de los ratones (*Mus musculus*) es importante recordar que los dos primeros somitos se forman a los 7 días 18 horas, y que el esbozo del miembro anterior se forma a los 9 días 9 horas. *Mus musculus* posee 7 vértebras cervicales, 13 torácicas, 6 lumbares, 4 sacras y un número variable de 20 o más vértebras caudales. Para esto, como se mencionó anteriormente, existe un código de expresión de genes (Hox5, Hox6, Hox9 y Hox10) a lo largo del eje axial, en cambio, en el esqueleto apendicular están involucradas otras proteínas teniendo así un origen diferente (Gilbert, 2005).

### **Ácido valproico**

Desde la década del setenta, el ácido valproico ha sido uno de los fármacos utilizados con mayor frecuencia como anticonvulsivante de primera línea (Dalessio, 1985). Está indicado como terapia para las distintas formas de epilepsia, se encuentra en la mayoría de los servicios de salud del país, es bien tolerado y su costo es bajo, lo que lo convierte en una importante herramienta para el manejo de esta patología (Elmazar, 1995). Además el ácido valproico es utilizado en desórdenes bipolares, migrañas y en el último tiempo se ha investigado su actividad como anticancerígeno (Blaheta *et al.*, 2005).

El ácido valproico se administra en forma oral para el tratamiento de la epilepsia, usualmente como monoterapia, en dosis de 5 a 15 mg/kg/día. En caso de necesidad del paciente y según su tolerancia, es posible incrementar las dosis, fijando como valor máximo 60 mg/kg/día (Marrari, 2005).

El ácido valproico es un ácido graso ramificado de cadena corta que, a diferencia de otros anticonvulsivantes, carece de una fracción de anillo aromático y nitrógeno. Este ácido graso se absorbe rápidamente a nivel intestinal con una biodisponibilidad de un 80%. La concentración máxima se logra entre 1 y 4 horas, proceso que se retarda en estómago lleno, se liga a las proteínas plasmáticas en un 90%.

El volumen de distribución se encuentra entre 0,1 y 0,4 l/kg. La concentración de este fármaco en plasma con efecto terapéutico, está entre 50 y 100 µg/ml. La concentración

en el líquido cerebro espinal alcanza el 10% de la plasmática, la vida media de eliminación varía entre 6 a 16 horas. Su biotransformación es principalmente hepático.

El principal efecto del ácido valproico es el aumento del GABA, mecanismo apoyado por una débil inhibición de 2 sistemas enzimáticos encargados de disminuir las concentraciones de este neurotransmisor: la gabatransaminasa y deshidrogenasa semialdehído succínica. Adicionalmente, presenta una acción bloqueadora débil de los canales de sodio dependientes de voltaje, incluso en menor magnitud que la fenitoina (Porter y Meldrum, 2002; Reiter *et al.*, 2005).

Está descrito que este fármaco inhibe la descarga sostenida y repetitiva provocada por despolarización de neuronas corticales y espinales en ratón (Macdonald y Mclean, 1986).

Su eliminación se realiza principalmente por vía renal, siendo también eliminado en pequeñas cantidades a través de las heces y el aire espirado. Es capaz de atravesar la barrera placentaria y se excreta en un 10 % por la leche materna (Marrari, 2005).

### **Ácido valproico y epilepsia**

La epilepsia es esencialmente una alteración de la función de las neuronas de la corteza cerebral. Se manifiesta en un proceso discontinuo de eventos clínicos denominados crisis epilépticas. Según el tipo de epilepsia, las crisis varían en su forma de manifestación, frecuencia, relación sueño-vigilia y duración. Es una afección neurológica crónica, de manifestación episódica, de diversa etiología caracterizada por la ocurrencia de a lo menos 2 crisis epilépticas. Se clasifica dentro de las enfermedades neurológicas crónicas y no transmisibles. Las crisis epilépticas únicas o secundarias a una agresión cerebral aguda, no constituyen una epilepsia propiamente tal (Ministerio de Salud, 2002)

La epilepsia es un trastorno frecuente que afecta hasta el 1% de la población. Aproximadamente, un tercio de las personas que reciben fármacos antiepilépticos se

encuentran en edad reproductiva, y aproximadamente 1 de 250 embarazos está expuesto a fármacos antiepilépticos (Adab *et al.*, 2006).

A pesar de que en nuestro país tenemos cerca de 300.000 personas con epilepsia y que la consulta por esta patología constituye alrededor del 30% de las atenciones en un policlínico de neurología, ésta continúa siendo en gran parte un tema de exclusiva responsabilidad del especialista. Se le considera escasamente en la educación de pre-grado y de post-grado del médico y de otras profesiones afines, produciendo una carencia en conocimientos sobre epilepsia en los profesionales recién egresados. Los estudios realizados en diferentes países concluyen que los errores en el diagnóstico en epilepsia en atención primaria se presentan en alrededor del 50% de los casos (Ministerio de Salud, 2002).

Las convulsiones propias de la epilepsia son potencialmente peligrosas para la mujer embarazada y el feto. Convulsiones aisladas pueden producir caídas u otras formas de daños físicos, mientras que convulsiones frecuentes o prolongadas pueden llevar a estrés físico poniendo en peligro la salud de ambos (Akos, 2006).

Las drogas antiepilépticas, tal como las conocemos, están ampliamente asociadas con anomalías congénitas, pero en el caso de pacientes con epilepsia activa estos tratamientos generalmente no pueden ser suspendidos, incluso cuando el embarazo es planificado. Como resultado de esto, los efectos adversos en fetos son la mayor preocupación de millones de mujeres epilépticas en todo el mundo (Perucca, 2005).

Existe un consenso general en relación a que los riesgos de las convulsiones no controladas en la madre superan el potencial riesgo teratogénico de la medicación y a la mayoría de las mujeres con epilepsia activa se les recomienda que continúen con la medicación durante el embarazo. Sin embargo, los estudios acerca del riesgo que las convulsiones pueden producir al niño en desarrollo son limitados y deben ser evaluados en una relación riesgo beneficio con los efectos en el embarazo, el cual se considera que está relacionado con la exposición a fármacos antiepilépticos *in utero* (Adab *et al.*, 2006).

## **Ácido valproico y su potencial teratogénico**

La relación entre la administración a la hembra gestante de drogas antiepilépticas y malformaciones fetales ha sido reconocida hace a lo menos tres décadas. Se ha asociado a una variedad de malformaciones mayores y menores, incluyendo un aumento de hasta 20 veces en defectos del tubo neural, labio y paladar hendido, anormalidades cardiovasculares, defectos genitourinarios, de retraso en el desarrollo, desórdenes endocrinológicos y defectos en los miembros (Alsdorf y Wyszynski, 2005).

Administraciones de ácido valproico en dosis mayores a 1.000 mg por día están consistentemente asociados con altos riesgos de defectos del tubo neural en la descendencia de madres tratadas (Duchowny, 2004).

Los defectos del tubo neural corresponden a las malformaciones congénitas más frecuentes en Chile, después de las cardiopatías congénitas (Cortés, 2003). Estos defectos los podemos definir como malformaciones congénitas graves resultantes de una falla en la neurulación. Este proceso del desarrollo es responsable de la formación del tubo neural, el precursor embrionario del cerebro y la columna vertebral.

El ácido valproico también se caracteriza por producir alteraciones morfológicas, especialmente en costillas y en el esqueleto axil (Seegmiller *et al.*, 1991), retardo en el crecimiento intrauterino, cardiopatías congénitas, paladar hendido y muerte embrionaria. (Sato *et al.*, 1995), párpado abierto, y micrognatia (Al Deeb *et al.*, 2000).

Distintos autores han ponderado de distintas maneras el riesgo de presentar malformaciones. Como se detalla a continuación, estudios revelan que parece haber un aumento de dos a tres veces en las malformaciones congénitas en los niños nacidos de mujeres con epilepsia, en comparación con la población general (El-Sayed, 1998).



Otro autor revela que la población expuesta al ácido valproico prenatal presenta defectos del desarrollo con una frecuencia de 10 veces más que en la población no expuesta, siendo la espina bífida el defecto más frecuente (Morrow, 2004).

En un estudio retrospectivo entre los años 1978 a 2000, pacientes que recibieron terapia con ácido valproico durante su embarazo, reveló que el 62% de los niños nacidos tuvieron anomalías musculoesqueléticas, el 30% tuvo alteraciones menores de la piel, un 26% presentó anomalías cardiovasculares, un 22% alteraciones en los genitales, y un 16% alteraciones pulmonares. Menos frecuente fue encontrar anomalías en cerebro, oculares, renales, y defectos auditivos. Los defectos del tubo neural fueron observados en un 3% de la muestra. Un 20% de los niños afectados murieron durante su infancia y un 29% de los sobrevivientes presentaron déficit en el desarrollo y/o retardo mental. Alrededor de un 15% fue afectado por retardo en crecimiento, y un patrón de crecimiento excesivo fue observado en un 9% (Kozma, 2001).

Una falla en la neurulación craneal resulta en excencefalia, precursor para el desarrollo de una anencefalia, la cual es una condición letal produciendo una degeneración *in utero* del tejido cerebral expuesto (Greene y Copp, 2005).

También existen estudios que ponen de manifiesto efectos antiandrogénicos en la descendencia de madres que recibieron tratamiento con ácido valproico, estos efectos pueden dar origen a alteraciones como la hipospadia la cual es bastante fácil de observar al nacimiento (Källén, 2004).

También se le ha atribuido al ácido valproico un patrón específico de dimorfismo facial el cual consiste en un conjunto de características como se detalla a continuación: pliegues epicánticos, narinas pequeñas y antevertidas, *filtrum* plano, puente nasal plano, labio superior largo y boca en carpa, denominándose el conjunto de características como síndrome valproico fetal (Aguinaga *et al.*, 2002), en estudios posteriores los autores describen que en ciertas familias la ocurrencia de este síndrome se da en todos los hermanos, lo cual sugiere fuertemente que la susceptibilidad sería hereditaria. El riesgo en

un embarazo siguiente puede ser alto y debe ser considerado en el asesoramiento hacia los padres y en la elección de la droga (Malm *et al.*, 2002).

El ácido valproico produce un incremento de las anomalías congénitas en estudios en especies como ratones, ratas, conejos y monos, en altas dosis (Ornoy, 2006). Además está descrito que alrededor de el 10% de los 12.000 niños que fueron expuestos a drogas antiepilépticas durante el embarazo cada año muestran malformaciones de uno u otro tipo (Faiella *et al.*, 2000). Incluso estudios recientes informan sobre cierto rol que tendría este fármaco en enfermedades mentales como el autismo (Schneider *et al.*, 2007).

Debido a sus efectos hepatotóxicos, en recientes estudios se ha descrito necrosis de células hepáticas neonatales, a veces dando lugar a muerte neonatal (Santana *et al.*, 2004). Esta hepatotoxicidad se explicaría ya que el estrés oxidativo ha sido asociado al tratamiento con ácido valproico, y la consecuente disfunción mitocondrial se ha asociado a la patogénesis de la hepatotoxicidad ocasionada por este fármaco (Tong *et al.*, 2005).

Estos antecedentes estimulan una investigación más a fondo de los efectos del ácido valproico, no sólo considerando su capacidad inductora de malformaciones congénitas, sino también sus potenciales efectos en la mortalidad del embrión.

Los efectos teratogénicos pueden también ser inducidos en modelos de ratón por administración de diferentes dosis de ácido valproico durante el período sensible en la gestación (Eikel *et al.*, 2006).

La embriotoxicidad del ácido valproico se ha puesto de manifiesto experimentalmente por distintos autores. El objetivo de estos estudios se ha centrado en comparar las gestaciones resultantes entre un grupo expuesto *in utero* al ácido valproico versus un grupo no expuesto. Los estudios en ratones han concluido que la administración de ácido valproico el día 8 de la gestación da lugar a un crecimiento y desarrollo anormal del embrión; aumentan las reabsorciones fetales uterinas y se reduce el promedio de fetos vivos (Al Deeb *et al.*, 2000). Otra experiencia similar, usando una dosis única de ácido

valproico, produjo una disminución del peso y longitud de los recién nacidos del grupo expuesto. Sus esqueletos axiles mostraban que, pese a que los huesos atlas y axis se osificaban de manera similar al grupo control, la distancia intervertebral a nivel lumbar era mayor al de este grupo. Las costillas del grupo expuesto también eran anormales, acercándose al esternón; mientras que las costillas falsas también mostraban posiciones anómalas debido a la presencia de costillas onduladas (Baran *et al.*, 2006a).

Está descrito que el ácido valproico altera significativamente la expresión de los genes responsables de la formación de la matriz del cartílago durante la condrogénesis lumbar del embrión. La alteración de la expresión de genes para proteínas críticas de la matriz durante la condrogénesis vertebral podría estar relacionada con los mecanismos responsables de la falla del desarrollo del arco neural dando así origen a la espina bífida (Basu y Wezeman, 2000).

El ácido valproico es considerado por la “Food and Drug Administration” (FDA) como categoría D, es decir, hay evidencia positiva de riesgo fetal en humanos, pero las ventajas del uso en mujeres embarazadas pueden ser aceptables a pesar del riesgo, en caso que la droga sea necesaria de administrar en una situación peligrosa para la vida o para una enfermedad seria para la cual drogas más seguras no se puedan utilizar o sean ineficaces (FDA, 2006).

Los estudios publicados durante la década del ochenta en humanos dan cuenta de riesgos elevados de defectos del tubo neural, hasta por sobre las veinte veces con respecto a la población no expuesta, al recibir ácido valproico *in utero* (Bjerkedal *et al.*, 1982). Durante los últimos años, sin embargo han surgido otros estudios que son algo más cautelosos en sus juicios.

Publicaciones recientes dan cuenta que pese a que el riesgo relativo (RR) de presentar defectos del tubo neural, en población expuesta al ácido valproico, es 0.61, el intervalo de confianza calculado para éste no es estadísticamente significativo (95% IC: 0.06-6.72), lo que pone en tela de juicio las conclusiones obtenidas en las décadas previas

(Gutiérrez y Moreno, 2005). Sin embargo algunos estudios son mas categóricos reportando así malformaciones congénitas que ocurren en niños cuyas madres reciben ácido valproico durante el embarazo como tratamiento antiepiléptico con una prevalencia de anomalías de un 9.4% (Lajeunie *et al.*, 2001).

Existen estudios en los cuales se analizan distintas alternativas al ácido valproico que han sido usadas como tratamientos antiepilépticos. Una comparación entre el ácido valproico, fenobarbital, fenitoína, lamotrigina y oxcarbazepina versus la carbamazepina, se observó que todas estas drogas presentan una mayor o menor incidencia en las malformaciones de embriones, siendo el ácido valproico la droga que más malformaciones provoca, seguido por el fenobarbital, no se observaron diferencias importante en cuanto al riesgo entre la carbamazepina y la fenitoína (Perucca, 2005), por lo cual la búsqueda de un modulador de estas malformaciones aumenta su importancia.

Los defectos del tubo neural son un ejemplo clásico de la influencia del país de residencia como factor muy importante. En Irlanda la incidencia de estas malformaciones llega a 10 casos mientras que en países como India y Estados Unidos los casos son 0,6 y 1 respectivamente, en tanto en todo el mundo se registran 2,6 casos, valores por cada 1000 nacidos vivos. La razón de la elevada incidencia en Irlanda ha sido muy debatida, entre las posibles causas estaría la predisposición racial, condiciones ambientales locales, y hasta políticas gubernamentales, también podría radicar en una mala nutrición de las mujeres embarazadas durante los meses de invierno, ocasionando niveles bajos de ácido fólico (Carlson, 2005).

### **Mecanismo Teratogénico del Ácido Valproico**

Actualmente, la teratogénesis en individuos nacidos de madre epilépticas pone de manifiesto la controversia de si la teratogénesis es causada por la patología o por el tratamiento (Holmes *et al.*, 2001). Sin embargo la tendencia actual se inclina en el

establecimiento de un mecanismo mediante el cual el anticonvulsivante pueda dañar al feto en gestación.

Hasta la fecha, el mecanismo por el cual el ácido valproico induce la teratogenicidad permanece desconocido. Se han sugerido como posibles mecanismos la alteración del pH normal del medio embrionario, los cambios en el metabolismo del ácido fólico, y otras hipótesis potenciales, como la modificación del metabolismo del zinc y el de los lípidos (Karabiber *et al.*, 2003).

Entre otras hipótesis que podrían explicar el efecto teratógeno del ácido valproico, se ha estudiado el efecto altamente reactivo de metabolitos derivados de este ácido (2-ene AVP y (E) 2-2, Z-3-diene AVP) que serían capaces de unirse al ADN produciendo errores en el crecimiento y desarrollo de los fetos (Jurima-Romet *et al.*, 1996).

Un posible mecanismo que recientemente ha recibido atención es el rol del ácido valproico en la alteración de la condrogénesis. La condrogénesis, es uno de los pasos morfogénéticos más tempranos en la formación del esqueleto. Consiste en una serie de eventos altamente coordinados los que involucran el reclutamiento y diferenciación de células mesenquimáticas hacia condrocitos, su maduración estructural y reemplazo por elementos óseos (Basu y Wezeman, 2000).

Otra hipótesis postula que el ácido valproico desorganizaría el cierre del tubo neural mediante alteraciones de la expresión de genes y proteínas modeladoras de la neurulación directa (Finnell *et al.*, 2002).

Diversas investigaciones sugieren que la exposición al ácido valproico lleva a un incremento de los ROS (reactive oxygen species). Este concepto incluye a los iones oxígeno, radicales libres y peróxidos entre otros (Flora, 2007), indicando que el ácido valproico alteraría el equilibrio redox intracelular (Na *et al.*, 2003).

El mecanismo propuesto consiste en que el ácido valproico puede potenciar cambios en los niveles de proteínas a través de inducción al estrés oxidativo. Esta hipótesis dice que la bioactivación embriónica del ácido valproico a metabolitos reactivos puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (Dawson *et al.*, 2006).

Los mismos autores evaluaron si la inhibición de la diferenciación de los cardiomiocitos por el ácido valproico era debido a niveles crecientes de ROS los cuales sobrepasaban la defensa antioxidante intracelular. Para esto, se coadministró ácido valproico junto con vitamina E. Este tratamiento restauró perceptiblemente la diferenciación de los cardiomiocitos, indicando así que la inhibición en la cardiomiogénesis por parte del ácido valproico habría sido ocasionada por los altos niveles intracelulares de ROS (Na *et al.*, 2003).

El aumento de los ROS dañaría el ADN, siendo éste reparado por el proceso de recombinación homóloga. Este un proceso no está libre de errores, pudiendo dar origen a cambios genéticos detrimentales (Defoort, 2006). Hipótesis recientes orientan hacia el rol que podrían tener los radicales libres en el proceso y serían los responsables de la citotoxicidad, hepatotoxicidad y teratogenicidad del ácido valproico (Al Deeb *et al.*, 2000).

### **Moduladores de Teratogenicidad**

En nuestro país, los defectos del tubo neural son la segunda malformación congénita más frecuente entre los recién nacidos, con una incidencia estimada de 6.37 / 10.000 nacidos vivos. Esta incidencia da cuenta de 166 casos nuevos por año (MINSAL-AUGE, 2002), muchos de los cuales son hijos de madres bajo tratamiento anticonvulsivante.

Pese a que no hay acuerdo internacional sobre la magnitud del daño que implicaría el uso de ácido valproico durante la gestación, la tendencia actual se orienta hacia la búsqueda de algún modulador que permita, pese al uso de los anticonvulsivantes, reducir el riesgo potencial que éste significa. Al Deeb *et al* (2000) demostraron que la

coadministración de ácido fólico y Vitamina E atenuaría los efectos teratogénicos del ácido valproico sobre el tubo neural en ratones, pero su rol en humanos no ha sido aclarado.

### **Ácido fólico:**

Perfil de seguridad: Vitamina liposoluble ampliamente estudiada durante el embarazo. La FDA la ha catalogado bajo perfil "A", es decir, que existen estudios que fallan en demostrar riesgos en el feto durante el primer trimestre de gestación (FDA, 2006).

Efectividad: En población no expuesta a ácido valproico, una revisión sistemática Cochrane (institución internacional de medicina basada en la evidencia) que involucró a 6425 mujeres, demostró que la suplementación periconcepcional con ácido fólico reduce la incidencia de defectos del tubo neural en los recién nacidos (RR: 0.28, 95% IC 0.13 a 0.58) (Lumley *et al.*, 2006).

Pese a que la suplementación con ácido fólico en población general es aceptada, no está claro si su uso protege de la embriotoxicidad y efectos teratogénicos de los anticonvulsivantes. Los estudios disponibles, conducidos tanto en animales como en humanos, han mostrado resultados contradictorios (Yerby, 2003). Pese a esto y dado que no se ha reconocido el rol de otro modulador, la recomendación sigue siendo suplementar con ácido fólico a las mujeres epilépticas que deban continuar recibiendo ácido valproico.

Se reportó el caso de un niño que nació con defectos del tubo neural, cuya madre recibió ácido valproico en dosis de 2.000 mg/día junto con ácido fólico, lo que sugiere que el ácido valproico no protege absolutamente contra las malformaciones (Craig *et al.*, 1999).

Se informa también que al menos un 30% de los defectos del tubo neural no son prevenibles con el consumo de suplementos de ácido fólico (Verrotti *et al.*, 2006).

Sin embargo, en nuestro país existe un estudio el cual informó un aumento de la frecuencia de nacimientos gemelares en madres que han recibido suplementación de ácido

fólico. El estudio reportó que la prevalencia de embarazos gemelares aumentó en un 34% desde que se fortificó la harina con ácido fólico, ésta conclusión refuerza la idea de encontrar otro modulador de la teratogenicidad inducida por el ácido valproico (Nazer et al., 2006).

### **Vitamina E:**

La vitamina E es un antioxidante natural, por lo cual se ha hipotetizado su rol preventivo en patologías asociadas al estrés oxidativo. (Navarová *et al.*, 2005).

Perfil de seguridad: La toxicidad de vitamina E es muy baja y sus efectos nocivos han sido escasamente notificados con dosis de hasta 2000 mg por día (Navarová *et al.*, 2005). El único efecto adverso constante del tratamiento con vitamina E son las alteraciones de la coagulación, fenómeno que ocurre exclusivamente en individuos con hipovitaminosis K preexistente (Kappus y Diplock, 1992).

Durante el embarazo, la FDA la ha catalogado bajo perfil "A", o sea, que existen estudios que fallan en demostrar riesgos en el feto durante el primer trimestre de gestación. La dosis estudiada en el embarazo es de 10 mg/ día. (FDA, 2006).

### Efectividad:

Hasta la fecha existen escasos estudios que evalúen la efectividad de la vitamina E en la disminución de malformaciones en embriones expuestos a ácido valproico.

Los estudios disponibles muestran:

- La suplementación con vitamina E, por si sola, no tendría ningún efecto significativo sobre la sobrevivencia fetal (Al Deeb *et al.*, 2000).
- El crecimiento, en peso y longitud, de los embriones expuestos a ácido valproico es significativamente mayor en el grupo suplementado con vitamina E (Al Deeb *et al.*, 2000).



- Las malformaciones observadas en el grupo expuesto se reducen al suplementar a las madres con vitamina E (Al Deeb *et al.*, 2000).
- En el esqueleto axil, los huesos atlas y el axis terminan su osificación de manera similar a la del grupo control. Se distinguen claramente las partes cartilaginosas y óseas de las costillas y no se observó alteraciones a nivel de costillas flotantes (Baran *et al.*, 2006a).

Actualmente, una de las hipótesis que se baraja para explicar el fenómeno protector que tendría la vitamina E en los fetos expuestos a ácido valproico tiene relación con su efecto antioxidante. La exposición de embriones de rata a altas concentraciones de oxígeno durante la neurulación temprana, o sea entre los días 9 y 10 de gestación, incrementa significativamente la incidencia de defectos del tubo neural. Este incremento varía según la capacidad del sistema antioxidante de combatir a los derivados de los radicales libres (Al Deeb *et al.*, 2000) y por tanto abre una nueva línea investigativa utilizando a la vitamina E como modulador.

Por otro lado, existe un estudio en el cual se evaluó el rol protector del ácido fólico y la vitamina E sobre los efectos tóxicos del ácido valproico en tejido hepático de hembras *Mus musculus* durante el período de gestación, se observaron cambios ultraestructurales en el grupo tratado con ácido valproico, así como también una protección en los grupos coadministrados con vitamina E y ácido fólico, se concluyó que ambos fármacos tienen un efecto protector de las células hepáticas. En este estudio, el mecanismo de protección, en el caso de la vitamina E, apuntaría también a un efecto antioxidante (Baran *et al.*, 2006b).

Se puede agregar también un estudio en el cual se trabajó con extracto de la hierba llamada *Silybum marianum* y vitamina E los que fueron administrados en conjunto por vía oral a ratones una hora antes de una dosis de ácido valproico. Al día 8 se midió la actividad enzimática de SGOT y SGPT, también se realizaron cortes de hígado para estudio histopatológico. Los resultados mostraron una hepatoprotección significativa respecto al grupo que solo recibió ácido valproico, concluyendo así que el extracto de esta hierba y la vitamina E pueden proteger el daño hepático causado por el ácido valproico en ratones (Kalantari y Talibi, 2003).

## **Hipótesis**

La hipótesis del presente estudio plantea que los fetos de ratón expuestos a ácido valproico en el día 8 de gestación, evidencian un aumento de malformaciones en el esqueleto axil y que estos defectos disminuyen significativamente con la coadministración de vitamina E. La vitamina E por si sola no produce malformaciones en el esqueleto axil.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar si la vitamina E disminuye los efectos adversos del ácido valproico en el embrión *Mus musculus* al ser utilizado como terapia anticonvulsivante.

### **Objetivos Específicos**

En los 4 grupos en estudio:

- Observar si existen diferencias en el tamaño de la camada.
- Comparar la longitud ápico-caudal de los fetos.
- Describir mediante lupa estereoscópica, las características mesoscópicas y microscópicas de la osificación del esqueleto axil.
- Reconocer posibles alteraciones en el grupo tratado sólo con vitamina E.
- Reconocer y cuantificar las malformaciones congénitas que se generan en el esqueleto axil.

## Material y Metodología

Todas las actividades fueron desarrolladas en el Laboratorio de Embriología Comparada, perteneciente al Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Se utilizaron 24 hembras *Mus musculus* juveniles de 6 semanas de vida, con un peso promedio de 25 gramos. Estas hembras se colocaron en las jaulas de machos reproductivamente activos en proporción de 3:1.

Para obtener crías de 8 días de gestación se procedió a observar diariamente (a las 8:00 AM) la vagina de las hembras buscando el tapón mucoso que se forma después de la cópula. Este tapón indica solamente que hubo coito, pero no asegura que hubo fecundación. Cuando se detectó el tapón, que es de color blanco, la hembra se trasladó a una jaula individual, consignando esta información en la tarjeta de reproducción de jaula, y considerando este momento como día cero de la preñez. La alimentación y el agua fue administrada *ad-libitum*, el alimento se suministró en forma de pellets. La luminosidad fue de 14 horas luz y 10 de oscuridad.

Se conformaron de esta manera, 4 grupos, constituidos por seis hembras cada uno, de tal manera que el número total de hembras gestantes fue de 24. Cuando las hembras cumplieron los ocho días de gestación recibieron el siguiente tratamiento.

Grupo 1: suero fisiológico (NaCl 0,9%) 0,3 ml una vez (grupo control).

Grupo 2: ácido valproico 400 mg/kg/peso por una vez (Atemperator®, laboratorio Recalcine®).

Grupo 3: vitamina E 200 UI por una vez (laboratorio Fasa®).

Grupo 4: ácido valproico 400 mg/kg/peso por una vez, previa administración de vitamina E 200 UI 1 hora antes.

Los fármacos se administraron por vía oral, utilizando micropipetas de 200 µl. Esta operación resultó fácil en la práctica ya que los ratones succionan el líquido de la micropipeta con agrado. Para cada tratamiento y animal se utilizaron puntas nuevas de manera de evitar contaminación entre los tratamientos.

La formulación comercial del ácido valproico utilizada fue la oral en frasco gotario. Según indica el fabricante, cada gota contiene 10 mg de ácido valproico como valproato de sodio y excipientes. En el caso de la vitamina E se utilizó la presentación en cápsulas blandas de 400 mg equivalentes a 400 UI. Se realizó una incisión mediante una hoja de bisturí en la cápsula, y se extrajo el contenido requerido. Posteriormente mediante una micropipeta se le administró a la hembra gestante. Luego de la administración de los medicamentos, los especímenes fueron devueltos a sus respectivas jaulas y trasladados a las dependencias del bioterio de la Facultad de Medicina durante nueve días.

El día 17 de gestación, las hembras fueron sacrificadas mediante dislocación cervical, de acuerdo a normativas éticas vigentes. Este procedimiento fue realizado por un médico veterinario con experiencia para evitar el sufrimiento del animal (ARAC, 1998). Posteriormente mediante una disección se separó el útero, y se depositó en una cápsula de Petri con suero fisiológico y se colocó en una cámara fría a -20°C. Luego de algunos minutos, tras confirmar que no existe movimiento fetal, éstos fueron extraídos desde el útero y depositados en una cápsula de Petri, eliminando la placenta y anexos embrionarios. Se repite el procedimiento anterior para tener la seguridad que ha transcurrido su muerte y que los fetos no experimentaron dolor.

Luego de esto, se procedió a examinar detalladamente los fetos, registrándose lo siguiente para cada camada y grupo experimental:

- Número total de fetos extraídos por camada para cada grupo.
- Longitud ápico caudal de cada feto mediante mediciones con papel milimetrado.
- Descripción detallada de las características externas de los fetos, consignando sus posibles defectos macroscópicos.

La mitad de los fetos de cada camada fueron procesados mediante el método de Hanken y Wassersug o diafanización (Anexo 1). Esta técnica se utiliza porque permite la transparentación de los tejidos facilitando el estudio de la forma y tinción de cartílagos y huesos. El esqueleto osificado se identifica por una coloración roja producto de la fijación de la alizarina sobre el hueso. El cartílago hialino se ve de color azul, debido a que el azul de Alcian detecta los glicosaminoglicanos los que se ven de coloración azul (Lettice *et al.*, 1999). Los fetos serán analizados mediante lupa estereoscópica marca ZEISS®, modelo Stemi DV4 con 320X de aumento máximo. Se obtuvieron fotografías digitales mediante cámara digital marca NIKON® modelo COOLPIX P1 de 8.0 megapíxeles.

La segunda mitad de los fetos de cada camada fueron procesados mediante técnica histológica, incluidos en parafina y fueron seccionados en forma seriada, tanto transversal como sagitalmente, utilizando un micrótomo a 5 µm. Los cortes histológicos se fijaron al portaobjeto con polilisina, y posteriormente fueron procesados con:

1. Técnica histológica corriente Hematoxilina - Eosina - Azul de Alcian (Anexo 2).
2. Técnica histoquímica de Von Kossa (Anexo 3). Permite visualizar la calcificación de los huesos.

Se analizaron y fotografiaron las secciones histológicas de cada muestra utilizando un microscopio marca NIKON® modelo Eclipse E 400. Las imágenes fueron almacenadas en formato JPG.

Luego se procede a la recolección de datos y su posterior análisis estadístico, se analizó para los 4 grupos en estudio: el tamaño de camada, la longitud ápico-caudal de los fetos, y las distintas malformaciones encontradas.

Con el fin de evaluar la significancia estadística para el tamaño de la camada, así como también para la longitud ápico-caudal se utilizó un análisis de varianza simple más test de Tukey. Para el análisis de las distintas malformaciones encontradas se utilizó la

prueba estadística de Ji-cuadrado. Para ambas pruebas, se consideró estadísticamente significativo un  $P \leq 0,05$ .

Como herramienta para estos análisis utilizó el programa estadístico InfoStat® (InfoStat, 2004), así como también fue utilizado el programa estadístico Statistica® (StatSoft, 2004).

## Resultados

### Tamaño camada

Las medias del tamaño de camada (número de fetos por hembra gestante) de los fetos de los 4 grupos de tratamientos, y las diferencias observadas mediante análisis de varianza más test de Tukey se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1: Análisis de Tamaño de la Camada (número de fetos por camada) de los 4 Grupos en Estudio.**

Grupo	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máy
1	6	7,5 A	0,84	11,16	7,00	9,00
2	6	8,7 A	1,21	13,97	7,00	10,00
3	6	8,3 A	1,51	18,07	7,00	10,00
4	6	8,7 A	3,78	43,58	6,00	16,00

Grupo 1 (control), Grupo 2 (ácido valproico), Grupo 3 (vitamina E), Grupo 4 (ácido valproico + vitamina E), n: número de camadas, Media (número de fetos por camada), DE (desviación estándar), CV coeficiente de variación. Mín (la camada con el menor número de fetos), Máx (la camada con el mayor número de fetos), test de Tukey: las letras distintas indican diferencias significativas. ( $p \leq 0,05$ )

No se encontró diferencias significativas en el tamaño de la camada entre los 4 grupos en estudio, esto se puede ver reflejado en el test de Tukey en donde las letras son iguales para cada uno de los grupos.

Para el Grupo 1 (control) la media fue 7,5 crías, el grupo tratado con ácido valproico tuvo una media de 8,7 fetos, el grupo tratado con vitamina E fue de 8,3 fetos, y el grupo 4 ácido valproico + vitamina E fue 8.7 fetos. En este aspecto debemos hacer notar que no se trata de fracciones de fetos. La prueba estadística indica que no hubo diferencias significativas entre los distintos grupos de tratamiento.

Hubo una alta variabilidad del tamaño de camada presente en los grupos en estudio, especialmente en el grupo 4 (tratado con ácido valproico + vitamina E) donde una hembra en particular tuvo 16 crías, esto se ve reflejado en la alta desviación estándar que presenta este grupo.

### **Longitud ápico-caudal**

En relación a la longitud ápico-caudal de los fetos, se observaron las siguientes medias y desviación estándar. Grupo 1:  $22,2 \pm 1,8$  mm, Grupo 2:  $20,6 \pm 2,4$  mm, Grupo 3:  $21,5 \pm 1,5$  mm y Grupo 4:  $20,7 \pm 1,7$  mm. De acuerdo a esto las camadas de las hembras del grupo 2 (ácido valproico) y las del grupo 4 (ácido valproico + vitamina E) presentaron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al grupo control según el test de Tukey. La diferencia entre el grupo 1 control y el grupo 3 no resultó ser estadísticamente significativa. Si comparamos el grupo 2 y el grupo 4 estos no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre si, por lo cual, el rol de la vitamina E no estaría influyendo en este descriptor.

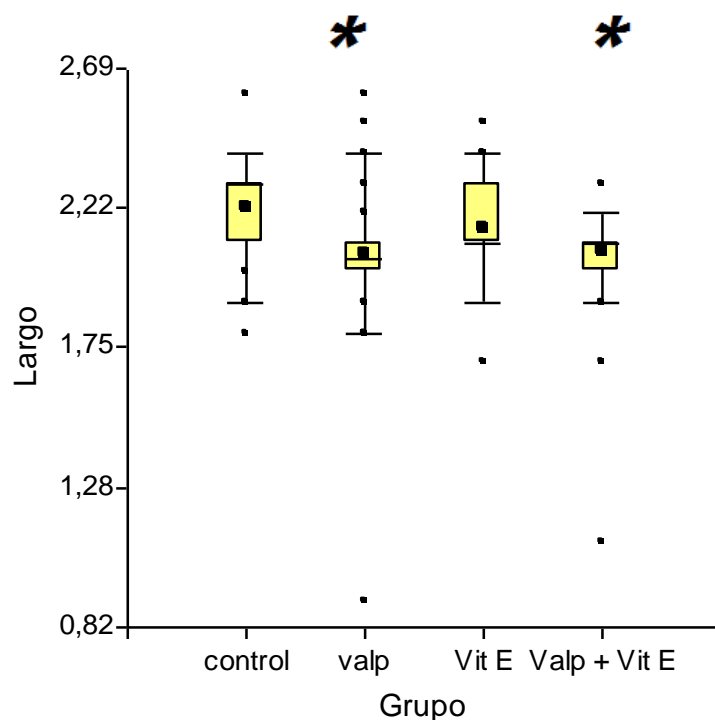
Las medias de la longitud ápico-caudal (mm) de los 4 grupos en estudio y las diferencias observadas mediante análisis de varianza más test de Tukey se muestran en la tabla 2 y gráfico 1.



**Tabla 2: Análisis de Longitud Ápico-caudal de los 4 Grupos en Estudio (medida en mm).**

Grupo	N	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
1	45	22,2 B	1,8	8,18	18,0	26,0
2	52	20,6 A	2,4	11,4	9,0	26,0
3	50	21,5 AB	1,5	7,16	17,0	25,0
4	52	20,7 A	1,7	8,21	11,0	23,0

Grupo 1 (control), Grupo 2 (ácido valproico), Grupo 3 (vitamina E), Grupo 4 (ácido valproico + vitamina E), n: número de fetos, DE (desviación estándar), CV coeficiente de variación. Mín (el feto de menor longitud), Máx (el feto de mayor longitud), test de Tukey: las letras distintas indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). El grupo 1 es significativamente diferente a los grupos 2 y 4



**Gráfico 1: Longitud Ápico-caudal (mm) de los Fetos de los 4 Grupos en Estudio.** Se presentan los datos con su promedio y desviación estándar, \* indican diferencias significativas versus el grupo control.

## **Análisis Morfológico de los Fetos**

En el esqueleto axil de los fetos de 17 días, mediante la técnica de Hanken y Wassersug (anexo1), se observó una progresión avanzada de la osificación endocondral en los cuerpos vertebrales y en el primer tercio de las costillas, permaneciendo los dos tercios restantes en etapa cartilaginosa (cartílago hialino), esto es similar en los 4 grupos en estudio (figuras 1a; 1b; 1c; y 1d).

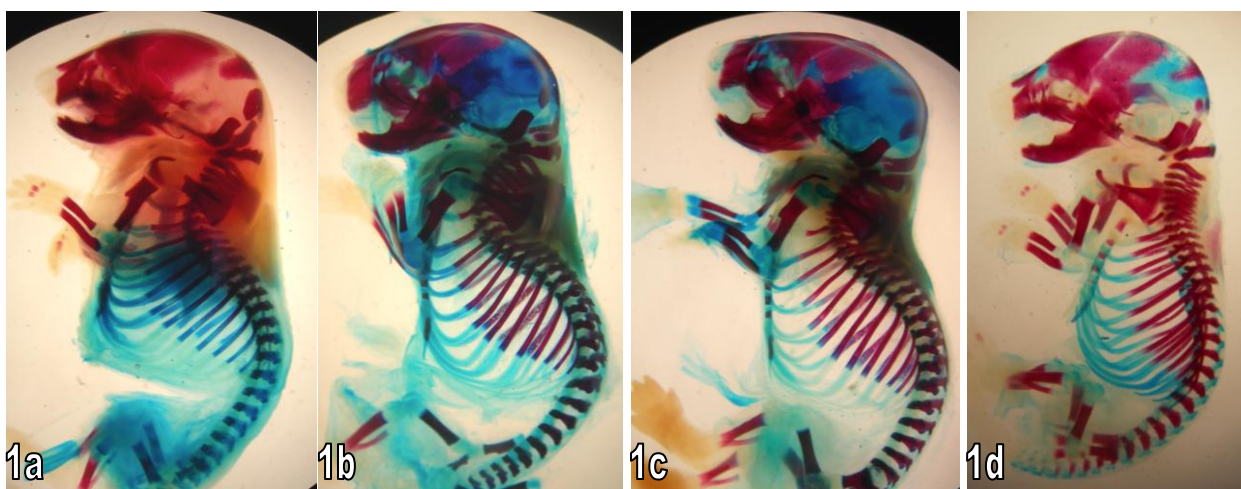
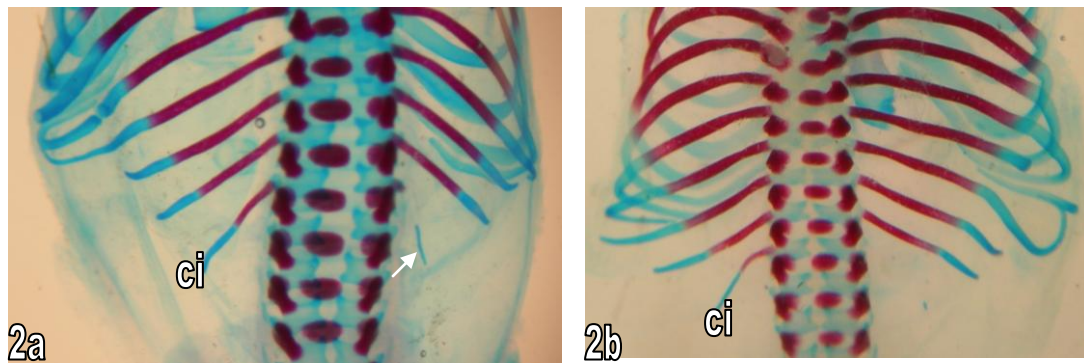


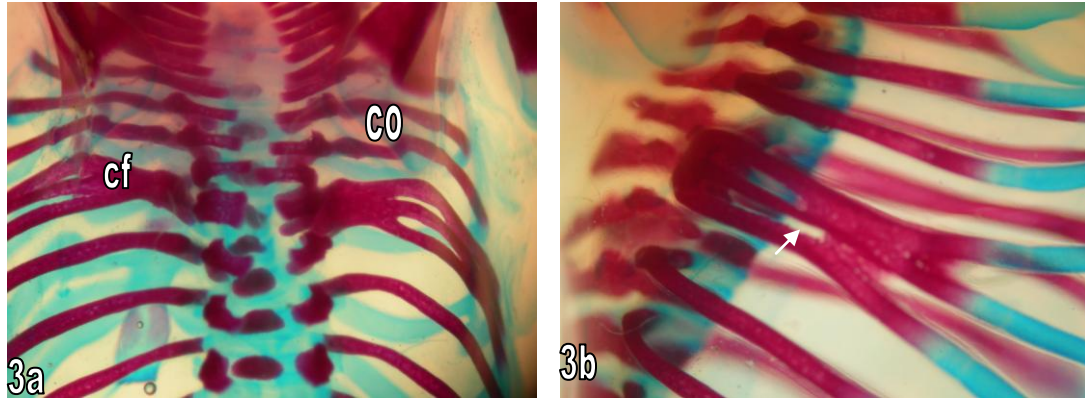
Figura 1: Fetos de los 4 grupos en estudio, vista lateral, tratados con técnica de Hanken y Wassersug, 3X. a) Control; b) Vitamina E; c) Ácido Valproico; d) Ácido Valproico + Vit E.

El número de cuerpos vertebrales fue 7 cervicales, 13 torácicos seguido por 5 o 6 vértebras lumbares, se identificó la presencia de costillas supernumerarias (figura 2), la mayor parte de las veces generadas desde la primera vértebra lumbar. La costilla izquierda (ci) evidenció un mayor desarrollo que la costilla derecha, en el lado derecho la costilla supernumeraria presenta tejido mesenquimático y en su parte mas apical cartílago hialino (flecha figura 2a). Se observó en el grupo 2 un significativo aumento de costillas accesorias lumbares uni y bilaterales  $p \leq 0,05$ .



Figuras 2a y 2b: Presencia de costillas supernumerarias, vista dorsal, técnica Hanken y Wassersug, grupo ácido valproico, 9.3X.

Se encontraron también en el grupo 2, fetos con dos o tres costillas fusionadas. La fusión ocurría en su parte ósea para luego separarse en su parte cartilaginosa (figuras 3a y 3b), esto no se observó en los otros tres grupos en estudio. En este carácter existe una diferencia significativa  $p \leq 0,05$  de costillas fusionadas en el grupo tratado con ácido valproico en comparación con el grupo control y con los otros dos grupos.



Figuras 3a y 3b: Se observan costillas onduladas (co) y tres costillas fusionadas en forma bilateral (cf), técnica Hanken y Wassersug, grupo ácido valproico, 3a vista dorsal, 9.3X y 3b vista lateral, 10X.

Se logró identificar también la presencia de costillas onduladas en fetos pertenecientes al grupo tratado con ácido valproico (figuras 3a y 4).

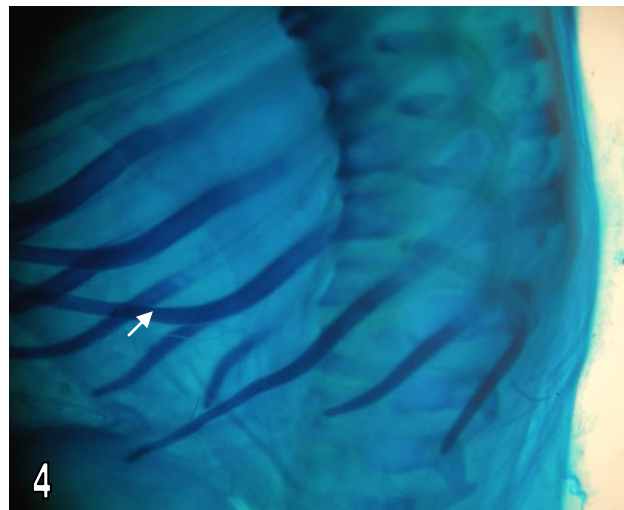
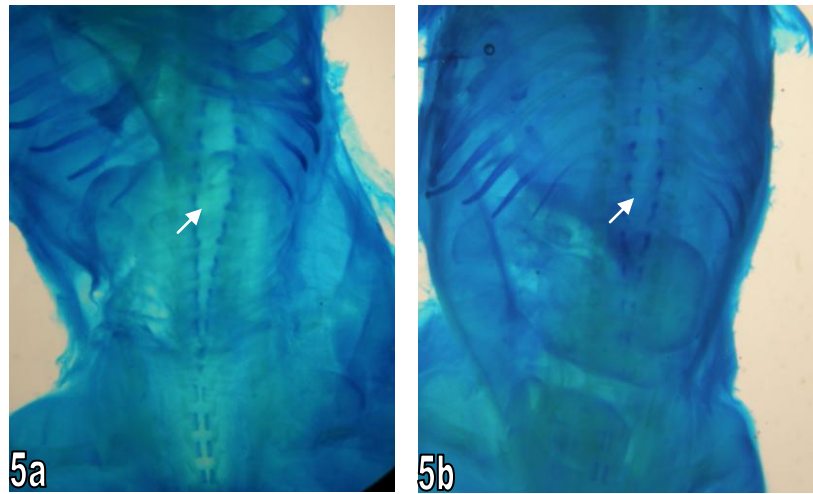


Figura 4: Costillas onduladas, vista oblicua, técnica Hanken y Wassersug, grupo ácido valproico, 10X.

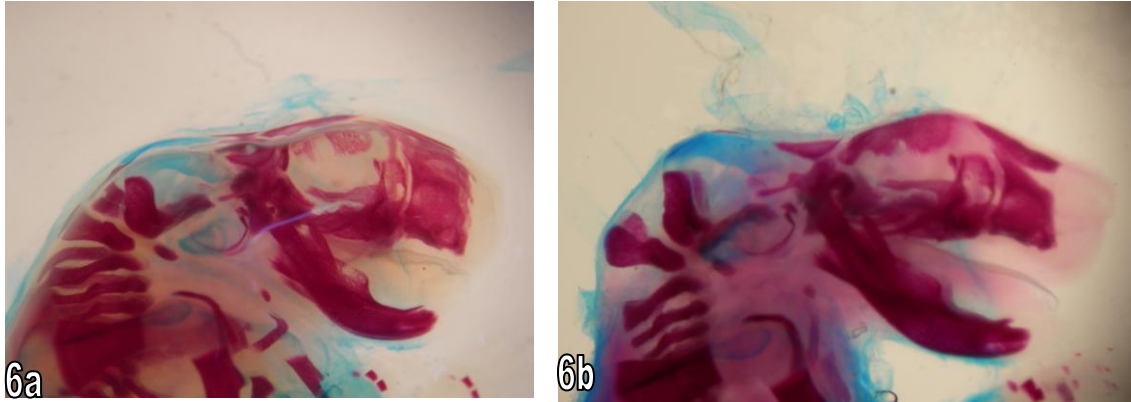
En 5 fetos tratados con ácido valproico se observó espina bífida, (figuras 5a y 5b) la cual no fue evidente en los otros grupos.



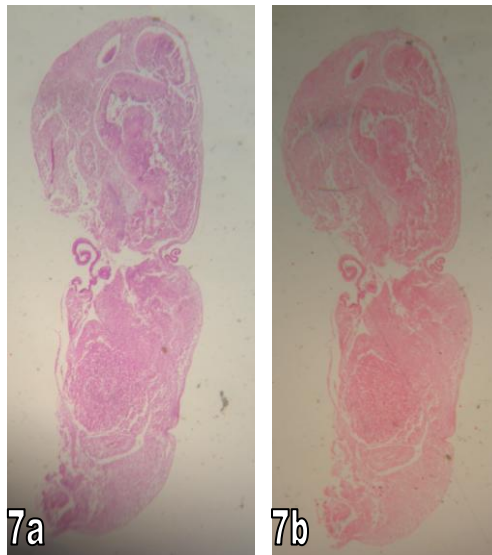
Figuras 5a y 5b: Espina bífida, vista dorsal, técnica Hanken y Wassersug, grupo ácido valproico, 7X.

Llama también la atención los ocho casos de exencefalia, encontrados con ácido valproico (figuras 6a y 6b). En esta malformación se observa la ausencia de huesos de la calota. Con la coadministración de vitamina E se identificó solo un caso.

Se encontró un feto amorfo en una camada de 16 fetos, cuya longitud era de 9 mm, lo cual era aproximadamente la mitad del tamaño del resto de la camada. Se observó cabeza, sin cara, cuello, y el cuerpo difícil de identificar con esbozos de extremidades. Los tejidos estaban alterados, sólo se pudo reconocer bien el sistema nervioso y algunos cartílagos. La técnica de Von Kossa indica que no hay calcificación ni huesos (figuras 7a y 7b).



Figuras 6a y 6b: Excencefalia, vista lateral, Técnica de Hanken y Wassersug, grupo ácido valproico, 8X.



Figuras 7a y 7b: Feto amorfo, vista lateral, grupo ácido valproico, 7a: Técnica H-E-Azul de alcian; 7b: Von Kossa, 8.75X.

En los grupos en estudio se reconocieron las siguientes malformaciones congénitas: costillas supernumerarias, costillas fusionadas, costillas onduladas, espinas bífidas, excencefalias, embriones amorfos, cuerpos vertebrales amorfos. En la tabla 3 se indican los porcentajes estas malformaciones.



**Tabla 3: Malformaciones Presentes en los 4 Grupos en Estudio Expresadas Porcentualmente.**

<b>Malformación</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
<b>Costillas supernumerarias</b>	8	29,6	3,7	22,2
<b>Costillas fusionadas</b>	0	33,33	0	0
<b>Costillas onduladas</b>	0	37,03	0	0
<b>Espinas bífidas</b>	0	18,51	0	0
<b>Excencefalias</b>	0	29,62	0	3,7
<b>Embrión amorfo</b>	0	3,7	0	3,7
<b>Cuerpo vertebral amorfo</b>	0	3,7	0	0

Las principales malformaciones en el grupo 2, tratado con ácido valproico fueron costillas onduladas, luego fusionadas, seguidas de costillas lumbares y excencefalia, espinas bífidas y finalmente embriones amorfos junto con cuerpos vertebrales amorfos.

En los grupos 1 y 3 no se evidenció ningún caso de costillas onduladas, fusionadas ni espinas bífidas. El grupo 4 presentó una alta incidencia de costillas supernumerarias, pero no evidenció costillas fusionadas, onduladas ni espinas bífidas.

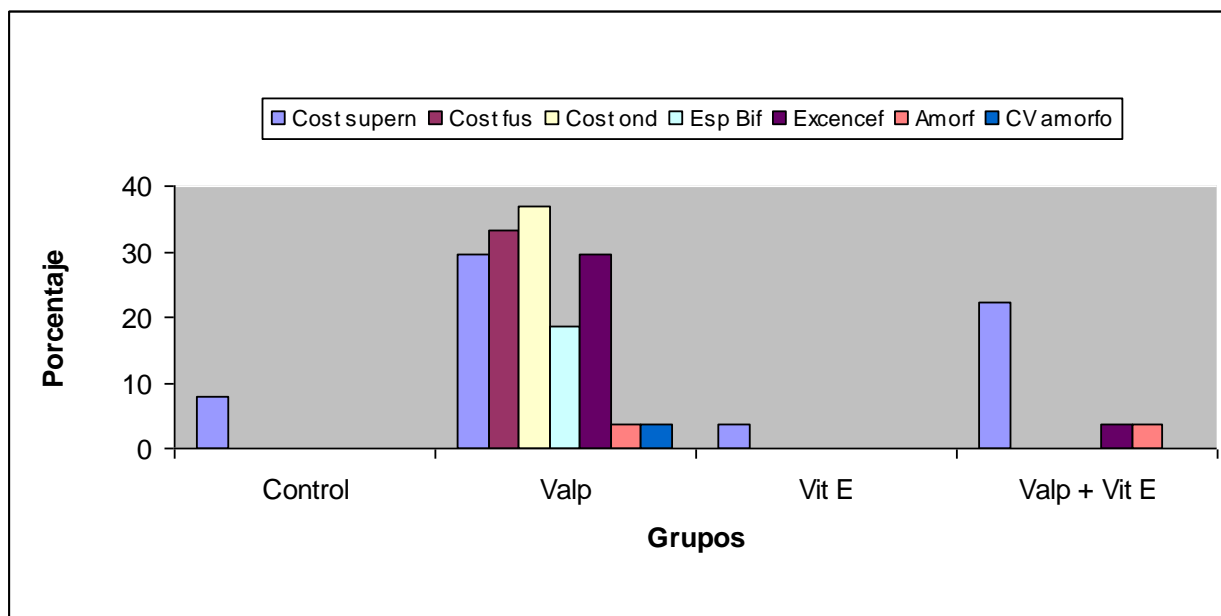
Cuando se realizó la determinación de la significancia estadística de las malformaciones congénitas, entre los cuatro grupos estudiados, mediante la prueba estadística no paramétrica de Ji cuadrado, que se utiliza para el caso de variables aleatorias continuas (Milton, 2007), se observó diferencias significativas entre los grupos en las siguientes malformaciones: costillas supernumerarias, costillas fusionadas, costillas onduladas, espinas bífidas, excencefalias y no se observaron estas diferencias: en embriones amorfos, ni cuerpos vertebrales amorfos (tabla 4).

**Tabla 4: Significancia estadística para las malformaciones encontradas en los grupos en estudio, valores de Ji Cuadrado**

**Comparaciones de las variables entre grupos**

<b>Variables a comparar</b>	<b>Valor de Ji cuadrado</b>	<b>Significancia</b>
<b>Costillas supernumerarias</b>	8,72	$P \leq 0,05$
<b>Costillas fusionadas</b>	28,77	$P \leq 0,05$
<b>Costillas onduladas</b>	32,31	$P \leq 0,05$
<b>Espinas bífidas</b>	15,35	$P \leq 0,05$
<b>Excencefalias</b>	21,15	$P \leq 0,05$
<b>Feto amorfo</b>	1,96	$P > 0,05$
<b>Cuerpo vertebral amorfo</b>	2,95	$P > 0,05$

Como se observa en el gráfico 2, existen diferencias relevantes entre las malformaciones de los distintos grupos en estudio cuando nos referimos a los porcentajes de éstas, se observan grandes diferencias en la totalidad de las malformaciones entre el grupo 2 que recibió ácido valproico y el grupo 4 (ácido valproico más la coadministración de vitamina E). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para la mayoría de las malformaciones. La vitamina E no generó efectos evidenciados con técnicas morfológicas, en el esqueleto axil.



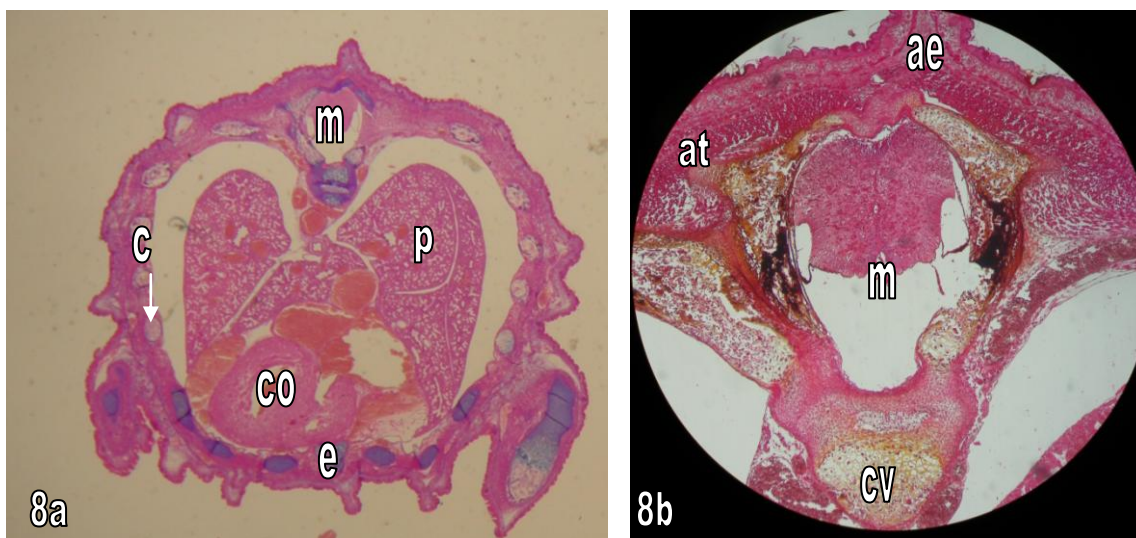
**Gráfico 2: Porcentaje de Cada Malformación en los 4 grupos en estudio.**



## Preparaciones Histológicas

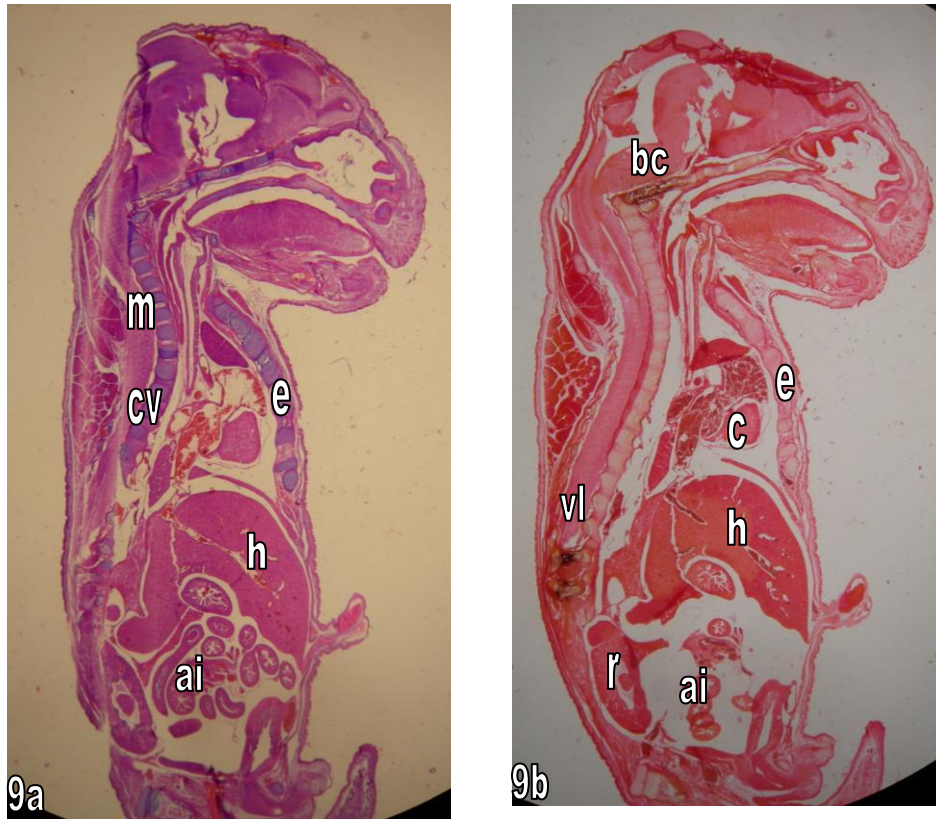
En los cortes transversales a nivel de tórax de grupo control se identifican costillas en proceso de osificación avanzado en la región dorsal, en cambio en la región ventral y esternón permanecen en etapa cartilaginosa, las extremidades se encuentran en etapa de osificación endocondral (figura 8a). La vértebra presenta también osificación en el cuerpo y apófisis transversa, pero no en la apófisis espinosa (figura 8b).

La médula espinal está protegida por un cuerpo vertebral, osificado pero no calcificado y el arco y sus correspondientes apófisis. Las cuales se evidencian en parte calcificadas. La unión de las apófisis espinosas, dorsal a la médula espinal no se encuentra osificada pero esta cerrada (figura 8b).



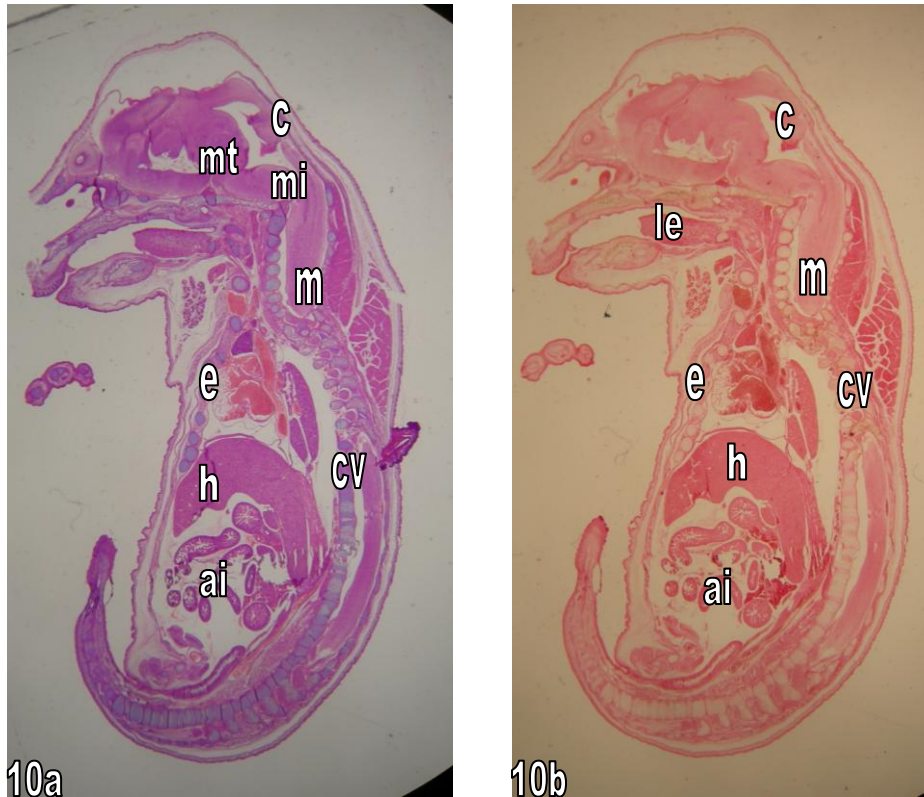
Figuras 8a y 8b: Cortes a nivel de tórax, corte transversal, grupo control, figura 8a: técnica H-E-azul de alcian. 10X, figura 8b técnica Von Kossa, 70X. Se observa m: médula espinal, c: costillas, p: pulmón, co: corazón, cv: cuerpo vertebral, at: apófisis transversa, ae: apófisis espinosa.

En fetos del grupo 3 tratado sólo con vitamina E (figuras 9a y 9b), se pudo observar calcificación en la zona de la base de cráneo (bc), y a nivel de las vértebras lumbares (vl). No se observaron alteraciones en cortes histológicos.



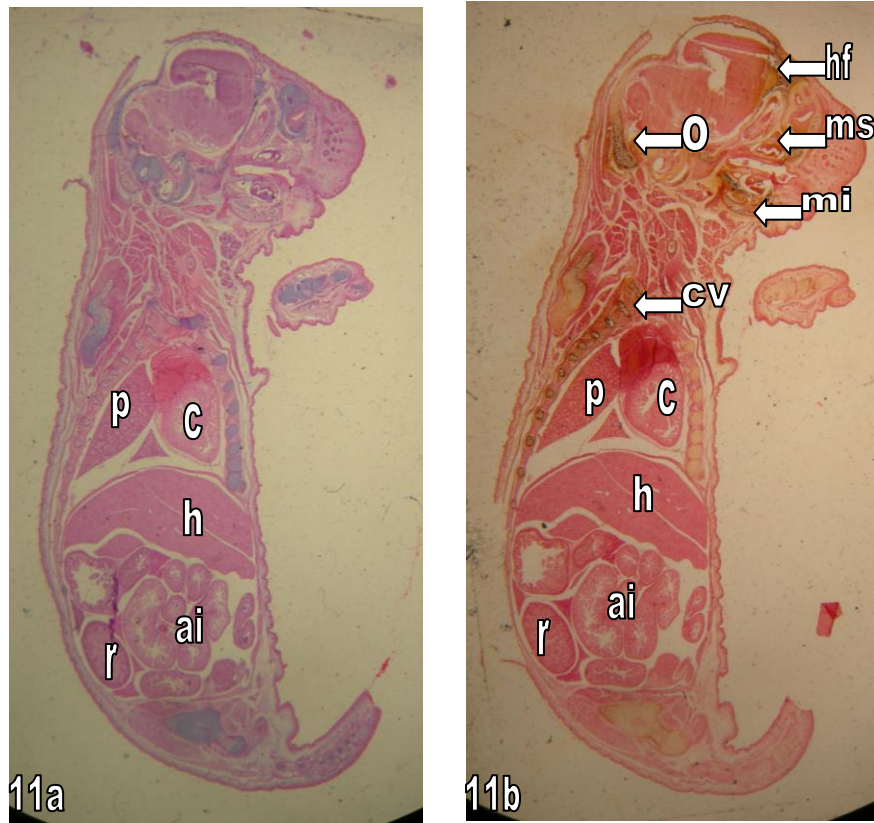
Figuras 9a y 9b: Preparación histológica de feto, corte sagital, grupo vitamina E, 7X, figura 9a: Técnica H-E-azul de alcian, figura 9b técnica Von Kossa. Se identifica además: m: médula espinal; cv: columna vertebral, ai: asas intestinales. r: riñón, c: corazón, e: esternón, h: hígado.

En cortes de fetos tratados con ácido valproico, desde el punto de vista histológico no se evidenciaron alteraciones de la histogénesis (figuras 10a y 10b). La única diferencia es que se observó fue una disminución de la calcificación detectada mediante la técnica de Von Kossa (figura 10b).



Figuras 10a y 10b: Preparación histológica feto, corte sagital, grupo ácido valproico, 5.6X, figura 10a técnica H-E-azul de alcian, figura 10b técnica de Von Kossa. Se identifica c: cerebelo, mt: metencéfalo, mi: mielencéfalo, m: médula espinal, cv: columna vertebral, l: lengua, ai: asas intestinales, e: esternón, h: hígado.

En fetos del Grupo 4, tratados con ácido valproico + vitamina E, se observa normalidad de órganos y tejidos, con técnica Von Kossa, se aprecia calcificación en los puntos indicados con flechas (figura 11b).



Figuras 11a y 11b: Preparaciones de fetos, cortes sagitales, grupo ácido valproico + vitamina E, 5.3X, figura 11a técnica H-E-azul de alcian, figura 11b técnica Von Kossa. Se observa además p: pulmón, c: corazón, h: hígado, r: riñón, ai: asas intestinales. Las flechas indican calcificación en el hueso frontal (hf), maxilar superior (ms), maxilar inferior (mi), occipital (o) y cuerpos vertebrales (cv). Se observa normalidad de órganos y tejidos, y calcificación en los huesos.

## Discusión

Al analizar los resultados obtenidos en el caso de la longitud ápico-caudal y someterlos a un análisis de varianza se observa que hubo una disminución significativa del tamaño de los embriones en el grupo 2 (ácido valproico) versus el grupo 1 (control) y el grupo 3 (vitamina E), sin embargo esta diferencia en el crecimiento corporal fue solamente de 1.5 mm.

En relación al tamaño de la camada sabemos que el promedio esperado es entre 5 y 10 crías (Montenegro y Mena, 1985), se obtuvieron promedios de entre 7,5 para el caso del grupo 1 control, y de 8,7 para el caso de los grupos 2 y 4, todo lo cual se encuentra dentro de los límites de normalidad para la especie y no presentaron diferencias estadísticamente significativa entre los grupos.

En nuestro estudio, el grupo de embriones expuestos a ácido valproico en el día 8 de gestación presentó principalmente falta de cierre del arco neural, dando como resultado una espina bífida oculta, y en otras ocasiones se observó excencefalia. Estas malformaciones que afectan al sistema nervioso, como resultado de la administración del ácido valproico durante el desarrollo embrionario, han sido profusamente documentadas en la literatura. (Al Deeb *et al.*, 2000; Verrotti *et al.*, 2006), nuestros resultados fueron similares a lo encontrado por otros autores.

Las malformaciones congénitas como la espina bífida se comprenden bien, si se recuerda que la inducción inicial para formar el arco vertebral proviene de la lámina superior del tubo neural, la cual conduce a la expresión de PAX-9 y de los genes que contienen homosecuencias Msx-1 y Msx-2. Este evento dirige a las células del esclerotoma lateral para configurar el arco vertebral. En este caso el tubo neural no logró inducir la formación de la cubierta correspondiente al arco neural. En el ratón la osificación del techo de los arcos vertebrales es tardía, y se puede observar en sus estadios mesenquimáticos o de condricificación en el día 17 post coito (Gilbert, 2003).



Se encontró que el ácido valproico inducía un aumento significativo de costillas accesorias lumbares, (29,6%) este porcentaje es muy superior a lo que se observa, en los embriones controles, donde la existencia de este tipo de costillas accesorias tiene una incidencia del 8%.

Resulta interesante comparar este trabajo con los resultados de Kessel (1992), quién estudió el efecto del ácido retinoico (AR) en hembras *Mus musculus* gestantes. En los embriones expuestos a AR en el día 8 de gestación, que corresponde a la gastrulación, ocurrió que la primera o la primera y segunda vértebras lumbares fueron transformadas hacia vértebras torácicas y se formaron costillas en ellas. Si recordamos que los ratones tienen solamente 7 vértebras cervicales, seguidas por 13 vértebras torácicas, 6 vértebras lumbares, 4 vértebras sacras y un número variable ( $\pm 20$ ) de vértebras caudales podríamos sugerir que en este estudio puede haber ocurrido exactamente lo mismo por efecto del ácido valproico, ya que la primera vértebra lumbar también presentó costillas, tanto unilateral como bilateralmente, este defecto disminuyó en los otros grupos, esto puede obedecer tal como lo indica Kessel a una expresión errónea de genes Hox específicos para estas vértebras (Kessel, 1992; Le Mouelic *et al.*, 1992).

La formación del patrón segmentario normal a lo largo del eje craneocaudal de la columna vertebral se puede garantizar porque la mayoría de las vértebras quedan determinadas por una única combinación de genes Hox. Por ejemplo, en el ratón, el atlas (C1) está caracterizado por la expresión de Hoxa-1, Hoxa-3, Hoxb-1 y Hoxd-4. El axis (C2) se especifica mediante estos cuatro genes junto con Hoxa-4 y Hoxb-4. El ácido retinoico (vitamina A) puede producir modificaciones de nivel craneal o caudal en la organización segmentaria global de las vértebras si la madre lo recibe en períodos específicos del desarrollo. Por ejemplo su uso precoz da lugar a un cambio craneal (la última vértebra cervical se transforma en la primera torácica, mientras que si se administra en gestación más avanzada, provoca un cambio caudal (las vértebras torácicas se extienden al nivel de las dos primera lumbares). Estas variaciones de nivel se denominan transformaciones homeóticas y son representativas de la amplia familia de mutantes homeóticos (Carlson, 2005). De acuerdo a lo anteriormente explicado, podríamos considerar que las

malformaciones observadas tendrían este origen, lo que además concuerda con los estudios de Baran *et al.* (2006a) quien indicó que el ácido valproico es capaz de alterar la expresión de estos genes de desarrollo.

Embriológicamente las costillas crecen desde las zonas de condensación de las células mesenquimatosas que quedan laterales al cuerpo vertebral (Carlson, 2005). Las costillas bifurcadas o fusionadas tienen la peculiaridad de ser asintomáticas y probablemente obedecen también a una expresión errónea de genes Hox específicos.

Uno de los objetivos del proyecto fue evaluar el rol de la vitamina E (alfatocoferol), este objetivo se cumplió a cabalidad ya que se pudo observar importantes diferencias en la presentación de malformaciones entre los diferentes grupos de tratamiento. Todos estos defectos disminuyeron significativamente con la coadministración de vitamina E, lo cual confirmaría la idea que el ácido valproico se relaciona con disminución de los niveles de vitamina E (Graf *et al.*, 1998).

Aún cuando la vitamina E demostró ser inocua para el desarrollo embrionario del esqueleto axil, y demuestra un marcado efecto protector de la teratogénesis inducida por el ácido valproico sobre el esqueleto de ratón *Mus musculus* no queda descartado que la vitamina E genere defectos en otros órganos y sistemas, tampoco se debe hacer extrapolaciones hacia otras especies. Los resultados que demuestran que la vitamina E ejerce un efecto protector del desarrollo embrionario, al disminuir considerablemente el número de malformaciones del esqueleto axil en embriones *Mus musculus*, al administrarla conjuntamente con ácido valproico, son acordes con los trabajos de Al Deeb *et al.* (2000).

La disminución de malformaciones encontradas en embriones tratados con vitamina E, fue evidente sobre todo en, espina bífida, costillas fusionadas, costillas lumbares y onduladas. Esto es importante, ya que la espina bífida es una de las malformaciones más graves producidas por el ácido valproico y que muchas veces es incompatible con la vida (tabla 3), esto sumado a la protección que los resultados reflejan para la excencefalia de 29,62% sin la coadministración de vitamina E versus un 3,7% con la protección de ésta. Nos permiten indicar que los objetivos de esta tesis han sido logrados.

Otro punto a resaltar es la validación de la vía oral como vía de administración del ácido valproico, puesto que hasta el momento sólo se había utilizado la vía subcutánea. La vía oral nos permitirá trabajar con tratamientos de tipo crónicos con ácido valproico, a diferencia de la vía subcutánea que sólo permite el tratamiento agudo. Con la vía de administración oral nos acercamos más a los niveles de biodisponibilidad que ocurren en humanos tratados con ácido valproico. Esto es de utilidad para estudios de biología del desarrollo.

Estos estudios representan un aporte para el conocimiento embriológico tanto del esqueleto axial de uno de los mas importantes animales de laboratorio *Mus musculus*, como para el conocimiento de la génesis de cuerpos vertebrales y costillas, pero en ningún caso pretenden una extrapolación a la especie humana en el estado actual de conocimientos.



## Conclusiones

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos afirmar que una dosis de 400 mg/kg peso vivo de ácido valproico administrados el día 8 de la gestación por vía oral, produce efectos teratogénicos en el esqueleto axil del ratón, como costillas supernumerarias o lumbares, costillas fusionadas, costillas onduladas, espinas bífidas, excencefalias, embriones amorfos, y cuerpo vertebral amorfo.

La presentación de estas malformaciones congénitas disminuyó significativamente cuando se coadministró el ácido valproico y la vitamina E. Esto confirma la hipótesis que indica que al administrar vitamina E exógenamente se evita la presentación de malformaciones del esqueleto axil.

La vitamina E administrada en dosis única, durante el día 8 del desarrollo, demostró ser inocua para la embriogénesis del esqueleto axil, pero se requieren futuros estudios para comprobar su inocuidad en todo el proceso de gestación.

Estos resultados representan un importante aporte para los estudios de la biología del desarrollo, porque se demuestra que el ácido valproico se comporta en forma similar al ácido retinoico, debido a que genera alteraciones morfológicas similares. Sin embargo el mecanismo por el que éstas se producen debe ser dilucidado. La co-administración de vitamina E en cambio contribuye a evitar estos defectos detrimentales.

## Bibliografía

- ADAB, N.; TUDUR, C.; VINTEN, J.; WILLIAMSON, P.; WINTERBOTTOM, J.** 2006. Fármacos antiepilépticos comunes en el embarazo en mujeres con epilepsia (Revisión Cochrane traducida). En: *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2006 Número 2. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>. (Traducida de *The Cochrane Library*, 2006 Issue 2. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.).
- AGUINAGA, M.; LLANO, I.; MAYÉN, D.G.; GARCÍA, R.** 2002. Polodactilia preaxial en recién nacidos expuestos a ácido valproico durante el embarazo: presentación de dos casos. *Perinatol. Reprod. Human.* 16:180-186.
- AKOS, C.** 2006. Risk of fetal death and malformation related to seizure medications. *Neurology.* 67:6-7.
- AL DEEB, S.; AL MOUTAERY, K.; ARSHADUDDIN, M.; TARIQ, M.** 2000. Vitamin E decreases valproic acid induced neural tube defects in mice. *Neurosci. Lett.* 292:179-182.
- ALSDORF, R.; WYSZYNSKI, D.F.** 2005. Teratogenicity of sodium valproate. *Expert. Opin. Drug. Saf.* 4:345-353.
- ARAC.** 1998. Guidelines for the euthanasia of mouse and rat fetuses and neonates. [en línea] <<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/euthmous.htm>> [consulta: 23-04-2006].
- BARAN, Ö.; NERGIZ, Y.; CUDI, M.** 2006a. The effects of valproic acid, vitamin E and folic acid on ribs of rat fetuses in the prenatal period. *Ann. Anat.* 188:117-125.

- BARAN, Ö.; KERVANCIOGLU, P.; AKKUS, M.; NERGIZ, Y.** 2006b. Ultrastructural investigation of the protective role of folic acid and vitamin E against toxic effects of valproic acid on maternal liver tissue during period of gestation. *Saudi. Med. J.* 27:407-409.
- BASU, A.; WEZEMAN, F.H.** 2000. Developmental Toxicity of Valproic Acid During Embryonic Chick Vertebral Chondrogenesis. *Spine.* 25:2158-2164.
- BJERKEDAL, T.; CZEIZEL, A.; GOUJARD, J.; KALLEN, B.; MASTROIACOVA, P., NEVIN, N.; OAKLEY, G. JR; ROBERT, E.** 1982. Valproic acid and spina bifida. *Lancet.* 2:1096.
- BLAHETA, R.A.; MICHAELIS, M.; HERNALIZ-DRIEVER, P.; CINATL, J.** 2005. The evolving anticancer drug valproic acids: insights into the mechanism and clinical studies. *Med. Res.* 25:383-397.
- CARDOZO DE MARTÍNEZ, C.A.; MRAD DE OSORIO, A.; MARTÍNEZ, C.; RODRÍGUEZ, E.; LOLAS, F.** 2007. El animal como sujeto experimental aspectos técnicos y éticos. CIEB Universidad de Chile. Santiago, Chile. 227 p.
- CARLSON, B. M.** 2005. Embriología Humana y Biología del Desarrollo. 3<sup>a</sup> ed. Editorial Mosby. Madrid, España. 527 p.
- COMRA.** 2002. Formulario Terapéutico C.O.M.R.A. Ministerio de Salud de la Nación – Programa PROAPS. Argentina. 47 p.
- CORTÉS F.** 2003. Prevención primaria de los defectos de cierre del tubo neural. *Rev. Chil. Pediatr.* 74:208-212.
- CRAIG, J.; MORRISON, P.; MORROW, J.; PATTERSON, V.** 1999. Failure of periconceptual folic acid to prevent a neural tube defect in the offspring of a mother taking sodium valproate. *Seizure.* 8:253-254.

- DALESSIO, D.J.** 1985. Current concepts: Seizure disorders and pregnancy. *New. Engl. J. Med.* 312:559-563.
- DAWSON, J.E.; RAYMOND, A.M.; WINN, L.M.** 2006. Folic acid and pantothenic acid protection against valproic acid-induced neural tube defects in CD-1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211:124-132.
- DUCHOWNY, M.** 2004. Neurobehavioral teratogenicity in antiepileptic drugs, The new Pandora's box. *Neurology.* 62:8-9.
- DEFOORT, E.N.; KIM, P.M.; WINN, L.M.** 2006. Valproic Acid Increases Conservative Homologous Recombination Frequency and Reactive Oxygen Species Formation: A Potential Mechanism for Valproic Acid-Induced Neural Tube Defects. *Mol. Pharmacol.* 69:1304-1310.
- EAMES, B.F.; DE LA FUENTE, L.; HELMS, J.A.** 2003. Molecular ontogeny of the skeleton. *Birth. Defects. Res. C. Embryo. Today.* 69:93-101.
- EIKEL, D.; LAMPEN, A.; NAU, H.** 2006. Teratogenic effects mediated by inhibition of histone deacetylases: evidence from quantitative structure activity relationships of 20 valproic acid derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* 19:272-278.
- EL-SAYED, Y.Y.** 1998. Obstetric and gynaecologic care of women with epilepsy. *Epilepsia.* 39:17-25.
- ELMAZAR, M.** 1995. Ethanol potentiates valproic acid-induced neural tube defect (NTDS) in mice due to toxicokinetic interactions, *Reprod. Toxicol.* 9:427-433.
- FAIELLA, A.; WERNIG, M.; CONSALEZ, G.G.; HOSTICK, U.; HOFMANN, C.; HUSTERT, E.; BONCINELLI, E.; BALLING, R.; NADEAU, J.H.** 2000. A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression. *Hum. Mol. Genet.* 9:227-236.

- FDA.** 2006. **Food and Drug Administration.** Categorization of drug risks to the fetus. [en línea] <[http://www.safefetus.com/fda\\_category.asp](http://www.safefetus.com/fda_category.asp)> [consulta 19-08-2006].
- FINNELL, R.H.** 1999. Teratology: General considerations and principles. *J. Allergy. Clin. Immunol.* 103:337-342.
- FINNELL, R.H., WAES, J.G., EUDY, J.D., ROSENQUIST, T.H.** 2002. Molecular basis of environmentally induced birth defects. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42:181-208.
- FLORA, S.J.** 2007. Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cell. Mol. Biol.* 53:1-2.
- GILBERT, S.** 2005. *Biología del Desarrollo.* 7<sup>a</sup> ed. Editorial Médico Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 902 p.
- GRAF, W.D.; OLEINIK, O.E.; GLAUSER, T.A.; MAERTENS, P.; EDER, D.N.; PIPPENGER, C.E.** 1998. Altered antioxidant enzyme activities in children with a serious adverse experience related to valproic acid therapy. *Neuropediatrics.* 29:195-201.
- GREENE, N.D.; COPP, A.J.** 2005. Mouse Models of Neural Tube Defects: Investigating Preventive Mechanisms. *Am. J. Med. Genet.* 135:31-41.
- GUTIÉRREZ, A.M.; MORENO, C.L.** 2005. The risk of defects in the neural tube caused by valproic acid and carbamazepine. *Rev. Neurol.* 41:268-272.
- HANKEN, J. AND WASSERSUG, R.** 1981. The visible skeleton. A new double-stain technique reveals the native of the "hard" tissues. *Funct. Photo.* 16:22-26.

**HOLMES, L.B.; HARVEY, E.A.; COULL, B.A.; HUNTINGTON, K.B.; KHOSHBIN, S.; HAYES, A.M.; RYAN, L.M.** 2001. The teratogenicity of anticonvulsant drugs. *N. Engl. J. Med.* 344:1132-1138.

**INFOSTAT.** 2004. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

**JURIMA-ROMET, M.; ABOIT, F.S.; TANG, W.; HUANS, H.S.; WHITEHOUSE, L.W.** 1996. Cytotoxicity of unsaturated metabolites of valproic acid and protection by vitamins C and E in glutathione-depleted rat hepatocytes. *Toxicology.* 112:69-85.

**KALANTARI, H.; TALIBI, F.** 2003. The protective effect of silybum marianum and vitamin e on liver toxicity induced by sodium valproate. *Toxicol. Lett.* 144:102.

**KÄLLÉN, B.** 2004. Valproic acid is known to cause hypospadias in man but does not reduce anogenital distance or causes hypospadias in rats. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 94:51-54.

**KAPPUS, H.; DIPLOCK, A.T.** 1992. Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free. Rad. Biol. Med.* 13:55-74.

**KARABIBER, H.; SONMEZGOZ, E.; OZEROL, E.; YAKINCI, C.; OTLU, B.; YOLOGLU, S.** 2003. Effects of valproate and carbamazepine on serum levels of homocysteine, vitamin B12, and folic acid. *Brain. Dev.* 25:113-115.

**KESSEL, M.** 1992. Respecification of vertebral identities by retinoic acid. *Development.* 115:487-501.

**KOZMA, CH.** 2001. Valproic acid embryopathy: report of two siblings with further expansion of the phenotypic abnormalities and a review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* 98:168-175.

- LAJEUNIE, E.; BARCIK, U.; THORNE, J.A.; EL GHOZZI, V.; BOURGEOIS, M.; RENIER, D.** 2001. Craniosynostosis and fetal exposure to sodium valproate. *J. Neurosurg.* 95:778-782.
- LE MOUÉLIC, H.; LALLEMAND, Y.; BRULET, P.** 1992. Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the Hox-3.1 gene. *Cell.* 69:251-264.
- LEIVA, S.; ALLIENDE, C.; SANS, J.; GONZÁLEZ, J.** 1984. *Histoquímica*. 2<sup>da</sup> ed. Santiago, Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de medicina, Universidad de Chile. 151p.
- LETTICE, L.A.; PURDIE, L.A.; CARLSON, G.J.; KILANOWSKI, F.; DORIN, J.; HILL, R.E.** 1999. The mouse bagpipe gene controls development of axial skeleton, skull, and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9695-9700.
- LOPEZ, M.L.; LEYTON, C.; GRAF, M.E.** 1982. *Técnicas de Histología y Citología*. 2da ed. Universidad de Chile. Santiago, Chile.
- LUMLEY, J.; WATSON, L.; WATSON, M.; BOWER, C.** 2006. Periconceptional supplementation with folate and/or multivitamins for preventing neural tube defects. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2000:1056.
- MACDONALD, R.L.; MCLEAN, M.J.** 1986. Anticonvulsant drugs: mechanisms of action. *Adv. Neurol.* 44:713-736.
- MALM, H.; KAJANTIE, E.; KIVIRIKKO, S.; KÄÄRIÄINEN, H.; PEIPPO, M.; SOMER, M.** 2002. Valproate embryopathy in three sets of siblings: Further proof of hereditary susceptibility. *Neurology.* 59:630-633.
- MARRARI, J.A.** (Ed). 2005. *Manual farmacoterapéutico: MF: Vademécum de especialidades medicinales*. 7<sup>a</sup> ed. Mercados del sur. Santiago, Chile. 1151 p.

- MENEGOLA, E.; BROCCIA, M.L.; PRATI, M.; RICOLFI, R.; GIAVINI, E.** 1996. Teratogenic effects of sodium valproate in mice and rats at midgestation and at term. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 16:97-108.
- MILTON, J.S.** 2007. Distribución ji-cuadrado e inferencias sobre la varianza. **In:** Estadística para biología y ciencias de la salud. Editorial Mcgraw-Hill. Madrid, España. pp. 432-436.
- MINSAL-AUGE.** 2002. Estudio de incidencia de malformaciones congénitas en RN en 9 maternidades Públicas de la Región Metropolitana, período 2001-2002.
- MINISTERIO DE SALUD.** 2002. Normas técnicas de epilepsia, primera edición, división de rectoría y regulación sanitaria. Santiago. Chile. 105 p.
- MINISTERIO DE SALUD.** 2005. Guía Clínica Epilepsia no Refractaria en personas desde 1 año y menores de 15 años 1st Ed. Santiago: Minsal.
- MONTENEGRO, M.A.; MENA, M.A.** 1985. Manual de laboratorio curso embriología comparada mecanismos de regulación, diferenciación y organización embrionaria. Santiago, Chile. 89 p.
- MORROW, J.I.** 2004. Getting It Right for Children Born to Mothers With Epilepsy: Morphology. Symposium held at the Austria Center in Vienna, Austria on May 30, 2004.
- NA, L.; WARTENBERG, M.; NAU, H.; HESCHELER, J.; SAUER, H.** 2003. Anticonvulsant valproic acid inhibits cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reactive oxygen species. *Clin. Mol. Teratol.* 67:174-180.



- NAVAROVÁ, J.; UJHÁZY, E.; DUBOVICKÝ, M.; MACH, M.** 2005. Phenytoin induced oxidative stress in pre- and postnatal rat development – effect of vitamin e on selective biochemical variables. *Biomed. Pap. Med.* 149:325-8.
- NAZER, J.; AGUILA, A.; CIFUENTES, L.** 2006. La frecuencia de nacimientos de gemelos aumentó en un hospital chileno coincidiendo con el consumo periconcepcional de harina fortificada con ácido fólico. *Rev. Méd. Chile.* 134:48-55.
- ORNOY, A.** 2006. Neuroteratogens in man: An overview with special emphasis on the teratogenicity of antiepileptic drugs in pregnancy. *Reprod. Toxicol.* 22:214-226.
- PERUCCA, E.** 2005. Birth defects after prenatal exposure to antiepileptic drugs. *Lancet. Neurol.* 4:781-786.
- PORTER, R. J.; MELDRUM, B. S.** 2002. Antiepilépticos. **In:** Katzung, B. G. *Farmacología básica y clínica.* 8<sup>a</sup> ed. México. pp. 451-476.
- REITER, P. D.; NICKISCH, J.; MERRITT, G.** 2005. Efficacy and Tolerability of Intravenous Valproic Acid in Acute Adolescent Migraine. *Headache.* 45:899-903.
- RICHMOND, J.** 2004. Epilepsy and Pregnancy: An obstetric perspective. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190:371-379.
- SANTANA, M.; PERNAS, R.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; DÍAZ-SANGUINO, J.; GÓMEZ-SÁNCHEZ, J.; RODRÍGUEZ-HUERTAS, F.** 2004. Hepatotoxicity by gabapentin. *Rev. Soc. Esp. Dolor.* 11:521-523.
- SATO, M.; SHIROTA, M.; NAGAO, T.** 1995. Pantothenic acid reduces valproic acid-induced neural tube defects in mice. *Teratology.* 52:143-148.

- SCHNEIDER, T.; ZIOLKOWSKA, B.; GIERYK, A.; TYMINSKA, A.; PRZEWLOCKI, R.** 2007. Prenatal exposure to valproic acid disturbs the enkephalinergic system functioning, basal hedonic tone, and motional responses in an animal model of autism. *Psychopharmacology*. 193:547-555.
- SEEGMILLER, R.E., HARRIS, C., LUCHEL, D.L., JUCHAU, M.R.** 1991. Morphological differences elicited by two weak acids, retinoic and valproic in rat embryos grown in vitro. *Teratology*. 43:133-150.
- SERRANO, S.; MARIÑOSO, M.L.** 1990. Bases histológicas de la histomorfometría ósea. In: Patología ósea metabólica. Barcelona, España. pp. 55-70.
- SPIEGELSTEIN, O.; CHATTERJIE N.; ALEXANDER G.; FINNELL R.H.** 2003. Teratogenicity of valproate conjugates with anticonvulsant activity in mice. *Epilepsy. Res.* 57:145-152.
- STATSOFT, Inc.** 2004. Statistica (data analysis software system), version 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- TONG, V.; TENG, X.W.; CHANG, T.K.; ABBOTT, F.S.** 2005. Valproic Acid II: Effects on Oxidative Stress, Mitochondrial Membrane Potential, and Cytotoxicity in Glutathione-Depleted Rat Hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 86:436-443.
- VERROTTI, A.; TANA, M.; PELLICCIA, P; CHIARELLI, F.; LATINI, G.** 2006. Recent advances on neural tube defects with special reference to valproic acid. *Endocr., Metab. Inmune. Disord.: Drug. Targets.* 6:25-31.
- YERBY M.** 2003. Management issues for women with epilepsy: neural tube defects and folic acid supplementation. *Neurology*. 61:23-26.

## Anexos

### Anexo 1: Método de Hanken y Wassersug

Para la implementación del método de Hanken y Wassersug o transparentado los fetos serán fijados en formalina neutra al 10% a lo menos por 10 días, posteriormente se removerá la piel, se lavará con agua destilada por algunas horas hasta un lapso de 2 días, se retirará el exceso de agua y se sumergirá en una solución (20 mg de azul de alcian 8GX, 70 ml de etanol absoluto y 30 ml de ácido acético glacial) durante 12 a 48 horas, hasta que el cartílago se torne azul.

Se retirará el exceso de solución y se colocará el espécimen en etanol absoluto por uno a tres días, cambiando el baño de alcohol al menos una vez durante este período. Se continuará con baños de alcohol etílico de concentraciones decrecientes (95; 75; 40 y 15) finalizando con agua destilada durante dos horas.

Se colocará el espécimen en una solución acuosa saturada, 30 ml de borato de sodio (bórax), 70 ml de agua destilada, 1 gramo de tripsina), se cambiará esta solución cada dos a tres días, o con mayor frecuencia si ésta se torna azulosa.

Se sumergirá el feto en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 0.5% diluido en agua destilada o alcohol etílico al 70%. Se saturará con rojo alizarina S (hasta tornar la solución de color púrpura), desde uno a varios días, hasta que los huesos se tornen de color rojo fuerte. Posteriormente se trasladará a concentraciones seriadas de glicerina-KOH al 0.5% (por ejemplo 3:1, 1:1, 1:3 hasta llegar al 100% de glicerina, al menos 24 horas en cada paso).

Los fetos permanecerán en blanqueo por varios días. Por último se agregará algunos cristales de timol o fenol a la glicerina pura para inhibir los hongos (Hanken y Wassersug, 1981).

Con esta técnica de tinción en estudios previos se han observado algunas malformaciones tales como: esquisis vertebral, ausencia de punto de osificación de las esternebras, suplicación vertebral a nivel torácico y lumbar, reducción de la 13<sup>o</sup> costilla y respecificación de la última vértebra lumbar (Menegola *et al.*, 1996).

## **Anexo 2: Técnica Histológica Corriente (Hematoxilina – Eosina – Azul De Alcían)**

Luego de la fijación, la cual puede ser realizada con cualquier fijador, se debe desparafinar los cortes e hidratar hasta el agua destilada de la siguiente forma:

- xilol I (5 minutos)
- xilol II (5 minutos)
- xilol III (5-10 minutos)
- alcohol 100% (5-10 minutos)
- alcohol 100%, segunda dosis (5 minutos)
- alcohol 95% (5 minutos)
- alcohol 70% (5 minutos)

Luego de cada paso dejar escurrir el exceso de solvente, luego lavar en agua destilada por 5 minutos, agregar solución al 1% de azul de alción pH 2,5; lavar con agua corriente y luego enjuagar en agua destilada.

Tinción nuclear con hemateína durante 4 a 6 minutos, lavar con abundante agua corriente (si fuere necesario diferenciar en alcohol clorhídrico al 0,5%, controlado al microscopio). Lavar en agua corriente por 10 minutos; si se desea apresurar el viraje, agregar unas gotas de amoníaco al agua (3 gotas en 100 ml). Lavar en agua para evitar restos de amoníaco. Tinción citoplasmática con eosina al 1% o bien floxina al 3% durante 1 a 2 minutos.

Lavado rápido en agua destilada; luego deshidratar en:

- alcohol 70% (2 a 3 minutos)
- alcohol 95% (2 a 3 minutos)
- nuevamente alcohol 95% (2 a 5 minutos)
- alcohol 100% (5 minutos)
- nuevamente alcohol 100% (5 minutos)
- aclarar en xilol I (5 minutos), xilol II (5 minutos), xilol III (5 minutos).

Montar en bálsamo del Canadá o resina sintética. Se observan los núcleos azules y el citoplasma junto con otros elementos tisulares rosa a rojo (López *et al.*, 1982).

Esta técnica permite obtener una visión en conjunto. Tiñe el osteoide de color rosa pálido y el hueso mineralizado de rosa oscuro (Serrano y Mariñoso, 1990).

### **Anexo 3: Tinción Von Kossa**

En el caso de la tinción de Von Kossa primero se debe desparafinar hasta el agua destilada, luego se colocan las placas en el nitrato de plata, filtrar con papel filtro por 10 minutos, y lavar en agua destilada (3 cambios de 5 minutos cada uno), posteriormente sumergir en otra solución por 10 minutos.

Lavar con agua corriente en la caja de tinción por 10 minutos. Enjuagar con agua destilada.

Llevar al Ponceau de xilidina por 30 a 45 minutos, luego lavado rápido con ácido acético al 1%. Enjuagar rápido con agua destilada, sumergir en solución de ácido fosfotúngstico - Orange G por 7 minutos, lavar en ácido acético al 1% en forma rápido y enjuagar en agua destilada, posteriormente deshidratar y montar.

La tinción de Von Kossa permite ver el ribete de osteoide de color rojo intenso y el hueso mineralizado de color negro. Este gran contraste facilita las lecturas histomorfométricas (Leiva *et al.*, 1984).