

EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL ÁCIDO VALPROICO SOBRE LA CORTEZA SOMATOSENSORIAL DE LAS RATAS (*Rattus norvegicus*)

Trabajo final de grado

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientación Neurociencias

Facultad de Ciencias - UdelaR

Diego Méndez Bonino

Orientador: Dr. Javier Nogueira

Laboratorio de Desarrollo y Plasticidad del Sistema Nervioso

Departamento de Histología y Embriología,

Facultad de Medicina- Universidad de la República



ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
Desarrollo del sistema nervioso	3
Las vibrisas de los roedores como modelo para el estudio del sistema somatosensorial	3
Trastornos del neurodesarrollo	5
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos.....	7
METODOLOGÍA	8
Animales.....	8
Tratamiento y grupos experimentales	8
Registro de peso y valoración de alteraciones macroscópicas	9
Colecta y procesamiento de encéfalos	9
Histoquímica para citocromo oxidasa	10
Inmunohistoquímica para c-Fos	11
Prueba de ambiente enriquecido	12
Obtención y procesamiento de imágenes	13
Análisis estadístico	13
RESULTADOS	15
Modelo ambiental de ácido valproico.....	15
Puesta a punto de la técnica histoquímica para citocromo oxidasa (COX)	16
Procesamiento de imágenes (COX)	17
Puesta a punto inmunohistoquímica (Fos)	18
Procesamiento de imágenes (Fos)	20
Marcación COX-Fos	20
Análisis de los cortes tangenciales de corteza cerebral: COX	20
Análisis de los cortes tangenciales de corteza cerebral: Fos	23
DISCUSIÓN	25
Puesta a punto de las técnicas	25
Tratamiento con ácido valproico	27
Conclusiones y perspectivas	29
BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

El desarrollo y maduración del sistema nervioso durante la gestación y el período posnatal temprano es altamente sensible a factores ambientales que modulan las capacidades sensoriales, motoras, cognitivas y sociales de los individuos, incidiendo en la probabilidad de desarrollar patologías psiquiátricas. Los trastornos del espectro autista (TEA) constituyen un conjunto heterogéneo de patologías del neurodesarrollo que se caracteriza por el deterioro de las interacciones sociales recíprocas, dificultades en la comunicación verbal, comportamientos repetitivos e intereses restringidos. Asimismo, se han reportado alteraciones del sistema somatosensorial aunque existen pocas referencias de las bases estructurales y funcionales implicadas. El tratamiento prenatal de roedores con ácido valproico (VPA) es un modelo ambiental de TEA que presenta un fuerte correlato con la clínica, y se basa en el efecto teratogénico del VPA observado en humanos. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tratamiento prenatal con ácido valproico en la organización cortical del sistema somatosensorial de vibrisas de la rata. En primer lugar, se pusieron a punto tres técnicas (histoquímica para citocromo oxidasa, inmunohistoquímica para Fos y la combinación de ambas para obtener un doble marcado), que permitieron el estudio de este sistema, en animales prenatalmente expuestos a VPA. Los animales expuestos presentaron alteraciones estructurales de la representación cortical de las vibrisas (corteza de barriles), entre las que se destaca una disminución en el tamaño del mapa, sin afectar los pesos corporales ni cerebrales. Asimismo, se observó que los animales tratados mostraron una tendencia hacia una menor actividad funcional del sistema evidenciada mediante la expresión de Fos, cuando exploraron un ambiente enriquecido. Este es el primer reporte que muestra cambios estructurales en la corteza de barriles en un modelo de VPA. Queda por determinar si la menor actividad funcional se mantiene al aumentar el número de individuos y si estas alteraciones se correlacionan con una disminución en la capacidad de discriminación táctil.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo del sistema nervioso

El establecimiento de los patrones generales de organización del sistema nervioso ocurre en etapas tempranas del desarrollo mediante mecanismos dependientes de la información genética [1][2], señales de interacción célula-célula y de la célula con la matriz extracelular [3], en un proceso previo a la formación de sinapsis e independiente de la actividad neuronal. Una vez establecidos los patrones generales de organización, la actividad nerviosa es responsable del refinamiento de los circuitos [4][5]. Durante las etapas tempranas de la vida posnatal, los patrones de actividad neuronal son guiados por las experiencias, permitiendo la adaptación estructural y funcional de los circuitos a las características del medio [6]. Estas ventanas temporales en las que la configuración de los circuitos neurales es altamente dependiente de la experiencia se conocen como períodos críticos del desarrollo [7].

Asimismo, los eventos ocurridos durante la gestación y las primeras etapas de la vida posnatal son capaces de modificar la trayectoria del desarrollo y maduración del sistema nervioso, modulando las capacidades sensoriales, motoras, cognitivas y sociales de los individuos, e incidiendo en la probabilidad de desarrollar patologías psiquiátricas en el transcurso de la ontogenia [8].

El sistema somatosensorial en particular tiene un importante papel en el desarrollo del individuo, y se encuentra alterado en distintos trastornos del neurodesarrollo [9][10]. Además, estas alteraciones se han visto asociadas con déficits en la comunicación, las habilidades motoras y las interacciones sociales [11][12].

Las vibrisas de los roedores como modelo para el estudio del sistema somatosensorial

La somatosensación mediada por las vibrisas es un sistema formado por un grupo de pelos que se ubican alrededor del hocico (vibrisas o *whiskers*) y que actúan como receptores táctiles que permiten la exploración activa del ambiente [13][14]. Se considera que ha evolucionado a partir de un sistema más rudimentario presente en un ancestro común a marsupiales y placentados como una ventaja adaptativa en especies de hábitos nocturnos [13][15]. El movimiento activo de las vibrisas (también llamado *whisking*) permite a los individuos realizar una variedad de funciones comportamentales como la exploración de nuevos ambientes, el reconocimiento de objetos, la navegación espacial y la interacción social [15][16].

En las ratas, las vibrisas adoptan una disposición en cuadrícula a cada lado del hocico. Allí se pueden distinguir unas vibrisas cortas, delgadas, más cercanas a la nariz, denominadas microvibrisas y otras vibrisas más largas, rígidas, caudales a las anteriores, conocidas como macrovibrisas. Estas últimas, forman una malla de cinco filas y entre cuatro y siete columnas [17]. Los folículos pilosos de estas vibrisas están inervados por axones distales de neuronas pseudounipolares del ganglio trigémino, mientras que los axones proximales proyectan hacia núcleos del complejo trigeminal del tronco encefálico ipsilateral (Figura 1A y B). En este complejo, las neuronas que reciben información sensitiva desde las células del ganglio trigémino forman agregados discretos denominados barriletes (*barreletts*), que representan cada vibrisa de forma individual (Figura 1C). Estos barriletes poseen una organización somatotópica que se corresponde con la distribución de las vibrisas en el hocico ipsilateral. A su vez, las neuronas de los barriletes envían proyecciones que decusan y proyectan sobre el núcleo ventro-posterior medial (VPM) del tálamo contralateral, formando otras agregaciones somatotópicas denominadas barriloides (*barriloids*) (Figura 1D). En último lugar, las aferencias de las neuronas talámicas de los barriloides forman agregados cilíndricos denominados barriles (*barrels*) en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria, estableciendo conexiones en una relación uno a uno entre cada vibrisa y cada barril contralateral. De esta forma, en la corteza somatosensorial primaria puede observarse un mapa de barriles dispuestos en filas (A-E) y columnas (1-5), separados por espacios denominados septos [17] (Figura 1E). Una forma clásica de demostrar este mapa es mediante el uso de la técnica histoquímica para citocromo oxidasa [18][19].

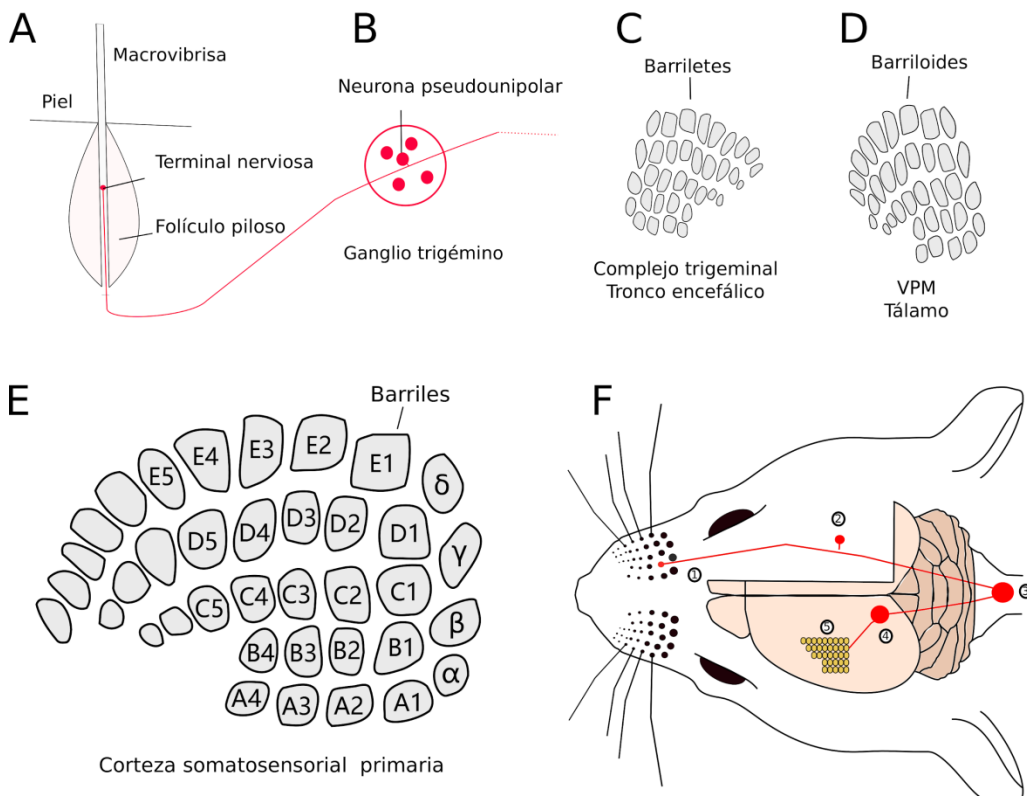


Figura 1. Esquema de la vía sensorial del sistema de vibrisas de la rata. La vía del sistema de vibrisas comienza en los folículos pilosos de las vibrisas localizadas a cada lado del hocico del animal (A). Los folículos pilosos están inervados por terminales nerviosas periféricas de células pseudounipolares localizadas en el Ganglio Trigémino (B). A su vez, las ramas proximales de los axones proyectan hacia el Complejo Trigeminal del tronco encefálico ipsilateral formando agregados discretos organizados somatotópicamente denominados barriletes, que corresponden al área de representación de cada vibrisa (C). Las neuronas de los barriletes proyectan y decusan hacia el núcleo ventro-posterior medial (VPM) del tálamo contralateral, formando otra serie de agregaciones somatotópicas denominadas barriloides (D). Finalmente, las neuronas del tálamo proyectan hacia la corteza somatosensorial primaria formando agregados cilíndricos discretos denominados barriles, dispuestos en filas (A-E) y columnas (1-5) (E). En (F) se muestra el esquema general de la vía.

Las características estructurales antes descritas hacen de este sistema un modelo ventajoso para el estudio de los procesos de desarrollo y plasticidad del sistema nervioso [20]. Este sistema se organiza de forma tal que la representación neural de cada vibrisa puede analizarse estructural y funcionalmente a lo largo de toda la vía y con relativa facilidad. Además, es un sistema de fácil acceso que permite realizar manipulaciones experimentales tanto a nivel central como periférico. Es así que el sistema de *whiskers* resulta un excelente modelo biológico para estudiar el papel de los factores genéticos y ambientales involucrados en los procesos de organización estructural y funcional de los circuitos neurales locales y de los mecanismos que subyacen a la formación de mapas somatotópicos, así como de los procesos de neuroplasticidad que operan durante el período posnatal temprano [20][21][22].

Trastornos del neurodesarrollo

Se han identificado múltiples factores genéticos y ambientales que pueden predisponer a desarrollar desórdenes del sistema nervioso. Es posible que las alteraciones del desarrollo no se deban únicamente a la presencia de uno u otro de estos factores sino a una combinación de los mismos. Un ejemplo de esto lo encontramos en los trastornos del espectro autista (TEA), que constituyen un conjunto heterogéneo de patologías cuya condición se establece tempranamente en el desarrollo del sistema nervioso y continúa durante toda la vida del individuo [23]. Este tipo de trastornos se caracteriza por alteraciones en la comunicación e interacción social, comportamientos repetitivos robustos e intereses restringidos y deficiencias sensoriales como la respuesta anormal a estímulos inocuos [24][25]. Con respecto a su etiología, se han descrito diferentes factores genéticos capaces de explicar la predisposición al desarrollo de TEAs [26][27].

El fenotipo comportamental exhibido en estos trastornos se puede reproducir en animales experimentales mediante distintos modelos genéticos, entre los que se encuentran *Mecp2*, *Shank3* y *Fmr1*. A partir de estos modelos, se han podido estudiar

más en profundidad las vías bioquímicas subyacentes y las bases celulares asociadas a los mismos [28]. Particularmente, en el sistema somatosensorial, se evidenció que estos modelos presentan hipersensibilidad a estímulos táctiles ligeros, discriminación y defensividad táctil alteradas, así como la disfunción de neuronas sensoriales [29][30][31]. En un modelo de *knockout* (KO) para *Mecp2*, se han reportado alteraciones estructurales en la corteza somatosensorial de barriles [32].

Si bien los modelos basados en alteraciones genéticas descritas en humanos resultan de gran interés, ninguna de las alteraciones identificadas permite explicar más de 1-2.5% de los casos registrados. Es por este motivo que la asociación con factores ambientales ha cobrado relevancia durante los últimos años, identificándose distintos factores pre y posnatales relacionados con el aumento de la probabilidad a desarrollar trastornos del espectro autista [33][34][35].

El ácido valproico (VPA, por sus siglas en inglés) es un factor ambiental que altera las trayectorias del neurodesarrollo, con un fuerte correlato clínico basado en la capacidad teratogénica del VPA observada en humanos. Las mujeres que durante la etapas tempranas del embarazo reciben tratamiento con VPA como antiepiléptico, tienen mayor probabilidad de que sus hijos desarrollen estos trastornos [36][37]. En particular, la exposición prenatal aumenta el riesgo de desarrollar alteraciones anatómicas [38][39], déficits atencional, hiperactividad, deficiencias en la comunicación y sociabilidad [40][41], así como hiperexcitabilidad [42]. En roedores se ha determinado que la exposición temprana de los embriones a VPA, próxima al período en que el tubo neural se cierra, induce anormalidades anatómicas y comportamentales similares a las observadas en pacientes humanos con TEA [43]. Entre los reportes se encuentran: hiperactividad, comportamientos repetitivos, menor actividad exploratoria, comportamientos sociales alterados así como déficits sensoriales como la hipersensibilidad a estímulos inocuos [44][45].

Dado que la información disponible sobre las alteraciones del sistema somatosensorial está restringida sobre todo a modelos genéticos de TEA, resulta interesante analizar el efecto de los factores ambientales, y del ácido valproico en particular, sobre el desarrollo de dicho sistema en la rata.

HIPÓTESIS

El tratamiento prenatal con ácido valproico produce alteraciones estructurales y funcionales en el sistema somatosensorial de vibrisas de la rata, similares a las observadas en modelos genéticos de trastornos del espectro autista.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto del tratamiento prenatal con ácido valproico en la organización anatomo-funcional de la corteza somatosensorial de vibrissas de la rata.

Objetivos específicos

1. Poner a punto la técnica histoquímica para la detección de la enzima citocromo oxidasa en la corteza de barriles.
2. Poner a punto la técnica inmunohistoquímica para la detección de la proteína Fos, como marcador de actividad neuronal.
3. Diseñar un protocolo estandarizado de procesamiento de imágenes para la obtención de parámetros morfométricos de la corteza de barriles obtenidos con la técnica histoquímica.
4. Comparar la organización estructural de la corteza de barriles entre dos grupos experimentales (control salino y tratamiento con ácido valproico).
5. Comparar la presencia de un marcador de actividad neuronal sobre la corteza de barriles entre dos grupos experimentales (control salino y tratamiento con ácido valproico), luego de una prueba de exploración activa en un ambiente nuevo y enriquecido.

METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) macho de la cepa Wistar, dado que este trastorno es diagnosticado cuatro veces más en hombres que en mujeres [25]. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de humedad (45-65%), temperatura (20-22°C), ciclo de luz-oscuridad (12-12hs), y con comida y agua *ad libitum*, en el Laboratorio de Experimentación Animal de Facultad de Ciencias de la Universidad de la República. Los protocolos experimentales fueron evaluados y aprobados en la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Ciencias (Exp. 240011-000425-20).

Tratamiento y grupos experimentales

Para la obtención de los animales experimentales, se realizaron cruzamientos de hembras receptivas (proestro tardío) con machos sexualmente activos, registrando la fecha de los mismos como día de gestación 0. Se crearon dos grupos experimentales, divididos en controles y tratados. En el grupo tratado se administró a ratas gestantes una única dosis intraperitoneal de VPA (500 mg/Kg) disuelto en solución salina (NaCl 0,9%) en el día 12,5 de gestación [45]; mientras en el grupo control, se administró a ratas gestantes el mismo volumen de solución salina mediante una única inyección intraperitoneal, el mismo día de gestación (Figura 2). Las hembras gestantes fueron alojadas en cajas de a cuatro, divididas de acuerdo al tratamiento recibido, y en el día 19 de gestación se realojaron en cajas individuales. El día del parto se contabilizó como día 0 postnatal. Una vez nacidas las crías, se unificaron las camadas obtenidas en un número de 4 hembras y 4 machos por camada. En el día 21 posnatal se separaron las crías de las madres. Una cohorte se dejó crecer hasta el rango de días postnatal 45-55 (P45-P55) y fue utilizada para determinar la actividad citocromo oxidasa y otra cohorte hasta el rango de día posnatal 54-74 (P54-P74) utilizadas para la inmunohistoquímica contra Fos.

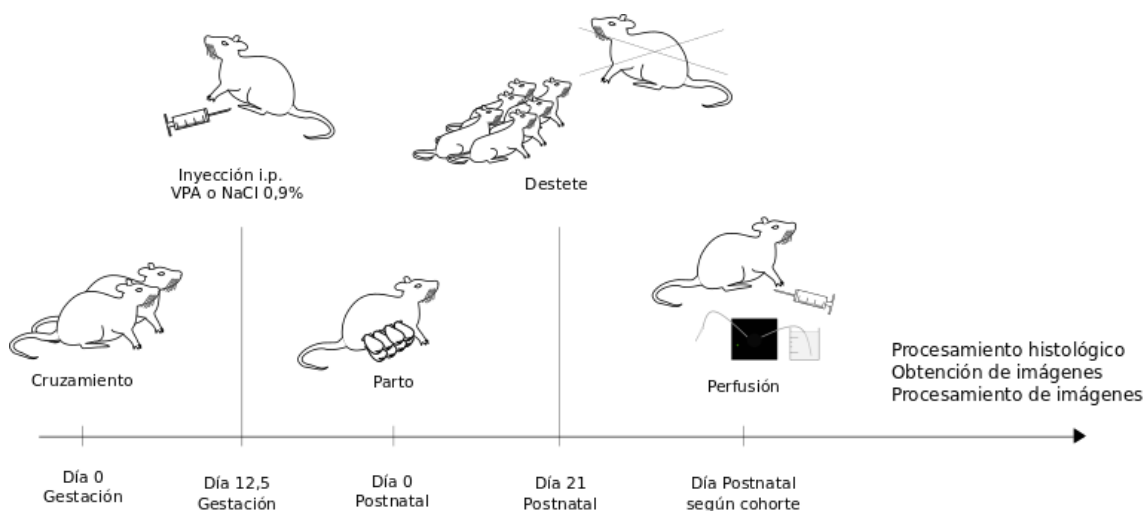


Figura 2. Esquema del tratamiento farmacológico. El día del cruzamiento se registró como día gestacional 0. En el día 12,5 gestacional se conformaron los grupos experimentales divididos en tratados y controles, mediante una única inyección intraperitoneal con ácido valproico (VPA, 500 mg/Kg) disuelta en solución salina o el mismo volumen solución salina (NaCl 0,9%). El día del parto se contabilizó como día postnatal 0. El día postnatal 21 se separaron las madres de las crías y se las dejó crecer hasta el día de la perfusión.

Registro de peso y valoración de alteraciones macroscópicas

Se contabilizó el número de macrovibras del hocico de los roedores y se valoró la existencia de alteraciones en la anatomía de la cola. También se registraron los pesos corporales y cerebrales, dado que en estudios previos se observó una disminución de los pesos así como la aparición de defectos en la anatomía de las colas de los individuos expuestos prenatalmente a VPA [44][46], utilizándolo como un reportero de la efectividad del tratamiento.

Colecta y procesamiento de encéfalos

Para obtener los encéfalos, los animales se anestesiaron con tiopental sódico (80 mg/Kg) por vía intraperitoneal. Luego de anestesiados, se perfundieron de forma transcardíaca con solución de buffer fosfato heparinizada (5 minutos), seguida de solución de paraformaldehído al 4% (1mL/g). A continuación, se disecaron los encéfalos para posteriormente analizar la corteza somatosensorial. Algunos encéfalos fueron utilizados para cortes coronales mientras que otros fueron utilizados para realizar cortes tangenciales a la superficie cortical. Para los primeros, luego de disecado el encéfalo, se realizaron dos cortes transversales al mismo: el primero por delante del septum triangular, y el segundo inmediatamente anterior a la glándula

pineal (Figura 3A). Las piezas de cerebro obtenidas fueron postfijadas durante tres horas y conservadas en buffer fosfato a 4°C hasta el momento del corte. Por otro lado, los cerebros utilizados para cortes tangenciales tuvieron una disección más minuciosa. Inmediatamente después de disecado el encéfalo, se procedió a disecar la corteza somatosensorial primaria. En primer lugar se realizaron dos cortes transversales sobre el encéfalo de la misma forma que fueron realizados para la obtención de los cortes frontales (Figura 3B). Luego, se separaron los hemisferios cerebrales mediante un corte sagital, para posteriormente diseccionar minuciosamente las regiones corticales del órgano mediante la ayuda de un bisturí. Una vez obtenida la corteza, la misma se postfijó bajo un vidrio durante tres horas para permitir su aplanado y mejorar así la visualización del mapa de la corteza de barriles. Tras la postfijación se incubaron las cortezas en buffer fosfato a 4°C hasta el momento del corte. Los cortes se realizaron a 40 micrómetros de espesor, de forma coronal o tangencial a la superficie cortical utilizando un vibrátomo Leica VT1000S, en una cuba con buffer fosfato.

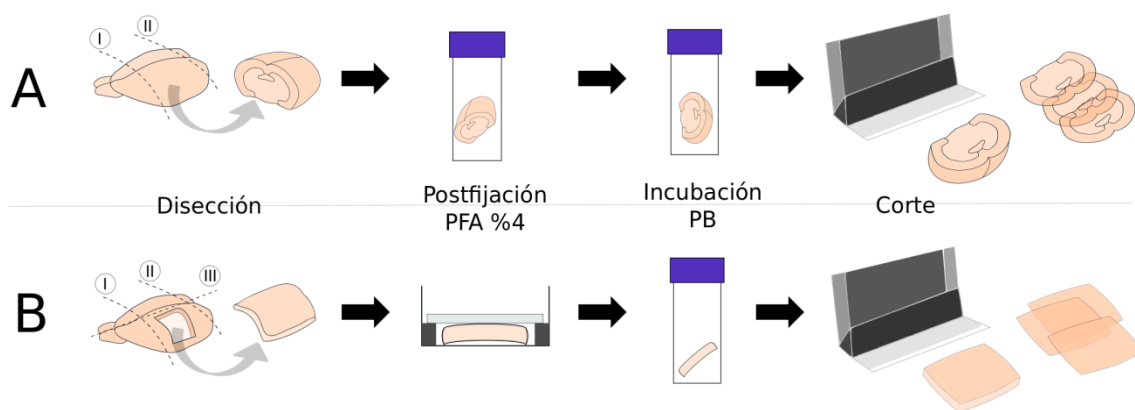


Figura 3. Esquema de la disección del cerebro para la obtención de cortes. Luego de la perfusión intracardiaca del animal se procedió a la disección de los cerebros. Para la obtención de cortes coronales se realizaron dos cortes con cuchilla transversales al órgano (A): uno anterior al septum triangular (I) y el segundo inmediatamente anterior a la glándula pineal (II). A continuación, la pieza de cerebro se postfijó durante 3 horas en paraformaldehído (PFA) 4% y luego se incubó en buffer fosfato (PB) hasta el momento del corte en vibrátomo. Para la obtención de los cortes tangenciales, se realizaron dos cortes transversales al órgano igual que para los cortes coronales (B: I y II) más un tercer corte sagital al órgano (III). Con un bisturí se disecó minuciosamente la corteza para luego postfijarla aplanada bajo un vidrio en PFA 4%. Luego se incubó la corteza aplanada en PB hasta el momento del corte en vibrátomo.

Histoquímica para citocromo oxidasa.

Las neuronas dependen principalmente del metabolismo oxidativo como fuente de energía, consumiendo el cerebro aproximadamente el 20% del oxígeno total [47]. Dada la importancia del ATP como moneda energética celular, se espera que un incremento en la actividad neuronal promueva una mayor respiración celular dada la

correlación entre la actividad oxidativa mitocondrial y el estado funcional de las neuronas [48].

En el presente trabajo, se determinó la actividad de la citocromo oxidasa mitocondrial (enzima terminal que compone la cadena de transporte de electrones), con una modificación de protocolos descritos previamente [48]. Se realizó una incubación en buffer fosfato (0,2 M) con 0,3 mg/mL de citocromo C, 0,6 mg/mL de diaminobencidina y 50 mg/mL de sacarosa a 37°C. La reacción se dejó transcurrir hasta 5 horas 30 minutos, evaluando los tejidos a distintos tiempos bajo lupa binocular. La reacción se detuvo mediante lavados con buffer fosfato y los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados. A continuación, se deshidrataron con alcoholes de concentración creciente, xilol, y finalmente se montaron utilizando bálsamo sintético.

Inmunohistoquímica para c-Fos.

La expresión de c-Fos se evaluó con modificaciones del protocolo descrito por otros autores [49]: las secciones de corteza se lavaron tres veces en PBS (pH 7.4), se incubó por 20 minutos en 45% etanol + 0,3% H₂O₂ en agua bidestilada, se lavó tres veces en PBS-Tritón X-100 al 0,5%, seguida por un bloqueo de sitios inespecíficos por 1 hora en PBS-Tritón X-100 al 0,5% + BSA 3% e incubado con el anticuerpo policlonal (anti-c-Fos, Santa Cruz, a dos concentraciones 1:200 y 1:400) por 48hs a 4°C en PBS con Tritón X-100 al 0,5% + BSA 3%. Luego las secciones fueron lavadas tres veces en PBS con Tritón X-100 al 0,3%, incubadas con el anticuerpo secundario biotilado (goat anti-rabbit, Vector, a dos concentraciones 1:500 y 1:1000) en PBS con Tritón X-100 al 0,3% + BSA 3% por dos horas. A continuación se realizaron tres lavados en PBS con Tritón X-100 al 0,3%, y se incubó con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (1:200, VECTASTAIN ABC) en PBS-Tritón X-100 al 0,3% por 1 hora, seguido por tres lavados en PBS y revelado con 50µL DAB / 1mL PBS + 50µL H₂O₂ / 1mL PBS. La reacción se detuvo con lavados de PBS. Posteriormente los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados y se deshidrataron con alcoholes de concentración creciente, xilol, y finalmente se montaron utilizando bálsamo sintético.

Una vez puesta a punto esta técnica se realizó una contratinción con Nissl para determinar la localización subcelular de la proteína Fos. Para ello, se coloreó el preparado con azul de toluidina al 1% por 30 segundos, luego se realizaron pasajes por alcoholes crecientes y posteriormente xilol, para finalmente montar los cortes sobre portaobjetos.

Prueba de ambiente enriquecido

La llegada de estímulos extracelulares sobre las células animales provoca la rápida transcripción de varios genes inmediatos tempranos. Entre ellos el gen *c-fos*, que es ampliamente utilizado como marcador de actividad neuronal. Con el fin de evaluar la activación de c-Fos en la corteza de barriles, se realizó una prueba basada en el comportamiento exploratorio de las ratas frente a un ambiente nuevo y enriquecido [50]. Para ello, se consideraron las condiciones óptimas para obtener una buena señal [51]: 1- supresión de la actividad conductual del animal mediante la privación sensorial aislando socialmente al animal previo a la presentación del estímulo; 2- maximizar la señal, presentando un nuevo estímulo hacia el individuo; 3- evitar la estimulación prolongada dado que resultaría en una señal subóptima.

Para resolver espacialmente el patrón de activación, se recortaron las macrovibrisas de ambos lados del hocico de la rata, excepto por la fila C. De esta forma, se espera obtener una menor activación sobre las representaciones corticales de las macrovibrisas cortadas y poder así estudiar la respuesta de la fila intacta. En primer lugar, se anestesió a los animales con una solución de 0.5mL/Kg conteniendo ketamina (75.0mg/mL), xilacina (7.5mg/mL) y acedan (1.5 mg/ml), para proceder al recorte agudo de las macrovibrisas correspondientes. Este recorte se realizó 24 horas antes de la prueba y se las mantuvo aisladas hasta el momento de la misma. A continuación, un grupo de animales de cada condición experimental previamente alojados en cajas de 48 × 33 × 16 cm, fueron realojados en nuevas cajas (ambiente nuevo) de iguales dimensiones y materiales, con un entorno enriquecido con distintos elementos que diferían en forma, tamaño y texturas, por 2 horas. Por otro lado, otro grupo de animales de cada condición experimental permaneció en la misma caja (sin cambio en su ambiente ni manipulación) (Figura 4). Luego de realizadas las pruebas, los animales fueron perfundidos y los cerebros procesados para inmunohistoquímica.

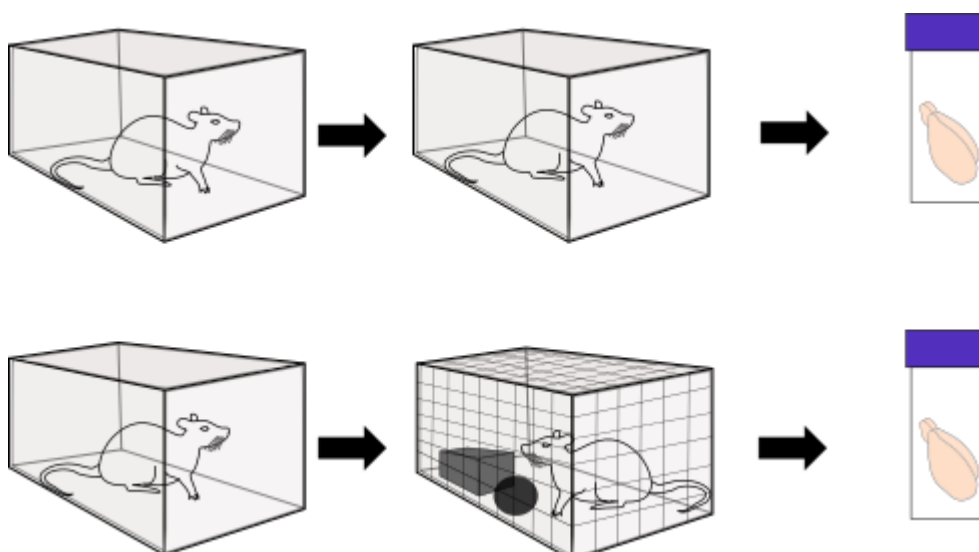


Figura 4. Diseño experimental para la prueba de ambiente enriquecido. Un grupo de ratas de cada condición experimental (tratados y controles) fue expuesto a un nuevo ambiente (abajo), enriquecido con distintos elementos de formas y estructuras variables. A otro grupo de animales (arriba) se los mantuvo en sus mismas cajas sin manipulación experimental. Luego de un período de 2 horas se perfundieron los animales y se procesaron los encéfalos para inmunohistoquímica.

Obtención y procesamiento de imágenes

Las imágenes para la técnica histoquímica citocromo oxidasa fueron obtenidas mediante una lupa NIKON SMZ1000 a 20 aumentos (20x), acoplada a una cámara digital. Los parámetros de configuración de la cámara se mantuvieron constantes durante la adquisición de todas las imágenes. Se registraron secciones en las cuales se evidenció el mapa de barriles completo o fragmentos del mismo que podían reconstruir la totalidad del mapa con cortes sucesivos. El procesamiento de las imágenes se realizó utilizando el software libre ImageJ (NIH) [52]. Esta herramienta informática permitió medir el área del mapa total (en aquellos registros fotográficos que se observó el mapa completo), el área del mapa ocupada por barriles, la longitud de los septos y la curvatura de las filas (parámetro inespecífico que se encuentra alterado en otros modelos y condiciones experimentales) [53]. Para determinar la curvatura se realizó el cociente entre la longitud de la línea que atraviesa el punto central de todos sus barriles (E1, E2, E3, E4 y E5), sobre la longitud de la línea que une únicamente el punto central de los barriles de los extremos (E1 y E5), estableciendo que una fila o columna menos curva (más parecido a una línea recta), dará lugar a un cociente más cercano a uno.

Las imágenes de la inmunohistoquímica contra c-Fos fueron obtenidas mediante un microscopio Nikon Eclipse E4000 acoplado a una cámara Micrometrics 319CU CMOS 3.2 Megapixel a 100 aumentos (100x). Los parámetros de configuración de la cámara se mantuvieron constantes durante el registro de las imágenes. En todos los casos fue posible identificar un sector de la corteza con un máximo nivel de reacción, contenido en una o más rodajas. Se registraron cortes donde se evidenció la máxima actividad c-Fos, correspondiente a la fila C del mapa de barriles. Para realizar la cuantificación de los núcleos positivos para c-Fos se utilizó el software ImageJ.

Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test de t Student a través del software Prism8 (GraphPad) [54]. El número de animales (n) por cada análisis experimental fue: pesos corporales $n_{\text{CONTROL}}=8$, $n_{\text{VPA}}=9$; pesos cerebrales $n_{\text{CONTROL}}=3$, $n_{\text{VPA}}=4$; área total del mapa $n_{\text{CONTROL}}=5$, $n_{\text{VPA}}=5$; área ocupada por el total de barriles $n_{\text{CONTROL}}=12$, $n_{\text{VPA}}=15$; porcentaje del área total del mapa ocupada por barriles

$n_{\text{CONTROL}}=5$, $n_{\text{VPA}}=5$; curvatura de las filas E $n_{\text{CONTROL}}=7$, $n_{\text{VPA}}=6$; expresión c-Fos $n_{\text{CONTROL NORMAL}}=2$, $n_{\text{CONTROL ENRIQUECIDO}}=4$, $n_{\text{VPA NORMAL}}=4$ $n_{\text{VPA ENRIQUECIDO}}=6$. Para cada experimento se trabajó con una cría por madre.

Todos los resultados se expresan como medias \pm desvío estándar (SD), excepto los resultados correspondientes al análisis de c-Fos que dado el bajo número de individuos se expresan como medias \pm error estándar de la media (SEM), para determinar la precisión de la media.

RESULTADOS

Modelo ambiental de ácido valproico

La progenie de hembras tratadas prenatalmente presentó malformaciones anatómicas en sus colas, fácilmente diferenciables de la estructura morfológica normal (grupo control), que se tornaron más evidentes en la etapa adulta (Figura 5A). La presencia de esta deformidad se utilizó para confirmar el éxito de la exposición al teratógeno. Sin embargo, la exposición al VPA no indujo diferencias significativas en los pesos cerebrales (Control: $1650,0 \pm 174,3$ mg, $n=3$; VPA: $1496,0 \pm 100,5$ mg, $n=4$) y corporales (Control: $266,1 \pm 29,6$ g, $n=8$; VPA: $281,7 \pm 10,2$, $n=9$), en comparación al grupo control, para los rangos de edad utilizados (Figura 5B y C, respectivamente). Tampoco se observaron diferencias en el número de macrovibrisas entre los grupos (datos no mostrados).

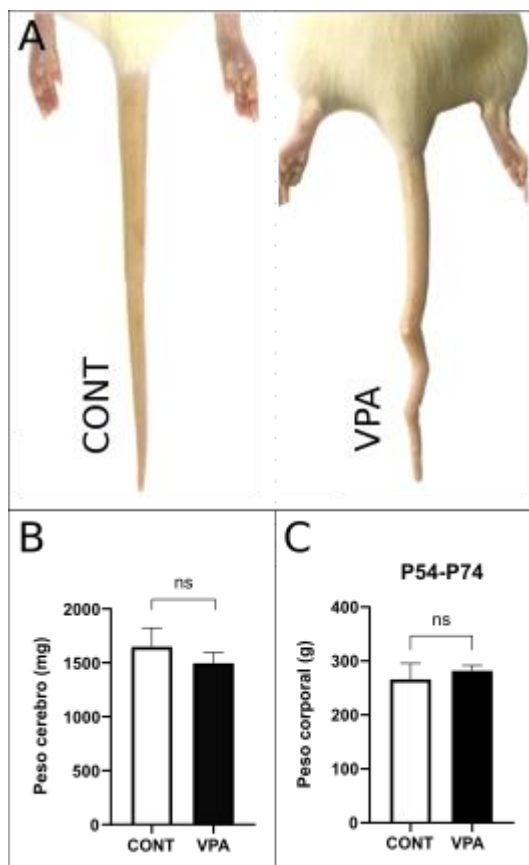


Figura 5. Comparación anatómica de las colas y pesos de los grupos experimentales. En (A) se muestran colas de ratas adultas control (izquierda) y tratadas con VPA (derecha). En (B) se observa la comparación de los pesos cerebrales y en (C) de los pesos corporales, de los grupos control (columnas vacías) y tratados (columnas llenas), para los rangos de edad P54-P74. Los resultados se muestran como medias \pm SD, test de t Student ; ns = no significativo.

Puesta a punto de la técnica histoquímica para citocromo oxidasa (COX)

Con el fin de determinar la actividad endógena citocromo oxidasa mitocondrial, se procedió a realizar una técnica histoquímica para su detección según el protocolo indicado en la sección Metodología. Fue necesario el transcurso de 4 horas y 30 minutos para lograr una definición clara de las regiones con actividad citocromo oxidasa. Para tiempos mayores el contraste disminuye y se hace difícil la observación microscópica.

La técnica histoquímica sobre las preparaciones histológicas de cerebro permitió observar, a aumentos topográficos de una lupa binocular (20x), una coloración amarronada en todo el tejido pero con una distribución heterogénea. En cortes coronales de cerebro, fue fácil reconocer la neocorteza y la arquicorteza con distintas tonalidades de una coloración marrón, mientras que la sustancia blanca se presentó apenas coloreada (Figura 6A).

En ciertas regiones corticales así como en áreas subcorticales, fue posible observar depósitos de una coloración marrón más oscura, poniendo en evidencia diferencias metabólicas entre las distintas áreas. Específicamente, en cortes coronales de la neocorteza somatosensorial se pudo apreciar una serie de manchas columnares (correspondientes a los barriles) con su eje mayor dispuesto perpendicular a la superficie cortical (Figura 6B). Los barriles presentaron una delimitación por regiones estrechas con baja actividad citocromo oxidasa (septos). Las regiones con barriles pudieron apreciarse aproximadamente desde bregma -0.36mm a -4.36mm.

En cortes tangenciales a la superficie cortical, se hizo evidente un patrón de manchas oscuras separadas entre sí por estrechas zonas con baja actividad citocromo oxidasa correspondiente a los septos (Figura 6C). Los barriles adoptan una disposición idéntica a como se posicionan las vibrisas contralaterales en la periferia. Se identificaron un número de 23 barriles que coinciden con el número total de macrovibrisas. Estas regiones oscuras corresponden a la representación somatosensorial de las vibrisas a nivel cortical. Los barriles no presentaron tamaño y forma uniformes dentro del mapa: los pertenecientes a las filas C-E presentaron un mayor tamaño que los de las filas A-B. Además, los pertenecientes a columnas con mayor denominación (columnas 4-5) también presentaron un tamaño ligeramente menor. El mismo patrón general de tamaños y formas no se presentó al azar sino que se repitió de forma similar en todos los individuos. En algunos casos el mapa de barriles apareció incompleto, con menor cantidad de barriles que lo esperado, debido seguramente al aplanamiento insuficiente del fragmento de corteza procesado o a la orientación imperfecta del plano de corte. En los casos en que se obtuvo menor cantidad de barriles, se utilizaron cortes sucesivos, tomando la máxima representación de los barriles para reconstruir el mapa completo.

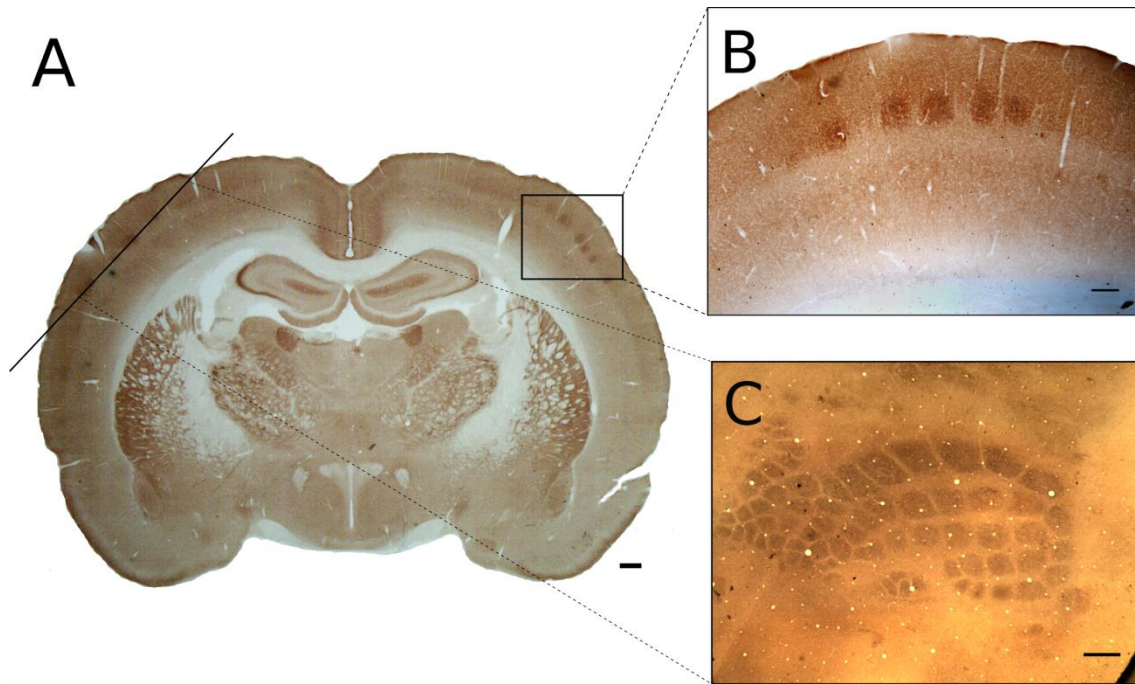


Figura 6. Puesta a punto de la técnica histoquímica citocromo oxidasa. En la imagen (A) se observa un corte coronal de cerebro de rata al que se le realizó la técnica histoquímica (barra escala = 500 μm). Puede observarse que el tejido presenta distintos grados de coloración marrón, distribuidos de forma heterogénea. Particularmente en la corteza somatosensorial se puede observar unas manchas más oscuras de aspecto columnar (barriles) (B; barra escala = 200 μm). En un corte tangencial a la superficie cortical (C; barra escala = 500 μm), los barriles se disponen en un arreglo en filas y columnas similar a la disposición de las vibrisas en la periferia.

Procesamiento de imágenes (COX)

Las imágenes de los cortes tangenciales de corteza cerebral con la técnica histoquímica para citocromo oxidasa, fueron procesadas con el software ImageJ. En primer lugar, se calibró y pasó a 8bit la imagen (Figura 7A) para luego delimitar el área total del mapa correspondiente a las macrovibrisas, de forma manual (Figura 7B), así como el área de cada uno de los barriles de interés (Figura 7C). Los barriles se seleccionaron como regiones de interés (ROIs) y se nombraron según su posición. Una vez determinadas las ROIs, se realizó la medición del área ocupada por los barriles, área total del mapa y se determinó la ubicación del punto central de cada barril (centroide). Con las coordenadas de los centroides definidas, se diseñó y ejecutó un corto código de programación que permitió trazar líneas que unían los centroides de los barriles adyacentes que constituían filas o columnas, conformando una malla (Figura 7D). Una vez establecida la malla se pudo medir las áreas seleccionadas, la longitud de las filas y columnas, la longitud de los septos y la curvatura de las filas.

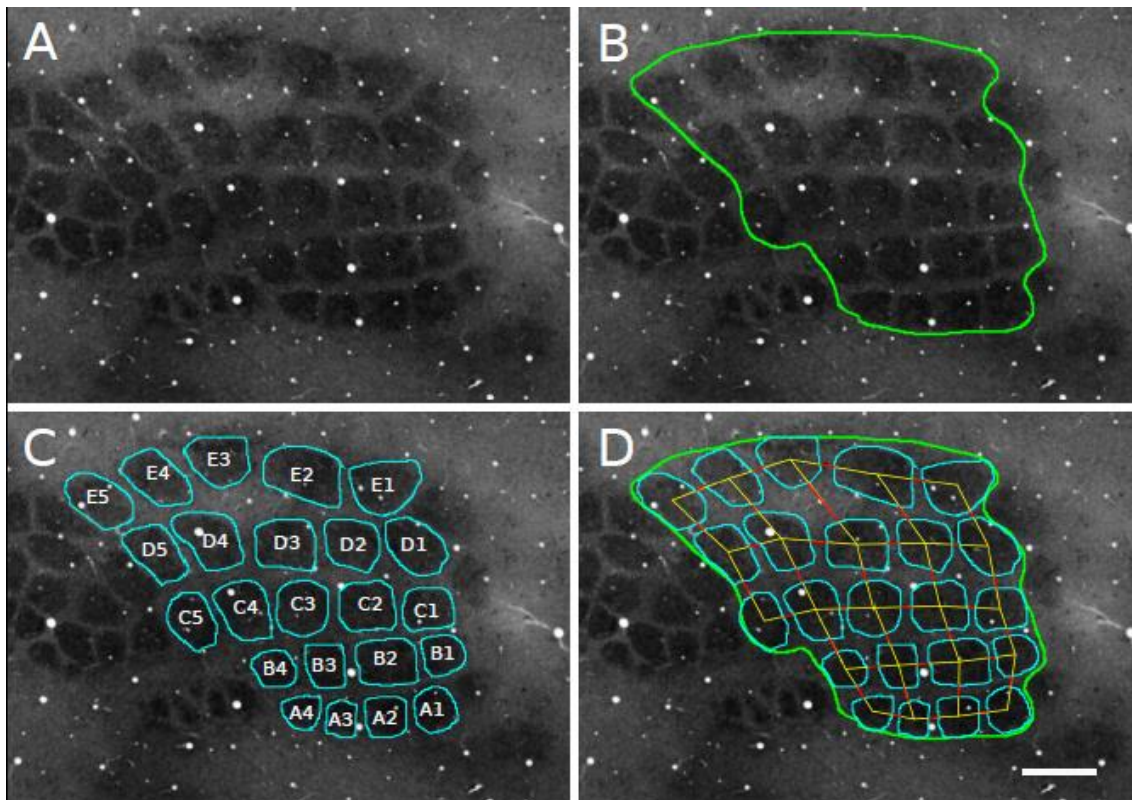


Figura 7. Procesamiento de imágenes tangenciales de corteza cerebral, con la técnica histoquímica para citocromo oxidasa. Las cortezas somatosensoriales de las ratas fueron cortadas tangencialmente a la superficie cortical y procesadas con la técnica histoquímica para citocromo oxidasa. Se realizó un procesamiento de imágenes con el software ImageJ para obtener y analizar datos morfométricos como área total del mapa, área ocupada por barriles, área ocupada por septos (regiones claras que separan los barriles), distancia de separación de barriles y curvatura de las filas. En (A) se muestra una imagen representativa de la corteza somatosensorial primaria de un individuo control en 8bit. En (B), se delimitó con una línea verde el área total del mapa de barriles de interés. En (C) se delimitó las áreas de los barriles individuales con celeste y se colocó su nomenclatura correspondiente. En (D) se trazaron líneas amarillas que unen los centroides de barriles adyacentes conformando el eje de las filas y columnas que constituyen el mapa; de esta forma se pudo analizar el grado de curvatura comparando cuánto se parecen a una recta las líneas trazadas. Con rojo se muestra la distancia que existe entre barriles vecinos. (Barra escala = 500 μ m).

Puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica (Fos)

Con el objetivo de determinar el patrón de actividad neuronal en la corteza de barriles de ratas expuestas a la prueba de ambiente enriquecido, se realizó la detección de la proteína Fos como se describe en la sección Metodología. Para ello se probaron varias diluciones, obteniéndose que la que dio lugar a una mejor señal/ruido se consiguió utilizando las diluciones: anticuerpo primario 1:400 y anticuerpo secundario 1:500 con un tiempo de revelado de 40 minutos. De esta forma se logró con éxito poner a punto la técnica para los tejidos cerebrales.

La observación topográfica a 40 aumentos con el microscopio óptico de los preparados histológicos con la técnica inmunohistoquímica evidenció una coloración amarillenta pálida bastante homogénea en todo el tejido. Sin embargo, fue posible distinguir estructuras corticales como subcorticales (Figura 8A). Al observar con mayores aumentos, se apreciaron depósitos puntuales marrón oscuro dispersos tanto en cortes coronales (Figura 8B) como en los cortes tangenciales (Figura 8C). La contratinción con la técnica de Nissl para comprobar la localización de la proteína, permitió confirmar que los puntos observados corresponden a una marcación nuclear (Figura 8D).

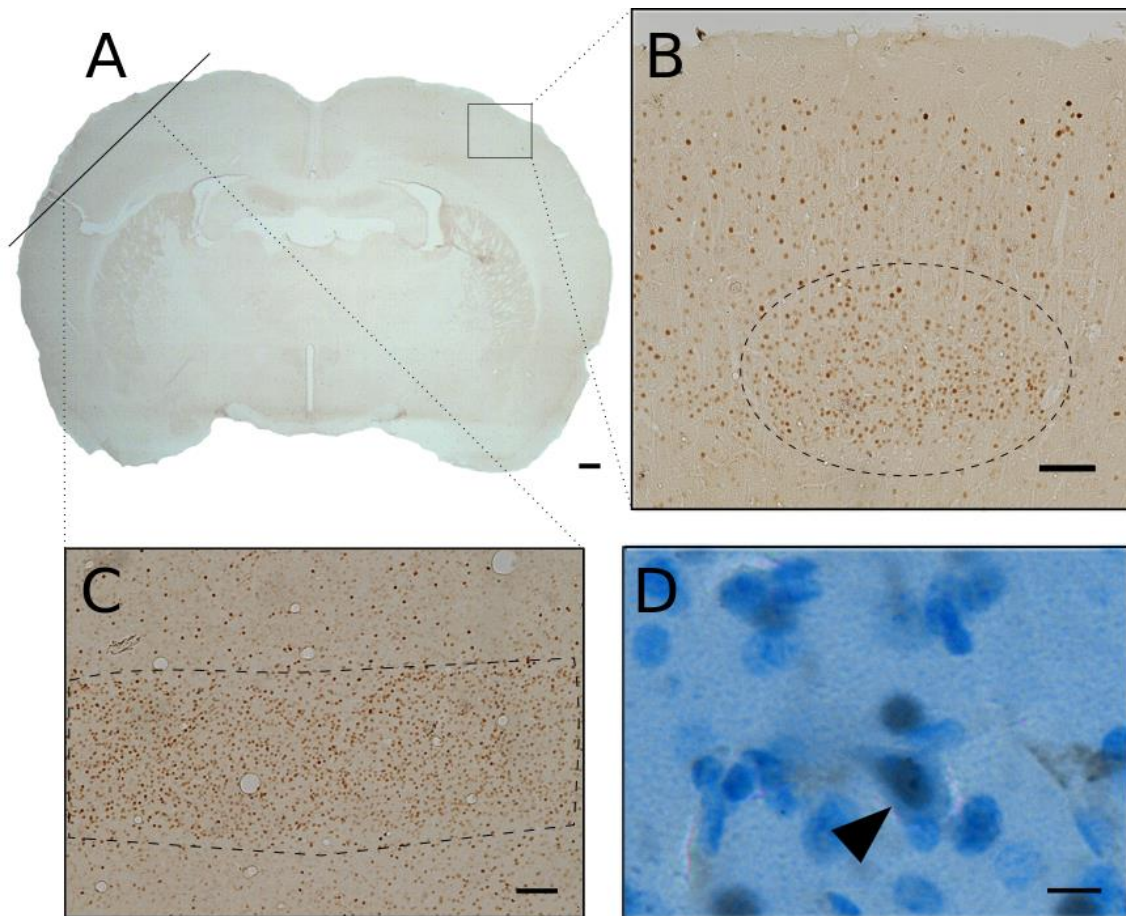


Figura 8. Puesta a punto de la técnica inmunohistoquímica para la detección de la proteína Fos en animales sometidos a una prueba de ambiente enriquecido. En la imagen (A) se observa un corte coronal de cerebro de rata al que se le realizó la técnica inmunohistoquímica contra la proteína Fos. Los animales recibieron un recorte agudo de todas las vibrisas, dejando intacta únicamente la fila C, y luego fueron expuestos a un ambiente nuevo y enriquecido (barra escala = 500 μ m); en la imagen (B) se observa un mayor aumento de la región señalada en la imagen (A) donde se observa la distribución de la proteína Fos en la neocorteza cerebral como puntos marrones (barra escala = 100 μ m); la imagen (C) corresponde a un corte tangencial a la superficie cortical donde es posible apreciar la disposición de la proteína Fos en la fila C (barra escala = 100 μ m); en (D) se observa un preparado de corteza cerebral aplanado al que se le realizó la técnica inmunohistoquímica con una contratinción con Nissl, donde puede evidenciarse que los puntos observados corresponden a una marcación nuclear, distinguiéndose bien núcleo y citoplasma de la célula (punta de flecha; barra escala = 20 μ m).

Procesamiento de imágenes (c-Fos)

Con la finalidad de cuantificar el número de núcleos positivos para la inmunohistoquímica contra c-Fos, se realizó un procesamiento de la imagen con el ImageJ, previo al conteo. Inicialmente se pasó la imagen a 8bit para luego realizar un filtro pasabanda. A continuación, se auto-umbralizó la imagen (con el modo máxima entropía) y se la hizo binaria. Luego, se tomó una ROI sobre el área de la fila C, con un tamaño establecido para todos los individuos. Una vez realizado esto, se efectuó un conteo automático de partículas, filtrando partículas menores a 100 píxeles y con una redondés menor a 0,5.

Marcación COX-Fos

Una vez puestas a punto tanto la técnica histoquímica como la técnica inmunohistoquímica, se logró combinar ambas y así se pudo visualizar el área de barriles junto a la presencia de la proteína Fos (Figura 9). De esta forma, se puede determinar con mayor precisión la activación de la proteína dentro de la región de interés y a su vez realizar las mediciones morfométricas en el mismo preparado.

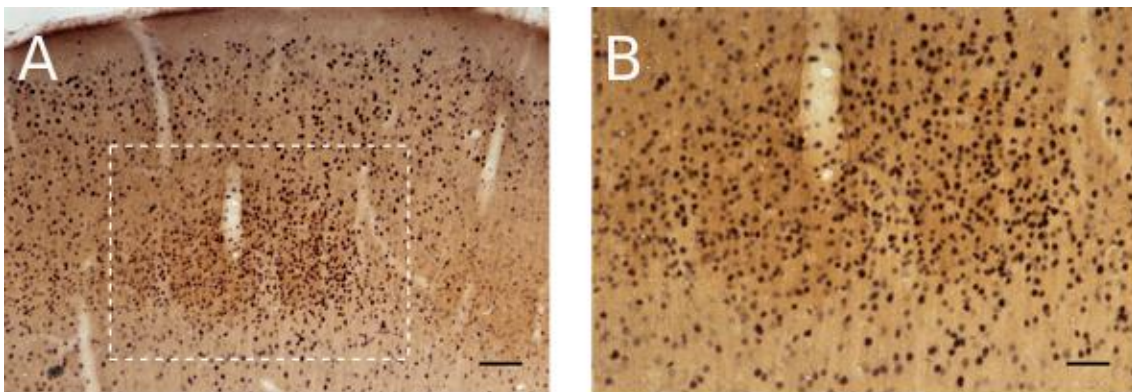


Figura 9. Puesta a punto de la co-marcación inmunohistoquímica contra Fos y la histoquímica para citocromo oxidasa. En (A) se observa un corte coronal de la corteza somatosensorial primaria donde es posible apreciar la actividad citocromo oxidasa junto con la marcación de la proteína Fos (barra escala = 100 μm); en (B) se muestra una ampliación del recuadro de la imagen (A) centrada en la región de interés (barra escala = 50 μm).

Análisis de los cortes tangenciales de corteza cerebral: COX

El análisis cualitativo de la representación somatotópica del mapa cortical de vibrisas, evidenció cambios estructurales de la corteza de barriles en los animales tratados con ácido valproico (Figura 10). Estos cambios incluyeron: la fusión de barriles adyacentes, una menor definición de sus límites y una menor curvatura de sus filas (es decir, si se

traza una línea que pase por el centro de cada barril que componen la fila, la línea trazada se asemeja más a una línea recta; Figura 10 B-D).

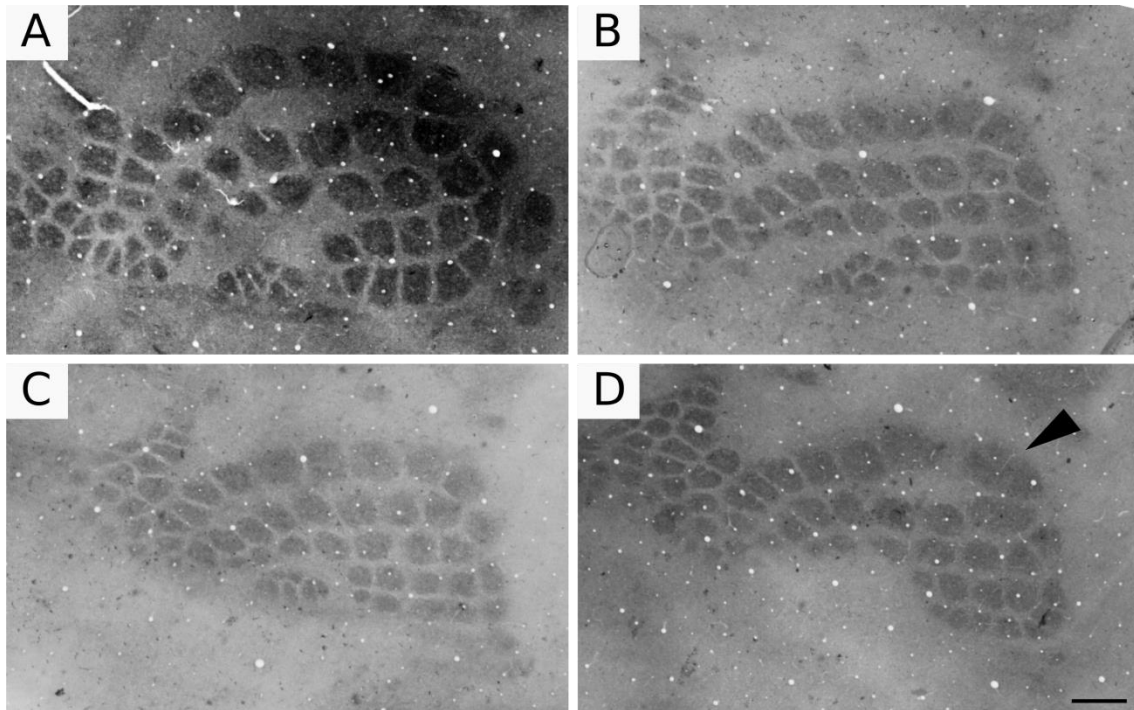


Figura 10. Alteraciones de la corteza somatosensorial de vibrisas de las ratas evidenciadas con la técnica histoquímica para citocromo oxidasa. En (A), se muestra un corte tangencial a la superficie de la corteza somatosensorial de un animal control. En (B), (C) y (D) se muestran cortes de animales tratados prenatalmente con ácido valproico. En los animales tratados se observan alteraciones del patrón normal de representación de vibrisas en la corteza: el mapa parece estar más compactado, los barriles aparecen menos definidos, las filas aparentan tener menor curvatura y existe fusión de barriles vecinos (punta de flecha; barra escala = 500 μm).

Con el fin de evaluar las alteraciones observadas en las cortezas somatosensoriales, se procedió a realizar el análisis cuantitativo de las mismas a partir de la información obtenida del procesamiento de las imágenes (Figura 11A). En primer lugar, se analizó si existían diferencias en el área total del mapa (región correspondiente a los barriles y los septos que los rodean) entre ambos grupos experimentales, obteniéndose una reducción significativa de aproximadamente 21,4% del área del grupo tratado comparado con el grupo control (Control: $3,989 \pm 0,104 \text{ mm}^2$, $n=5$; VPA: $3,136 \pm 0,108 \text{ mm}^2$, $n=5$; Figura 11B). Considerando que no se encontraron diferencias entre los pesos corporales y cerebrales de ambos grupos, se evaluó si la disminución del área total conlleva a una reducción del área de representación de las vibrisas. En efecto, el área ocupada por el total de barriles disminuyó de forma significativa en los animales tratados, con respecto al grupo control (Control: $2,538 \pm 0,089 \text{ mm}^2$, $n=12$; VPA: $2,148 \pm 0,093 \text{ mm}^2$, $n=15$; $p=0,0034$) (Figura 11C). Contemplando estos resultados, se examinó qué porcentaje del área total del mapa estaba ocupado por barriles. No se

advirtieron diferencias significativas entre los grupos, observándose que los barriles ocuparon aproximadamente el 60% del área total del mapa (Control: $59,98 \pm 1,62$ %, $n=5$; VPA: $59,92 \pm 1,48$ %, $n=5$; Figura 11D). Por último, la curvatura de las filas E fue analizada ya que desde el punto de vista cualitativo, parecían menos curvas. El análisis mostró que las filas E de los animales tratados con ácido valproico se tornaron significativamente menos curvas, comparado a los animales control (Control: 1.028 ± 0.003 , $n=7$; VPA: 1.011 ± 0.003 $n=6$; $p=0,0033$; Figura 11E).

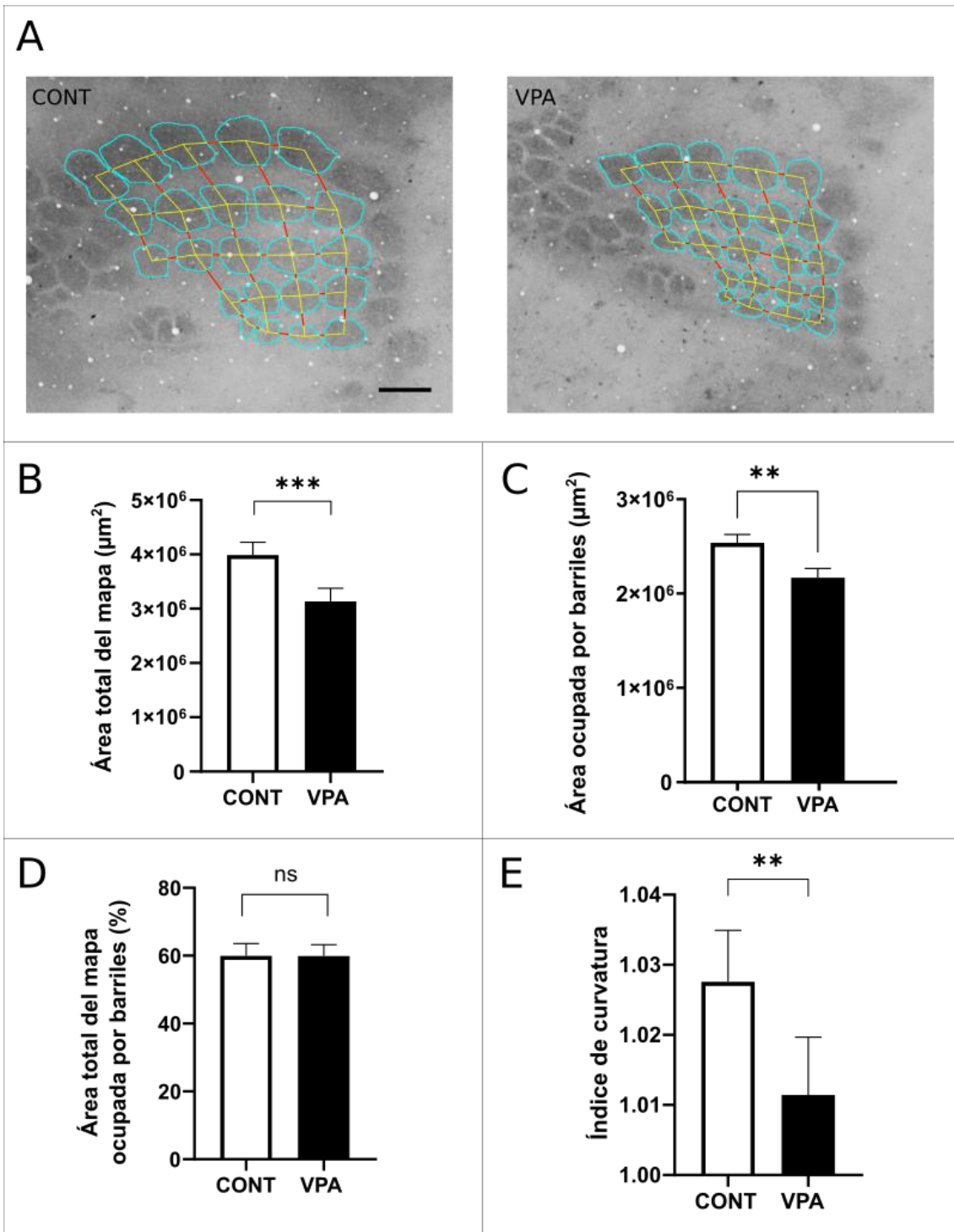


Figura 11. Comparaciones morfométricas de las cortezas somatosensoriales primarias con la técnica histoquímica para citocromo oxidasa. En (A) se presentan cortes tangenciales a la superficie cortical de la corteza somatosensorial primaria de individuos control (izquierda) y tratados con VPA (derecha), que fueron procesados con el software ImageJ para obtener datos cuantificables (barra escala = 500µm). En (B) se presentan las comparaciones de las áreas totales del mapa, incluyendo barriles y regiones claras entre barriles (septos) en ambos grupos experimentales (controles, columnas vacías; tratados con VPA, columnas llenas). En (C) se presentan las comparaciones de la sumatoria de las áreas ocupadas por barriles. En (D) se muestran las comparaciones del porcentaje de área total ocupada por barriles. En (E) se muestran las comparaciones del índice de curvatura de las filas E para ambos grupos experimentales. Un índice = 1 corresponde a una línea recta. Los resultados se expresan como medias \pm SD Test de t Student; (**) $P < 0.01$; (***) $P < 0.001$; ns = no significativo

Análisis de los cortes tangenciales de corteza cerebral: Fos

Una vez puesta a punto la técnica, se analizaron los cortes tangenciales del mapa de barriles de los individuos que sufrieron un recorte agudo de sus macrovibrisas (con excepción de la fila C) y luego realizaron la prueba de ambiente enriquecido. Se pudo observar que el marcador de actividad neuronal Fos estaba presente en los cortes de todos los individuos expuestos al nuevo ambiente como también en aquellos que no cambiaron de ambiente. Esta marcación no ocurrió de manera homogénea en el mapa sino que la región central correspondiente a la fila C de barriles (cuyas vibrisas quedaron intactas), demostró mayor densidad de núcleos Fos positivos, independientemente del grupo experimental (Figura 12).

Por otra parte, el análisis de la expresión de c-Fos mostró que los animales que fueron sometidos a un nuevo ambiente con un entorno enriquecido tuvieron una tendencia hacia una mayor expresión de la proteína, evidenciada por un aumento en el número de núcleos Fos positivos. Esto se hizo más evidente en los individuos pertenecientes al grupo control, no siendo tan claro para los individuos tratados (Control Normal: 935 ± 188 , $n=2$; VPA Normal: 883 ± 127 , $n=4$; Control Enriquecido: 1149 ± 172 , $n=4$; VPA Enriquecido: 987 ± 6 , $n=2$; Figura 12). Estos resultados deben ser confirmados aumentando el número de animales.

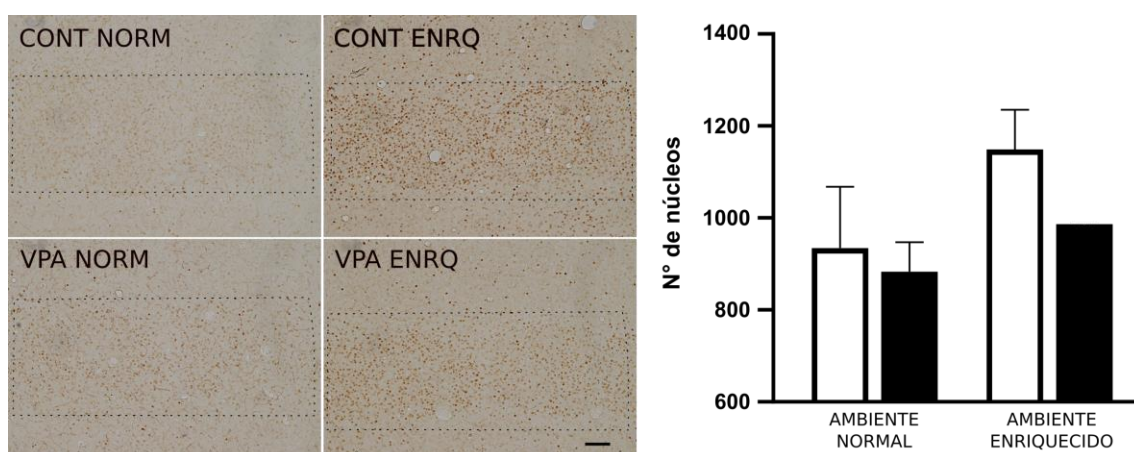


Figura 12. Inmunohistoquímica contra Fos en la corteza somatosensorial primaria, luego de la exploración en un ambiente enriquecido. Se realizó el recorte agudo de todas las macrovibrisas con excepción de la fila C y se sometió un grupo de individuos de cada condición experimental (CONT: control, columnas vacías; o VPA: tratado con ácido valproico, columnas llenas) a un nuevo ambiente enriquecido (ENRQ) mientras que otro grupo permaneció en su mismo ambiente sin cambios (NORM). A la izquierda, se muestran imágenes de cortes tangenciales a la superficie cortical de un individuo por cada condición experimental (barra escala = 100 μ m). A la derecha, se contabilizó el número de células con núcleos positivos para Fos. Los resultados se expresan como medias \pm SEM (la barra de error de la columna correspondiente a VPA en ambiente enriquecido no se aprecia debido a la poca variación de los datos).

DISCUSIÓN

El sistema somatosensorial de vibrisas es un sistema con una estructura modular y un ordenamiento somatotópico robusto. Es así que se presenta como un sistema modelo para el estudio de los factores tanto genéticos como ambientales que subyacen a la organización y establecimiento de los mapas somatotópicos [20][21][22]. En este sentido, se planteó el objetivo de estudiar la existencia de posibles alteraciones en la organización cortical del sistema de vibrisas de la rata tras el tratamiento prenatal con un factor ambiental como el ácido valproico. Para llevar a cabo el análisis del sistema en la corteza somatosensorial primaria, se realizó de forma exitosa la puesta a punto de una batería de protocolos y procedimientos que permitieron analizar la organización estructural y funcional de la corteza de barriles.

PUESTA A PUNTO DE LAS TÉCNICAS

Existen distintos métodos que permiten la detección de la citocromo oxidasa en las neuronas como la espectroscopía, los ensayos bioquímicos, la inmunohistoquímica y la histoquímica. La histoquímica en particular fue introducida por un grupo de investigadores para determinar la ubicación de la citocromo oxidasa en muestras de corazón, hígado y riñón [55]. Posteriormente, se modificó la técnica para estudiar la localización de la misma enzima en el tejido nervioso [56]. Esta técnica proporciona una localización precisa del producto de reacción a nivel tisular y de su grado de actividad relativa [48][57]. Además, cuenta con la ventaja de proporcionar un mapeo general de las diferencias metabólicas dentro de una región del tejido [58][59]. Con el fin de evidenciar la corteza de barriles, se realizó la técnica histoquímica para detectar la actividad citocromo oxidasa. Con el protocolo utilizado se logró determinar el tiempo óptimo de reacción para obtener una definición clara de las regiones de interés. Tiempos mayores dieron lugar a imágenes con mucho ruido de fondo, con la consiguiente pérdida de contraste. De esta manera, se logró poner a punto la técnica histoquímica permitiendo evidenciar la representación somatosensorial del sistema de vibrisas. La técnica permitió observar el característico patrón de manchas oscuras dispuestas en forma de malla, en cortes tangenciales a la superficie cortical [18][19].

Por otra parte, para estudiar la presencia del marcador de actividad neuronal Fos, se realizó la inmunohistoquímica de esta proteína luego de someter al animal a un ambiente nuevo y enriquecido. Como se expuso antes, los mecanorreceptores periféricos que inervan las vibrisas forman un mapa preciso en la corteza de barriles [60], permitiendo estudiar la relación anatómica y funcional de los efectos producidos por la estimulación sensorial. La llegada de estímulos adecuados puede inducir la expresión de genes inmediatos tempranos con una corta latencia [61]. Cuando se produce activación neuronal, la concentración intracelular del ión calcio aumenta

como consecuencia del influjo del mismo. Este aumento de la concentración de calcio intracelular puede activar distintas quinasas, entre ellas, la MAPK que media la expresión de la proteína Fos. Comparada a otras quinasas, la MAPK requiere una fuerte estimulación externa y un mayor aumento de calcio. Por lo tanto, es poco probable que estímulos externos débiles resulten en la expresión de la proteína Fos [51]. A diferencia de otros mecanismos de estimulación de las vibrisas donde se utilizan agentes farmacológicos, estimulación directa del animal anestesiado, o mediante la estimulación de animales despiertos con metales pegados sobre las vibrisas y sometidos a un campo magnético [50], aquí se evaluaron los patrones de actividad cortical inducidos por el comportamiento exploratorio. Como es propuesto por otros autores [50], este mecanismo de estimulación cuenta con la ventaja de evaluar al animal en condiciones fisiológicas sin someterlo al estrés de la manipulación, o al uso de anestésicos que pudiesen influir en el patrón de activación cortical de Fos. Por su parte, la inmunohistoquímica proporcionó una buena representación espacial de la proteína, permitiendo analizar su distribución en el mapa de barriles. Preservar únicamente una fila de vibrisas de cada lado del hocico permitió delimitar y analizar mejor el área de activación, que parece restringirse al área correspondiente a la fila C, en ambos grupos experimentales (ya sea en un ambiente normal o enriquecido). Esto sugiere que no existiría pérdida evidente de integridad en las vías. Sin embargo, la utilización de esta técnica presenta la desventaja de no tener un marco de referencia claro en el mapa de barriles, siendo necesaria una doble marcación para delimitar el mapa. Asimismo, se logró poner a punto la técnica y pudo ser utilizada en el procesamiento de muestras de cerebro de animales expuestos a una prueba de ambiente enriquecido.

Finalmente, se combinaron las técnicas histoquímica e inmunohistoquímica con el objetivo de analizar la actividad de la enzima citocromo oxidasa y la presencia de la proteína FOS en las mismas rodajas de tejido. Al combinar ambas es posible delimitar el mapa de barriles y determinar la localización precisa (sobre el área de barriles o septos) de la proteína FOS en la misma imagen. De esta forma, se logró poner a punto la técnica para analizar las cortezas somatosensoriales en futuros experimentos y poder así realizar un análisis más riguroso del mapa de barriles. Este último protocolo se puso a punto luego de haber procesado la primera serie de animales exclusivamente con la técnica inmunohistoquímica.

El análisis de la corteza de barriles requiere de herramientas informáticas que permitan el procesamiento de un elevado número de imágenes de forma rápida, estandarizada y objetiva, evitando posibles sesgos por parte del investigador. En este sentido, nos propusimos desarrollar una herramienta informática que permita la segmentación y cuantificación de esta corteza para realizar un análisis semi-automático de las muestras. Sin embargo, no fue posible adaptar las funciones de la

herramienta a las características y requerimientos específicos de cada imagen. Por esta razón, se diseñó un protocolo manual para el procesamiento del mapa de barriles de dos grupos experimentales, que permitieron extraer los parámetros morfométricos de interés. Por otra parte, también se logró establecer un protocolo para el conteo de núcleos Fos positivos que se utilizó para evaluar ambos grupos experimentales.

TRATAMIENTO CON ÁCIDO VALPROICO

Una de las principales comorbilidades asociadas a los TEA en humanos son las deficiencias sensoriales [62][63][64], siendo las alteraciones a la respuesta a un estímulo inocuo una de las características comúnmente identificadas en los pacientes [25]. Las disfunciones sensoriales logran ser reproducidas en animales de experimentación tras el tratamiento prenatal con VPA, presentando alteraciones de comportamiento similares a las encontradas en humanos [44][45].

En este trabajo se utilizó el sistema de vibrisas como modelo para el estudio de las alteraciones del sistema somatosensorial producidas por el tratamiento prenatal con VPA. Se analizaron los cambios estructurales de la corteza de barriles y de la activación producida por la estimulación táctil de las vibrisas durante la exploración espontánea del ambiente.

La exposición intrauterina aguda al VPA durante el período de cierre del tubo neural, produjo alteraciones en el desarrollo de la progenie. Macroscópicamente se destaca la alteración de la morfología normal de las colas, similar a lo observado por otros investigadores [46], que resulta útil como reportero de la efectividad del tratamiento farmacológico. Por otra parte, los pesos corporales y cerebrales de los individuos no difirieron significativamente, contrastando a lo obtenido por otros autores [44][46]. Este resultado presumiblemente se deba a una diferencia en las dosis utilizadas (500mg/mL en lugar de 600mg/mL). A diferencia de lo reportado en otro estudio [45], nuestros ensayos preliminares con una dosis de 600mg/mL provocaron mayor letalidad en las madres y un número muy reducido de descendencia que hacían que proseguir con los experimentos fuese inviable. De todos modos, ambas dosis mencionadas son aproximadamente diez veces más altas que las que se usaban en un principio en la clínica [45].

Al analizar la corteza somatosensorial, se observaron alteraciones de la estructura normal del mapa de barriles en la corteza somatosensorial primaria de los individuos expuestos. El análisis de diferentes parámetros morfométricos mostró una disminución significativa del área total del mapa, acompañada por una disminución relativa del área ocupada por los barriles. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores [32], que estudiando un modelo genético de TEA en ratones KO-*Mecp2* constataron una disminución del área ocupada por barriles. Utilizando este mismo modelo, en otro estudio [65], se demostró una disminución de las terminales de los

axones talamocorticales sobre la capa IV en la corteza somatosensorial primaria, un menor tamaño de las células estrelladas de la misma capa, una reducción de la longitud dendrítica, así como una menor densidad de las espinas dendríticas de estas células.

Por lo tanto, en este trabajo se reporta por primera vez alteraciones de la estructura de la corteza de barriles en un modelo de VPA.

Teniendo en cuenta la existencia de alteraciones en la estructura normal del mapa de barriles, se estudió si las mismas podrían implicar una alteración funcional del mapa. Para ello, se realizó el estudio de la expresión de c-Fos, factor de transcripción ampliamente utilizado para mapear la actividad funcional del cerebro [50]. En este trabajo, se realizó una prueba basada en el comportamiento de exploración natural de las ratas en combinación con un nuevo ambiente con un entorno enriquecido. Otros autores [50][66], observaron que la exposición de los animales a un nuevo ambiente, con un entorno enriquecido, resulta en un incremento de la expresión del factor de transcripción c-Fos. Este incremento se evidenció principalmente en la capa IV de la corteza somatosensorial primaria (sitio en que las neuronas de la capa IV reciben las principales entradas de información desde el tálamo), seguido por las capas II/III (sitio al que proyectan en gran medida las neuronas de la capa IV) [17]. En sintonía con estos trabajos, los resultados aquí reportados también muestran una tendencia hacia un incremento en la expresión de c-Fos. Esto no fue tan claro para los animales pertenecientes al grupo tratado, mostrando una tendencia hacia la disminución en la cantidad de expresión de c-Fos. A pesar de que es necesario aumentar el número de individuos para poder inferir conclusiones, las tendencias observadas coinciden con una menor activación de los barriles evidenciada por otros autores mediante colorante sensible al voltaje luego de la estimulación de un barril en el modelo de *Mecp2* [65]. Cabe destacar, que en este modelo genético, se estudia la funcionalidad en la corteza sobre un animal anestesiado. Esto cuenta con excelentes ventajas dado que se pueden establecer distintos parámetros de estimulación como amplitud, frecuencia, y orientación de la deflexión de la vibrisa. Sin embargo, el proceso de *whisking* es un proceso activo, donde el animal realiza un movimiento de barrido con sus vibrisas de adelante hacia atrás, para localizar y palpar objetos, pudiendo acompañarlos por movimientos con su cabeza [67]. Es así que el *whisking* no se vería reflejado mediante la estimulación pasiva del animal anestesiado. Si bien la inmunohistoquímica para c-Fos presenta ciertas limitantes [68], cuenta con la posibilidad de explorar la actividad del animal en libre movimiento y comparar distintas situaciones experimentales. Por otra parte, al ser la exploración táctil un sistema que integra salidas motoras con las entradas sensoriales y dado que existen reportes que indican la existencia de dificultades en la coordinación motora en humanos con TEA [69], queda por investigar si existen alteraciones motoras en los individuos tratados con VPA.

La mayoría de los estudios acerca de los TEA han puesto principal atención en explorar los circuitos corticales que subyacen a la percepción táctil aberrante [32][45][65][70]. Sin embargo, en los últimos años ha cobrado mayor relevancia el potencial del sistema nervioso periférico en contribuir a entender las deficiencias sensoriales en estos trastornos [30][31]. Un grupo de investigadores [30][31], demostró que la delección de *Mecp2*, *Gabrb3* o *Shank3* (genes asociados al autismo) en las neuronas somatosensoriales periféricas resultaron en sensibilidad y discriminación táctiles aberrantes. La disfunción de las neuronas somatosensoriales primarias fue una característica compartida entre estos modelos, a pesar de presentar mecanismos fisiopatológicos distintos. En este sentido, sería interesante explorar el sistema nervioso periférico en el modelo de VPA.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se pusieron a punto tres técnicas para el estudio del sistema de vibras de las ratas: histoquímica para citocromo oxidasa, inmunohistoquímica para c-Fos y la combinación de ambas para obtener un doble marcado. Estas técnicas permitieron el estudio de la corteza de barriles de animales prenatalmente expuestos a ácido valproico.

Se reportó por primera vez una disminución en el área de representación de las vibras en la corteza somatosensorial primaria en un modelo ambiental de VPA.

Asimismo, se evidenció una tendencia hacia una menor actividad funcional del sistema con respecto al grupo control, mediante la expresión de c-Fos en animales explorando un ambiente nuevo y enriquecido. Estos resultados deben ser confirmados aumentando el número de animales.

Como perspectivas a este trabajo se implementará en futuros procesamientos el doble marcado COX-Fos ajustando las ROIs a las filas en estudio, ya que como se mostró antes, los animales VPA tuvieron una reducción en el área del mapa. De esta forma se podría lograr un recuento más preciso del número de núcleos Fos positivos, con la referencia del mapa brindada por la COX en la capa IV. Asimismo se incrementará la cantidad de individuos para realizar la estadística de los datos inmunohistoquímicos.

Por otra parte, con el fin de evaluar posibles deficiencias en la discriminación de texturas, se están poniendo a punto pruebas de reconocimiento de objetos novedosos que difieran tan sólo en textura (por ejemplo, utilizando cubos de igual tamaño, uno liso y otro rugoso), y compararlos con el reconocimiento de objetos novedosos que difieran en color y forma, similar a lo evaluado por otros autores [30][31]. De esta forma, se podrá determinar si el animal presenta deficiencias en la discriminación táctil

o si se debe a una falta de comportamiento de búsqueda de nuevos objetos. Además, está previsto analizar el tiempo de exploración de los objetos para identificar posibles aversiones a los mismos. Queda por explorar también el comportamiento de *whisking*, que podría evaluarse mediante la obtención de imágenes a alta velocidad en una tarea de discriminación de texturas.

Por último, sería interesante analizar distintos niveles de la vía somatosensorial, particularmente el primer nivel de la vía, considerando que en los modelos genéticos de TEA se presentan disfunciones a nivel periférico.

Este trabajo fue realizado gracias a la financiación de la Universidad de la República y el grupo interdisciplinario IMAGINA (Espacio Interdisciplinario).

BIBLIOGRAFÍA

1. Keynes R, Krumlauf R. Hox Genes and Regionalization of the Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*. 1994;17(1):109-132.
2. Rubenstein J. Genetic Control of Cortical Development. *Cerebral Cortex*. 1999;9(6):521-523.
3. Sanes J. Extracellular Matrix Molecules that Influence Neural Development. *Annual Review of Neuroscience*. 1989;12(1):491-516.
4. Francis N, Landis S. CELLULAR AND MOLECULAR DETERMINANTS OF SYMPATHETIC NEURON DEVELOPMENT. *Annual Review of Neuroscience*. 1999;22(1):541-566.
5. Spitzer N. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*. 2006;444(7120):707-712.
6. Katz L, Shatz C. Synaptic Activity and the Construction of Cortical Circuits. *Science*. 1996;274(5290):1133-1138.
7. Hensch T. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*. 2005;6(11):877-888.
8. Fujiwara T, Morisaki N, Honda Y, Sampei M, Tani Y. Chemicals, Nutrition, and Autism Spectrum Disorder: A Mini-Review. *Frontiers in Neuroscience*. 2016;10 1-7.
9. Sugranyes G, Kyriakopoulos M, Corrigall R, Taylor E, Frangou S. Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia: Meta-Analysis of the Neural Correlates of Social Cognition. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e25322.
10. Rais M, Binder D, Razak K, Ethell I. Sensory Processing Phenotypes in Fragile X Syndrome. *ASN Neuro*. 2018;10:1-19.
11. Cascio C. Somatosensory processing in neurodevelopmental disorders. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*. 2010;2(2):62-69.
12. Acevedo B, Aron E, Pospos S, Jessen D. The functional highly sensitive brain: a review of the brain circuits underlying sensory processing sensitivity and seemingly related disorders. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2018;373(1744):20170161.
13. Petersen C. The Functional Organization of the Barrel Cortex. *Neuron*. 2007;56(2):339-355.
14. Chakrabarti S, Schwarz C. Cortical modulation of sensory flow during active touch in the rat whisker system. *Nature Communications*. 2018;9(1):3907.

15. Ramamurthy D, Krubitzer L. The evolution of whisker-mediated somatosensation in mammals: Sensory processing in barrelless S1 cortex of a marsupial, *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology*. 2016;524(17):3587-3613.
16. Tsytsarev V, Arakawa H, Zhao S, Chédotal A, Erzurumlu R. Behavioral Consequences of a Bifacial Map in the Mouse Somatosensory Cortex. *The Journal of Neuroscience*. 2017;37(30):7209-7218.
17. Adibi M. Whisker-Mediated Touch System in Rodents: From Neuron to Behavior. *Frontiers in Systems Neuroscience*. 2019;13:40.
18. Woolsey T, Van der Loos H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex. *Brain Research*. 1970;17(2):205-242.
19. Land P, Simons D. Cytochrome oxidase staining in the rat sml barrel cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 1985;238(2):225-235.
20. Fox K. Anatomical pathways and molecular mechanisms for plasticity in the barrel cortex. *Neuroscience*. 2002;111(4):799-814.
21. Feldmeyer D, Brecht M, Helmchen F, Petersen C, Poulet J, Staiger J et al. Barrel cortex function. *Progress in Neurobiology*. 2013;103:3-27.
22. Erzurumlu R, Gaspar P. Development and critical period plasticity of the barrel cortex. *European Journal of Neuroscience*. 2012;35(10):1540-1553.
23. Servadio M, Vanderschuren L, Trezza V. Modeling autism-relevant behavioral phenotypes in rats and mice: Do 'autistic' rodents exist?. *Behavioural Pharmacology*. 2015;26(6):522-540.
24. Pichot P, López-Ibor Aliño J, Valdés Miyar M. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. 4th ed. Barcelona: Masson; 1995.
25. American Psychiatric Association : Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5th ed. Washington, D.C. American Psychiatric Publishing; 2013
26. Geschwind D. Autism: Many Genes, Common Pathways?. *Cell*. 2008;135(3):391-395.
27. Betancur C. Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Research*. 2011;1380:42-77.
28. Varghese M, Keshav N, Jacot-Descombes S, Warda T, Wicinski B, Dickstein D et al. Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models. *Acta Neuropathologica*. 2017;134(4):537-566.

29. He C, Cantu D, Mantri S, Zeiger W, Goel A, Portera-Cailliau C. Tactile Defensiveness and Impaired Adaptation of Neuronal Activity in the *Fmr1* Knock-Out Mouse Model of Autism. *The Journal of Neuroscience*. 2017;37(27):6475-6487.
30. Orefice L, Zimmerman A, Chirila A, Sleboda S, Head J, Ginty D. Peripheral Mechanosensory Neuron Dysfunction Underlies Tactile and Behavioral Deficits in Mouse Models of ASDs. *Cell*. 2016;166(2):299-313.
31. Orefice L, Mosko J, Morency D, Wells M, Tasnim A, Mozeika S et al. Targeting Peripheral Somatosensory Neurons to Improve Tactile-Related Phenotypes in ASD Models. *Cell*. 2019;178(4):867-886.
32. Moroto M, Nishimura A, Morimoto M, Isoda K, Morita T, Yoshida M et al. Altered somatosensory barrel cortex refinement in the developing brain of *Mecp2*-null mice. *Brain Research*. 2013;1537:319-326.
33. Rivera H, Christiansen K, Sullivan E. The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience*. 2015;9.
34. Bölte S, Girdler S, Marschik P. The contribution of environmental exposure to the etiology of autism spectrum disorder. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019;76(7):1275-1297.
35. Iwata K, Matsuzaki H, Takei N, Manabe T, Mori N. Animal Models of Autism: An Epigenetic and Environmental Viewpoint. *Journal of Central Nervous System Disease*. 2010;2:37-44.
36. Roulet F, Lai J, Foster J. In utero exposure to valproic acid and autism — A current review of clinical and animal studies. *Neurotoxicology and Teratology*. 2013;36:47-56.
37. Christensen J, Grønberg T, Sørensen M, Schendel D, Parner E, Pedersen L et al. Prenatal Valproate Exposure and Risk of Autism Spectrum Disorders and Childhood Autism. *JAMA*. 2013;309(16):1696-1703.
38. Ardinger H, Atkin J, Blackston R, Elsas L, Clarren S, Livingstone S et al. Verification of the fetal valproate syndrome phenotype. *American Journal of Medical Genetics*. 1988;29(1):171-185.
39. Stadelmaier R, Nasri H, Deutsch C, Bauman M, Hunt A, Stodgell C et al. Exposure to Sodium Valproate during Pregnancy: Facial Features and Signs of Autism. *Birth Defects Research*. 2017;109(14):1134-1143.
40. Rasalam A, Hailey H, Williams J, Moore S, Turnpenny P, Lloyd D et al. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 2005;47(8):551-555.

41. Coste J, Blotiere P, Miranda S, Mikaeloff Y, Peyre H, Ramus F et al. Risk of early neurodevelopmental disorders associated with in utero exposure to valproate and other antiepileptic drugs: a nationwide cohort study in France. *Scientific Reports*. 2020;10(1).
42. Koch S, Jäger-Roman E, Lösche G, Nau H, Rating D, Helge H. Antiepileptic drug treatment in pregnancy: drug side effects in the neonate and neurological outcome. *Acta Paediatrica*. 1996;85(6):739-746.
43. Ornoy A, Koren G, Yanai J. Is post exposure prevention of teratogenic damage possible: Studies on diabetes, valproic acid, alcohol and anti folates in pregnancy: Animal studies with reflection to human. *Reproductive Toxicology*. 2018;80:92-104.
44. Schneider T, Przewłocki R. Behavioral Alterations in Rats Prenatally Exposed to Valproic Acid: Animal Model of Autism. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(1):80-89.
45. Dendrinou G, Hemelt M, Keller A. Prenatal VPA Exposure and Changes in Sensory Processing by the Superior Colliculus. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2011;5(68).
46. Foley A, Gannon S, Rombach-Mullan N, Prendergast A, Barry C, Cassidy A et al. Class I histone deacetylase inhibition ameliorates social cognition and cell adhesion molecule plasticity deficits in a rodent model of autism spectrum disorder. *Neuropharmacology*. 2012;63(4): 750-760.
47. Wong-Riley M. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences*. 1989;12(3):94-101.
48. Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Research*. 1979;171(1):11-28.
49. Kaminska B, Kaczmarek L, Chaudhuri A. Visual Stimulation Regulates the Expression of Transcription Factors and Modulates the Composition of AP-1 in Visual Cortex. *The Journal of Neuroscience*. 1996;16(12):3968-3978.
50. Filipkowski R, Rydz M, Berdel B, Morys J, Kaczmarek L. Tactile Experience Induces *c-fos* Expression in Rat Barrel Cortex. *Learning & Memory*. 2000;7(2):116-122.
51. Chung L. A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal. *Development & Reproduction*. 2015;19(2):61-67.
52. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):676-682. <https://imagej.net/Fiji>

53. Miceli S, Negwer M, van Eijs F, Kalkhoven C, van Lierop I, Homberg J et al. High serotonin levels during brain development alter the structural input-output connectivity of neural networks in the rat somatosensory layer IV. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2013;7:1-15.
54. Test t de Student se realizó utilizando GraphPad Prism version 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com
55. Seligman A, Karnovsky M, Wasserkrug H, Hanker J. NONDROPLET ULTRASTRUCTURAL DEMONSTRATION OF CYTOCHROME OXIDASE ACTIVITY WITH A POLYMERIZING OSMIOPHILIC REAGENT, DIAMINOBENZIDINE (DAB). *Journal of Cell Biology*. 1968;38(1):1-14.
56. Wong-Riley M, Welt C. Histochemical changes in cytochrome oxidase of cortical barrels after vibrissal removal in neonatal and adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(4):2333-2337.
57. Gonzalez-Lima F, Cada A. Cytochrome oxidase activity in the auditory system of the mouse: A qualitative and quantitative histochemical study. *Neuroscience*. 1994;63(2):559-578.
58. Melendez-Ferro M, Rice M, Roberts R, Perez-Costas E. An accurate method for the quantification of cytochrome C oxidase in tissue sections. *Journal of Neuroscience Methods*. 2013;214(2):156-162.
59. Vélez-Hernández M, Padilla E, Gonzalez-Lima F, Jiménez-Rivera C. Cocaine reduces cytochrome oxidase activity in the prefrontal cortex and modifies its functional connectivity with brainstem nuclei. *Brain Research*. 2014;1542:56-69.
60. Harding-Forrester S, Feldman D. Chapter 4 - Somatosensory maps. 3rd ed. Giuseppe Vallar, H. Branch Coslett; 2018.
61. Staiger J. Immediate-early gene expression in the barrel cortex. *Somatosensory & Motor Research*. 2006;23(3-4):135-146.
62. Geschwind D. Advances in Autism. *Annual Review of Medicine*. 2009;60(1):367-380.
63. Thye M, Bednarz H, Herringshaw A, Sartin E, Kana R. The impact of atypical sensory processing on social impairments in autism spectrum disorder. *Developmental Cognitive Neuroscience*. 2018;29:151-167.
64. Kojovic N, Ben Hadid L, Franchini M, Schaer M. Sensory Processing Issues and Their Association with Social Difficulties in Children with Autism Spectrum Disorders. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(10):1508.

65. Lee L, Tsytsarev V, Erzurumlu R. Structural and functional differences in the barrel cortex of *Mecp2* null mice. *Journal of Comparative Neurology*. 2017;525(18):3951-3961.
66. Staiger J, Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle J, Zilles K. Exploration of a novel environment leads to the expression of inducible transcription factors in barrel-related columns. *Neuroscience*. 2000;99(1):7-16.
67. Diamond M, von Heimendahl M, Knutsen P, Kleinfeld D, Ahissar E. 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008;9(8):601-612.
68. McReynolds J, Christianson J, Blacktop J, Mantsch J. What does the Fos say? Using Fos-based approaches to understand the contribution of stress to substance use disorders. *Neurobiology of Stress*. 2018;9:271-285.
69. Hannant P, Cassidy S, Tavassoli T, Mann F. Sensorimotor Difficulties Are Associated with the Severity of Autism Spectrum Conditions. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2016;10.
70. Fontes-Dutra M, Santos-Terra J, Deckmann I, Brum Schwingel G, Della-Flora Nunes G, Hirsch M et al. Resveratrol Prevents Cellular and Behavioral Sensory Alterations in the Animal Model of Autism Induced by Valproic Acid. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*. 2018;10:9.