



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**MORFOMETRÍA DEL CUERPO CALLOSO EN RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS
PRENATAL CRÓNICO POR RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO.**

PAULINA ANDREA RIVEROS HEAP

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUÍA: RICARDO OLIVARES PÉREZ MONTT

SANTIAGO, CHILE

2021



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**MORFOMETRÍA DEL CUERPO CALLOSO EN RATAS SOMETIDAS A ESTRÉS
PRENATAL CRÓNICO POR RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO.**

PAULINA ANDREA RIVEROS HEAP

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

NOTA FINAL: 6,8

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. RICARDO OLIVARES P-M.	7,0	
PROFESOR CONSEJERO: DR. JULIO LARENAS H.	7,0	
PROFESOR CONSEJERO: DR. GUSTAVO FARÍAS R.	6,5	

SANTIAGO, CHILE
2021

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a quienes me ayudaron en la realización de esta memoria de título,

A mi profesor guía, Dr. Ricardo Olivares Pérez -Montt, por su inmensa paciencia, por su confianza, disposición y por compartir conmigo tanto su tiempo, como sus conocimientos.

Al Dr. Julio Larenas y al Dr. Gustavo Farías, quienes me ayudaron y guiaron en la realización de esta memoria mediante sus correcciones y consejos.

A mis hermanos, mis pequeños gigantes.

A mi madre, mi luz, mi guía.

A mi padre, Dr. Víctor Riveros, que me enseñó a amar esta carrera por sobre todo y a pelear por lo que se quiere.

A mi pequeño pedazo de cielo, yo en la tierra y tú más allá, siempre juntos.

ÍNDICE

Resumen	
Abstract	
Introducción	1
Revisión Bibliográfica	2
• Anatomía del Sistema Nervioso	2
Hemisferios cerebrales.....	3
Histología Sistema Nervioso.....	4
• Cuerpo Calloso	7
Desarrollo del Cuerpo Calloso.....	8
Divisiones Macroscópicas del Cuerpo Calloso.....	9
Diferenciación Histológica del Cuerpo Calloso.....	10
Mielinización del Cuerpo Calloso.....	13
• Estrés	14
Efecto del estrés sobre el sistema nervioso central.....	15
Estrés prenatal.....	17
Cuerpo Calloso y estrés prenatal.....	20
Objetivos	23
Material y Método	24
Resultados	28
Discusión	32
Conclusiones	38
Bibliografía	39
Anexo 1	51

Índice de figuras

Figura 1. Sistema nervioso central y periférico.....	2
Figura 2. Hemisferios cerebrales.....	3
Figura 3. A. Neurona, cuerpo celular y sus procesos. B. Neurona en microfotografía de un frotis de médula espinal.....	4
Figura 4. Representación esquemática de la disposición de los diferentes tipos de células neurogliales y fotografías de las principales células gliales del sistema nervioso central.....	6
Figura 5. Vista medial de encéfalo. Desde una secuencia anteroposterior se observa rodilla cuerpo y esplenio del cuerpo calloso.....	7
Figura 6. Esquema comparativo del desarrollo embrionario entre marsupiales y mamíferos placentados, donde se observa la presencia de Cuerpo Calloso en estos últimos.....	8
Figura 7. Diagrama del Cuerpo Calloso humano, indicando su división anatómica en rodilla, cuerpo, istmo y esplenio, en una secuencia antero-posterior.....	9
Figura 8. Diagrama de un corte sagital del Cuerpo Calloso humano, donde se indica la distribución de las diferentes regiones en su composición fibrilar.....	11
Figura 9. Diagrama donde se indica la distribución de fibras en el Cuerpo Calloso en diferentes áreas corticales de un gato.....	12
Figura 10. Barrera placentaria a la exposición fetal a glucocorticoides.....	18
Figura 11. Fotografía de las cajas de madera que permitió una adecuada restricción del movimiento según el protocolo descrito Vyas et al.....	24
Figura 12. Fotografía de las jaulas de mantención de los grupos de animales experimentales. Bioterio INTA, Universidad de Chile.....	25
Figura 13. Fotografía de la vista medial de hemiencéfalo de rata, donde se destaca el Cuerpo Calloso (punteado).....	26
Figura 14. Fotografía de la vista plano medial de hemiencéfalo de rata, indicando la división del Cuerpo Calloso en tercios y quinto posterior, en base a la longitud máxima de éste. TA: Tercio anterior; TM: Tercio medio; TP: Tercio posterior; y QP: Quinto posterior.....	27
Figura 15. Área total promedio del Cuerpo Calloso.....	28
Figura 16. Áreas parciales promedio del Cuerpo Calloso.....	29

Figura 17. Perímetro promedio del Cuerpo Caloso.....	30
---	----

Índice de tablas

Tabla 1. Área Total Promedio del Cuerpo Caloso por grupo.....	28
Tabla 2. Áreas Parciales Promedio del Cuerpo Caloso por grupo	29
Tabla 3. Perímetro Promedio del Cuerpo Caloso por grupo.....	30
Tabla 4A. Pesos corporales y encefálicos promedios de las crías por grupo	31
Tabla 4B. Pesos promedios de las madres al inicio y término del protocolo.....	31

Tablas de compendio de medidas realizadas en estudio macroscópico del cuerpo caloso

Tabla A. Área total cuerpo caloso (mm ²).....	52
Tabla B. Áreas parciales promedio cuerpo caloso (mm ²).....	53
Tabla C. Perímetro total cuerpo caloso (mm)	54
Tabla D. Pesos grupo control y restricción (g).....	55
Tabla E. Peso hembras al inicio y término del protocolo (g).....	56

RESUMEN

El Cuerpo Calloso (CC), es la mayor comisura de sustancia blanca del encéfalo de los mamíferos placentados, constituida por numerosos haces de fibras transversales que conectan áreas corticales de ambos hemisferios cerebrales. Por otro lado, el estrés se define como una respuesta general del organismo ante demandas externas o internas, inicialmente amenazantes, que consiste en movilizar recursos fisiológicos y psicológicos para poderlas afrontar. Dada la importancia del CC en las conexiones cortico-corticales, el objetivo de la presente memoria de título fue evaluar el efecto en ratas, de un estrés prenatal crónico por inmovilización, sobre la anatomía macroscópica del CC.

Se utilizaron seis ratas preñadas de la cepa *Wistar* de 250g, de las cuales tres fueron sometidas, a partir del octavo día postconcepción, a una restricción de movimiento por diez días (2h/día). Posteriormente, las madres prosiguieron su gestación, parto y lactancia. Al nacimiento, las camadas fueron ajustadas a seis crías machos por madre (n=36), las cuales fueron pesadas al nacimiento, destete y sacrificio (45-52 días de edad).

Los encéfalos fueron seccionados a través de la cisura interhemisférica y ambos hemisferios fotografiados por su cara medial. Las imágenes fueron digitalizadas y analizadas mediante el programa *Scion Image*®, para la medición del área total, parciales (tercio anterior, medio, posterior y quinto posterior) y perímetro callosal.

Es así como, el estrés prenatal por inmovilización, afectó significativamente ($p < 0,01$), la morfología macroscópica del cuerpo calloso. Evidenciándose una disminución del área total, áreas parciales y perímetro callosal, en los animales sometidos a restricción.

Estableciendo, por trabajos previos, una relación directa entre número de axones y área callosal e inversa entre diámetro y densidad axonal; lo observado podría tener incidencia en la transferencia interhemisférica.

Palabras Clave: Cuerpo Calloso, Estrés Prenatal, Rata.

ABSTRACT

The Corpus Callosum (CC) is the largest commissure of white matter in the brain of placental mammals, consisting of numerous transverse fiber bundles that connect cortical areas of both cerebral hemispheres. On the other hand, stress is defined as a general response of the organism to external or internal demands, initially threatening, which consists of mobilizing physiological and psychological resources to be able to face them. Given the importance of CC in cortico-cortical connections, the objective of this thesis was to evaluate the effect in rats of chronic prenatal stress due to immobilization on the macroscopic anatomy of CC. Six 250g pregnant rats of the Wistar strain were used, three of which were subjected to movement restriction for ten days (2h/day) from the eighth day post-conception. Subsequently, the mothers continued their gestation, birth and lactation. At birth, litters were adjusted to six male offspring per mother (n=36), which were weighed at birth, weaning and slaughter (45-52 days of age). The brains were fixed, to be later sectioned through the interhemispheric fissure and both hemispheres photographed by their medial aspect. The images were digitized and analyzed using the *Scion Image*® program, for the measurement of the total, partial area (anterior third, middle, posterior, and posterior fifth) and callosal perimeter. Thus, prenatal stress due to immobilization significantly affected ($p<0.01$), the macroscopic morphology of the CC. Evidence shows a decrease in the total area, partial areas and callosal perimeter in the animals subjected to restriction, as compared to normal animals. Establishing, by previous Works, a direct relation between number of axons and callosal area and inverse relation between diameter and axonal density; what was observed could have an impact on interhemispheric transfer.

Key Words: Corpus Callosum, Prenatal Stress, Rat

INTRODUCCIÓN

Estudios experimentales, fundamentalmente realizados en roedores, demuestran que la organización final del sistema nervioso depende de factores no genéticos y que estresores como la desnutrición, el deterioro del medioambiente o la supresión de estímulos visuales, pueden provocar efectos deletéreos sobre la morfología y función de diversas estructuras del sistema nervioso central como el hipocampo, amígdala y corteza prefrontal.

El estrés es una reacción fisiológica del organismo, en el que participan diversos mecanismos de defensa para enfrentar una situación que se percibe como amenazante, siendo una respuesta natural y necesaria para la supervivencia; en la mayor parte de los casos, el estrés se produce como respuesta a las grandes presiones que se le imponen al organismo. El desequilibrio entre las demandas del organismo y la capacidad de éste para sobrellevarlas, caracterizan una situación estresante. Es así, como al estrés se le considera como un factor ambiental, que tiene un profundo efecto sobre la morfología y función de diversas estructuras del Sistema Nervioso Central (SNC).

Por otra parte, el Cuerpo Caloso (CC) es la mayor comisura de sustancia blanca del encéfalo de los mamíferos placentados, constituida por numerosos haces de fibras transversales que conectan áreas corticales de ambos hemisferios cerebrales. Tal es así, que determinados segmentos del CC contienen preferentemente fibras que provienen de áreas específicas de la corteza cerebral, existiendo hoy en día una activa investigación sobre la participación de esta comisura en las capacidades cognitivas y organización cerebral. De esta forma, se ha estudiado el efecto de diferentes estresores sobre la anatomía del CC, como son las restricciones nutricionales, el estrés acústico, visual y la ingesta de alcohol, entre otros.

Dada la importancia de CC en las conexiones cortico-corticales, el objetivo de esta memoria de título fue evaluar el efecto en ratas, de un protocolo de estrés prenatal crónico por inmovilización, con el propósito de demostrar si este tipo de estrés puede modificar la anatomía macroscópica del CC.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El sistema nervioso es el responsable de la interacción estímulo-respuesta entre el ambiente y el organismo, de la regulación y coordinación de los sistemas corporales, del control del sistema endocrino e inmunológico y de los órganos de los sentidos (König y Liebich, 2011).

Anatomía del Sistema Nervioso

Convencionalmente, el sistema nervioso se divide en tres porciones: sistema nervioso central (SNC), sistema nervioso periférico (SNP) y sistema nervioso autónomo (SNA). Los tres componentes actúan en conjunto en el control e integración de actividades motoras, sensitivas y conductuales del organismo (Afifi y Bergman, 1998).

El SNC está conformado por el encéfalo y la médula espinal, donde ocurre la correlación y la integración de la información nerviosa. Ambos están cubiertos por las meninges y suspendidos en el líquido cerebroespinal; además se encuentran protegidos por los huesos del cráneo y la columna vertebral, respectivamente (Snell, 2007).

El SNP está compuesto por los nervios craneales, nervios espinales, los ganglios asociados a éstos y los órganos receptores periféricos. El SNA (simpático y parasimpático), es la parte que participa en la regulación de funciones viscerales y sus componentes se localizan tanto en el SNC como en el SNP (Afifi y Bergman, 1998) (Figura 1).

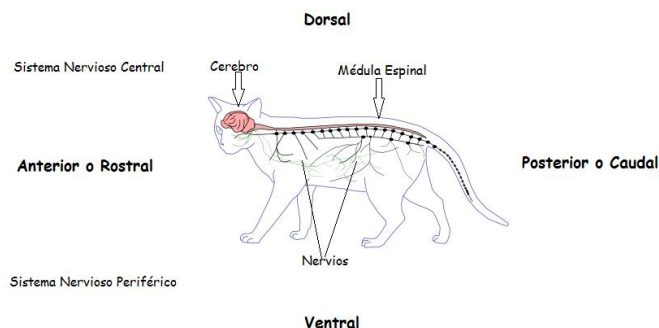


Figura 1.-Sistema nervioso central y periférico

Adaptado de https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/guiada_o_a_01nervioso.php

Hemisferios cerebrales

Los hemisferios cerebrales forman la mayor parte del encéfalo separados en la línea media por la fisura longitudinal cerebral. Esta contiene un pliegue de duramadre con forma de hoz y las arterias cerebrales anteriores. En la profundidad de ésta se ubica el Cuerpo Calloso, que conecta los hemisferios a través de la línea media (Snell, 2007). Cada hemisferio está formado por tres subdivisiones principales. La primera, la corteza cerebral (sustancia gris), la cual cubre toda la superficie de los hemisferios; el segundo elemento importante es la sustancia blanca subcortical, que está formada por los axones mielínicos y amielínicos que transportan la información que va hacia la corteza cerebral o sale de ella, siendo la cápsula interna la estructura de sustancia blanca subcortical de mayor organización; el tercer componente fundamental es un grupo destacado de somas neuronales denominado en conjunto núcleos basales, estos importantes centros prosencefálicos están implicados en la función motora (Haines, 2003) (Figura 2).

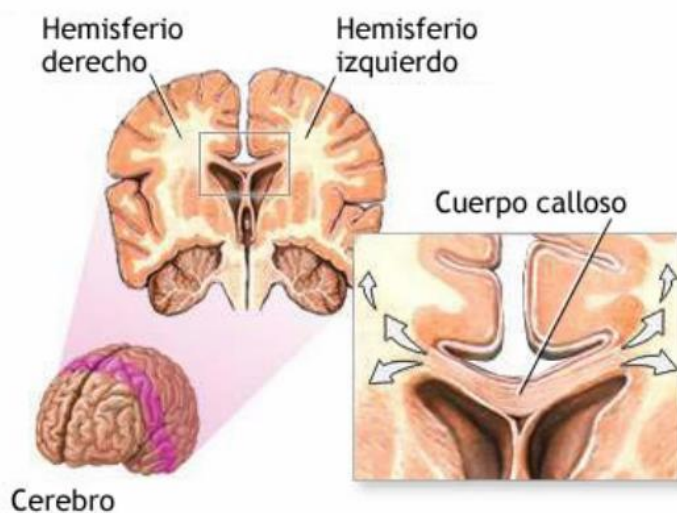
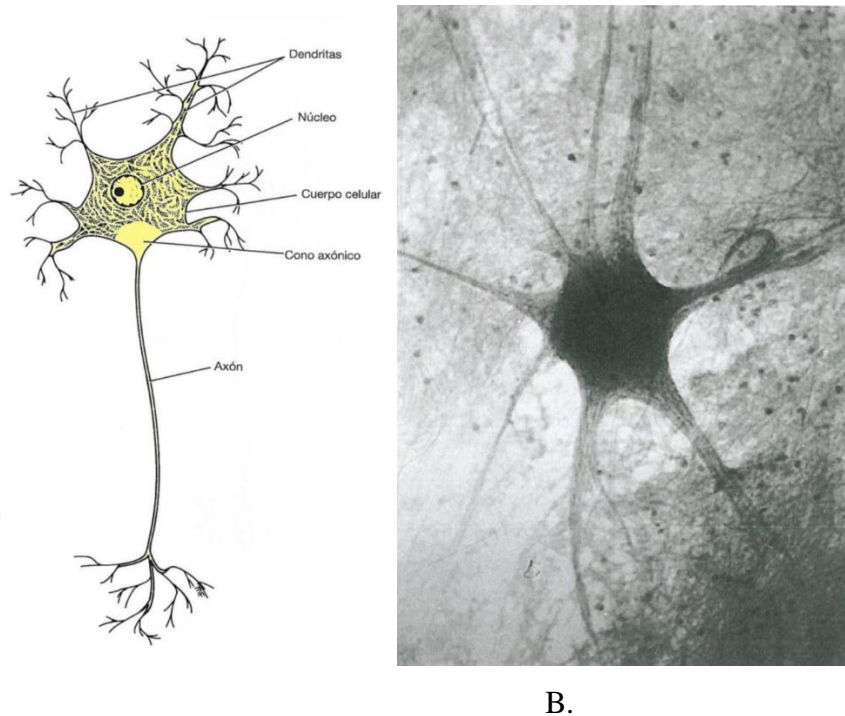


Figura 2.-Hemisferios cerebrales

Adaptado de https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/8753.htm

Histología del Sistema Nervioso

Existen dos tipos celulares en el sistema nervioso: la neurona y la célula glial. La neurona es la unidad funcional básica del sistema nervioso. La gran cantidad de neuronas y sus interconexiones son las responsables de la complejidad del sistema nervioso (Cunningham y Klein, 2009). Están formadas por un cuerpo celular, soma o pericarión (que contiene el núcleo) y sus procesos: el axón y las dendritas (Afifi y Bergman, 1998) (Figura 3).



A. B.
Figura 3.- A. Neurona, cuerpo celular y sus procesos. B. Neurona en microfotografía de un frotis de médula espinal. Adaptado de Snell, 2007.

El cuerpo celular tiene una función crítica en la fabricación de proteínas esenciales para el funcionamiento neuronal. Existen cuatro organelos especialmente importantes para realizar dicha función: el núcleo que contiene el diseño para la síntesis de las proteínas; los ribosomas libres, que sintetizan las proteínas citosólicas; el retículo endoplásmico rugoso, en el que se sintetizan las proteínas secretoras y de membrana; y el aparato de Golgi, que procesa y organiza los componentes secretores de membrana para el transporte (Cunningham y Klein, 2009).

Un conjunto de somas constituye la sustancia gris del SNC y las agrupaciones de somas que comparten funciones específicas en éste se denominan núcleos (Haines, 2003). Las dendritas son las prolongaciones que se ramifican cerca del soma, incrementando la superficie receptiva del cuerpo celular, son variables en patrón de ramificación y número, representando sitios de contacto sináptico con terminales axónicos de otras neuronas por medio de sus proyecciones conocidas como espinas o botones dendríticos. El axón es único, de mayor longitud y cilíndrico, se origina del cuerpo celular en una zona denominada cono axónico (Afifi y Bergman, 1998); constituyen la "carretera" para transferencia de información dentro del cerebro mediante señalización electroquímica y transporte de componentes celulares (Paus *et al.*, 2014), transmitiendo impulsos nerviosos a destinos más alejados y terminando en estructuras especializadas denominadas sinapsis (Haines, 2003).

El sostén de las neuronas del SNC consiste en variedades de células no excitables que en conjunto se denominan neuroglia. Las células de la neuroglia en general son más pequeñas que las neuronas y las superan en 5 a 10 veces en número; constituyen aproximadamente el 50% del volumen total del encéfalo y médula espinal (Snell, 2007).

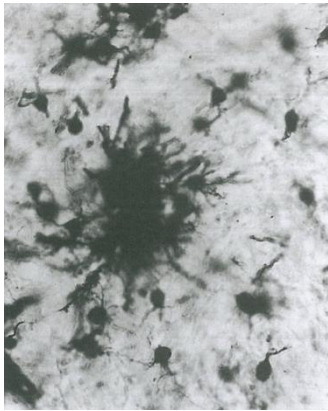
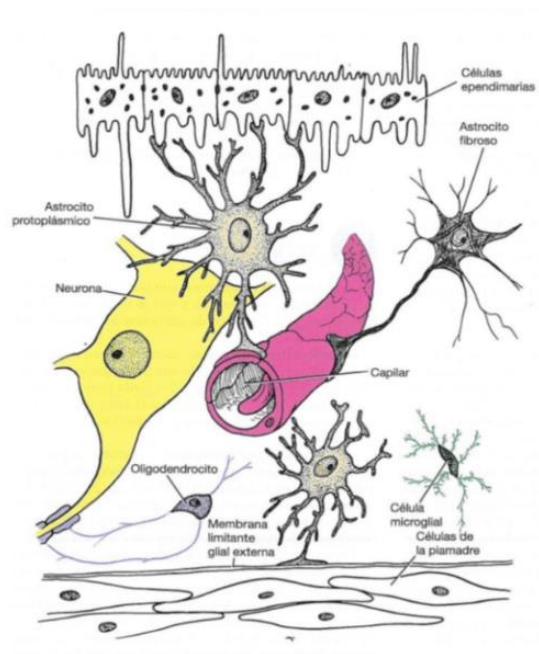
Existen varios tipos, las que se pueden organizar de la siguiente manera: macroglía (astrocitos y oligodendrocitos), microglía y células endoteliales (Afifi y Bergman, 1998).

Se hallan ubicadas entre los capilares y las células nerviosas. En el encéfalo las células de la microglía y la macroglía cumplen funciones de intercambio de sustancias y nutrición de las células nerviosas, colaborando en la conducción del impulso y como estructuras especiales, se encargan de tareas propias del sistema de defensa celular inespecífico. Las células de la glía forman la barrera hematoencefálica (König y Liebich, 2011).

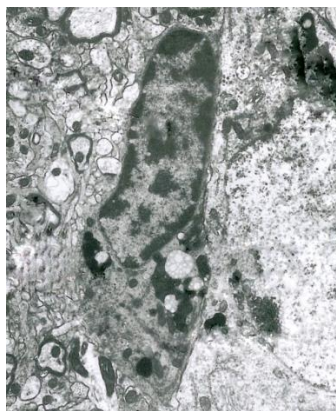
Los oligodendrocitos dan origen a la vaina de mielina que rodea los axones en el SNC y también es responsable de la formación de mielina dentro de la comisura interhemisférica (Rodríguez-Pena, 1999).

La microglía consiste en células de sostén no neurales pequeñas, que intervienen en la reparación del SNC mediante su acción fagocítica, convirtiéndose en células de limpieza (Crossman y Neary, 2007).

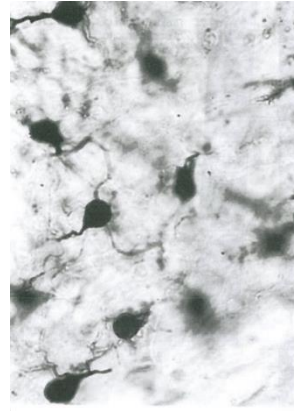
Las células endoteliales revisten los espacios interiores (ventrículos) del encéfalo y del canal central de la médula espinal (König y Liebich, 2011) (Figura 4).



Astrocito



Microglia



Oligodendrocito

Figura 4.- Representación esquemática de la disposición de los diferentes tipos de células neurogliales y fotografías de las principales células gliales del sistema nervioso central. Adaptado de Snell, 2007.

Cuerpo Calloso

El Cuerpo Calloso (CC), es la mayor de las comisuras de sustancia blanca que conecta áreas coincidentes de la corteza cerebral izquierda y derecha del encéfalo de los mamíferos placentados, situada en el fondo de la cisura longitudinal, constituida por numerosos haces de fibras transversales (Aboitiz y Montiel, 2003; Fitzgerald *et al.*, 2012) (Figura 5).

En un principio, se afirmó que la principal ventaja evolutiva de tener CC, era la capacidad de fusión de la línea media cortical en la comunicación interhemisférica. Posteriormente, se observó que, en los mamíferos placentados, el CC había permitido una adecuada sincronía entre los dos hemisferios y al mismo tiempo la transferencia de información entre ellos, lo que puede haber mejorado la capacidad de procesamiento del cerebro (Aboitiz y Montiel, 2003), cumpliendo un papel relevante en funciones auditivas, de lenguaje, de memoria y visuales, entre otras (Gazzaniga, 2000).

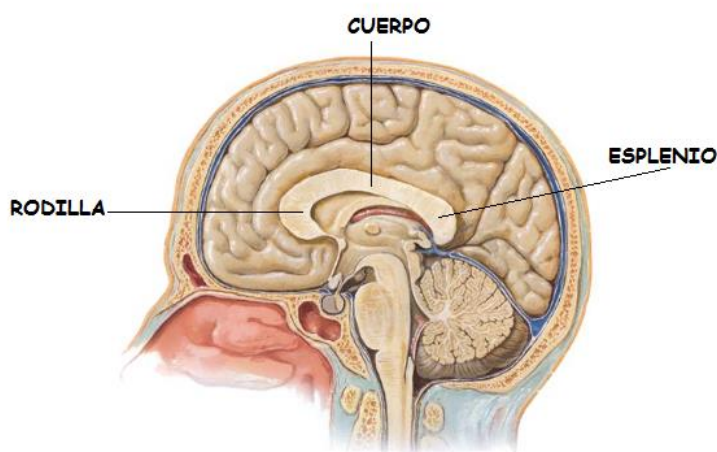


Figura 5.- Vista medial de encéfalo. Desde una secuencia anteroposterior se observa rodilla cuerpo y esplenio del cuerpo calloso.

Adaptado de <https://www.auladeanatomia.com/novosite/sistemas/sistema-nervoso/telencefalo/>

Desarrollo del Cuerpo Caloso

El CC se desarrolla fundamentalmente durante el periodo prenatal siguiendo un patrón anteroposterior; es decir, desde la rodilla hacia el esplenio callosal (Quintero-Gallego *et al.*, 2003). Desde el punto de vista del desarrollo embrionario y filogenético, el CC se origina como un componente de la comisura hipocampal (palial), una extensión de fibras conservadas que conectan la corteza medial (hipocampo), de los dos hemisferios. Posteriormente, el CC se separa de la comisura hipocampal y se localiza en la parte dorsal de la formación hipocámpica (Rakic y Yakovlev, 1968) (Figura 6).

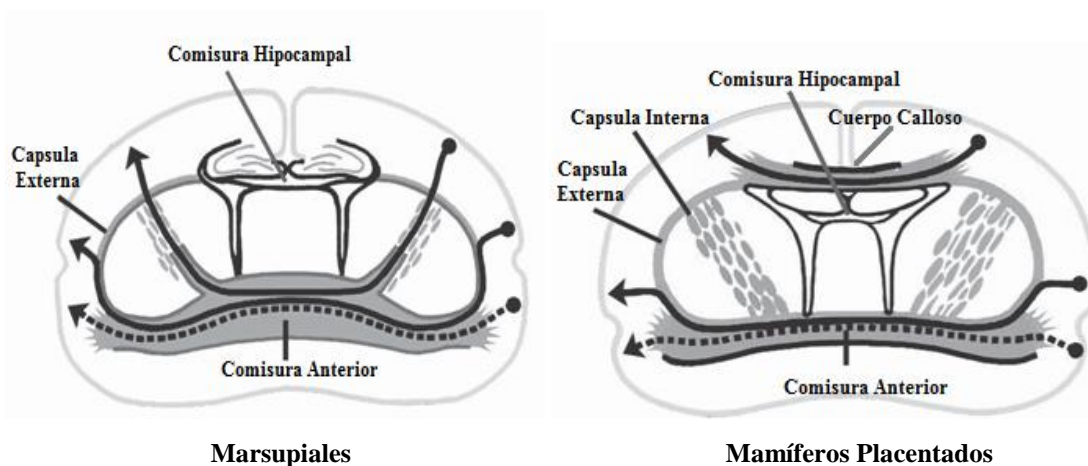


Figura 6.- Esquema comparativo del desarrollo embrionario entre marsupiales y mamíferos placentados, donde se observa la presencia de Cuerpo Caloso en estos últimos (Aboitiz y Montiel, 2003).

Lo anterior se relaciona con el origen de la isocorteza en los mamíferos, donde el mapa sensorial que originalmente era proyectado en el mesencéfalo en los reptiles, llegó a representarse en el telencéfalo, con la transferencia de la representación topográfica hacia los hemisferios cerebrales, haciéndose necesario un mecanismo de fusión en la línea media, ya que en el telencéfalo de los no placentados existen sólo las comisuras anterior y palial. En los monotremas y marsupiales, la solución fue enviar las fibras interhemisféricas a través de la comisura anterior, pero en los mamíferos placentados estas fibras tomaron una ruta más corta, la comisura hipocampal, con la posterior formación del CC (Aboitiz y Montiel, 2003).

Además, en los mamíferos placentados, el origen del CC se relaciona con la necesidad de integrar las hemirepresentaciones topográficas de la superficie sensorial a través de la línea media; otra función importante es la coordinación bimanual, pero se cree que esta última involucra al CC en etapas posteriores de la evolución cortical, después que los mapas topográficos ya se han establecido y la corteza cerebral ha empezado a ejercer un control significativo en la conducta motora a través de las vías piramidales (Aboitiz y Montiel, 2003).

Divisiones Macroscópicas del Cuerpo Calloso.

El CC se divide arbitrariamente en tres regiones, en relación a su longitud máxima: tercio anterior (rodilla), el tercio medio (cuerpo) y el tercio posterior (Witelson, 1989) (Figura 7).

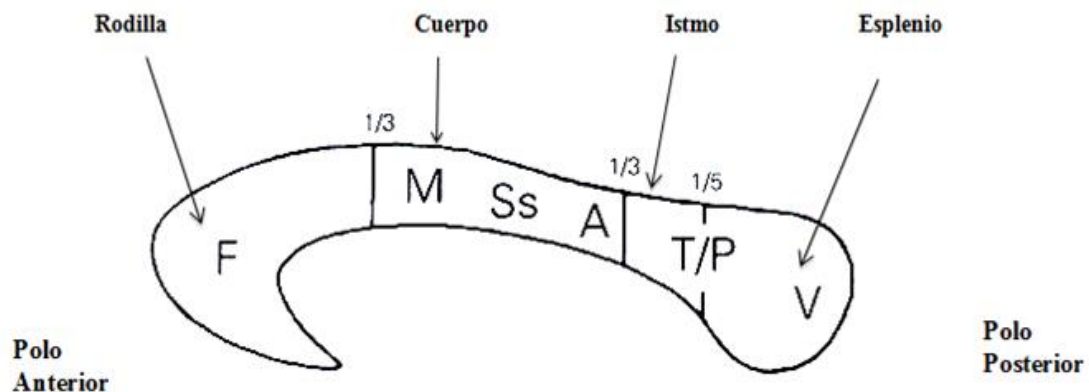


Figura 7.- Diagrama del Cuerpo Calloso humano, indicando su división anatómica en rodilla, cuerpo, istmo y esplenio, en una secuencia antero-posterior. Además, se indican las diferentes regiones corticales. F: fibras frontales; M: fibras de la corteza motora; Ss: fibras somatosensoriales; A: fibras auditivas; T/P: fibras temporoparietales; V: fibras visuales (Aboitiz y Montiel, 2003).

El tercio anterior, es una región bulbosa que contiene fibras que conectan la corteza prefrontal; el tercio medio, contiene proyecciones desde las áreas corticales motoras, somatosensorial y auditiva, en una secuencia antero-posterior y el tercio posterior es

frecuentemente dividido en un quinto posterior (esplenio), que contiene anteriormente proyecciones desde la corteza asociativa parietal y temporal y posteriormente fibras visuales provenientes de la corteza occipital. La región entre el quinto posterior y el tercio medio es el istmo, que conecta la corteza temporal superior y regiones parietales inferiores, incluyendo las áreas perisilvianas, relacionadas con el procesamiento del lenguaje (Pandya y Seltzer, 1986; Witelson, 1989; Witelson *et al.*, 1995) (Figura 7).

Además, es importante recordar que en el CC la mayoría de las fibras son homotópicas, es decir, unen regiones recíprocas ubicadas en los sectores simétricos de ambos hemisferios. Lo anterior no quiere decir que no existan fibras heterotópicas, las que pueden ser muy importantes para la propagación de la actividad de otras áreas corticales (Aboitiz y Montiel, 2003). En las áreas sensoriales primarias, sin embargo, la situación se considera más simple ya que las conexiones son esencialmente homotópicas (Houzel *et al.*, 2002).

Por otra parte, estudios morfométricos interespecie del CC indican una fuerte relación entre el tamaño callosal y el peso cerebral; del mismo modo existen diferencias interespecie en el tamaño relativo de algunos segmentos callosales, particularmente en el tercio posterior, siendo éste más grande en especies de visión frontal (Olivares *et al.*, 2000).

Diferenciación Histológica del Cuerpo Caloso.

En cuanto a su composición fibrilar, el CC no es homogéneo, presentando en el primate y humano las densidades de fibras delgadas y gruesas, una distribución complementaria (La Mantia y Rakic, 1990; Aboitiz *et al.*, 1992a). Es así como, en humanos, se ha establecido que el tercio anterior presenta la más alta densidad de fibras de menor diámetro (> de 0,4 μm) y la más baja densidad de fibras de mayor diámetro (> de 3 y 5 μm); por lo tanto, en esta región hay mayor densidad de fibras, de menor diámetro y menos mielinizadas, conduciendo los impulsos a una baja velocidad. En dirección posterior la densidad total de fibras tiende a disminuir, mientras que la proporción de fibras de gran diámetro y alta velocidad de conducción, aumenta hasta la mitad posterior del cuerpo; luego de este punto, el patrón se invierte de tal forma que la proporción de fibras de mayor diámetro disminuye. Finalmente, en la región más posterior hay un aumento local de fibras de mayor diámetro, con una concomitante disminución de la densidad total (Aboitiz *et al.*, 1992a) (Figura 8).

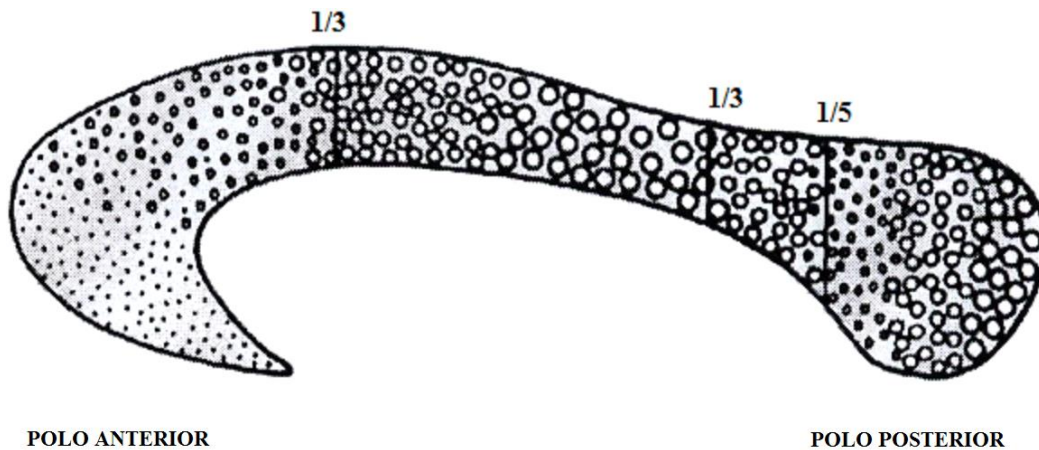


Figura 8.- Diagrama de un corte sagital del Cuerpo Calloso humano, donde se indica la distribución de las diferentes regiones en su composición fibrilar, de manera que el diámetro de las fibras es proporcional al radio del círculo que representan (Aboitiz y Montiel, 2003).

Debido a que la velocidad de conducción del impulso nervioso aumenta con el diámetro fibrilar, se pueden asignar diferencias en la función de las distintas zonas a lo largo del CC, en base a su composición de fibras. Es así como, las regiones con una alta densidad de fibras de menor diámetro (tercio anterior y esplenio anterior), que conectan las áreas de asociación prefrontales y temporo-parietales, respectivamente, presentan en promedio baja velocidad de conducción interhemisférica (fibras pobremente mielinizadas y de menor diámetro), pero poseen un mayor número de terminaciones en las respectivas áreas corticales. En cambio, aquellas regiones con mayor densidad de fibras de mayor diámetro (cuerpo medio y esplenio posterior), las que tienden a conectar áreas sensoriales, tienen mayor velocidad de conducción (altamente mielinizadas y de mayor diámetro) y suelen estar restringidas a la representación de la línea media sensorial o motora (Aboitiz *et al.*, 1992a, b).

Sin embargo, en otros mamíferos como los carnívoros, roedores y ungulados, no se observan diferencias regionales en el tamaño de fibras, por lo menos en la parte posterior

del CC. Lo anterior podría reflejar en parte la topografía más difusa del CC de estas especies (Aboitiz y Montiel, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado en gatos, que las conexiones visuales primarias se concentran a lo largo del límite entre las zonas 17 y 18, observándose la sincronía interhemisférica dependiente del CC durante la estimulación visual (Houzel *et al.*, 2002) (Figura 9).

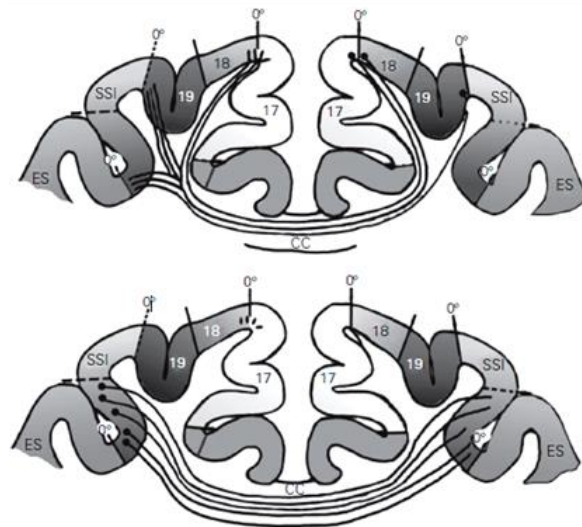


Figura 9.- Diagrama donde se indica la distribución de fibras en el Cuerpo Calloso en diferentes áreas corticales de un gato. En la imagen superior, se observa como las fibras originadas en 17/18 se proyectan a varias regiones representando visualmente puntos equivalentes a lo largo de la línea media (0 grados). En la imagen inferior, las fibras que conectan con áreas de orden superior (ES= corteza ectosilviana) y se proyectan a el área contralateral (CC = cuerpo calloso; SSI = corteza suprasilviana) (Aboitiz y Montiel, 2003).

En el neonato de rata, las células callosas están distribuidas uniformemente a través de la corteza occipital, pero hacia el final de la segunda semana postnatal, poco antes de la apertura de los ojos, ya se puede reconocer el patrón presente en el adulto (Olavarría y Van Sluyters, 1985). La investigación de los mecanismos que guían el desarrollo de las conexiones callosas, ha mostrado que esta vía se puede alterar significativamente por disrupción de las proyecciones retinianas en el neonato.

Estudios a nivel neuronal han tenido el propósito de determinar los tipos de neuronas dentro de la corteza visual de la rata, determinándose que las proyecciones visuales del CC surgen tanto de células piramidales (capas II a VIb) como de células piramidales modificadas (capas II, IV y VIb). Además, existen estudios que comparan roedores con gatos, que indican que la proporción de células no piramidales en las proyecciones del CC es mayor en roedores. Aunque las proyecciones del CC de ambos son notablemente similares en la morfología de las células piramidales, a pesar de las profundas diferencias que existen entre los sistemas visuales. Lo anterior sugiere que las proyecciones callosales visuales son funciones básicas que no han cambiado sustancialmente durante la evolución de los mamíferos (Martínez-García *et al.*, 1994).

Es así como, si se analiza a nivel interespecie, existe una conservación de la composición fibrilar callosal con una buena relación entre el número de fibras y tamaño cerebral. El diámetro fibrilar promedio tiende a conservarse entre especies, indicando una mantención de la velocidad de conducción más común. No obstante, el diámetro fibrilar máximo tiende a su aumento en especies de cerebros grandes (Olivares *et al.*, 2001).

Mielinización del Cuerpo Calloso.

La mielinización consiste en el recubrimiento de los axones con una membrana especializada que permite una adecuada transmisión de los impulsos nerviosos (Avaria, 2005). La mielinización comienza durante las últimas etapas del desarrollo fetal y continúa bien entrada la adultez (Lebel *et al.*, 2012; Dean *et al.*, 2014).

En roedores, la mielinización del CC se inicia relativamente tarde en su desarrollo, demostrándose que la mielinización callosal comienza alrededor del día 15 postnatal y el número de axones mielínicos en el esplenio aumentan entre los 25 y 60 días de edad, con el concomitante aumento del área esplénica. Al día 15 y 25, machos y hembras tienen el mismo número de axones mielínicos; al día 60, los machos presentan más axones mielinizados que las hembras, pero el número total de axones es el mismo (Kim y Juraska, 1997).

Estudios indican que la mielinización del CC en la rata continúa en la edad adulta, y esto podría subyacer al aumento continuo del tamaño callosal; lo anterior queda demostrado en

que el aumento del tamaño y mielinización del esplenio del CC en la rata, continúa a lo menos sobre los 120 días de edad (Nuñez *et al.*, 2000).

Aunque hay indicios sobre el crecimiento en tamaño y mielinización del CC en la rata durante la adultez, aún no se sabe cuánto tiempo más continúa este crecimiento. Es así como, se estudiaron los posibles cambios relacionados entre edad, área ocupada por la mielina y tamaño del tercio anterior y esplenio del cuerpo caloso en ratas de edad adulta (4 meses), edad mediana (12-13 meses), y en la vejez (18-26 meses). Lo anterior reveló un aumento en el tamaño y área compuesta de mielina entre las ratas de edad adulta y de edad mediana, y se mantuvo en la vejez sin indicios de pérdida relacionada con la edad en las regiones estudiadas (Yates y Juraska, 2007).

Estrés

El estrés se define como una respuesta general del organismo ante demandas externas o internas, inicialmente amenazantes, que consiste en movilizar recursos fisiológicos y psicológicos para poderlas afrontar. Es decir, será el desequilibrio entre las demandas del organismo y la capacidad de éste para sobrellevarlo lo que caracteriza una situación estresante; el mantenimiento de esta situación caracteriza al estrés crónico o diestrés (Montoro *et al.*, 2009).

El estrés agudo es necesario para que el organismo sea capaz de afrontar amenazas reales o imaginarias a corto plazo. Sin embargo, el estrés crónico puede alterar la respuesta inmune, la remodelación neuronal y ocasionar déficit de la memoria (Sapolsky, 2000; Erickson *et al.*, 2003; Morales-Medina *et al.*, 2009).

Cabe señalar, ante una situación de estrés, el organismo tiene una serie de reacciones fisiológicas que suponen la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA). Este eje, junto con el sistema nervioso simpático, se activa tanto con las agresiones físicas como con las psíquicas y, al activarse, el hipotálamo segrega la hormona FLC (factor liberador de corticotropina), la que actúa sobre la glándula hipófisis y provoca la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Esta secreción incide sobre la corteza de las glándulas adrenales, las que dan lugar a la producción de glucocorticoides que, junto a catecolaminas, como la adrenalina, pasan al torrente circulatorio y producen múltiples

incidencias orgánicas sobre la respuesta fisiológica a un evento determinado o al inicio de alguna enfermedad (Dagnino-Subiabre *et al.*, 2006).

Una exposición al estrés prolongado en el tiempo, aumentará el tono basal del eje HHA y, por tanto, la reactividad al estrés, generando una elevada secreción de glucocorticoides y la desconexión de los mecanismos de retroalimentación negativa del sistema (Jankord y Herman, 2008).

La reacción del eje HHA al estrés, está modulado en su intensidad y su duración por el *feedback* de los glucocorticoides a nivel del hipocampo, siendo las neuronas hipocámpicas muy sensibles al exceso o la insuficiencia de glucocorticoides, la variación de la eficacia de este sistema de freno, debería dar cuenta de las diferencias individuales de reactividad al estrés (Duval *et al.*, 2010).

Además, al acumularse en exceso los corticoides, se detienen los procesos de regeneración celular del organismo, incluyendo la mucosa del sistema digestivo y las células del sistema inmunológico entre otras (Dagnino-Subiabre *et al.*, 2006).

Efecto del estrés sobre el sistema nervioso central

El estrés tiene un profundo efecto sobre la morfología y función de diversas estructuras del SNC. En ratas se ha observado que induce alteraciones morfológicas en hipocampo, amígdala y corteza prefrontal, estructuras que están relacionadas con el aprendizaje, memoria y respuestas emocionales (Vyas *et al.*, 2002). El estrés repetido genera, en fase de agotamiento, una hipercortisolemia crónica. En el animal se ha demostrado que la hipercortisolemia podía ser neurotóxica para las estructuras cerebrales vulnerables como el hipocampo (M^c Ewen, 2002a).

Es así como, ratas que fueron sometidas a un estrés por inmovilización, presentaron atrofia dendrítica en las neuronas del colículo caudal, estructura relacionada con la vía auditiva refleja, y al dar un periodo de recuperación de quince días post-estrés, las neuronas de dicho colículo presentaron su estructura dendrítica totalmente restaurada (Dagnino-Subiabre *et al.*, 2005).

Estudios en modelos animales que fueron sometidos a un estrés crónico y hormonal, han demostrado que el estrés induce remodelación dendrítica de las neuronas piramidales del

área CA3 del hipocampo, disminuyendo en el adulto la neurogénesis en el giro dentado y reduciendo el volumen hipocampal total (Czeh *et al.*, 2001).

Ratas de tres meses de edad sometidas a estrés crónico por inmovilización, presentaron una menor densidad neuronal en la corteza visual primaria (área 17), que el grupo control y una significativa menor densidad neuronal ($p < 0,05$) que el grupo postestrés, el cual presentó la más alta densidad neuronal observada. Estableciendo una relación inversa entre densidad neuronal y tamaño de los somas neuronales y sus respectivas conexiones y ramificaciones dendríticas, lo anterior podría tener incidencia en el procesamiento de la información visual (Olivares *et al.*, 2010).

A su vez, estudios sobre el estado morfofuncional del componente capilar de la microcirculación cerebral en ratas sometidas a estrés por inmovilización, mostraron que los animales estresados presentaban, en el período inmediatamente postestrés, una mayor constricción de los capilares *versus* los animales controles, seguida de una dilatación compensatoria a las 24 horas (Danielyan, 2008).

Además, se ha evidenciado que ratas criadas en la oscuridad presentan menor densidad vascular en la capa IV de la corteza visual *versus* animales criados con ciclos de luz–oscuridad (Argandoña y La Fuente, 2000).

En estudios experimentales con ratas *Sprague-Dawley* de 13 días de edad, en donde se indujo hipoxia e hipoxia + isquemia, se observaron cambios significativos en el peso cerebral relacionados con la pérdida de tejido cerebral (Suryana y Jones, 2014).

Por otro lado, estudios de neuroimágenes en humanos, han demostrado diferencias en las propiedades estructurales de la sustancia blanca relacionada con experiencias adversas tales como el estrés prenatal (Sarkar *et al.*, 2014).

Es así como en Monos Rhesus (*Macaca mullata*) adolescentes, que experimentaron maltrato materno-infantil, presentaron una significativa reducción de la concentración de sustancia blanca, utilizando imagenología de resonancia por tensor de difusión, en cuerpo calloso, corteza occipital, lámina medular externa y tronco encefálico. Lo anterior se asoció a altos niveles plasmáticos de cortisol (Howell *et al.*, 2013).

Estrés prenatal

El estrés prenatal (EP), se define como la reacción inespecífica del organismo ante estímulos psíquicos y físicos, que involucran varios procesos de adaptación y requiere diversas estrategias de afrontamiento (McEwan, 2002b; Zurroza-Estrada *et al.*, 2009).

El período perinatal es crítico para el desarrollo del sistema nervioso, pues constituye un espacio de vulnerabilidad en el que las interacciones entre genoma y ambiente provocan cambios morfofuncionales con expresión conductual, eventualmente persistentes hasta la adultez (Silberman, *et al.*, 2016). Barker (1995), introdujo el concepto “programación fetal”, dando cuenta de la interrelación entre el ambiente prenatal y el desarrollo del feto: si el primero resulta adverso, se asociará con mayor probabilidad al surgimiento de patologías en la vida extrauterina. En efecto, algunos autores consideran al fenómeno, como factor de riesgo mayor para el desarrollo de trastornos psiquiátricos y enfermedades somáticas (Toepfer *et al.*, 2017).

El EP afecta a varias regiones del cerebro en la descendencia expuesta, incluyendo el hipocampo, amígdala, cuerpo caloso, neocorteza, cerebelo e hipotálamo. Estos cambios inducidos por el estrés, son visibles tanto macroscópicamente como microscópicamente (Charil *et al.*, 2010).

Por ejemplo, la exposición a estrés prenatal breve y suave diario, tiene efectos beneficiosos sobre la neurogénesis y dendrogénesis, mediados por receptores mineralocorticoides; mientras que el estrés gestacional extendido y severo, tiene efectos deletéreos completamente opuestos mediados por receptores glucocorticoides (Fujioka *et al.*, 2006).

El cortisol (corticosterona en roedores), es un glucocorticoide y el producto final primario del eje HHA, un componente importante del sistema de estrés en humanos, monos y roedores (Seckl y Holmes, 2007). Durante el embarazo, las mujeres tienen niveles naturalmente elevados de cortisol. Este glucocorticoide es en realidad esencial para el crecimiento fetal y la inducción de ciertas enzimas, como el surfactante pulmonar, preparando al feto para la vida extrauterina (Garbrecht *et al.*, 2006).

Esta hormona esteroidea, junto con el sistema nervioso simpático, ayuda en la movilización de los recursos energéticos del organismo cuando un evento potencialmente amenazante requiere que el individuo entra en un modo de "lucha o huida"; Sin embargo, en condiciones estresantes particulares, las concentraciones maternas de cortisol pueden

alcanzar niveles anormalmente altos, en consecuencia, este exceso de cortisol materno (corticosterona en roedores), que es por lo general, en su mayoría transformado en su forma inactiva (es decir, cortisona), llega al feto en altas concentraciones que potencialmente pueden alterar el desarrollo y crecimiento fetal (Seckl y Holmes, 2007).

Durante la preñez, la activación del eje HHA materno, junto con el subsecuente aumento en los niveles de glucocorticoides (GC), en respuesta a situaciones de estrés agudo, no alteran significativamente los niveles de cortisol fetal gracias a la acción de la enzima placentaria 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11b-HSD2) (Welberg *et al.*, 2005).

Sin embargo, condiciones de estrés crónico conducen a una activación prolongada del eje HHA materno, generando hipercortisolemia, un fenómeno asociado con la perturbación en el funcionamiento de la barrera de la enzima 11b-HSD2, exponiendo así al feto a niveles elevados de GC (Welberg *et al.*, 2005). Adicionalmente, la activación del eje HHA materno es acompañado por un aumento sustantivo de las concentraciones plasmáticas de catecolaminas, lo cual induce vasoconstricción de las arterias placentarias, reduciendo el flujo de sangre y oxígeno al feto. También ha sido observado que los GCs maternos estimulan la producción de las hormonas de liberación de corticotropina y la liberación de cortisol desde las glándulas adrenales fetales, contribuyendo a un estado crónico de hipercortisolemia fetal (Buckingham, 2006) (Figura 10).

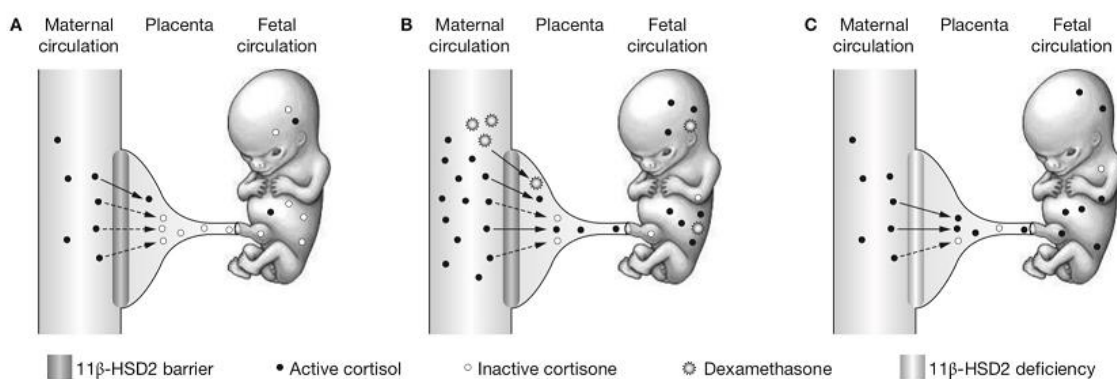


Figura 10.- Barrera placentaria a la exposición fetal a glucocorticoides.

(A) En situación normal la 11 β -HSD2 placentaria actúa como una barrera protectora al inactivar glucocorticoides fisiológicos activos (por ejemplo, cortisol) a formas inertes (por

ejemplo, cortisona). La inactivación de glucocorticoides placentarios asegura que los niveles altos de glucocorticoides maternos se excluyan en gran medida del feto.

(B) El estrés materno severo puede elevar los niveles de cortisol materno y saturar la actividad 11 β -HSD2 que aumenta la exposición fetal al cortisol. La dexametasona es un sustrato pobre de 11 β -HSD2 que pasa fácilmente a través de la placenta.

(C) Si la 11 β -HSD2 placentaria es deficiente, los niveles elevados de cortisol activo pasan intactos a través de la placenta.

11 β -HSD2: 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (Seckl y Holmes, 2007).

La mayor parte de los estudios sobre las consecuencias del EP han sido realizados en roedores. En ellos, se ha verificado que la exposición al estrés durante la preñez y la privación materna al inicio de la vida postnatal, se asocia con conductas de tipo ansioso (Vallée *et al.*, 1997), desregulación del eje HHA (Takahashi *et al.*, 1991), desarrollo neuronal alterado a nivel de hipocampo y amígdala (Lemaire *et al.*, 2000), déficits cognitivos (Paris *et al.*, 2011) y comportamientos sociales desajustados en la descendencia (Lee *et al.*, 2007).

Estudios de EP por restricción del movimiento de las hembras gestantes, han permitido observar en las crías consistentes incrementos de la hormona corticosterona en respuesta a estrés y atrofia en neuronas del hipocampo, ambos factores vinculados con hiperactividad del eje HHA (Maccari *et al.*, 2003; Jia *et al.*, 2010; Bock *et al.*, 2011).

A su vez, estudios en roedores, primates y rumiantes, específicamente ovejas, han evidenciado que la exposición prenatal a glucocorticoide, retrasa la maduración de oligodendrocitos y astrocitos (Antonow-Schlorke *et al.*, 2003), células esenciales para la biosíntesis de mielina. También se observó, que la administración prenatal de betametasona fue asociado con adelgazamiento de la vaina de mielina del cuerpo calloso en ovejas (Huang *et al.*, 2001 a,b).

Desde una perspectiva conductual, se ha observado en ratas de 21 días de edad, expuestas a un EP por restricción de movimiento, mayor latencia de escape y un patrón de nado aleatorio, con respecto a las ratas controles, al evaluar el aprendizaje y memoria espacial, mediante el laberinto acuático de *Morris* (González *et al.*, 2011).

Por otro lado, ratones de la cepa CF-1 al día de nacimiento, presentaron alteraciones significativas en la anatomía de los huesos de la cabeza ósea y en la longitud de los huesos apendiculares, al ser sometidas sus madres, a un estrés por restricción de movimiento, durante la última semana de gestación (Lizana *et al.*, 2012; Henríquez *et al.*, 2013).

Cuerpo calloso y estrés prenatal

El Cuerpo Calloso (CC), aparece alrededor del día 18 de gestación en ratas, 72 en primates no humanos y comienzo del segundo trimestre en humanos (Clancy *et al.*, 2001).

La investigación de los mecanismos que guían el desarrollo de las conexiones callosas, ha mostrado que esta vía se puede alterar significativamente por disrupción de las proyecciones retinianas en el neonato, es así como, estudios de como el estrés por privación visual afecta el CC en ratas sometidas a entrenamiento sensorio-motriz, demostró que al comparar el grupo control (sin estimulación y sin deprivación visual) *versus* el grupo estimulado, este último presentó un aumento del área del tercio posterior del cuerpo calloso; y al contrastar dichos resultados con los animales sometidos a estimulación y privación visual mediante lesión retiniana, existió una disminución de dicha área callosal, sugiriendo una disminución en las proyecciones tálamo-corticales que se dirigen hacia la corteza visual (Suazo *et al.*, 2009). Además, se ha observado que la enucleación bilateral al nacimiento produce marcadas anomalías en la distribución y topografía de las conexiones callosas interhemisféricas, generando una disminución de la proporción de botones sinápticos en la corteza visual de la rata (Sorensen *et al.*, 2003).

En cuanto al CC y el EP se ha observado que hembras preñadas de la especie *Macaca mulatta* (gestación de 164 días), que fueron sometidas a un estrés acústico diario durante 10 minutos desde los 90 a los 140 días de gestación, al realizarles resonancia magnética a sus crías entre los 7-11 meses de edad, se demostró que las alteraciones en la morfología del cuerpo calloso afectan de diferente manera a machos y hembras, teniendo los machos una menor área callosal total que las hembras. Estos resultados, nos indican que factores prenatales pueden influenciar el desarrollo del cuerpo calloso, afectando posiblemente la comunicación interhemisférica (Coe *et al.*, 2002).

Ratas que fueron sometidas a un tipo de estrés nutricional, donde fueron malnutridas prenatalmente y durante la lactancia, con una dieta isocalórica e hipoproteica, presentaron

un cuerpo calloso más pequeño a los 45-52 días de edad, al compararlos con los controles; en cambio, aquellos animales rehabilitados durante la lactancia con una dieta alta en proteínas, mostraron normalidad en el desarrollo del tercio medio y posterior del CC; pero no del tercio anterior a pesar de la rehabilitación dietaria durante la vida postnatal (Olivares *et al.*, 2002).

Estudios realizados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), en ratas de 60-62 días de edad sometidas a estrés nutricional prenatal, con una dieta isocalórica e hipoproteica presentaron una significativa disminución, en el diámetro axonal promedio en el esplenio callosal que los animales eutróficos, tanto de las fibras mielínicas como amielínicas y se observó una mayor densidad axonal promedio, con respecto a los controles en ambos tipos de fibras; lo anterior sugiere que la velocidad de transmisión interhemisférica puede estar afectada por la desnutrición oculta, en particular lo que dice relación con las conexiones visuales (Olivares *et al.*, 2007).

A su vez, ratas sometidas a una restricción calórica proteica a contar del 8^{vo} día postconcepción, equivalente aproximadamente a un 40% del consumo normal de una hembra en la segunda y tercera semana de gestación (25 g) y que después de su nacimiento fueron transferidas a ratas nodrizas para una adecuada lactancia, presentaron a nivel macroscópico, a los 45-52 días de edad, una reducción significativa de las áreas parciales y totales del cuerpo calloso, como también una disminución del perímetro callosal, en relación con los animales controles. Además, mediante MET del esplenio callosal, se evidenció una disminución significativa del diámetro de las fibras mielínicas en los animales malnutridos y una mayor densidad axonal de éstas. En relación a las fibras amielínicas se observó una disminución significativa del diámetro de las fibras y un aumento también significativo de la densidad axonal en los animales malnutridos (Olivares *et al.*, 2012).

Estudios en ratas preñadas sometidas a estrés prenatal por natación forzada durante 20 minutos, se pudo observar en las crías, una disminución en el número de microglías en el cuerpo calloso tanto al día 1 como al día 10 postnatal (Gómez-González y Escobar, 2010).

Finalmente, estudios por Resonancia Magnética, en humanos, sometidos a eventos de estrés prenatal, se evidenció una menor Magnetización de relación de transferencia (MTR *Magnetization Transfer Ratio*) y Fracción de agua con mielina (MWF *Myelin Water*

Fraction), en la rodilla y/o esplenio del CC y baja MTR en el volumen total de sustancia blanca. Por otro lado, factores estresantes durante la niñez temprana (0 a 4 años), se asoció a un aumento de MTR en el esplenio; y el estrés durante la adolescencia con aumento de MTR en la rodilla y disminución de la Difusividad media (MD Mean Diffusivity) en el esplenio (Jensen *et al.*, 2018).

Grandes axones tienen relativamente delgadas vainas de mielina comparado con pequeños axones (Paus *et al.*, 2014), por lo cual una disminución de MTR y MWF puede reflejar un aumento de la densidad de axones pequeños con gruesas vainas de mielina (Jensen *et al.*, 2018).

Sobre la base de los antecedentes expuestos, y tomando en consideración como diversos factores estresantes (ambientales y nutricionales), pueden modificar la anatomía del sistema nervioso, se consideró de interés observar, cómo un tipo de estrés prenatal crónico por inmovilización, es capaz de modificar la anatomía macroscópica del Cuerpo Calloso en la descendencia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio anatómico macroscópico del cuerpo calloso en ratas sometidas a estrés prenatal crónico por restricción de movimiento.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar y comparar el área total y áreas parciales (tercio anterior, medio, posterior y quinto posterior) del cuerpo calloso, como también el perímetro de éste, en ratas controles y ratas sometidas a estrés prenatal crónico.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 36 crías ratas macho (*Rattus norvegicus* variedad albina), de la cepa *Wistar*, obtenidas de la cruce de seis hembras primíparas de 250 g de peso (100 días de edad). El día cero de gestación se identificó por la presencia de tapón mucoso vaginal. Las hembras preñadas se dispusieron aleatoriamente en un grupo control y un grupo de restricción, de tres animales cada uno.

El grupo experimental fue sometido a un protocolo de restricción de movimiento descrito por Vyas *et al.*, 2002 a partir del octavo día post concepción, en el cual se procedió a introducir a la hembra preñada en una caja de madera de 18x6x6cm, la que contaba con una adecuada ventilación y que permitió una completa restricción del animal, pero con un espacio mínimo necesario, para que eventualmente estos pudieran defecar y orinar y no tener contacto con sus desechos (Figura 11).

Las hembras preñadas permanecieron en las cajas de inmovilización 2 horas por día, de las 10-12 AM, durante 10 días consecutivos, para posteriormente volver a su jaula de mantención correspondiente. Las hembras preñadas del grupo control fueron manipuladas al igual que los animales sometidos al protocolo de restricción.



Figura 11.- Fotografía de las cajas de madera que permitió una adecuada restricción del movimiento según el protocolo descrito Vyas *et al.*, (2002).

Posterior a los 10 días ambos grupos (control y restricción) siguieron su gestación, parto y lactancia en sus jaulas de mantención, siendo pesadas al inicio y final del modelo experimental.

Al nacimiento, las camadas fueron ajustadas a 6 crías machos por madre (18 controles y 18 restricción n=36), los cuales fueron pesados al nacimiento, destete (21 días) y sacrificio (45-52) días de edad.

El origen de los animales y el procedimiento experimental, se realizó en el Bioterio del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), bajo un régimen de 12 h luz/12 h oscuridad a una temperatura de $21\pm 1,2^{\circ}\text{C}$ y con acceso a agua y comida *ad libitum* (Figura 12).



Figura 12.- Fotografía de las jaulas de mantención de los grupos de animales experimentales. Bioterio INTA, Universidad de Chile.

Al momento de su sacrificio, los animales fueron anestesiados con Tiopental Sódico (40-60 mg/kg de peso corporal), vía intraperitoneal y luego, perfundidos trascardialmente con

formalina al 5%, posteriormente los cuerpos fueron decapitados y las cabezas descalotadas, para extraer los encéfalos, los cuales fueron pesados y fijados en formalina al 10%, hasta el momento del estudio morfométrico.

Los encéfalos extraídos y fijados por 15 días, fueron seccionados a través de la cisura interhemisférica y ambos hemisferios fotografiados por su cara medial a una escala de 2,5:1 cm, las imágenes fotográficas fueron digitalizadas y analizadas mediante el programa Scion Image® for Windows (Merlo *et al.*, 2002).

Se procedió a realizar la medición del área total y parciales callosales (tercio anterior, medio, posterior, y quinto posterior, en mm^2); como también la medición del perímetro (mm) de éste (Olivares *et al.*, 2012) (Figura 13).

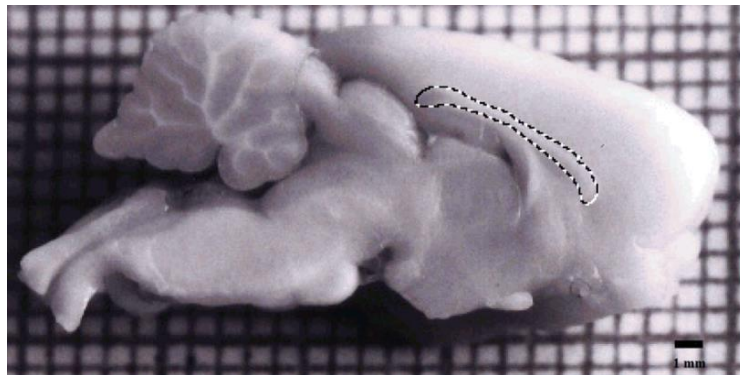


Figura 13.- Fotografía de la vista medial de hemicéfalo de rata, donde se destaca el Cuerpo Calloso (punteado).

Para obtener los valores de las áreas callosales totales y parciales se midió la longitud lineal máxima del cuerpo calloso, desde el polo rostral al polo caudal. Posteriormente dicho valor fue dividido en tres partes para delimitar cada uno de los tres segmentos del cuerpo calloso (tercio anterior, medio y posterior); el valor del quinto posterior se obtuvo dividiendo dicha longitud por cinco (Olivares *et al.*, 2002) (Figura 14).

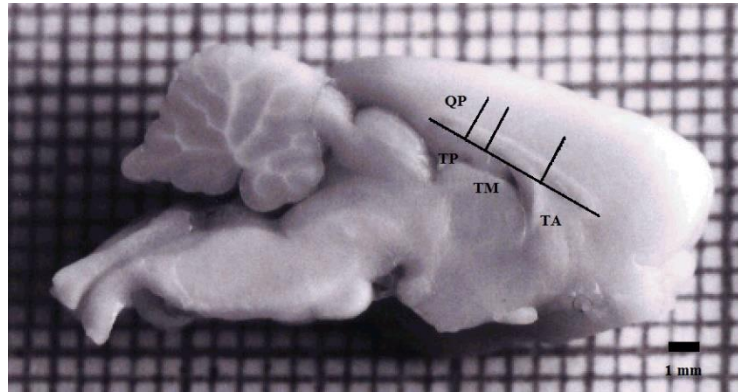


Figura 14.- Fotografía de la vista plano medial de hemiencéfalo de rata, indicando la división del Cuerpo Calloso en tercios y quinto posterior, en base a la longitud máxima de éste. TA: Tercio anterior; TM: Tercio medio; TP: Tercio posterior; y QP: Quinto posterior.

Los valores morfométricos obtenidos, fueron corregidos a su magnificación real, tabulados y caracterizados, para el análisis estadístico correspondiente, mediante una prueba de *t* de *Student* de muestras independientes.

El protocolo de experimentación y el método de sacrificio de los animales en el presente trabajo, fue aprobado por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Certificado N° 16-2015) (Anexo 1).

RESULTADOS

Se realizó el estudio del cuerpo calloso de ratas machos (*Rattus norvegicus* variedad albina) de la cepa *Wistar*, descendientes de madres sometidas a un protocolo de estrés prenatal por restricción de movimiento. En el presente estudio macroscópico se midió el área total, las áreas parciales (TA, TM, TP y QP), así como también el perímetro callosal, tanto en el grupo Control (n=18) como en el grupo Restricción (n=18).

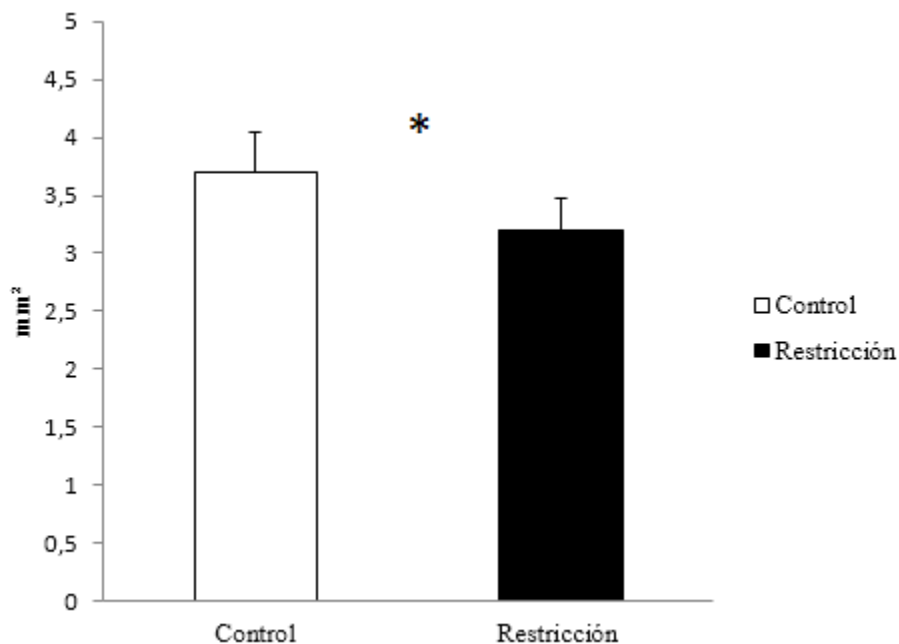
Los resultados obtenidos son indicados a continuación en las tablas y gráficos detallados:

Tabla 1.- Área Total Promedio del Cuerpo Calloso por grupo.

Área total Cuerpo Calloso	(mm ²)
Grupo Control (n=18)	3,70 ± 0,34
Grupo Restricción (n=18)	3,19 ± 0,29 *

Ver Anexo 2: Tabla A, donde se especifica en detalle la información.

* $p < 0,0001$



* $p < 0,0001$

Figura 15.- Área total promedio del Cuerpo Calloso

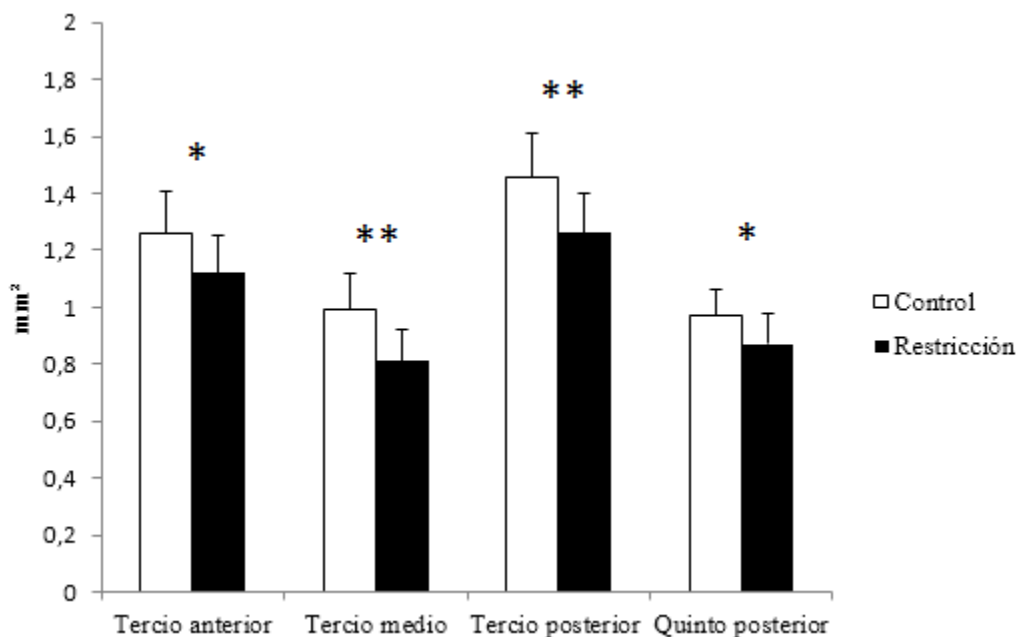
Los resultados obtenidos indican una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,0001$), del área total del cuerpo calloso en aquellos animales sometidos al protocolo de estrés prenatal (Tabla 1, Figura 15). El detalle de los valores por animal de cada grupo, se indican en el Anexo 2 Tabla A.

Tabla 2.- Áreas Parciales Promedio del Cuerpo Calloso por grupo.

Áreas Cuerpo Calloso (mm ²)	Tercio Anterior	Tercio Medio	Tercio Posterior	Quinto Posterior
Grupo Control (n=18)	1,26 ± 0,15	0,99 ± 0,13	1,46 ± 0,15	0,97 ± 0,09
Grupo Restricción (n=18)	1,12 ± 0,13*	0,81 ± 0,11**	1,26 ± 0,14**	0,87 ± 0,11*

Ver Anexo 2: Tabla B, donde se especifica en detalle la información.

$p < *0,01$ $**p < 0,001$



$*p < 0,01$ $**p < 0,001$

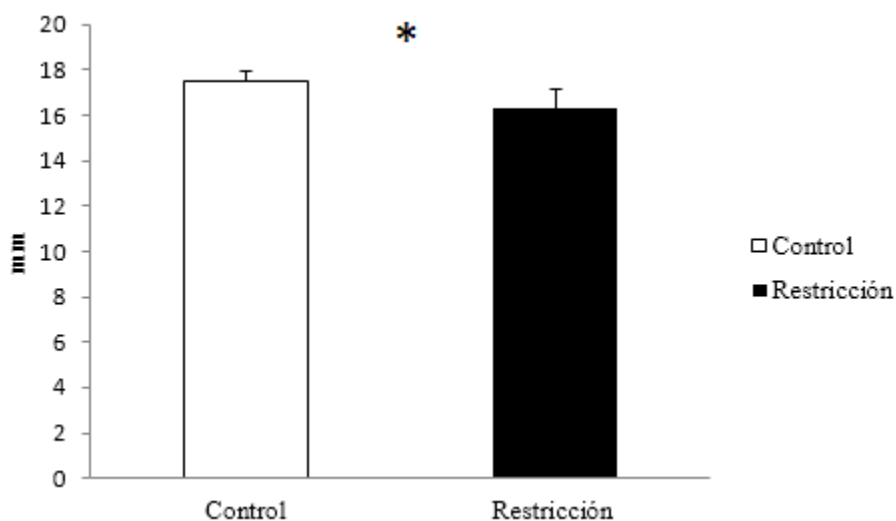
Figura 16.- Áreas parciales promedio del Cuerpo Calloso

Los resultados obtenidos en las mediciones de los tercios y quinto posterior, se observó en el grupo sometido al protocolo de restricción de movimiento, una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) de todas las áreas evaluadas, con respecto al grupo control (Tabla 2, Figura 16). El detalle de los valores por animal de cada grupo, se indican en el Anexo 2 Tabla B.

Tabla 3.- Perímetro Promedio del Cuerpo Calloso por grupo.

Perímetro Cuerpo Calloso	(mm)
Grupo Control (n=18)	17,50 ± 0,44
Grupo Restricción (n=18)	16,28 ± 0,86*

Ver Anexo 2: Tabla C, donde se especifica en detalle la información. * $p < 0,0001$



* $p < 0,0001$

Figura 17.- Perímetro promedio del Cuerpo Calloso

Finalmente se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,0001$), del perímetro del cuerpo caloso, en los animales del grupo restricción (Tabla 3, Figura 17). El detalle de los valores por animal de cada grupo, se indican en el Anexo 2 Tabla C.

Por otro lado, cabe señalar, que no se observaron diferencias estadísticamente significativas, al comparar los pesos de los animales del grupo control y restricción al nacimiento, destete y sacrificio; y peso de los encéfalos. Como tampoco al comparar los pesos de las madres al comienzo y final del protocolo (Tabla 4A y 4B, respectivamente). El detalle de los valores de los pesos de las madres, así como de crías control y restricción, se encuentran indicadas en el Anexo 2 Tabla E.

Tabla 4A.- Pesos corporales y encefálicos promedios de las crías por grupo.

Peso (g)	Grupo Control (n=18)	Grupo Restricción (n=18)
Nacimiento	6,3 ± 0,4	6,5 ± 0,5
Destete (21 días)	48,0 ± 2,6	49,6 ± 5,2
Sacrificio (45-52 días)	198, 9 ± 22,9	211,8 ± 25,7
Encéfalo	1,68 ± 0,05	1,69 ± 0,06

Tabla 4B.- Pesos promedios de las madres al inicio y término del protocolo.

Peso (g)	Hembras control (n=3)	Hembras restricción (n=3)
Inicio	295,9 ± 19,6	309,9 ± 24,4
Término	315,3 ± 12,4	350,9 ± 35,4

DISCUSIÓN

En la presente memoria de título se realizó un estudio anatómico del Cuerpo Caloso (CC), en ratas sometidas a un protocolo de estrés prenatal por inmovilización, donde los animales fueron divididos en un grupo control y otro restringido. Para tal propósito, se midió el área total y áreas parciales del CC: tercio anterior, medio, posterior y quinto posterior o esplenio; además del perímetro callosal, en su plano mediano. Esto se realizó a través de un método morfométrico ampliamente utilizado para este tipo de estudio, como es el programa *Scion Image® for Windows* (Merlo *et al.*, 2002).

Es así como se observó una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,01$), de las áreas callosales y perímetro de éste, en el grupo de estrés prenatal producido por restricción del movimiento al compararlo con el grupo control. Resultado similar al de ratas que fueron sometidas a otro tipo de estrés, en que fueron malnutridas prenatalmente y durante la lactancia, con una dieta isocalórica e hipoproteica, que también presentaron un CC más pequeño, a los 45-52 días de edad al compararlos con los controles; en cambio, aquellos animales rehabilitados durante la lactancia con una dieta alta en proteínas, mostraron normalidad en el desarrollo del tercio medio y posterior del CC; pero no el tercio anterior a pesar de la rehabilitación dietaria durante la vida postnatal (Olivares *et al.*, 2002), existiendo la posibilidad que el efecto de la malnutrición sobre el CC anterior se relacione con el daño producido en regiones de la corteza frontal durante el período pre y postnatal, ya que dichas áreas frontales son las últimas en mielinizarse y en madurar (Fuster, 1989).

El estrés ha sido relacionado con la reducción de la mielinización, mientras que, entre los eventos asociados con un incremento de ésta, se incluye el enriquecimiento ambiental (Gibson *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha descrito que el estrés puede producir un incremento de la mielinización, es así como un estudio en roedores sometidos a un destete temprano se asoció a un aumento de la mielinización (Ono *et al.*, 2008) y algunos estudios en humanos han asociados experiencias estresantes con aumento del volumen de sustancia blanca (Abe *et al.*, 2006; Hanson *et al.*, 2010). Una posible explicación a lo anterior, es que moderados niveles de estrés pueden producir un aumento de la mielinización como un fenómeno de adaptación a un ambiente estresante. En el presente estudio, si bien no se

realizó un análisis microscópico del CC, podríamos asumir, dada la disminución significativa de las áreas totales y parciales, además del perímetro en los cuerpos callosos de los animales estresados comparados con los controles, que el estrés prenatal por restricción de movimiento, produjo una disminución de la mielinización.

A su vez, ratas sometidas a una restricción calórica proteica a contar del octavo día postconcepción, equivalente aproximadamente a un 40% del consumo normal de una hembra en la segunda y tercera semana de gestación (25 g) y que después de su nacimiento fueron transferidas a ratas nodrizas para una adecuada lactancia, presentaron a nivel macroscópico, a los 45-52 días de edad, una reducción significativa de las áreas parciales y totales del cuerpo caloso, como también una disminución del perímetro callosal, en relación con los animales controles (Olivares *et al.*, 2012). Fenómeno similar a lo encontrado en este estudio, con un estrés prenatal por inmovilización.

Por otro lado, hembras preñadas de la especie *Macaca mulatta* (gestación de 164 días), que fueron sometidas a un estrés acústico diario durante 10 minutos desde los 90 a los 140 días de gestación, al realizarles resonancia magnética a sus crías entre los 7-11 meses de edad, se observaron alteraciones en la morfología del CC que afectaron de diferente manera a machos y hembras, teniendo los machos una menor área callosal total que las hembras, en las cuales se evidenció un aumento de dicha área. Estos resultados, nos indican que factores estresantes prenatales como la restricción del movimiento, pueden influenciar el desarrollo del CC, afectando posiblemente la comunicación interhemisférica (Coe *et al.*, 2002).

La investigación de los mecanismos que guían el desarrollo de las conexiones callosas, ha mostrado que esta vía se puede alterar significativamente por disrupción de las proyecciones retinianas en el neonato, es así, como estudios de como el estrés por privación visual afecta el cuerpo caloso en ratas sometidas a entrenamiento sensorio-motriz, demostró que al comparar el grupo control (sin estimulación y sin deprivación visual) *versus* el grupo estimulado, este último presentó un aumento del área del tercio posterior del cuerpo caloso; y al contrastar dichos resultados con los animales sometidos a estimulación y privación visual mediante lesión retiniana, existió una disminución de dicha

área callosal, sugiriendo una disminución en las proyecciones tálamo-corticales que se dirigen hacia la corteza visual (Suazo *et al.*, 2009). En el presente estudio también se evidenció una disminución del área del tercio posterior e incluso también, más específicamente, del esplenio (quinto posterior), lo que haría sugerir que el tipo de estrés prenatal utilizado, también afectó las conexiones visuales.

En estudios en ratas preñadas sometidas a estrés prenatal por natación forzada durante 20 minutos, se pudo observar en las crías una disminución en el número de microglías en el cuerpo calloso tanto al día 1 como al día 10 post natal (Gómez-González y Escobar, 2010). La razón que sustenta el estudiar cómo el estrés prenatal por inmovilización afecta la estructura del CC, es porque constituye la mayor comisura interhemisférica que conecta transversalmente ambos hemisferios (Quintero-Gallego *et al.*, 2003), y por tanto afectaría las conexiones somatosensoriales, motoras y de asociación de la corteza cerebral de ambos hemisferios cerebrales.

En este trabajo se utilizó el protocolo descrito por Vyas *et al.*, (2002), el cual demostró que una completa inmovilización de los animales en estudio (dos horas por día, de las 10 a 12 AM) por diez días consecutivos en cajas de inmovilización, fue suficiente para provocar alteraciones anatómicas en el hipocampo y amígdala.

El estrés prenatal afecta a varias regiones del cerebro en la descendencia expuesta incluyendo el hipocampo, amígdala, cuerpo calloso, neocorteza, cerebelo e hipotálamo. Estos cambios inducidos por el estrés son visibles tanto macroscópicamente como microscópicamente (Charil *et al.*, 2010). Coincidente con esto, en este estudio observamos una disminución anatómica macroscópica del cuerpo calloso, tanto en las áreas callosales totales y parciales, como en el perímetro de éste.

Cabe mencionar que altos niveles de glucocorticoides afectan la estructura del cerebro durante el desarrollo, lo que puede alterar la actividad de los neurotransmisores y la plasticidad sináptica, produciendo cambios sutiles o drásticos en la función posterior, que

alteran notablemente el comportamiento y la cognición; así como la susceptibilidad a enfermedades en la edad adulta (Weinstock, 2008).

Del mismo modo, al analizar el efecto crónico por inmovilización sobre el desarrollo embriológico del cerebro anterior en fetos de ratas preñadas, se demostró que fetos de 12 días de gestación de madres estresadas, mostraron un aumento del tamaño de la vesícula telencefálica: el perímetro y espesor del cerebro anterior presentaron diferencias significativas en relación a los controles. Este efecto de estrés crónico se podría considerar reversible en los estadíos gestacionales subsecuentes (Mugnaini *et al.*, 2006). A su vez, se ha demostrado que el estrés en el periodo prenatal, puede alterar la morfología cerebral y las funciones cognitivas, emocionales y conductuales (Lemaire *et al.*, 2000). En el presente estudio de estrés prenatal, se produjo una alteración de la morfología callosal, lo que podría incidir en funciones cerebrales superiores.

El estrés prenatal en ratas disminuye significativamente la densidad de la columna dendrítica en el giro cingulado anterior y corteza orbito frontal (Murmu *et al.*, 2006). Estudios en ovejas demostró que la administración repetida de glucocorticoides sintéticos en hembras preñadas, retrasa la maduración de la unión estrecha de astrocitos y capilares y retrasa la mielinización del cuerpo caloso en los cerebros de los fetos en desarrollo (Antonow-Schlorke *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2001 a,b). A razón de lo anterior, sería de utilidad a futuro el ampliar el presente estudio a un análisis morfométrico histológico, como también a la medición de niveles plasmáticos de ciertos metabolitos.

Estudios similares de estrés prenatal crónico por inmovilización en ratas, han identificado reducción en el crecimiento dendrítico y de espinas dendríticas de células piramidales (Jia *et al.*, 2010; Bock *et al.*, 2011); el incremento de corticosterona inducido por estrés prenatal reduce la expresión de receptores mineralocorticoides en células granulares, que tienen directa participación con el menor crecimiento de dendritas y de espinas dendríticas (Tamura *et al.*, 2011).

En otras especies, por ejemplo, en cobayas, se ha observado que el estrés prenatal reduce la producción y sensibilidad a los neuroesteroides, así como reduce la mielinización y modifica el comportamiento (Hirst *et al.*, 2016). Otro estudio en corderos recién nacidos y jóvenes (1 mes), ha demostrado que el estrés prenatal aumenta la densidad de la columna dendrítica en el hipocampo y la corteza prefrontal (Coulon *et al.*, 2013; Petit *et al.*, 2015) y que está asociado con un estado afectivo negativo, aumentando las reacciones de miedo y deterioro de la cognición (Coulon *et al.*, 2015).

Para homogenizar la muestra de los animales del estudio, se seleccionaron solo ratas machos ya que existe una controversial línea de investigación que sugiere la existencia de diferencias sexuales en lo que respecta a la anatomía del CC (Aboitiz y Montiel, 2003). Además, se ha visto que ratas machos y hembras, responden de diferente manera a un evento estresante, como lo demostró Lin *et al.*, (2009), quienes observaron diferencias significativas en la medición de respuestas moleculares en algunas estructuras nerviosas según el sexo, sugiriendo que dichas diferencias pueden tener importantes implicancias para los potenciales tratamientos contra la depresión, siendo las hembras relativamente más resistentes a los efectos neurobiológicos del estrés agudo y crónico.

Al evaluar mediante resonancia magnética cómo los eventos estresantes durante el desarrollo prenatal, la infancia y la adolescencia se relacionan con la variación en las propiedades de la sustancia blanca en la edad adulta temprana en hombres, se concluyó, que las asociaciones entre el estrés prenatal y las propiedades de sustancia blanca pueden estar relacionadas con anomalías en la neurogénesis, que afectan el número y la densidad de los axones; mientras que el estrés postnatal puede interferir con procesos relacionados con la mielinización o el crecimiento radial de los axones (Jensen *et al.*, 2018). Estudios previos en niños y adolescentes sugieren que el desarrollo de la sustancia blanca sigue patrones específicos de sexo, que pueden afectar la forma en que el estrés afecta los procesos normales de desarrollo (Perrin *et al.*, 2009; Deoni *et al.*, 2012).

Estudios recientes sugieren que los fetos masculinos son más vulnerables a la adversidad biológica y psicosocial en comparación con los femeninos (DiPietro y Voegtline, 2017).

Por lo cual, un estudio que evaluara morfológicamente, el efecto del estrés prenatal por restricción de movimiento en hembras y machos descendientes de hembras estresadas prenatalmente, sería interesante para comparar los resultados obtenidos. Además, se ha demostrado que el aumento de glucocorticoides en el periodo prenatal, aumentó la ansiedad y los comportamientos depresivos en las mujeres, pero no en varones, y que estos efectos se asociaron con una función alterada del sistema central de serotonina (Hiroi *et al.*, 2016). Por otra parte, en crías ratas macho adultas, la exposición prenatal a glucocorticoides redujo la duración de los procesos astrogiales en el hipocampo, así como disminuyó el crecimiento dendrítico en células granuladas dentadas, deteriorando la memoria espacial y aumento de los comportamientos similares a la ansiedad en la descendencia (Bustamante *et al.*, 2014; Pascual *et al.*, 2015).

Si bien la investigación en torno a estos procesos es inicial, ha corroborado, sobre todo en modelos animales, el rol protagónico del eje HHA y de los glucocorticoides, en las modificaciones epigenéticas que emergen en el sistema nervioso central, convergiendo la acción de diversos sistemas y estructuras en un equilibrio dinámico también en virtud del sexo y la etapa del desarrollo en que emerja (Cáceres *et al.*, 2017).

Finalmente, sería importante realizar estudios futuros que pudiesen complementar y respaldar los resultados obtenidos en el presente trabajo, por ejemplo, realizar un protocolo de estrés de mayor duración o realizar el estudio en animales de mayor edad para así poder evaluar si la disminución del tamaño del cuerpo calloso se revierte en edades más tardías.

Por otra parte, se podría complementar lo anterior, con la medición de otros indicadores como los niveles de cortisol urinario (Czéh *et al.*, 2001), cortisol salival (Murphy *et al.*, 2015) y variaciones en ganancia de peso corporal (Vyas *et al.*, 2002; Dagnino-Subiabre *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

El estrés prenatal por inmovilización en ratas preñadas, afectó significativamente, la morfología macroscópica del cuerpo calloso de sus crías. Evidenciándose una disminución del área total, áreas parciales (tercio anterior, tercio medio, tercio posterior y quinto posterior) y perímetro callosal, en las crías de las ratas sometidas a restricción de movimiento, al compararlas con los animales controles.

Estableciendo una relación directa entre número de axones y área callosal (Zimmerberg y Mickus, 1990) e inversa entre diámetro y densidad axonal (Aboitz *et al.*, 1992a); lo observado podría tener incidencia en la transferencia interhemisférica.

Sería de utilidad en estudios futuros, considerar un mayor número de animales, de ambos sexos y un análisis histológico callosal, así como también la medición de factores conductuales y hormonales, que pudiesen complementar y respaldar los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA

- ABE, O.; YAMASUE, H.; KASAI, K.; YAMADA, H.; AOKI, S.; IWANAMI, A.; OHTANI, T.; MASUTANI, Y.; KATO, N.; OHTOMO, K. 2006. Voxel-based diffusion tensor analysis reveals aberrant anterior cingulum integrity in posttraumatic stress disorder due to terrorism. *Psychiatry Research: Neuroimaging* 146:231-242.
- ABOITIZ, F.; SCHEIBEL, A.; FISHER, R.; ZAIDEL, E. 1992a. Fiber composition of the human corpus callosum. *Brain Res.* 598:143-153.
- ABOITIZ, F.; SCHEIBEL, A.; FISHER, R.; ZAIDEL, E. 1992b. Individual differences in brain asymmetries and fiber composition in the human corpus callosum. *Brain Res.* 598:154-161.
- ABOITIZ, F.; MONTIEL, J. 2003. One hundred million years of interhemispheric communication: the history of the corpus callosum. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36:409-420.
- AFIFI, A.; BERGMAN, R. 1998. *Neuroanatomía funcional. Texto y atlas.* 1ª ed. Interamericana McGraw – Hill. México DF, México. 727pp.
- ANTONOW-SCHLORKE, I.; SCHWAB, M.; LI, C.; NATHANIELSZ, P.W. 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J. Physiol.* 547:117-123.
- ANTONOW-SCHLORKE, I.; HELGERT, A.; GEY, C.; COKSAYGAN, T.; SCHUBERT, H.; NATHANIELSZ, P.W.; WITTE, O.W.; SCHWAB, M. 2009. Adverse effects of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination in sheep. *Obstet. Gynecol.* 113:142-151
- ARGANDOÑA, E.; LA FUENTE, J. 2000. Influence of visual experience deprivation on the postnatal development of the microvascular bed in layer IV of the rat visual cortex. *Brain Res.* 855:137-142.

- AVARIA, M. 2005. Aspectos biológicos del desarrollo psicomotor. *Rev. Ped. Elect.* 2:36-46.
- BARKER, D.J.P. 1995. Intrauterine programming of adult disease. *Mol. Med. Today* 1:418-423.
- BOCK, J.; MURMU, M.S.; BIALA, Y.; WEINSTOCK, M.; BRAUN, K. 2011. Prenatal stress and neonatal handling induce sex-specific changes in dendritic complexity and dendritic spine density in hippocampal subregions of prepubertal rats. *Neuroscience* 193:34-43.
- BUCKIGHAM, J. 2006. Glucocorticoids: Exemplars of multitasking. *Brit. J. Pharmacol.* 147:258-268.
- BUSTAMANTE, C.; VALENCIA, M.; TORRES, C.; GONZALEZ, M.J.; CARVAJAL, C.; SANDOVAL, D.; GUTIERREZ-ROJAS, C.; PASCUAL, R.; 2014. Effects of a single course of prenatal betamethasone on dendritic development in dentate gyrus granular neurons and on spatial memory in rat offspring *Neuropediatrics* 45:354-361.
- CÁCERES, R.; MARTÍNEZ-AGUAYO, J. C.; ARANCIBIA, M.; SEPÚLVEDA, E. 2017. Neurobiological effects of prenatal stress on the newborn. *Rev. Chil. Neuro-psiquiatr.* 55:103-113
- CHARIL, A.; LAPLANTE, D.P.; VAILLANCOURT, C.; KING, S. 2010. Prenatal stress and brain development. *Brain. Res. Rev.* 65:56-79
- CLANCY, B.; DARLINGTON, R.B.; FINLAY, B.L. 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105:7-17
- COE, C.; LULBACH, G.; SCHNEIDER, M. 2002. Prenatal disturbance alters the size of the corpus callosum in young monkeys. *Dev. Psychobiol.* 41:178-185.
- COULON, M.; WELLMAN, C.L.; MARJARA, I.S.; JANCZAK, A.M.; ZANELLA, A.J. 2013. Early adverse experience alters dendritic spine density and gene expression in prefrontal cortex and hippocampus in lambs. *Psychoneuroendocrinology* 38:1112-1121.

- COULON, M.; NOWAK, R.; ANDANSON, S.; PETIT, B.; L'ÉVY, F.; BOISSY, A. 2015. Effects of prenatal stress and emotional reactivity of the mother on emotional and cognitive abilities in lambs. *Dev. Psychobiol.* 57:626-636.
- CROSSMAN, A.; NEARY, D. 2007. *Neuroanatomía. Texto y atlas.* 3ª ed. Elsevier Masson. Barcelona, España. 185p.
- CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. 2009. *Fisiología Veterinaria*, 4ª ed. Editorial Elsevier. Madrid, España. 720 pp.
- CZÉH, B.; MICHAELIS, T.; WATANABE, T.; FRAHM, J.; DE BIURRUN, G.; VAN KAMPEN, M.; BARTOLOMUCCI, A.; FUCHS, E. 2001. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:12796-12801.
- DAGNINO-SUBIABRE, A.; TERREROS, G.; CARMONA-FONTAINE, C.; ZEPEDA, R.; ORELLANA, J.; DÍAZ-VÉLIZ, G.; MORA, S.; ABOITIZ, F. 2005. Chronic stress impairs acoustic conditioning more than visual conditioning in rats: Morphological and behavioural evidence. *Neurosci.* 135:1067-1074.
- DAGNINO-SUBIABRE, A.; ORELLANA, J.; CARMONA-FONTAINE, C.; MONTIEL, J.; DIAZ-VELIZ, G.; SERRON-FERRE, M.; WYNEKEN, U.; CONCHA, M.; ABOITIZ, F. 2006. Chronic stress decreases the expression of sympathetic markers in the pineal gland and increases plasma melatonin concentration in rats. *J. Neurochem.* 97:1279-1287.
- DANIELYAN, M. 2008. Reaction of rat brain capillaries to immobilization stress. *Neurosci. Behav. Physiol.* 38:929-931.
- DEAN, D.C, O'MUIRCHEARTAIGH, J.; DIRKS, H.; WASKIEWICZ, N.; LEHMAN, K.; WALKER, L.; HAN, M.; DEONI, S.C. 2014. Modeling healthy male white matter and myelin development: 3 through 60 months of age. *Neuroimage* 84:742-752.
- DEONI, S.C.L.; DEAN, D.C.; O'MUIRCHEARTAIGH, J.; DIRKS, H.; JERSKEY, B.A. 2012. Investigating white matter development in infancy and early childhood

using myelin water fraction and relaxation time mapping. *Neuroimage* 63:1038-1053.

- DIPIETRO, J.A.; VOEGTLIN, K.M. 2017. The gestational foundation of sex differences in development and vulnerability. *Neuroscience* 342:4–20.
- DUVAL, F.; GONZALEZ, F.; HASSEN, R. 2010. Neurobiología del estrés. *Rev. Chil. Neuro-psiquiat.* 48:307-318
- ERICKSON, K; DREVETS, W.; SCHULKIN, J. 2003. Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27:233-246.
- FITZGERALD, M.J.T.; GRUENER, G.; MTUI, E. 2012. *Neuroanatomía clínica y neurociencia*. 6ª ed. Editorial Elsevier España. Barcelona. España.432 pp.
- FUJIOKA, A.; FUJIOKA, T.; ISHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; NAKAMURA, S. 2006. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 141:907-915
- FUSTER, J. 1989. *The prefrontal cortex: Anatomy, physiology and neuropsychology of the frontal lobe*. 2ª ed. Raven Press. New York, USA. 333 pp.
- GARBRECHT, M.R.; KLEIN, J.M.; SCHMIDT, T.J.; SNYDER, J.M. 2006. Glucocorticoid metabolism in the human fetal lung: implications for lung development and the pulmonary surfactant system. *Biol. Neonate* 89:109–119.
- GAZZANIGA, M. 2000. Cerebral specialization and interhemispheric communication. Does the corpus callosum enable the human condition? *Brain*. 13:1293-1326.
- GIBSON, E.M.; PURGER, D.; MOUNT, C.W.; GOLDSTEIN, A.K.; LIN, G.L.; WOOD, L.S.; INEMA, I.; MILLER, S.E.; BIERI, G.; ZUCHERO, J.B.; BARRES, B.A.; WOO, P.J.; VOGEL, H.; MONJE, M. 2014. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science* 344:1252304

- GÓMEZ-GONZÁLEZ, B.; ESCOBAR, A. 2010. Prenatal stress alters microglial development and distribution in postnatal rat brain. *Acta Neuropathol.* 119:303-315
- GONZÁLEZ, O.; GUTIERREZ, Y.; GUZMAN, J.; MOY, N. 2011. El estrés intrauterino afecta el aprendizaje espacial de la progenie de ratas Wistar. *Rev. Invest. Clin.* 63:279-286.
- HAINES, D. 2003. *Principios de Neurociencia.* 2^a ed. Elsevier Science. Madrid, España. 582 pp.
- HANSON, J.L.; CHUNG, M.K.; AVANTS, B.B.; SHIRTCLIFF, E.A.; GEE, J.C.; DAVIDSON, R.J.; POLLAK, S.D. 2010. Early stress is associated with alterations in the orbitofrontal cortex: a tensor-based morphometry investigation of brain structure and behavioral risk. *J. Neurosci.* 30:7466–7472.
- HENRÍQUEZ, R.; OLIVARES, R.; CARO, G.; GUEVARA, V.; LIZANA, P. 2013. Prenatal stress caused by movement restriction induces changes in the development of skull bone in CF-1 mice progeny. *Int. J. Morphol.* 31:1034-1040.
- HIROI, R.; CARBONE, D.L.; ZULOAGA, D.G.; BIMONTE-NELSON, H.A.; HANDA, R.J. 2016. Sex-dependent programming effects of prenatal glucocorticoid treatment on the developing serotonin system and stress-related behaviors in adulthood. *Neuroscience* 320:43–56.
- HIRST, J.J.; CUMBERLAND, A.L.; SHAW, J.C.; BENNETT, G.A.; KELLEHER, M.A.; WALKER, D.W.; PALLISER, H.K. 2016. Loss of neurosteroid-mediated protection following stress during fetal life. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 160:181–188.
- HOUZEL, J; CARVALHO, M.; LENT, R. 2002. Interhemispheric connections between primary visual areas: beyond the midline rule. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:1441-1453.
- HOWELL, B.R.; MCCORMACK, K.M.; GRAND, A.P.; SAWYER, N.T.; ZHANG, X.; MAESTRIPIERI, D.; HU, X.; SANCHEZ, M.M. 2013. Brain white matter microstructure alterations in adolescent rhesus monkeys exposed to early life

stress: associations with high cortisol during infancy. *Biol Mood Anxiety Disord.* 3: 21.

- HUANG, W.L.; HARPER, C.G.; EVANS, S.F.; NEWNHAM, J.P.; DUNLOP, S.A. 2001a. Repeated prenatal corticosteroid administration delays astrocyte and capillary tight junction maturation in fetal sheep. *Int. J. Dev. Neurosci.* 19:487-93
- HUANG, W.L.; HARPER, C.G.; EVANS, S.F.; NEWNHAM, J.P.; DUNLOP, S.A. 2001b. Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int. J. Dev. Neurosci* 19:415-425
- JANKORD, R.; HERMAN, J.P. 2008. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1148:64–73.
- JIA, N.; YANG, K.; SUN, Q.; CAI, Q.; LI, H.; CHENG, D.; FAN, X.; ZHU, Z. 2010. Prenatal stress causes dendritic atrophy of pyramidal neurons in hippocampal CA3 region by glutamate in offspring rats. *Dev. Neurobiol.*70:114-125.
- JENSEN.S.K.G.: PANGELINAN, M.; BJÖRNHOLM, L; KLASNJA, A.; LEEMANS, A.; DRAKESMITH, M.; EVANS, C.J.; BARKER, E.D.; PAUS, T. 2018. Associations between prenatal, childhood, and adolescent stress and variations in white-matter properties in young men. *Neuroimage* 182:389–397.
- KIM, J.; JURASKA, J. 1997. Sex differences in the development of axon number in the splenium of the rat corpus callosum from postnatal day 15 through 60. *Dev. Brain. Res.* 102:77-85.
- KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. 2011. *Anatomía de los Animales Domésticos.* 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 650pp.
- LA MANTIA, A.; RAKIC, P. 1990. Cytological and quantitative characteristics of four cerebral commissures in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 291:520-537.
- LEBEL, C.; GEE, M.; CAMICIOLI, R.; WIELER, M.; MARTIN, W.; BEAULIEU, C. 2012. Diffusion tensor imaging of white matter tract evolution over the lifespan. *Neuroimage* 60:340–352.

- LEE, P.R.; BRADY, D.L.; SHAPIRO, R.A.; DORSA, D.M.; KOENIG, J.I. 2007. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res.* 1156:152-167.
- LEMAIRE, V.; KOEHL, M.; LE MOAL, M.; ABROUS, DN. 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:11032-11037.
- LIN, Y.; TER HORST, G.; WICHMANN, R.; BAKKER, P.; LIU, A.; LI, X.; WESTENBROEK, C. 2009. Sex differences in the effects of acute and chronic stress and recovery after long-term stress on stress-related brain regions of rats. *Cereb. Cortex.* 19:1978–1989
- LIZANA, P.; HENRIQUEZ, R.; MUÑOZ, P. 2012. Prenatal stress caused by movement restriction induces changes in the appendicular osseous development of CF-1 mice progeny. *Int. J. Morphol.* 30:1132-1138.
- MACCARI, S.; DARNAUDERY, M.; MORLEY-FLETCHER, S.; ZUENA, A. R.; CINQUE, C.; VAN REETH, O. 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27:119-127.
- MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T.; MARTÍNEZ-MILLÁN, L. 1994. Pyramidal and nonpyramidal callosal cells in the striate cortex of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 350:439-451.
- Mc EWEN, B. S. 2002a. Cortisol, Cushing's syndrome, and a shrinking brain-new evidence for reversibility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:1947-1948.
- Mc EWEN, B. S. 2002b. The neurobiology and neuroendocrinology of stress. Implications for post-traumatic stress disorder from a basic science perspective. *Psychiatr. Clin. North Am.* 25:469-494.
- MERLO, A.; ALBANECE, A.; MIÑO, J.; GÓMEZ, E.; SAUBIDET, A.; MASCITTI, T.; INGRATA, A.; ALBANECE, E. 2002. Cuerpo calloso en el plano mediano de imágenes de resonancia magnética: perímetro, superficie y forma en relación a edad y sexo. *Rev. Chil. Anat.* 20:131-138.

- MONTORO, J.; MULLOL, J.; JÁUREGUI, I.; DÁVILA, I.; FERRER, M.; BARTRA, J.; DEL CUVILLO, A.; SASTRE, J.; VALERO, A. 2009. Stress and allergy. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 19:40-47.
- MORALES-MEDINA, J.C.; SANCHEZ, F.; FLORES, G.; DUMONT, Y.; QUIRION, R. 2009. Morphological reorganization after repeated corticosterone administration in the hippocampus, nucleus accumbens and amygdala in the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 38:266-272.
- MUGNAINI, M.; SOÑEZ, C.; ROLANDO, A.; ROMANINI, M.; BOZZO, A.; PASTORINO, I.; GAUNA, H.; PAZ, D. 2006. Maternal chronic stress induces premature telencephalic vesicles development. *Int. J. Morphol.* 24:525-530.
- MURMU, M.S.; SALOMON, S.; BIALA, Y.; WEINSTOCK, M.; BRAUN, K.; BOCK, J. 2006. Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy. *Eur. J. Neurosci.* 24:1477-1487
- MURPHY, S. E.; BRAITHWAITE, E. C.; HUBBARD, I.; WILLIAMS, K. V.; TINDALL, E.; HOLMES, E. A.; RAMCHANDANI, P. G. 2015. Salivary cortisol response to infant distress in pregnant women with depressive symptoms. *Arch. Womens Ment Health.* 18:247–253.
- NUÑEZ, J.; NELSON, J.; PYCH, J.; KIM, J.; JURASKA, J. 2000. Myelination in the splenium of the corpus callosum in adult male and female rats. *Dev. Brain. Res.* 120:87-90.
- OLAVARRIA, J.; VAN SLUYTERS, R. 1985. Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 239:1-26.
- OLIVARES, R.; MICHALLAND, S.; ABOITIZ, F. 2000. Cross-species and intraspecies morphometric analysis of the corpus callosum. *Brain Behav. Evol.* 55:37-43.

- OLIVARES, R.; MONTIEL, J.; ABOITIZ, F. 2001. Species differences and similarities in the fine structure of the mammalian corpus callosum. *Brain Behav. Evol.* 57:98-105.
- OLIVARES, R.; SOTO-MOYANO, R.; HERNÁNDEZ, A.; ABOITIZ, F. 2002. La malnutrición prenatal proteica leve afecta el desarrollo del cuerpo calloso anterior. *Rev. Chil. Anat.* 20:159-163.
- OLIVARES, R.; SOTO-MOYANO, R.; HERNÁNDEZ, A.; GIL, J.; GIMENO, M.; LABORDA, J.; ABOITIZ, F. 2007. Efecto de la desnutrición oculta prenatal sobre la histología del esplenio callosal. *Int. J. Morphol.* 25:717-721.
- OLIVARES, R.; TOLEDO, C.; VERA, Y.; MORGAN, C.; PÉREZ, H.; ORTIZ, A.; HENRÍQUEZ, M.; HERNÁNDEZ, A.; CIFUENTES, F. 2010. Densidad neuronal en la corteza visual primaria (Area 17), en ratas sometidas a estrés crónico. *Int. J. Morphol.* 28:855-860.
- OLIVARES, R.; MORGAN, C.; PÉREZ, H.; HERNÁNDEZ, A.; ABOITIZ, F.; SOTO-MOYANO, R.; GIL, J.; ORTIZ, A.; FLORES, O.; GIMENO, M.; LABORDA, J. 2012. Anatomy of corpus callosum in prenatally malnourished rats. *Biol. Res.* 44:83-88.
- ONO, M.; KIKUSUI, T.; SASAKI, N.; ICHIKAWA, M.; MORI, Y.; MURAKAMI-MUROFUSHI, K. 2008. Early weaning induces anxiety and precocious myelination in the anterior part of the basolateral amygdala of male Balb/c mice. *Neuroscience* 156:1103–1110.
- PANDYA, D.; SELTZER, B. 1986. The topography of commissural fibers. **In:** Two hemispheres-One Brain: The topography of commissural fibers. Eds. Leporé, F., Ptito, M. & Jasper, H. H. New York, USA. pp 47-73.
- PARIS, J. J.; BRUNTON, P.J.; RUSSELL, J. A.; FRYE, C.A. 2011. Immune stress in late pregnant rats decreases length of gestation and fecundity, and alters later cognitive and affective behaviour of surviving pre-adolescent offspring. *Stress* 14: 652-664.

- PASCUAL, R.; VALENCIA, M.; BUSTAMANTE, C. 2015. Antenatal betamethasone produces protracted changes in anxiety-like behaviors and in the expression of microtubule-associated protein 2, brain-derived neurotrophic factor and the tyrosine kinase B receptor in the rat cerebellar cortex. *Int. J. Dev. Neurosci.* 43:78–85.
- PAUS, T.; PESARESI, M.; FRENCH, L. 2014. White matter as a transport system. *Neuroscience* 276:117–125.
- PERRIN, J.S.; LEONARD, G.; PERRON, M.; PIKE, G.B.; PITIOT, A.; RICHER, L.; VEILLETTE, S.; PAUSOVA, Z.; PAUS, T. 2009. Sex differences in the growth of white matter during adolescence. *Neuroimage* 45:1055–1066.
- PETIT, B.; BOISSY, A.; ZANELLA, A.; CHAILLOU, E.; ANDANSON, S.; BES, S.; LÉVY, F.; COULON, M. 2015. Stress during pregnancy alters dendritic spine density and gene expression in the brain of new-born lambs. *Behav. Brain Res.* 291:155-163.
- QUINTERO-GALLEGO, E.; MANAUT, E.; RODRÍGUEZ, E.; PÉREZ-SANTAMARÍA, J.; GÓMEZ, C. 2003. Desarrollo diferencial del cuerpo calloso en relación con el hemisferio cerebral. *Rev. Esp. Neuropsicol.* 1:49-64.
- RAKIC, P.; YAKOVLEV, P. 1968. Development of the corpus callosum and cavum septi in man. *J. Comp. Neurol.* 132:45-72.
- RODRÍGUEZ-PENA, A. 1999. Oligodendrocyte development and thyroid hormone. *J. Neurobiol.* 40:497-512.
- SAPOLSKY, R. 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry.* 57:925-935.
- SARKAR, S.; CRAIG, M.C.; DELL'ACQUA, F.; O'CONNOR, T.G.; CATANI, M.; DEELEY, Q.; GLOVER, V.; MURPHY, D.G. 2014. Prenatal stress and limbic-prefrontal white matter microstructure in children aged 6–9 years: a preliminary diffusion tensor imaging study. *World J. Biol. Psychiatry.* 15:346–352.
- SECKL, J.R.; HOLMES, M.C. 2007. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat. Clin.*

Pract. Endocrinol. Metab. 3:479–488

- SILBERMAN, D. M.; ACOSTA, G. B.; ZORRILLA ZUBILETE, M.A. 2016. Long-term effects of early life stress exposure: Role of epigenetic mechanisms. *Pharmacol. Res.* 109:64-73.
- SNELL, R. S. 2007. *Neuroanatomía clínica*. 6ª ed. Editorial Medica Panamericana. Buenos aires. Argentina. 612 pp.
- SORENSEN, S.; JONES, T.; OLAVARRIA, J. 2003. Neonatal enucleation reduces the proportion of callosal boutons forming multiple synaptic contacts in rat striate cortex. *Neurosci. Lett.* 351:17-20.
- SUAZO, G.; LOPEZ, F.; CANTIN, L. 2009. Effects of visual loss in the Corpus Callosum in rats subjected lo sensory-motor training. *Int. J. Morphol.* 27:1031-1031.
- SURYANA, E.; JONES M. 2014. The effects of hypoxic preconditioning on white matter damage following hypoxic-ischaemic injury in the neonatal rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 37:69-75.
- TAMURA, M.; SAJO, M.; KAKITA, A.; MATSUKI, N.; KOYAMA, R. 2011. Prenatal stress inhibits neuronal maturation through downregulation of mineralocorticoid receptors. *J. Neurosci.* 31:11505-1114
- TAKAHASHI, L.K.; KALIN, N.H. 1991. Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rat pups. *Brain Res.* 558:75-78.
- TOEPFER, P.; HEIM, C.; ENTRINGER, S.; BINDER, E.; WADHWA, P.; BUSS, C. 2017. Oxytocin pathways in the intergenerational transmission of maternal early life stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 73:293-308
- VALLÉE, M.; MAYO, W.; DELLU, F.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; MACCARI, S. 1997. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.* 17:2626-2636

- VYAS, A.; MITRA, R.; SHAKARANARAYANA RAO, B.; CHATTARJI, S. 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J. Neurosci.* 22:6810-6818.
- WELBERG, L.A.; THRIVIKRAMAN, K.V.; PLOTSKY, P.M. 2005. Chronic maternal stress inhibits the capacity to up regulate placental 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *J. Endocrinol.* 186:7-12.
- WEINSTOCK, M. 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32:1073-1086
- WITELSON, S. 1989. Handedness and sex differences in the isthmus and genu the human corpus callosum: a postmortem morphological study. *Brain* 112:799-835.
- WITELSON, S.; GLEZER, I.; KIGAR, D. 1995. Women have greater density of neurons in posterior temporal cortex. *J. Neurosci.* 15:3418-3428.
- YATES, M.; JURASKA, J. 2007. Increases in size and myelination of the rat corpus callosum during adulthood are maintained into old age. *Brain Res.* 1142:13–18.
- ZIMMERBERG, B.; MICKUS, L. A. 1990. Sex differences in corpus callosum: influence of prenatal alcohol exposure and maternal undernutrition. *Brain Res.* 1990 537:115-122.
- ZURROZA-ESTRADA, A. D.; OVIEDO-RODRÍGUEZ, I. J.; ORTEGA-GÓMEZ, R.; GONZÁLEZ-PÉREZ, O. 2009. Relationship between personality profiles and stress in medical residents. *Rev. Invest. Clin.* 61:110-118.

ANEXO 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 19 de junio de 2015

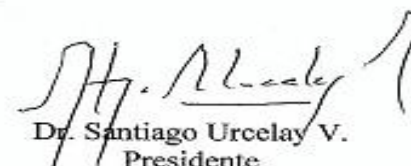
CERTIFICADO N° 16-2015

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto: **“Morfometría del cuerpo calloso en ratas sometidas a estrés prenatal por restricción de movimiento”**. Dicho proyecto corresponde a la Memoria de Título de la estudiante Paulina Riveros H., donde el Investigador Responsable será el **Dr. Ricardo Olivares P-M.**, y sus detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto este Comité entiende que el Investigador Responsable trabajará con un máximo de ratas Wistar y sus respectivas crías. Todos los individuos serán mantenidos en el bioteño del INTA y serán sacrificados al término del estudio de acuerdo a los detalles contenidos en el formulario.


Dra. Tamara Tadich
Directora
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

**COMPENDIO DE MEDIDAS REALIZADAS EN ESTUDIO MACROSCÓPICO
DEL CUERPO CALLOSO**

Tabla A.- Área total cuerpo calloso (mm²).

Control	Área total
C1	3,50
C2	3,70
C3	3,65
C4	3,82
C5	4,40
C6	3,74
C7	3,60
C8	4,0
C9	3,99
C10	3,54
C11	3,64
C12	3,99
C13	3,76
C14	3,10
C15	3,79
C16	2,82
C17	3,75
C18	3,79
Promedio	3,70 ± 0,34

Restricción	Área total
R1	3,49
R2	3,02
R3	3,25
R4	3,10
R5	2,71
R6	2,87
R7	3,23
R8	2,86
R9	3,31
R10	3,68
R11	3,67
R12	3,27
R13	2,93
R14	3,40
R15	3,55
R16	3,21
R17	3,07
R18	2,82
Promedio	3,19 ± 0,29

Tabla B.- Áreas parciales promedio cuerpo calloso (mm²).

Control	Tercio anterior	Tercio medio	Tercio posterior	Quinto posterior
C1	1,39	0,91	1,20	0,91
C2	1,24	0,96	1,50	1,12
C3	1,29	0,89	1,47	0,96
C4	1,27	1,07	1,48	0,98
C5	1,45	1,20	1,75	1,05
C6	1,18	0,94	1,62	0,96
C7	1,20	0,90	1,50	1,01
C8	1,34	1,21	1,45	0,99
C9	1,48	1,20	1,31	0,94
C10	1,10	0,94	1,50	1,08
C11	1,21	0,95	1,48	1,05
C12	1,42	1,02	1,55	0,98
C13	1,25	0,99	1,52	0,91
C14	0,94	0,85	1,31	0,85
C15	1,32	1,02	1,45	0,95
C16	0,98	0,72	1,12	0,75
C17	1,31	1,01	1,43	0,96
C18	1,28	0,96	1,55	1,06
Promedio	1,26 ± 0,15	0,99 ± 0,13	1,46 ± 0,15	0,97 ± 0,09

Restricción	Tercio anterior	Tercio medio	Tercio posterior	Quinto posterior
R1	1,19	1,06	1,24	0,94
R2	1,06	0,74	1,22	0,81
R3	1,18	0,77	1,30	0,83
R4	1,06	0,82	1,22	0,81
R5	0,87	0,67	1,17	0,74
R6	1,09	0,69	1,09	0,79
R7	1,08	0,78	1,37	0,86
R8	0,84	0,94	1,08	0,80
R9	1,20	0,81	1,30	1,02
R10	1,33	0,90	1,45	1,06
R11	1,24	0,82	1,61	0,95
R12	1,10	0,78	1,39	1,01
R13	1,07	0,66	1,20	0,75
R14	1,27	0,80	1,33	0,97
R15	1,24	1,04	1,27	0,95
R16	1,27	0,80	1,14	0,85
R17	1,11	0,79	1,17	0,71
R18	0,98	0,72	1,12	0,80
Promedio	1,12 ± 0,13	0,81 ± 0,11	1,26 ± 0,14	0,87 ± 0,11

Tabla C.- Perímetro total cuerpo caloso (mm)

Control	Perímetro
C1	17,45
C2	17,10
C3	17,43
C4	17,26
C5	17,85
C6	17,66
C7	17,33
C8	17,73
C9	17,63
C10	17,15
C11	17,78
C12	17,25
C13	17,06
C14	17,31
C15	18,13
C16	16,47
C17	18,42
C18	17,19
Promedio	17,50 ± 0,44

Restricción	Perímetro
R1	17,90
R2	16,30
R3	15,79
R4	17,19
R5	15,01
R6	15,55
R7	15,99
R8	15,87
R9	16,65
R10	17,16
R11	16,90
R12	17,42
R13	15,25
R14	15,98
R15	15,10
R16	17,18
R17	16,32
R18	15,47
Promedio	16,28 ± 0,86

Tabla D.- Pesos grupo control y restricción (g)

Peso (g)	Nacimiento	Destete	Sacrificio	Encéfalo
C1	5,8	46,9	188,5	1,64
C2	6,6	45,0	191,7	1,66
C3	6,7	50,0	170,9	1,62
C4	6,1	46,2	190,2	1,67
C5	6,1	47,6	205,7	1,69
C6	6,5	45,8	192,8	1,65
C7	6,3	49,4	178,6	1,61
C8	5,6	47,8	183,8	1,66
C9	6,5	52,5	184,6	1,63
C10	6,1	53,8	227,2	1,68
C11	5,8	46,2	156,4	1,62
C12	6,7	48,9	185,1	1,64
C13	6,6	49,5	245,3	1,73
C14	6,1	45,5	223,8	1,74
C15	6,8	43,8	224,0	1,76
C16	6,3	46,6	213,7	1,77
C17	5,8	50,5	196,1	1,75
C18	6,4	47,6	222,6	1,68
Promedio	6,3 ± 0,4	48,0 ± 2,6	198,9 ± 22,9	1,68 ± 0,05

Peso (g)	Nacimiento	Destete	Sacrificio	Encéfalo
R1	5,8	42,9	219,1	1,62
R2	5,8	42,5	245,5	1,64
R3	6,0	46,0	246,4	1,65
R4	6,4	43,9	256,3	1,66
R5	6,0	42,8	236,2	1,63
R6	6,2	43,2	242,8	1,72
R7	7,2	56,0	216,0	1,74
R8	7,1	54,4	203,1	1,76
R9	6,7	56,4	217,1	1,78
R10	6,8	56,4	212,2	1,77
R11	7,1	55,1	211,8	1,76
R12	6,8	54,6	209,4	1,71
R13	6,9	49,4	186,2	1,78
R14	6,3	52,7	185,3	1,63
R15	6,4	49,5	182,9	1,64
R16	6,1	47,7	186,6	1,65
R17	6,3	49,2	178,5	1,67
R18	6,7	50,0	176,8	1,62
Promedio	6,5 ± 0,5	49,6 ± 5,2	211,8 ± 25,7	1,69 ± 0,06

Tabla E.- Peso hembras al inicio y término del protocolo (g)

HEMBRAS CONTROL

Peso (g)	Inicio	Término
H1	315,3	305,5
H2	296,2	329,2
H3	276,2	311,3
Promedio	295,9 ± 19,6	315,3 ± 12,4

HEMBRAS RESTRICCIÓN

Peso (g)	Inicio	Término
H1	337,2	390,1
H2	302,3	341,2
H3	290,2	321,4
Promedio	309,9 ± 24,4	350,9 ± 35,4