

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

ESCUELA DE GRADUADOS



**EFFECTO DEL RETARDO EN EL CRECIMIENTO
INTRAUTERINO SOBRE LA MADURACION DE LA
CORTEZA CEREBELOSA DE RATA.**

ESTUDIO ESTRUCTURAL.

TRABAJO QUE CON EL CARACTER DE

T E S I S

P R E S E N T A

LA C. BIOL. GUADALUPE TAPIA ARIZMENDI

**PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**

GUADALAJARA, JAL.

JUNIO, 1982

EFFECTO DEL RETARDO EN EL CRECIMIENTO INTRA-
UTERINO SOBRE LA MADURACION DE LA CORTEZA
CEREBELOSA DE RATA. ESTUDIO ESTRUCTURAL.

AL DR. ALFREDO FERIA VELASCO,
pilar importante en mi forma-
ción académica, por su valio-
sa guía como Tutor en el desa-
rrollo de mi trabajo de Tesis.

A la UNIDAD DE INVESTIGACION
BIOMEDICA DE OCCIDENTE del Ins-
tituto Mexicano del Seguro So-
cial y a todas las personas que
de alguna manera han contribui-
do en mi formación profesional.

A MIS PADRES Y HERMANOS, con
cariño, por su confianza y a
poyo que siempre me han brind
ado.



BIBLIOTECA CENTRAL

A MA. TERESA TAPIA BECERRIL, con
reconocimiento a su valiosa colaa
boración.

A TODOS LOS ESTUDIANTES DE
BIOLOGIA, con mis mejores
deseos por su superación
académica.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
HIPOTESIS.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	8
Objetivos particulares.....	8
MATERIAL Y METODOS.....	10
Grupo I.....	10
Grupo II.....	12
Grupos testigo.....	13
ESTUDIO ESTRUCTURAL.....	13
RESULTADOS.....	17
LIGADURA UNILATERAL.....	17
LIGADURA BILATERAL.....	19
DISCUSION.....	29
CONCLUSIONES.....	39
REFERENCIAS.....	41

70. PETERS, D.P.: Effects of prenatal nutritional deficiency on affiliation and aggression in rats. *Physiol. Behav.* 20:359-362, 1978.
71. PORTMAN, O.W., ALEXANDER, M., NEURINGER, M., NOVY, M., ILLINGWORTH, R. y UNO, H.: Effects of perinatal malnutrition on lipid composition of neural tissue from Rhesus monkeys. *J. Nutr.* 107:2228-2235, 1977.
72. RESNICK, O., MILLER, M., FORBES, W., HALL, R., KEMPER, T., BRONZINO, J. y MORGANE, P.J.: Developmental protein malnutrition: Influences on the central nervous system of the rat. *Neurosc. Behav. Rev.* 3:233-246, 1979.
73. REINISCH, J.M. y SIMON, N.G.: Prenatal exposure to prednisone in human and animals retards intrauterine growth. *Science* 202:436-438, 1978.
74. REINISCH, J.M., SIMON, N.G. y GANDELMAN, R.: Prenatal exposure to prednisone permanently alters fighting behavior of female mice. *Pharmac. Biochem. Behav.* 12: 213-216, 1980.
75. ROACH, M.K., CORBIN, J. y PENNINGTON, W.: Effect of undernutrition on amino acid compartmentation in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 22:521-528, 1974.
76. ROUX, J.M., TORDET-CARIDROIT, C. y CHANEZ, C.: Studies on experimental hypotrophy in the rat, I. Chemical composition of the total body and some organs in the rat foetus. *Biol. Neonate* 15:342-347, 1970.

77. SEEDS, N.W. y HAFFKE, S.C.: Cell junction and ultrastructural development of reaggregated mouse brain cultures. *Dev. Neurosci.* 1:69-79, 1978.
78. SHIMADA, M., YAMANO, T., NAKAMURA, T., MORIKAWA, T. Y KUSUNOKI, T.: Effect of maternal malnutrition on matrix cell proliferation in the cerebrum of mouse embryo: an autoradiographic study. *Pediat. Res.* 11: 728-731, 1977.
79. SHOEMAKER, W.J. y BLOOM, F.E.: Effect of undernutrition on brain morphology. En: Wurtman, R.J. y Wurtman, J.J. (eds.): *Nutrition and the brain*. Vol. 2 Raven Press. New York. 1977 pp. 147-191.
80. SOBOTKA, T.J., COOK, M.P., BRODIE, R.E.: Neonatal malnutrition: Neurochemical, hormonal and behavioral manifestations. *Brain Research*, 65:443-457, 1974.
81. STEMPAK, J.G. y WARD, R.T.: An improved staining method for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 22: 697-701, 1964.
82. STERN, W.C., MILLER, M., FORBES, W.B., LEAHY, P.J., MORGANE, P.J. y RESNICK, O.: Effects of protein malnutrition during development on protein synthesis in brain and peripheral tissues. *Brain Res. Bull.* 1:27-31, 1976.
83. STEVENSON, L. y ECHLIN, F.: The nature and origin of some tumors of the cerebellum.- Medulloblastoma. *Arch. Neurol. & Psychiat.* 31:93-98, 1934.

84. STEWART, R.J.C., MERAT, A. y DICKERSON, J.W.T.: Effect of a low protein diet in mother rats on the structure of the brain of the offspring. *Biol. Neonate* 25:125-134, 1974.
85. TAPIA-ARIZMENDI, G., ALMODOVAR, C. y FERIA-VELASCO, A.: Cambios estructurales y bioquímicos en corteza cerebelosa de rata durante el desarrollo postnatal inducidos por retardo en el crecimiento intrauterino. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 12: Supl. 2, 43, 1981.
86. TORDET-CARIDROIT, C., ROUX, J. y CHANEZ, C.: Etude du développement post-natal du rat né dysmature. *C.R. Soc. Biol. Paris*, seance du 24 Junio 1969. pp 1321-1323.
87. VAN GEIJN, H.P., KAYLOR Jr., W.M., NICOLA, K.R. y ZUSPAN, F.P.: Induction of severe intrauterine growth retardation in the Sprague-Dawley rat. *Am. J. Obst. Gynecol.* 137:43-47, 1980.
88. VAN MARTHENS, E., HAREL, S. y ZAMENHOF, S.: Experimental intrauterine growth retardation. A new animal model for the study of brain development. *Biol. Neonate* 26:221-231, 1975.
89. VENABLE, J.H. y COGGESHALL, R.E.: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25:407-408, 1965.
90. WIGGLESWORTH, J.S.: Experimental growth retardation in the foetal rat. *J. Path. Bact.* 88:1-13, 1964.

91. WINICK, M.; Malnutrition and brain development. Oxford University Press, New York, 1976. pp 104.
92. WINICK, M.; Malnutrition and Brain Development. Oxford University Press. New York. 1976. pp 25, 128.
93. ZAMENHOF, S. y GUTHRIE, D.: Differential responses to prenatal malnutrition among neonatal rats. Biol. Neonate 32:205-210, 1977.
94. ZAMENHOF, S. y VAN MARTHENS, E., MARGOLIS, F.L.: DNA (cell number) and protein in neonatal brain: alteration by maternal dietary protein restriction. Science 160: 322-323, 1968.

55

TABLA I. Peso corporal, de placenta, cerebro y cerebelo de ratas recién nacidas con retardo en el crecimiento por ligadura de una arteria uterina en la gestación.

	Peso corporal	Peso de placenta	Peso de cerebro*	Peso de cerebelo	
Animales intactos	5,710±420 (177)	1,145±200 (177)	165.72±15.2 (93)	10.31±1.1 (93)	
Animales manipulados	5,425±430 (72)	1,090±180 (72)	166.40±15.1 (36)	10.41±1.2 (36)	
Animales experimentales	Del lado no ligado	5,740±380 (78)	1,040±250 (78)	165.76±15.3 (28)	10.07±1.2 (28)
	Del lado ligado	4,250±410** (53)	1,000±240 (53)	150.26±13.4** (25)	7.5 ±0.91** (25)

Los datos se expresan en mg y representan la media ± Error Standard de la Media.

El número de animales por grupo aparece entre paréntesis.

(*) Separado de tallo cerebral.

(**) $p < 0.001$

TABLA II. Reabsorción de productos en ratas con ligadura de una arteria uterina en la gestación.

		Número de reabsorciones por cuerno uterino					
		0	1	2	3	4	5
Animales intactos (38)		18	18	2			
Animales manipulados (14)		6	5	3			
Animales experimentales	Del lado no ligado (15)	11	3	1			
	Del lado ligado (15)	2	4	6	2		1

Los números en paréntesis representan el número de cuernos uterinos evaluados por grupo.

TABLA III. Agrupamiento de cuernos uterinos de acuerdo al número de reabsorciones por cuerno en el modelo de retardo en el crecimiento intrauterino por ligadura de una arteria uterina en la gestación.

Reabsorciones por cuerno uterino	Animales intactos (38)	%	Animales manipulados (14)	%	Animales Experimentales			
					Del lado no ligado (15)	%	Del lado ligado (15)	%
0 a 1	36	94.7	11	78.6	14	93.3	6	40
2 a 5	2	5.3	3	21.4	1	6.7	9	60

La suma de los valores en cada columna corresponde al total de cuernos uterinos por grupo, que aparece entre paréntesis.

TABLA IV. Reducción de peso corporal, de cerebro y de cerebelo inducida por retardo en el crecimiento intrauterino.

	RN	5	10	15	20	25	30	35
Peso corporal	21.48	42.86	36.22	18.87	20.15	12.77	15.67	13.98
Peso de cerebro	8.79	33.76	19.37	26.01	16.83	15.98	9.79	10.88
Peso de cerebelo	24.51	42.34	25.09	21.21	13.72	10.8	9.77	10.05

Las cifras expresan el porciento de reducción en relación con los valores de los grupos testigo en cada edad.

RN = recién nacidos

Valor mínimo de n en cada grupo = 6

TABLA V. Reducción del espesor de capa granular externa de corteza cerebelosa en el modelo de retardo del crecimiento intrauterino.

	RN	5	10	15	20	25	30	35
Testigo	130±10	95±7.4	85±7.3	45±6.4	-	-	-	-
Experimentales	100±9.2	90.1±8	86±8.2	75±7.1	50.2±4.1	25±4.5	-	-

Los valores se expresan en μm y representan la media \pm el Error Standard de la Media de 12 áreas por grupo (3 animales por grupo; 4 áreas por animal).

RN - recién nacidos

TABLA VI. Celularidad e índice de mitosis en la capa granular externa de corteza cerebelosa de ratas con retardo en su crecimiento intrauterino.

	E D A D P O S T N A T A L							
	RN		5		10		15	
	Testigo	Exper.	Testigo	Exper.	Testigo	Exper.	Testigo	Exper.
n	62	69	60	30	40	30	70	40
Células por área*	40.1774 ±0.8982	35.4928 ±0.9374	42.1167 ±1.0659	45.4 ±1.4595	49.7 ± 1.2951	44.93 ±1.3527	44.4286 ±0.6124	43.7 ± 0.8931
Mitosis(%)	2.41	0.82**	2.57	3.59	1.66	1.85	1.64	1.14

Las cifras expresan las medias en cada grupo ± el Error Standard de la Media.

n = número de áreas evaluadas por grupo.

* = área: 3,600 μm^2

** = $\bar{p} < 0.001$

TABLA VII. Distribución de áreas* en base al número de mitosis por área de capa granular externa de cerebelo durante el desarrollo postnatal en condiciones de retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU).

	Recién nacido		5 días		10 días		15 días		20 días	
	Testigo	RCIU	Testigo	RCIU	Testigo	RCIU	Testigo	RCIU	Testigo	RCIU
Areas con 0 mitosis	17	52	19	8	15	12	32	24	38	76
Areas con 1 mitosis	32	14	24	7	19	12	27	12	2	4
Areas con 2 mitosis	12	3	12	8	5	5	9	4	-	-
Areas con 3 mitosis	-	-	4	4	-	1	2	-	-	-
Areas con 4 mitosis	1	-	-	2	1	-	-	-	-	-
Areas con 5 mitosis	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Areas con 6 mitosis	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Areas totales	62	69	60	30	40	30	70	40	40	80

* = Area: 3,600 μm^2

Fig. 1 -- Obtención de productos por cesárea en el día 21, donde se observan ambos cuernos uterinos con los productos a término. Se observa el momento de la extracción de uno de ellos y la sección del cordón umbilical.

Fig. 2 Sistema de perfusión con los elementos necesarios para llevarla a cabo por vía intracardiaca. El producto se encuentra en la parte central de la mesa de trabajo.

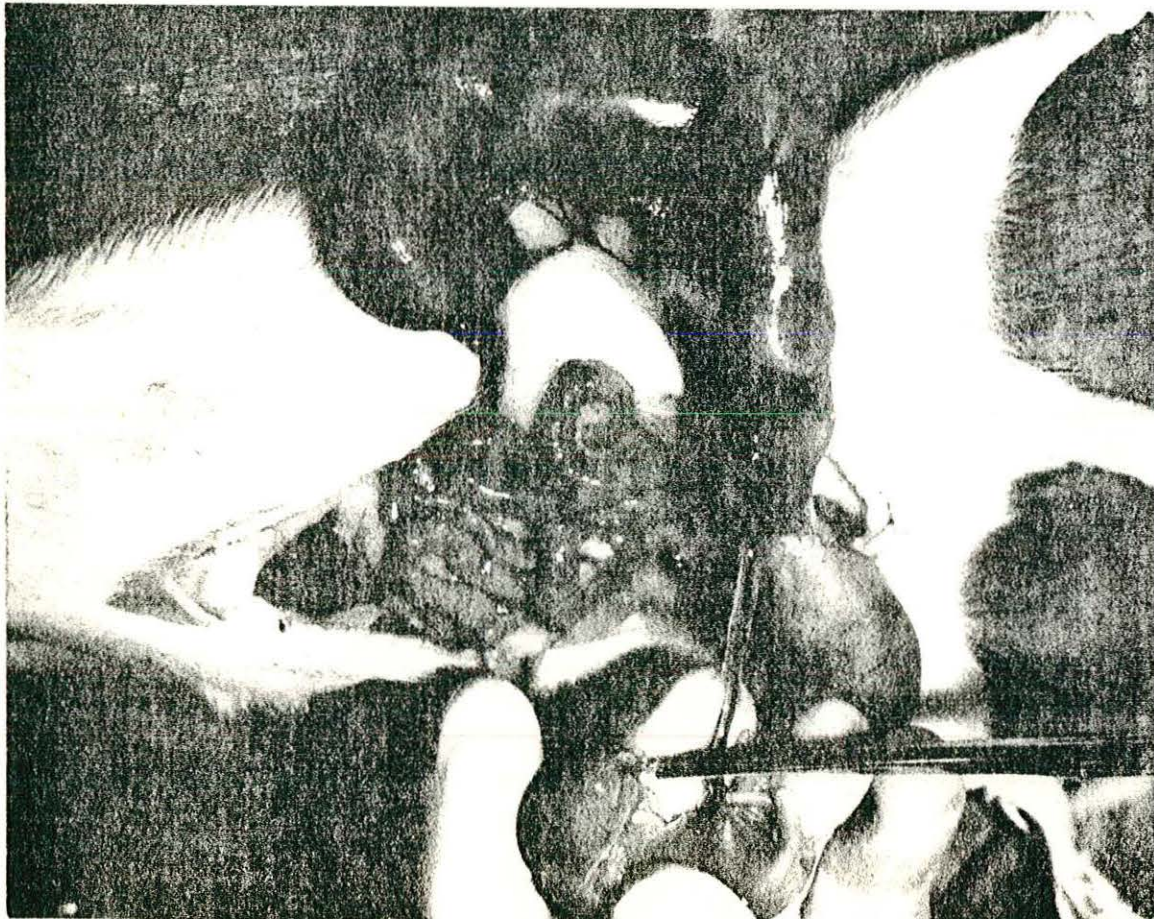
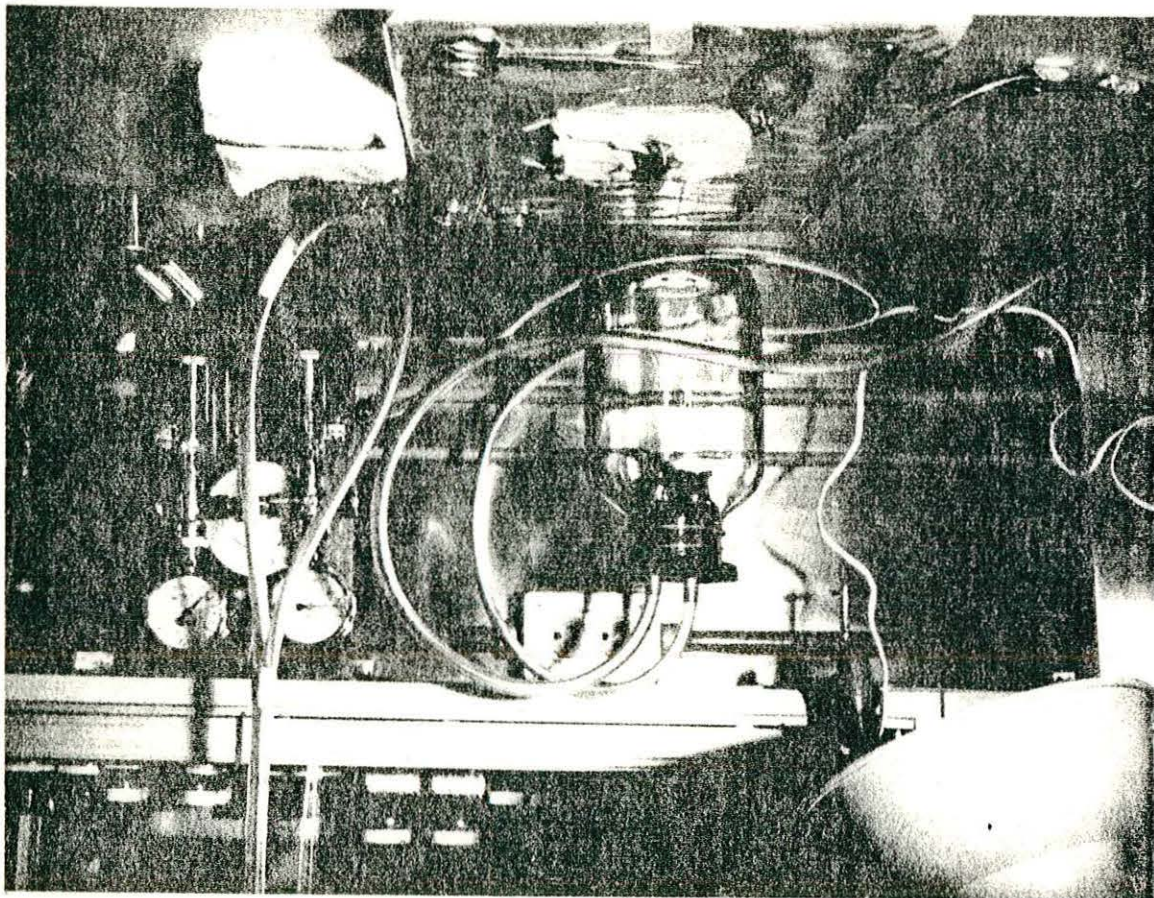


Fig. 3 Acercamiento de un producto recién nacido para mostrar la posición de la aguja dentro del ventrículo izquierdo en el momento del corte de aurícula derecha.



Fig. 4 Efecto del RCIU sobre el peso corporal durante el desarrollo postnatal.

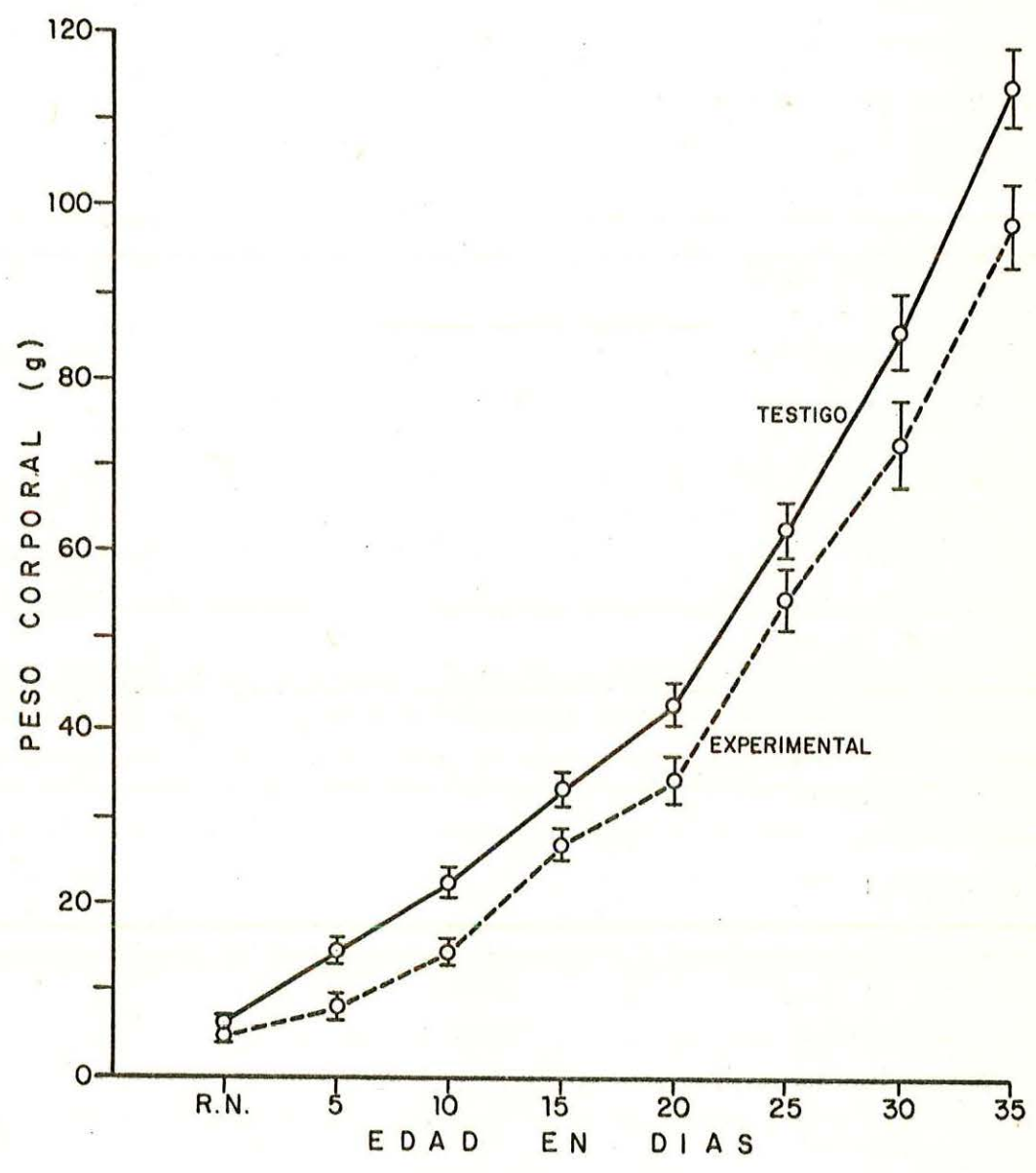


Fig. 5 Efecto del RCIU sobre el peso de cerebro durante el desarrollo postnatal.

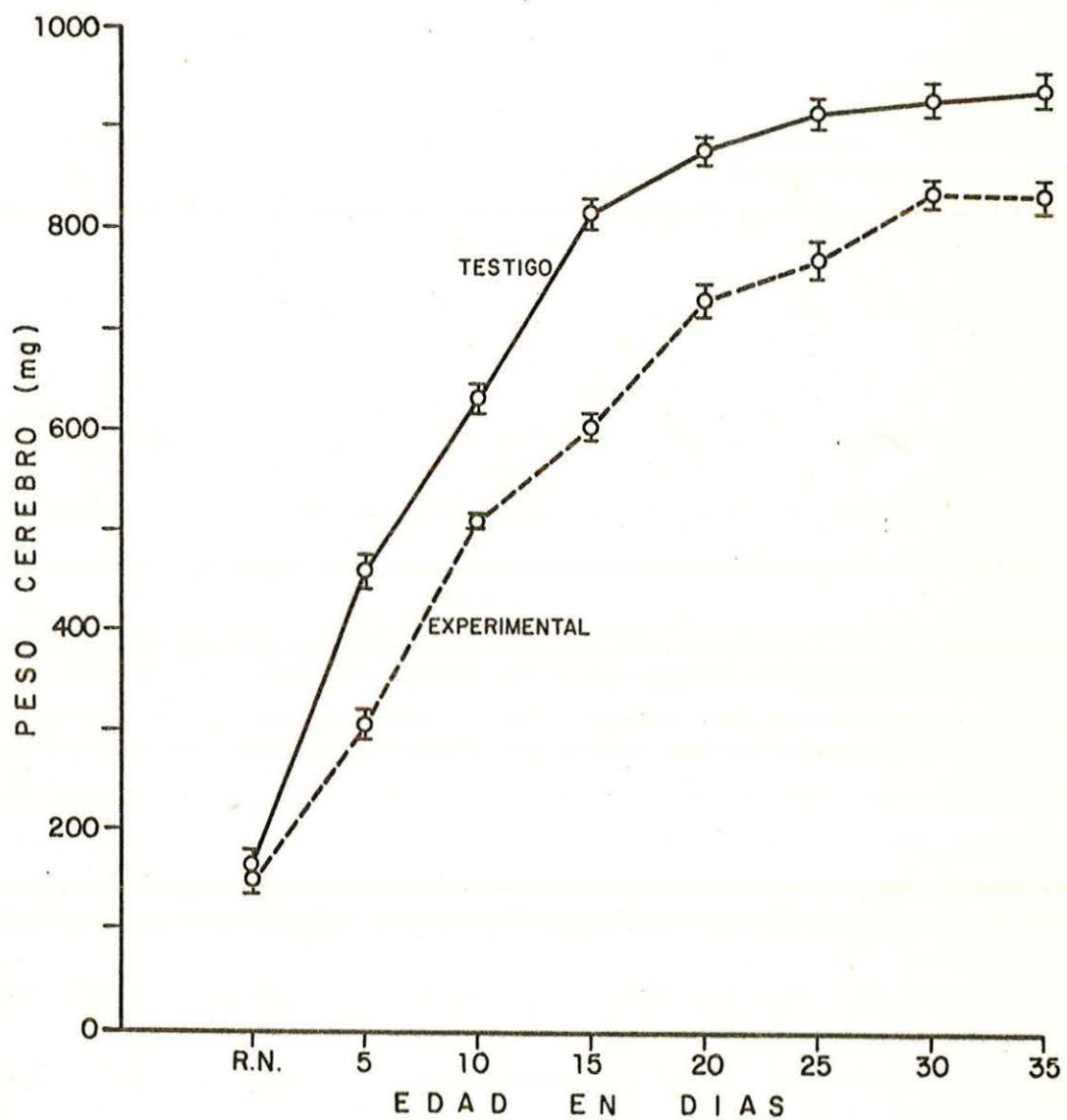


Fig. 6 Efecto del RCIU sobre el peso del cerebello durante el desarrollo postnatal.

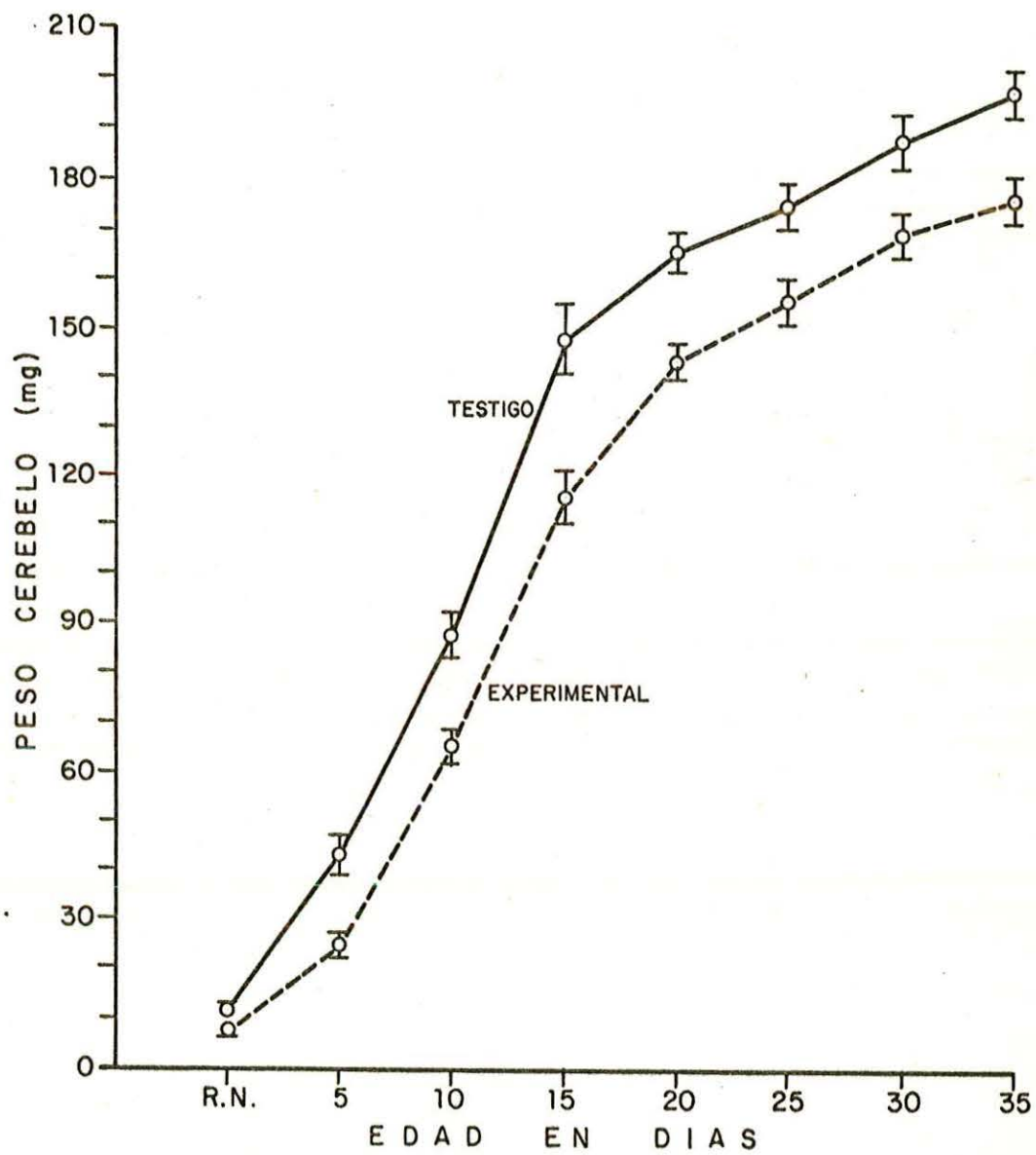
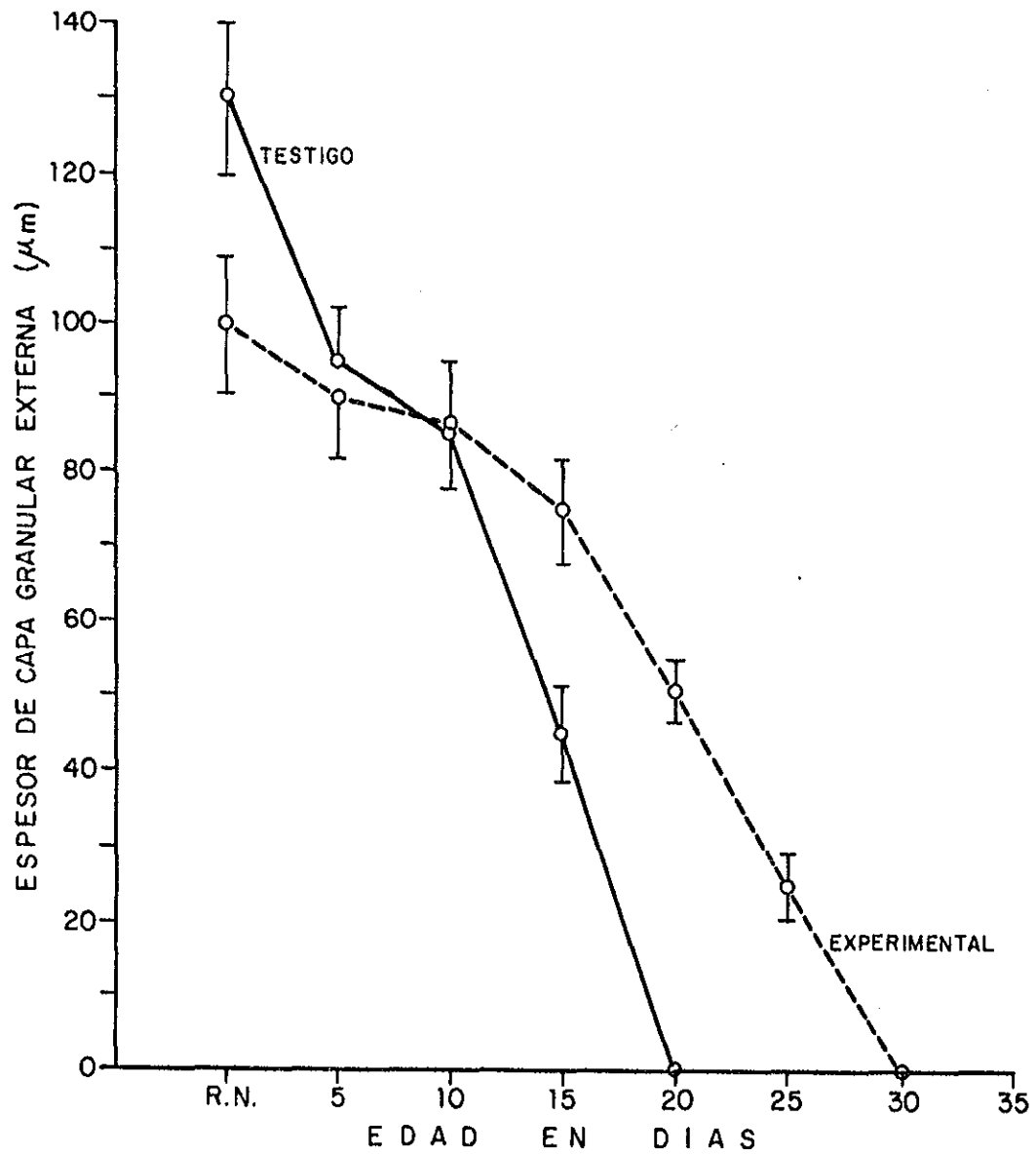


Fig. 7 Representación gráfica de las diferencias en la pendiente de desaparición de la capa granular externa de corteza cerebelosa durante el desarrollo postnatal en animales con RCIU y los del grupo testigo.

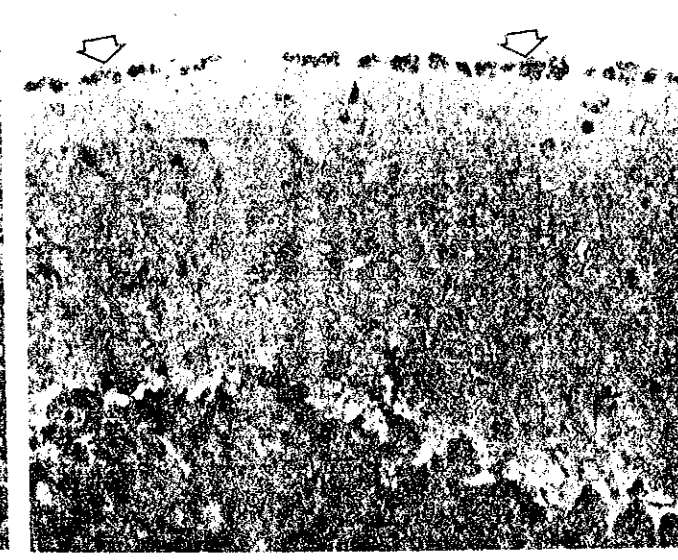
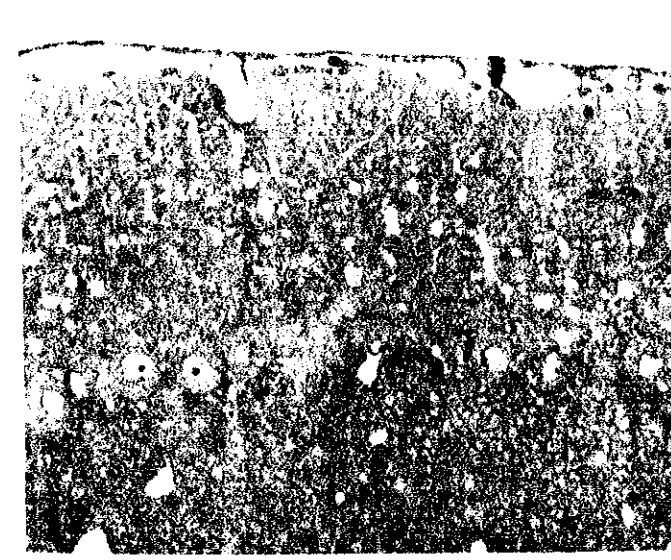
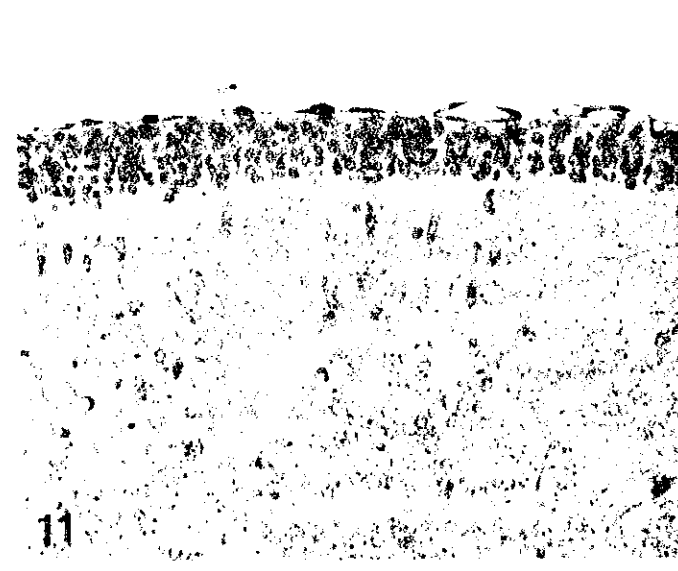
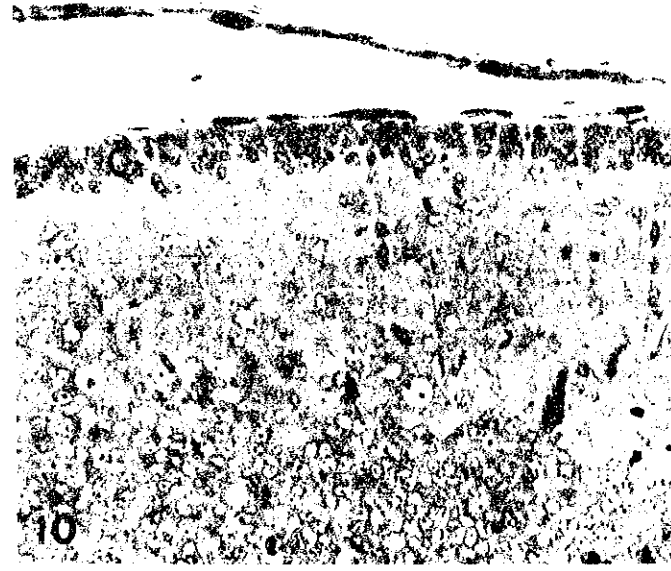
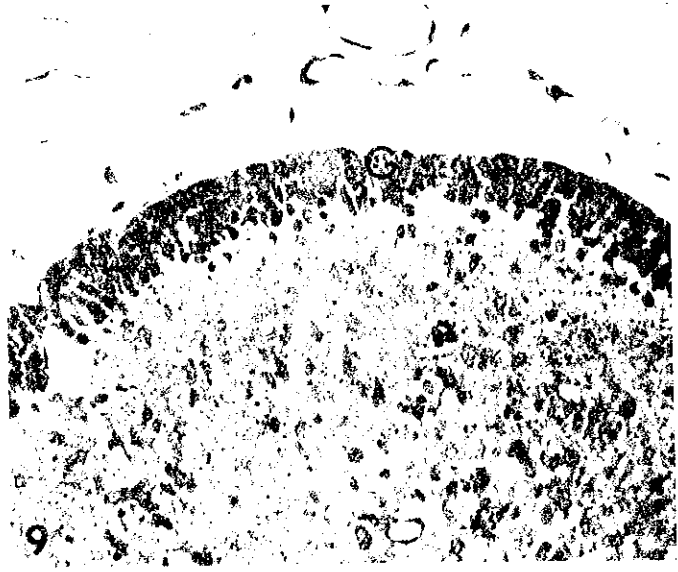
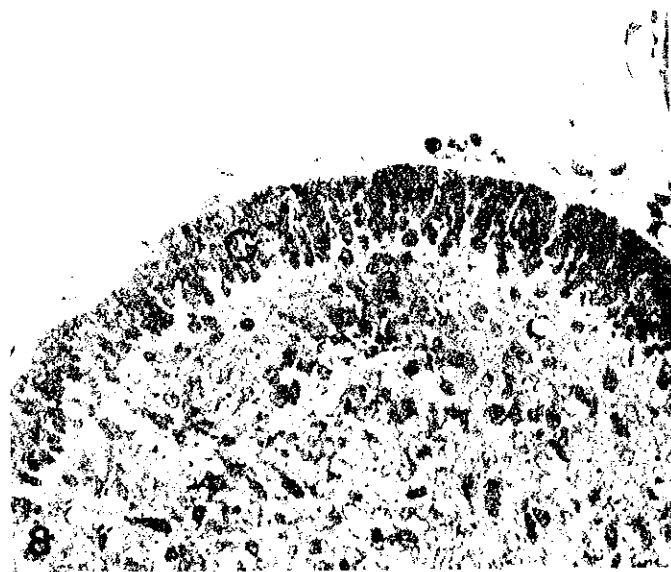


Figs. 8 - 13

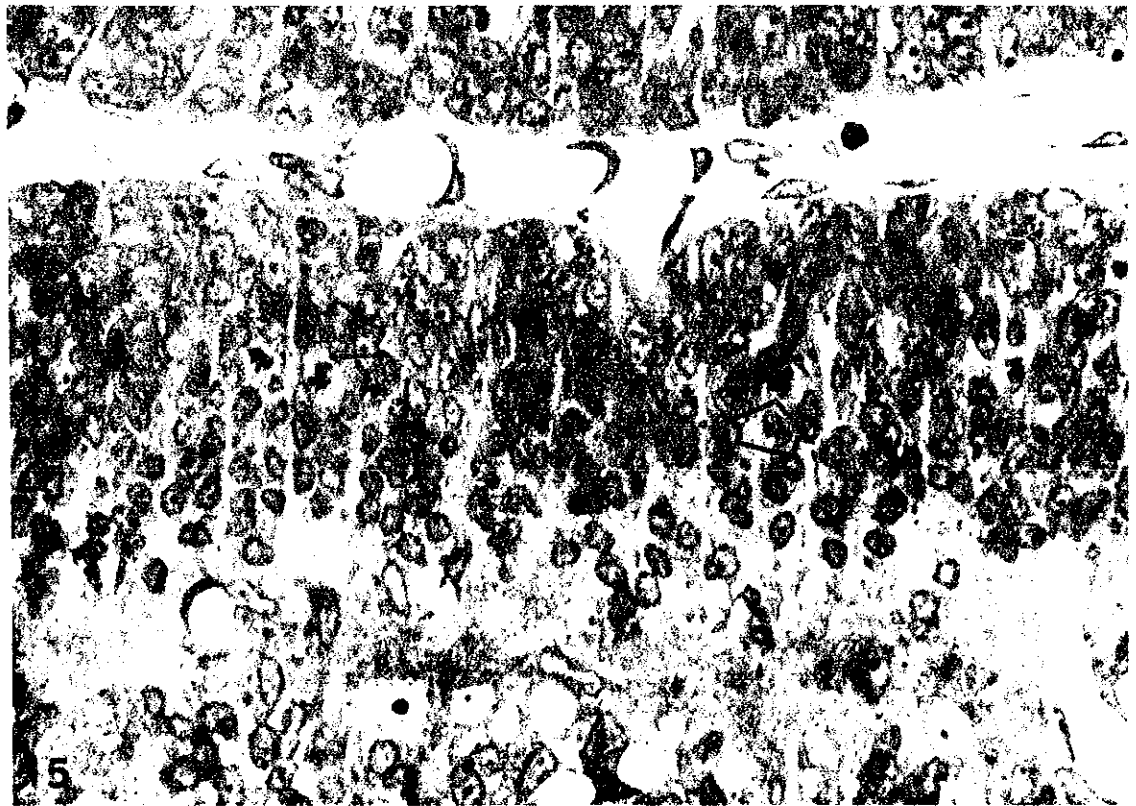
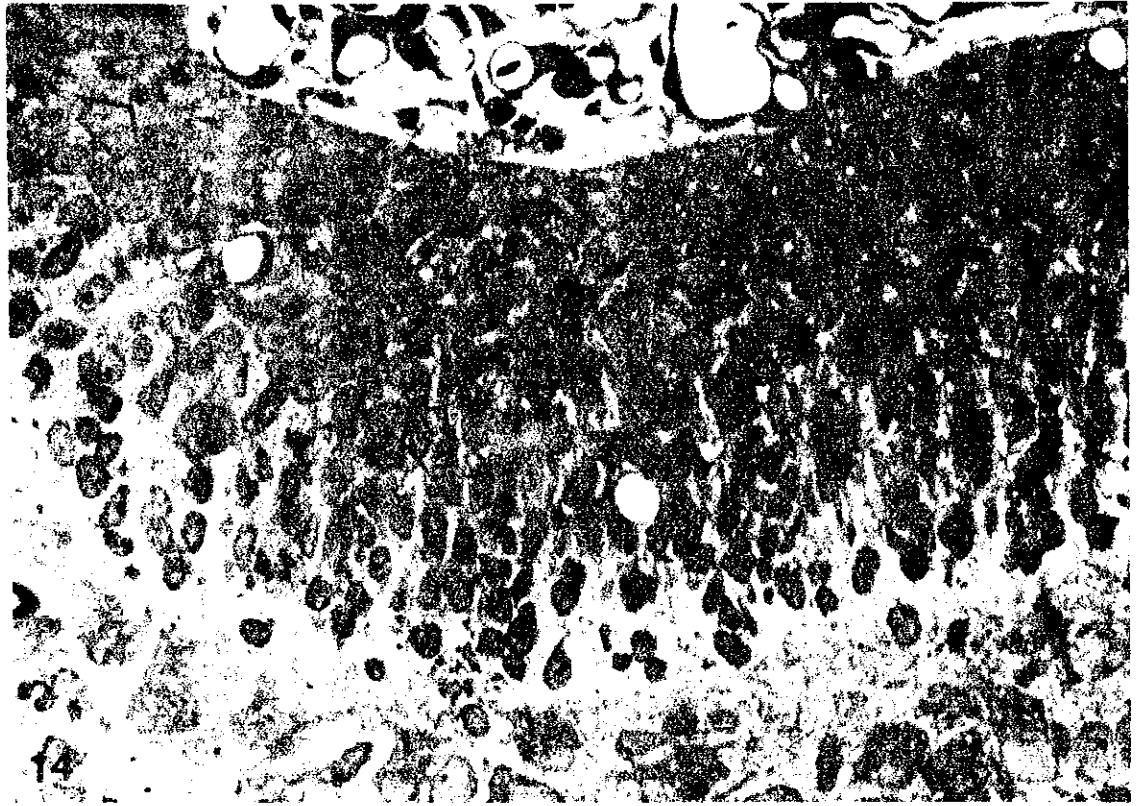
Imágenes representativas de la disminución secuencial del espesor de la capa granular externa (G) tanto en el grupo de animales testigo a las edades de recién nacidos (Fig. 8), 15 días (Fig. 10) y 25 días en donde ha desaparecido completamente (Fig. 12). En condiciones de RCIU se ilustra la capa granular externa en un animal recién nacido (Fig. 9), uno de 15 días (Fig. 11) y uno de 25 días (Fig. 13). En éste último se identifica aún una doble capa de células (flechas). Azul de toluidina (300 X).



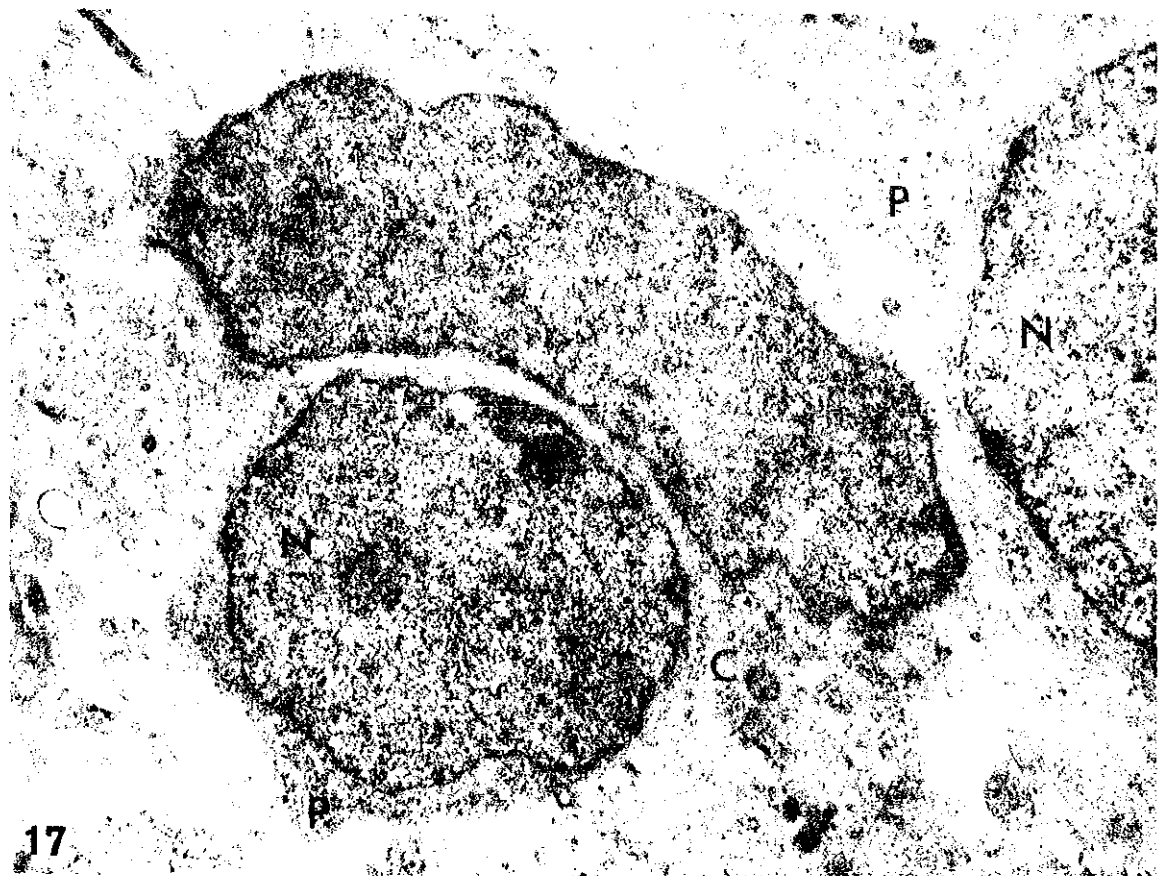
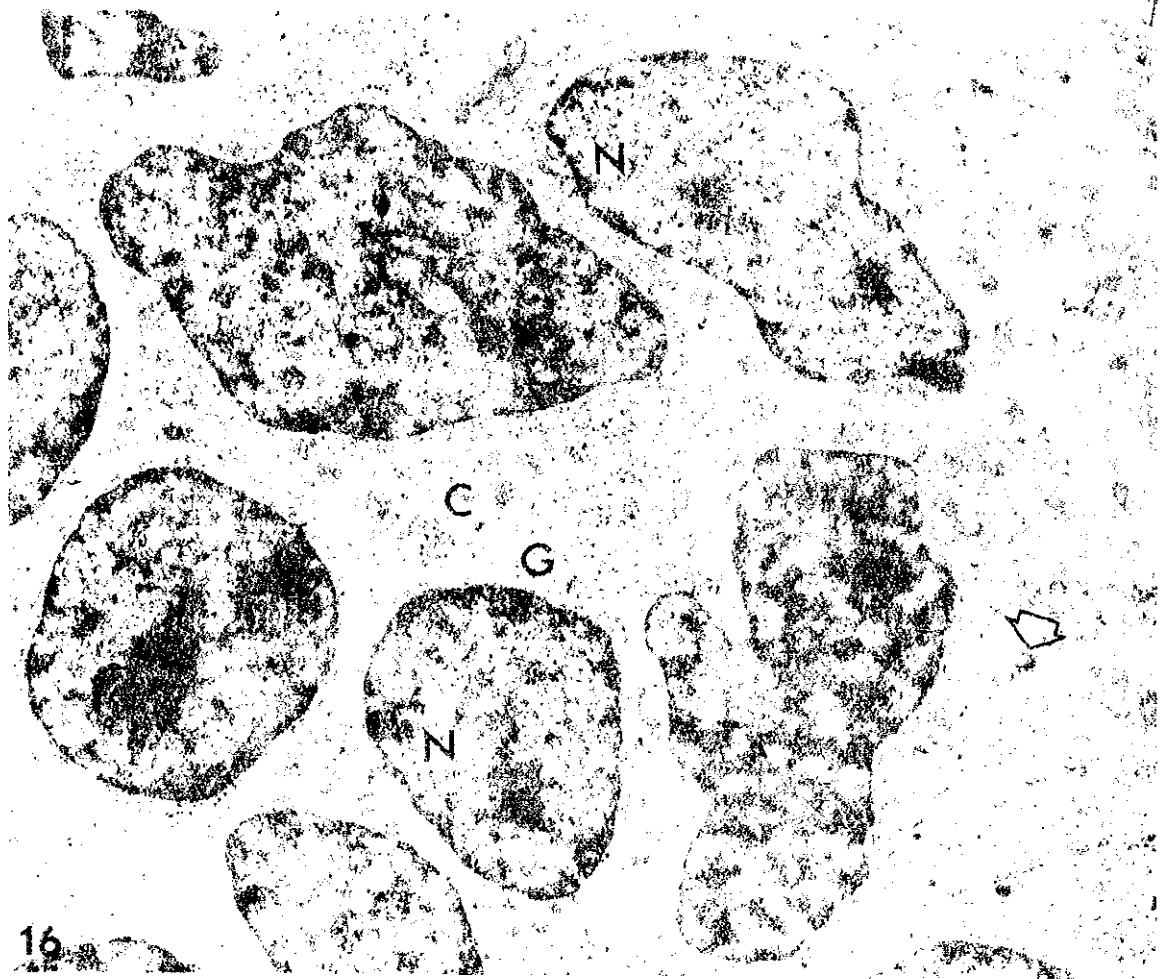
7



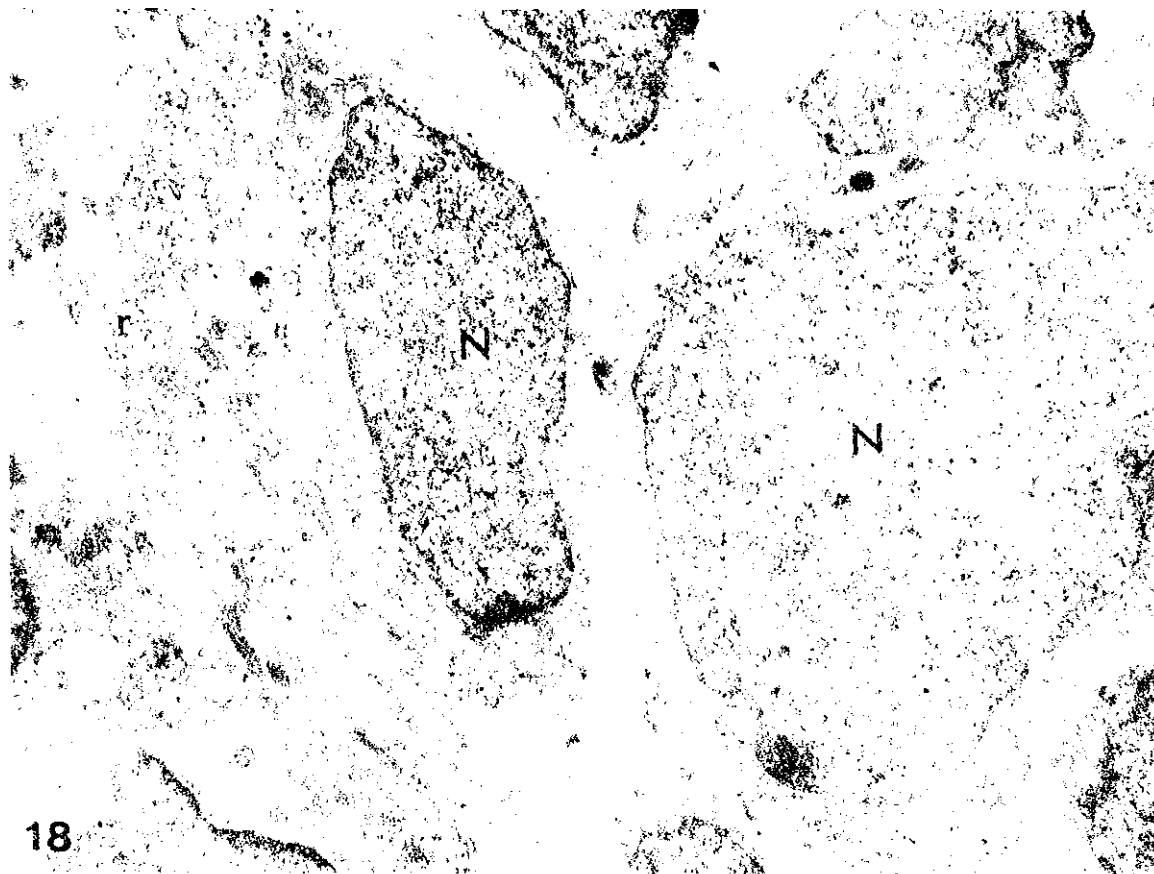
Figs. 14 y 15. Capa granular externa de corteza cerebelosa de animales de 10 días de edad, donde no se observan diferencias significativas entre los animales testigo (Fig. 14) y los animales con RCIU (Fig. 15), en relación a su estructura microscópica, celularidad y número de mitosis (flechas). Azul de toluidina (900 X).



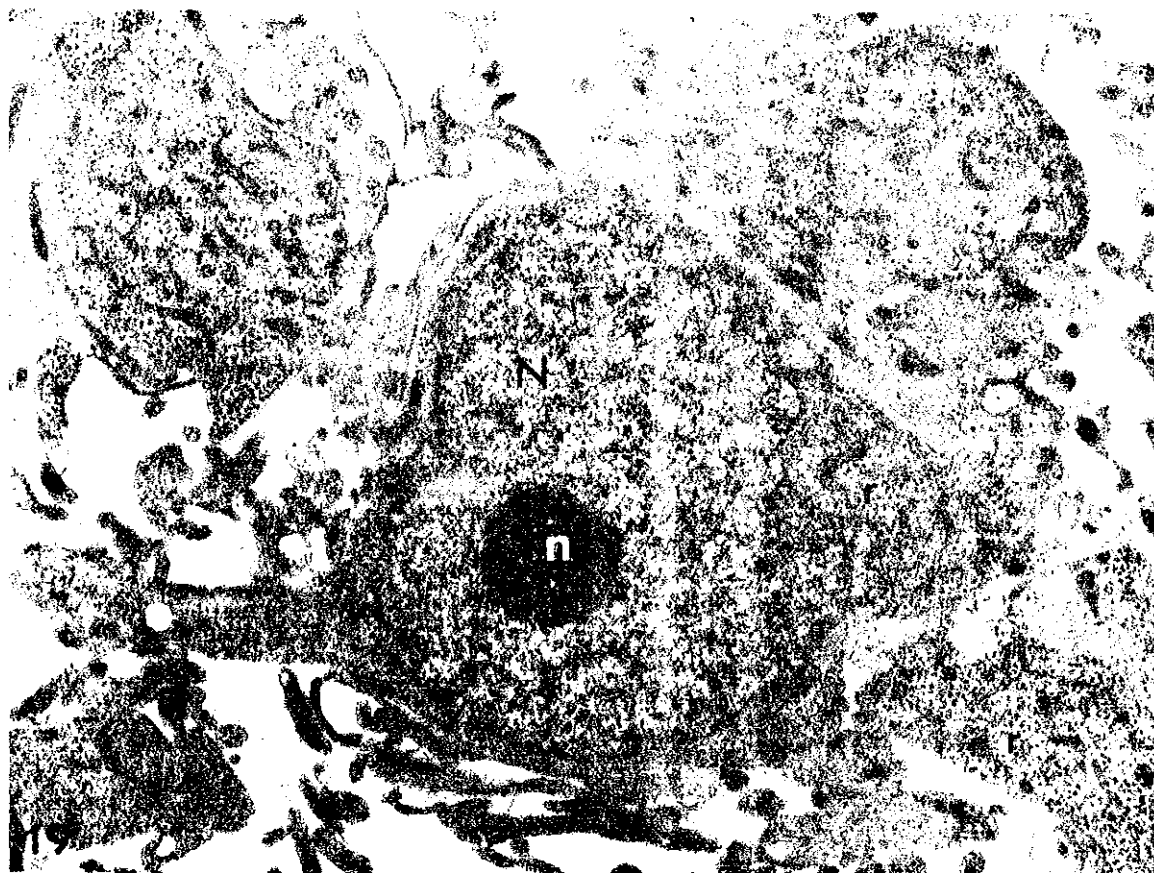
Figs. 16 y 17 Aspecto ultraestructural normal de células de capa granular externa de animales recién nacidos correspondientes al grupo testigo. N = núcleos; C = citoplasma; P = polirribosomas; flecha = centriolo; G = aparato de Golgi. Acetato de uranilo y citrato de plomo (9,000 X).



Figs. 18 y 19 Células de capa granular externa en animales recién nacidos del grupo testigo en cuyo citoplasma se identifican numerosos ribosomas libres y polirribosomas (r). Los núcleos son de contorno regular (N), n = nucleolo, Acetato de uranilo y citrato de plomo (9,000 X).



18



Figs. 20 y 21

Micrografías electrónicas que muestran la apariencia irregular de los núcleos (N) de las células de la capa granular externa de animales recién nacidos con RCIU. En ambas figuras, las invaginaciones de la envoltura nuclear aunadas al plano de corte hacen aparecer a los núcleos como si estuvieran fragmentados (N). Algunas fibras del neuropilo muestran expansión citoplásmica con numerosas vesículas claras en su interior (V). G = aparato de Golgi; P = polirribosomas; E = amplios espacios intercelulares; flechas = vacuolas citoplásmicas. Acetato de uranilo y citrato de plomo (9,000 X).

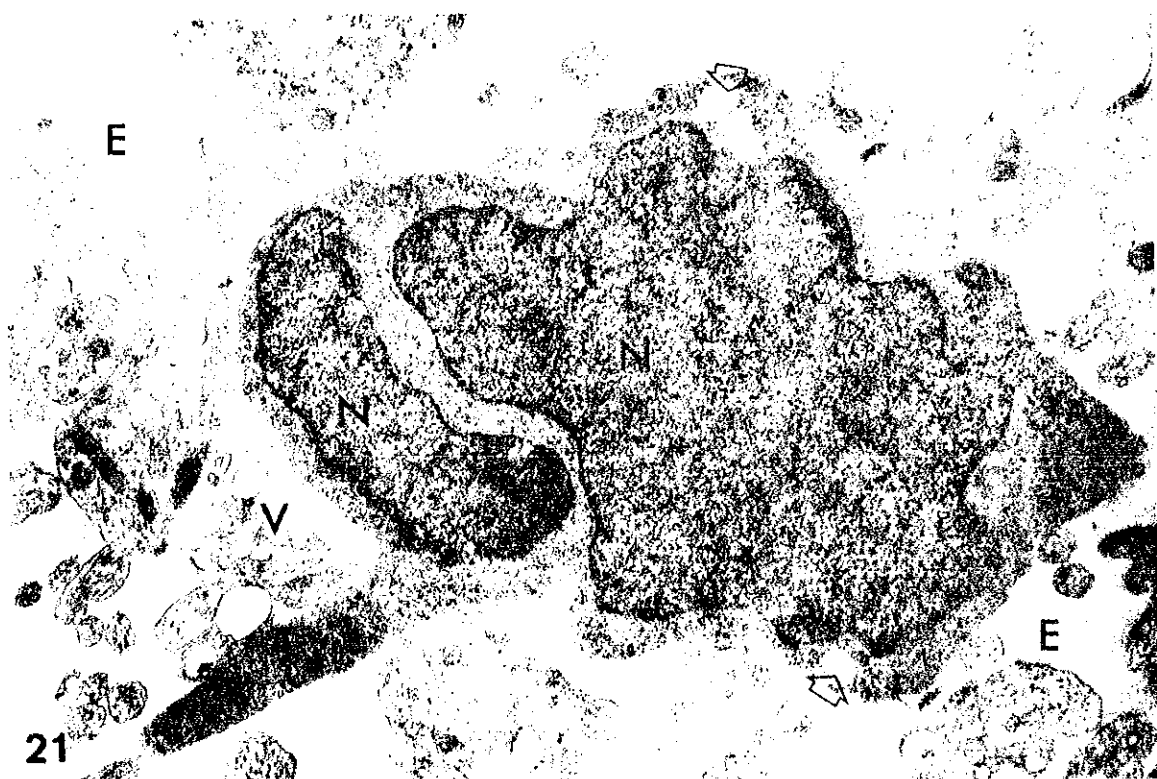
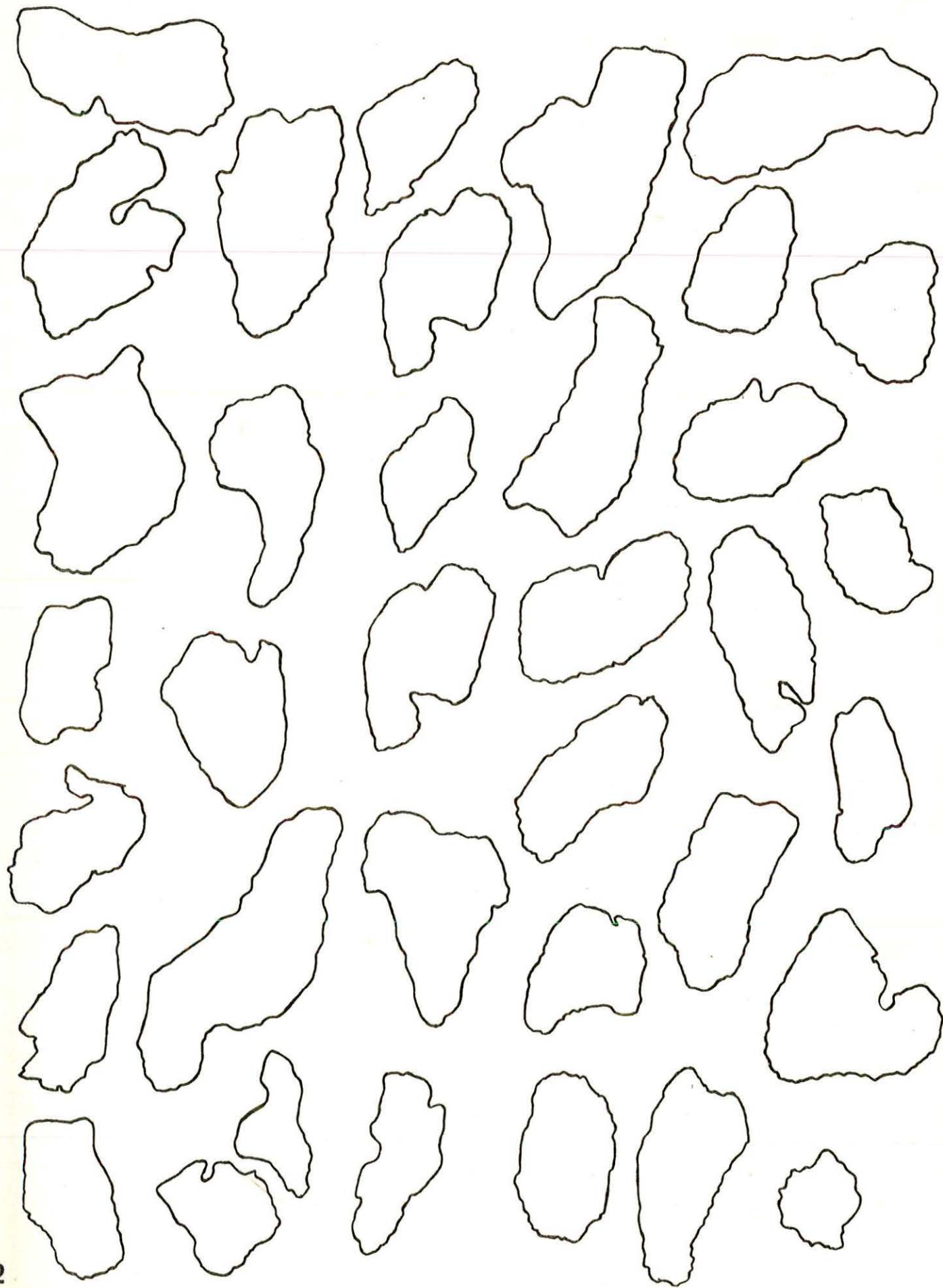


Fig. 22 Representación gráfica de varios contornos nucleares obtenidos de micrografías electrónicas de áreas de la capa granular externa de animales testigo recién nacidos. La morfología nuclear es en general de contornos regulares. Dibujos obtenidos de micrografías a una amplificación de 4,500 X.



Figs. 23 y 24 Representación gráfica de varios contornos nucleares obtenidos de micrografías electrónicas de áreas de la capa granular externa de animales recién nacidos con RCIU. Se observan irregularidades en el contorno, indentaciones (i) e invaginaciones profundas de la envoltura nuclear (flechas), así como variaciones en tamaño. Estos cambios fueron observados en la tercera parte de los núcleos examinados en la capa granular externa en los animales recién nacidos con RCIU. Dibujos obtenidos de micrografías a una ampliificación de 4,500 X.

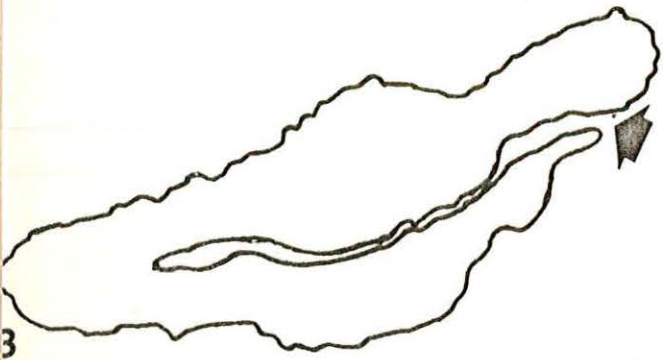
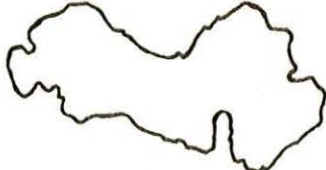
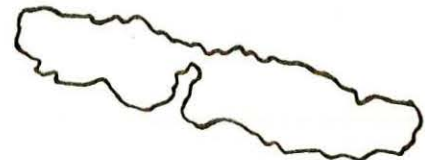
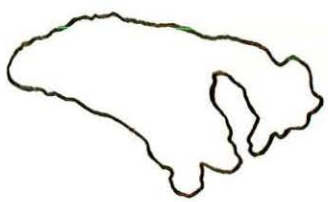
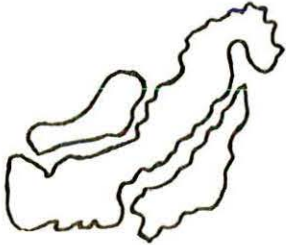
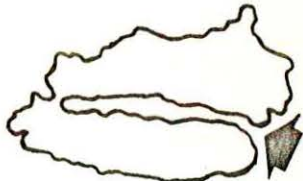
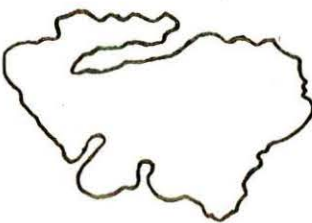
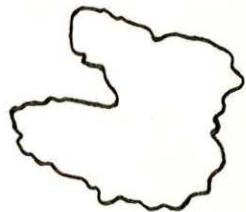
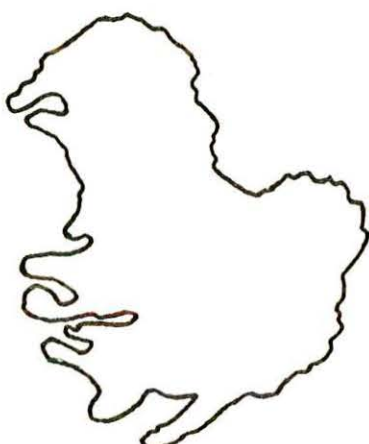
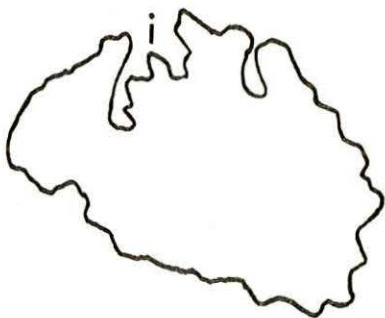
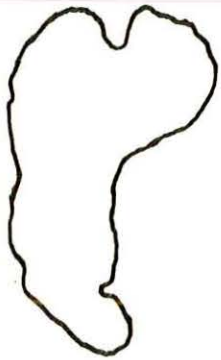
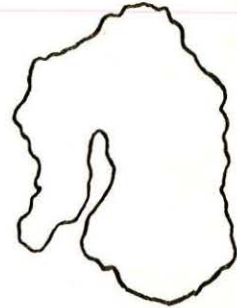
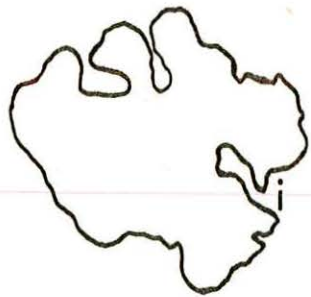
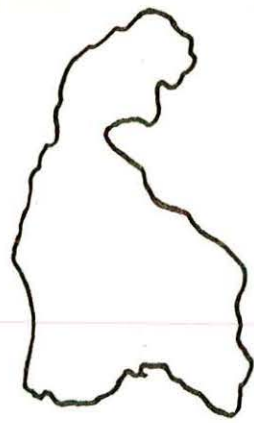
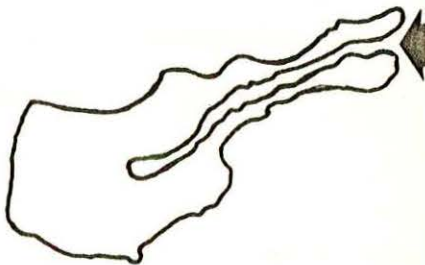
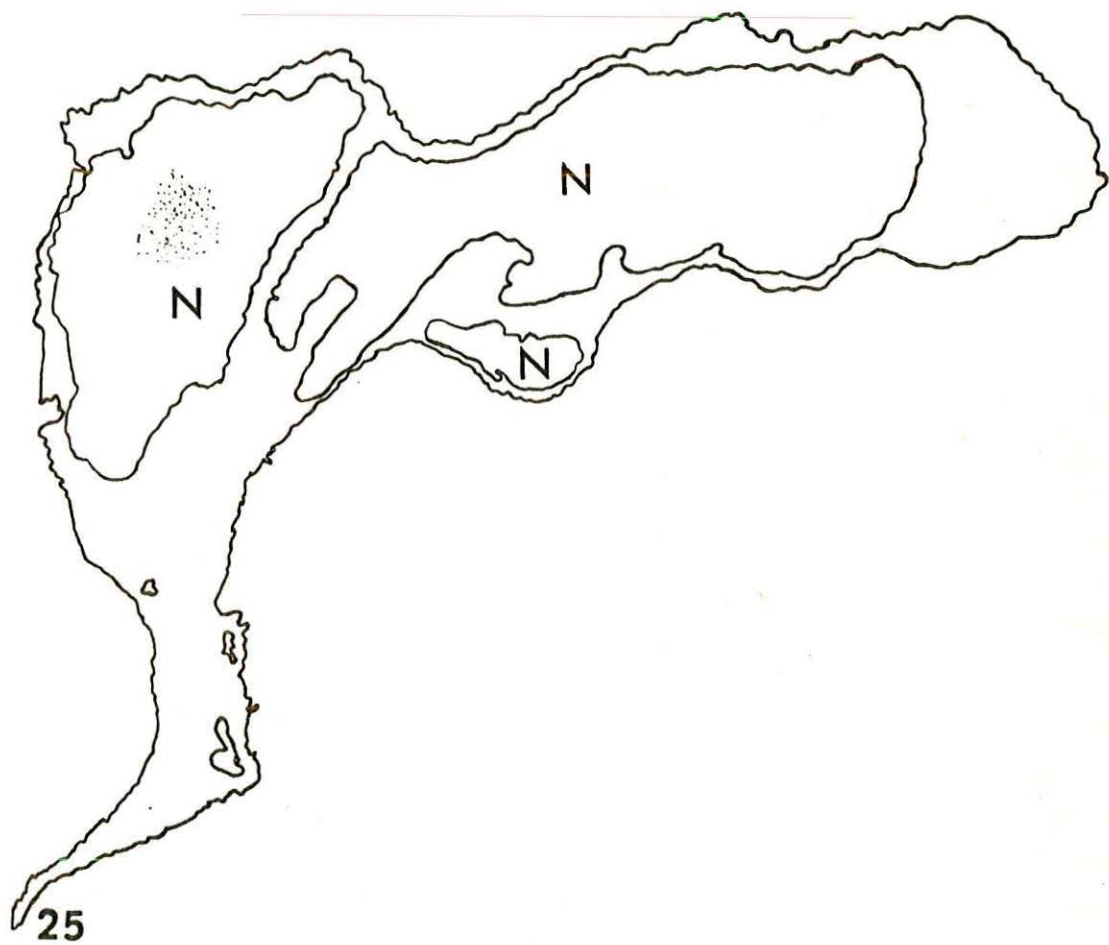
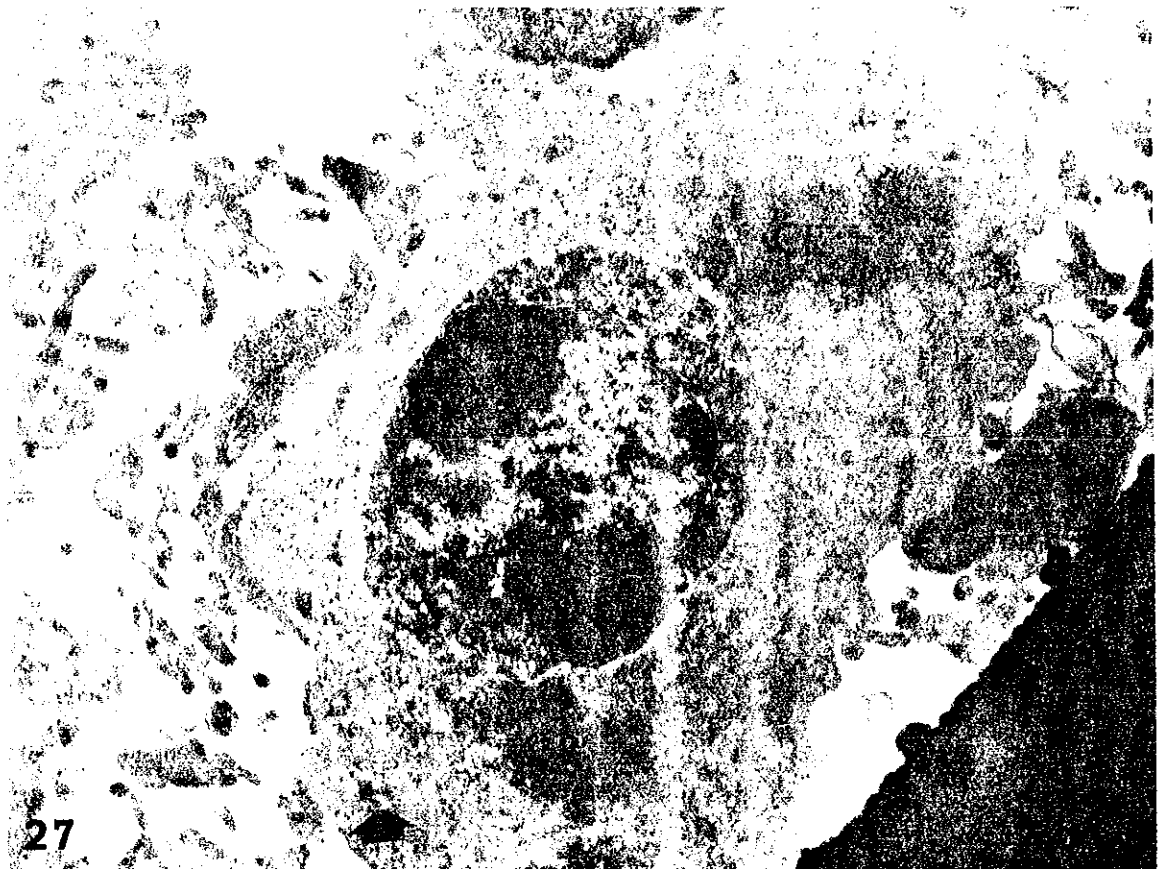
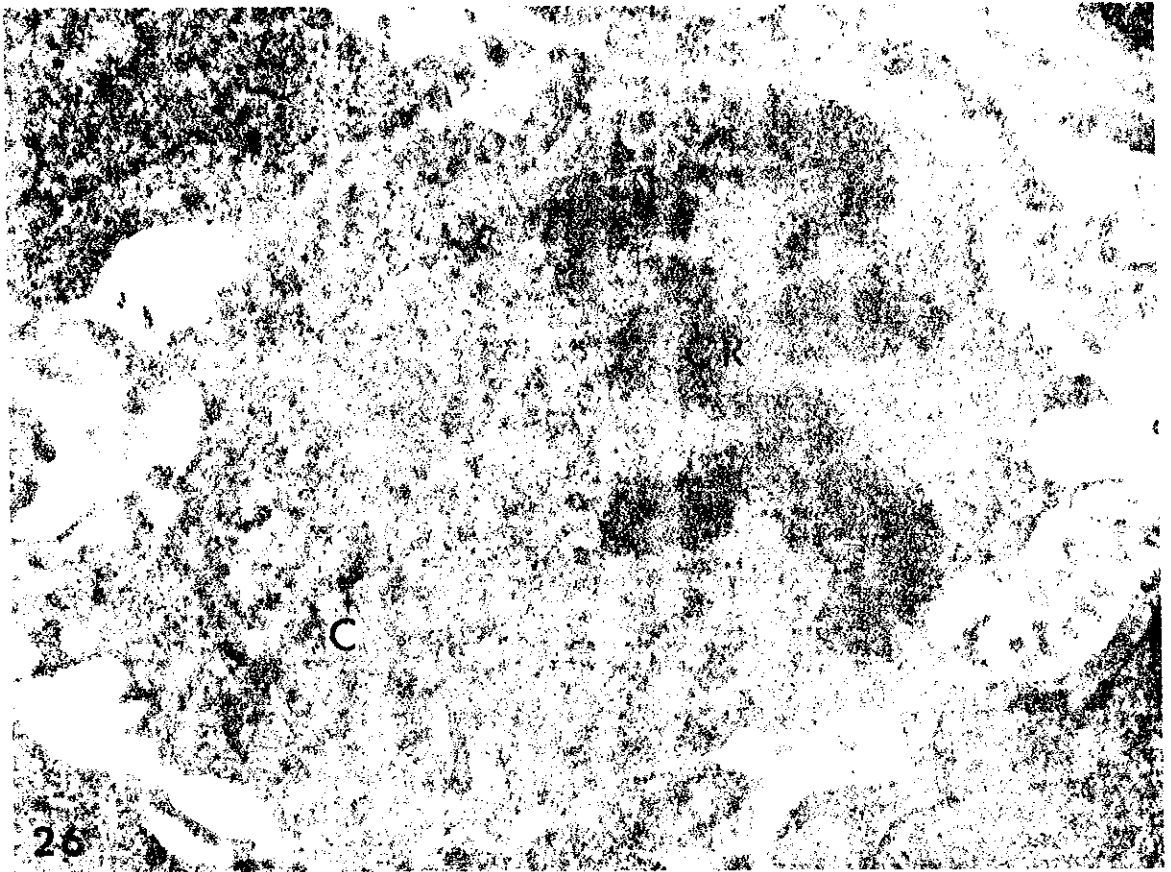


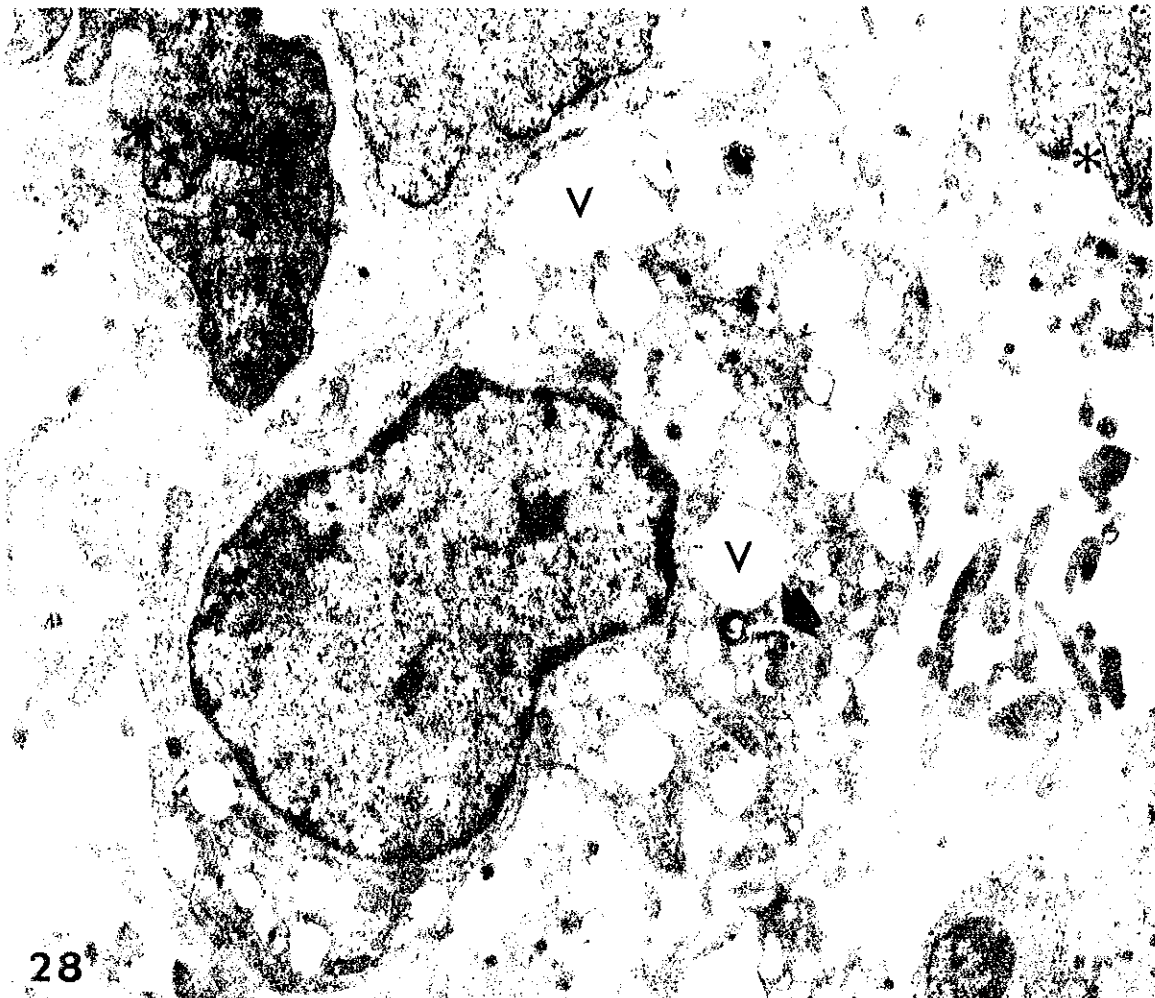
Fig. 25 Aspecto general de una célula de la capa granular externa de un animal recién nacido con RCIU que muestra irregularidades del contorno nuclear con lobulaciones pronunciadas, que dan al núcleo (N) un aspecto multilobulado. Dibujo obtenido de una micrografía a una amplificación de 5,500 X.



- Fig. 26 Micrografía electrónica de una célula en mitosis de la capa granular externa en animal recién nacido del grupo testigo. CR = cromosomas; C = centriólo. Acetato de uranilo y citrato de plomo (8,000 X).
- Fig. 27 Célula en mitosis, en capa granular externa en rata recién nacida con RCIU. Se observa una célula con cambios degenerativos, en el interior de la célula en mitosis, sin poderse definir si se trata de célula fagocitada o inmersa en una invaginación de la membrana plasmática. CR= cromosomas; flecha = centriólo. Acetato de uranilo y citrato de plomo (8,000 X).



- Fig. 28 Célula de capa granular externa de animal recién nacido con RCIU, que muestra considerable vacuolación en el citoplasma (V) y algunos cuerpos residuales (flechas). El núcleo de otras células muestran irregularidades en su contorno (asteriscos). Acetato de uranilo y citrato de plomo (7,000 X).
- Fig. 29 Citosegresoma (CS) en el citoplasma de una célula de capa granular externa de rata recién nacida con RCIU. N = núcleo. Acetato de uranilo y citrato de plomo (27,000 X).





- Fig. 30 Neuropilo en porción superficial de capa molecular de corteza cerebelosa de animal recién nacido del grupo testigo. Se observan amplios espacios intercelulares (E). Acetato de uranilo y citrato de plomo (9,000 X).
- Fig. 31 Neuropilo en porción superficial de capa molecular de corteza cerebelosa de animal recién nacido con RCIU. Se observan amplios espacios intercelulares (E) y no hay cambios en las prolongaciones celulares. Acetato de uranilo y citrato de plomo (13,500 X).
- Fig. 32 Neuropilo en porción superficial de capa molecular de corteza cerebelosa de rata de 5 días de edad, con RCIU, donde los espacios intercelulares son menos amplios (E) y se observan expansiones citoplasmicas que contienen numerosas vesículas claras (V). Acetato de uranilo y citrato de plomo (9,000 X).

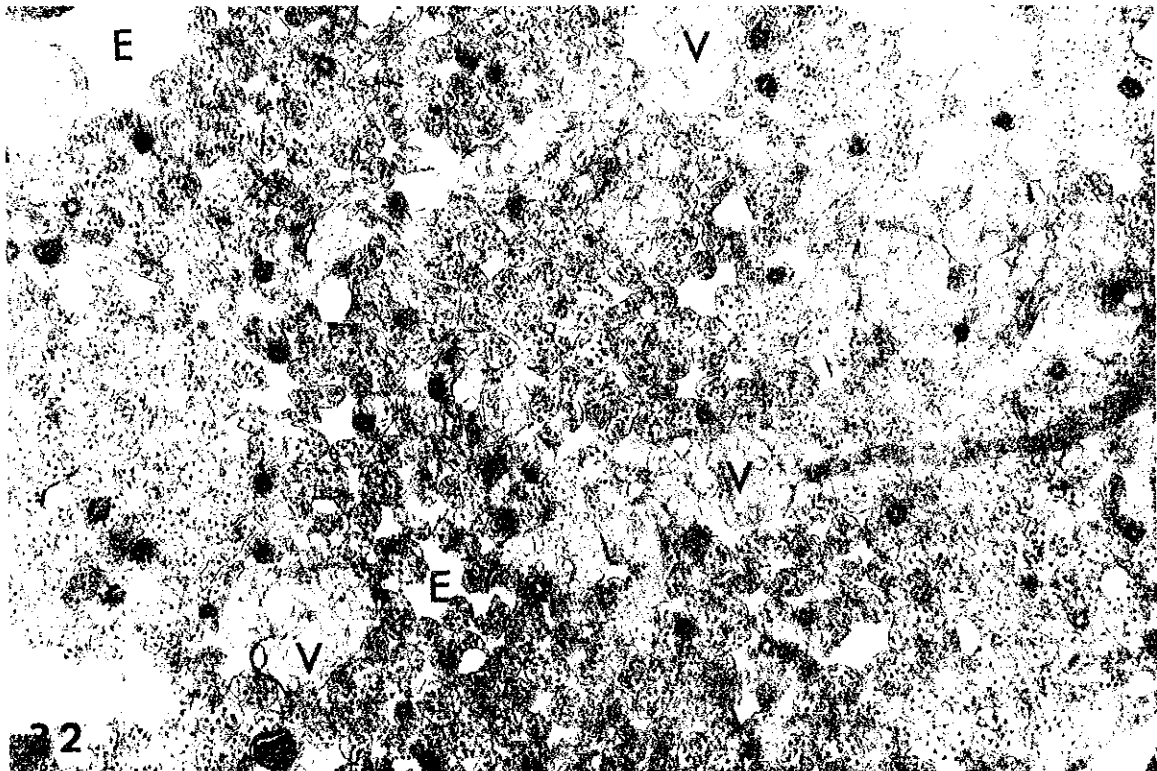
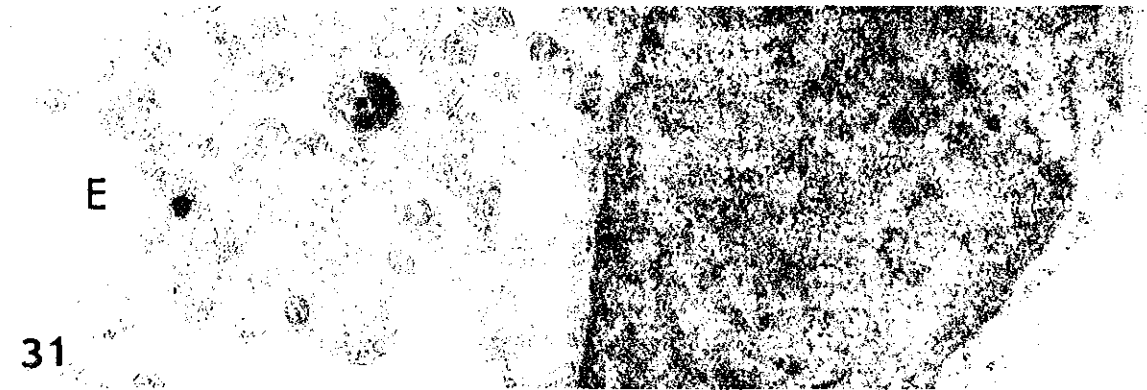
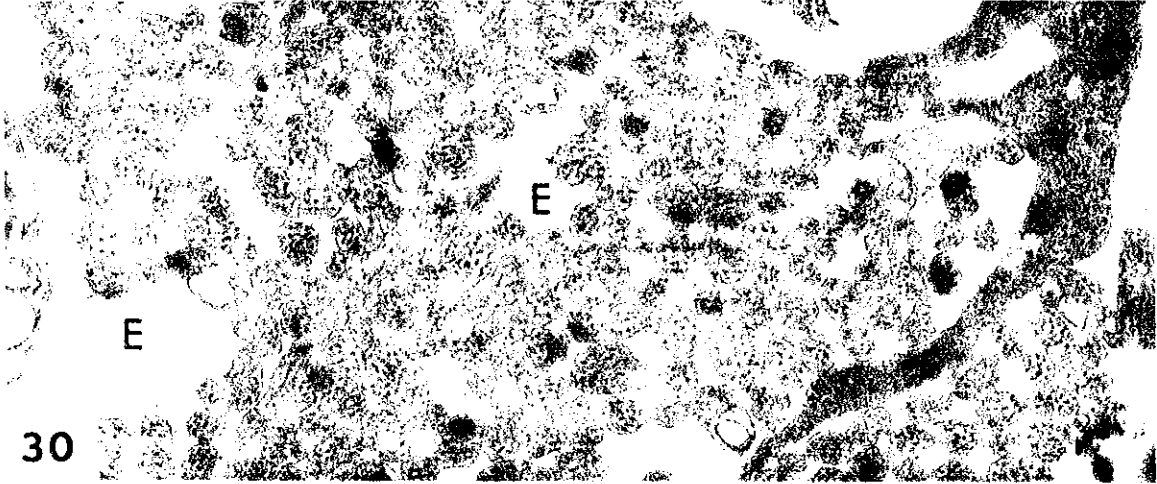
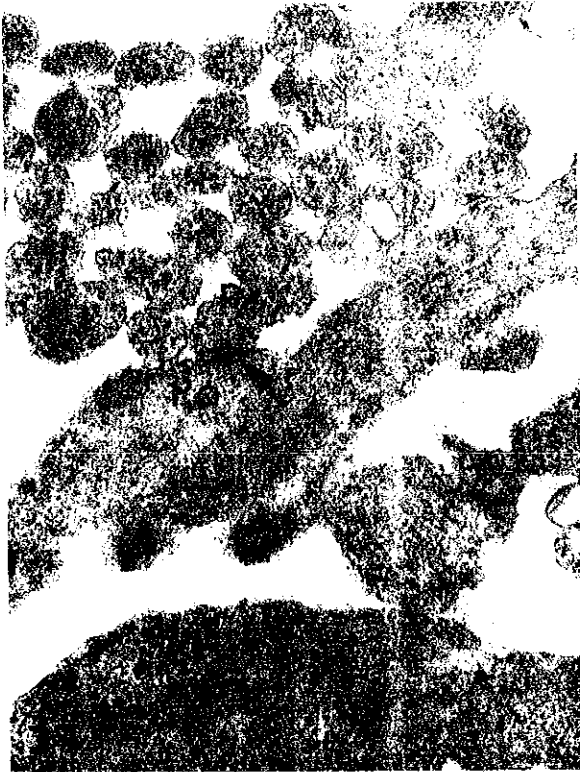
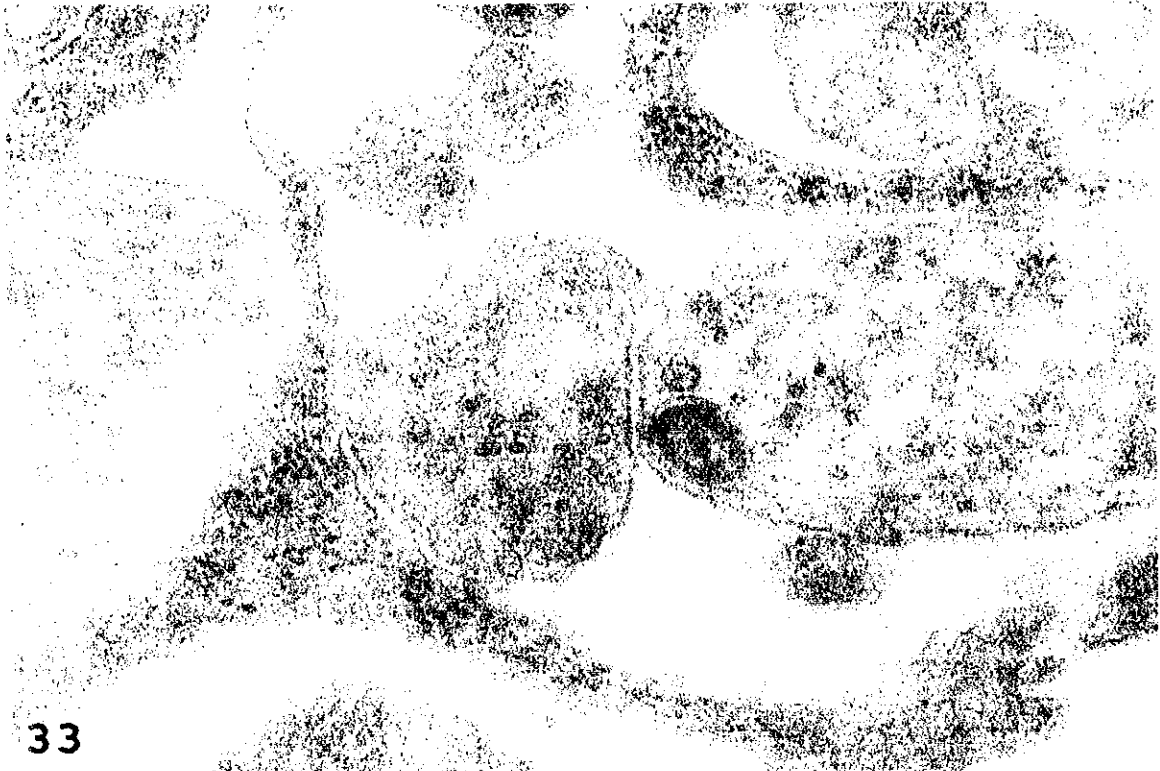


Fig. 33 - 37 Imágenes representativas de diferentes fases de la sinaptogénesis en neuropilo de la región superficial de capa molecular de corteza cerebelosa. No se observaron diferencias cualitativas entre los hallazgos del grupo con RCIU al compararlos con los correspondientes al grupo testigo. P = estructura presináptica; Po = estructura postsináptica; v = vesículas sinápticas; flechas = zona densa postsináptica. Fig. 33: rata de 10 días del grupo testigo (35,000 X); Figs. 34 y 35: ratas de 10 días con RCIU (18,000 X); Fig. 36: rata de 15 días del grupo testigo (45,000 X); Fig. 37: rata de 15 días con RCIU (45,000 X). Acetato de uranilo y citrato de plomo.



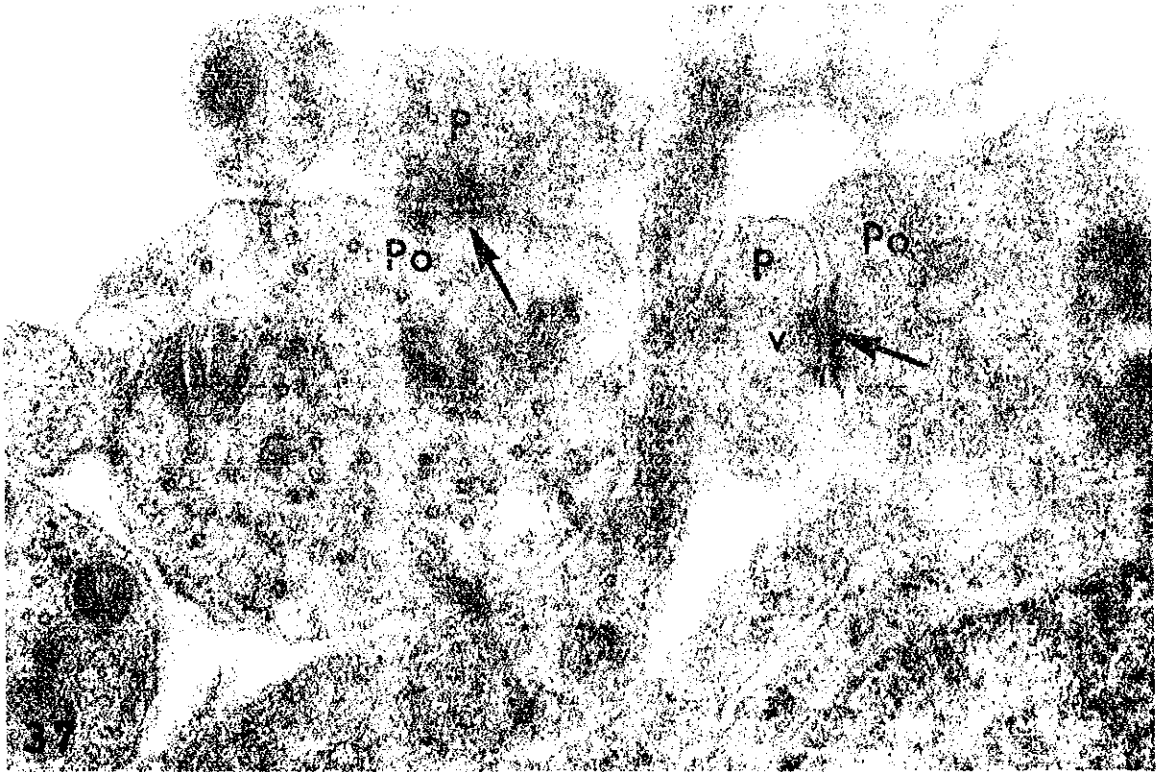
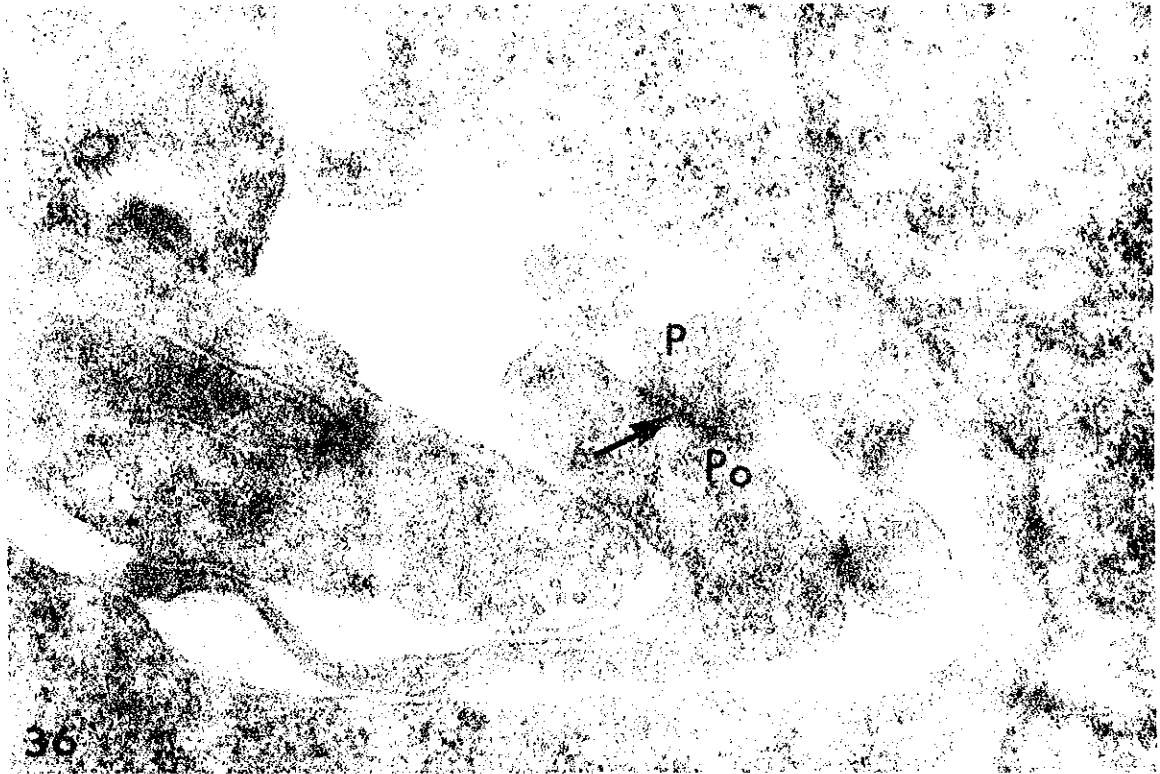
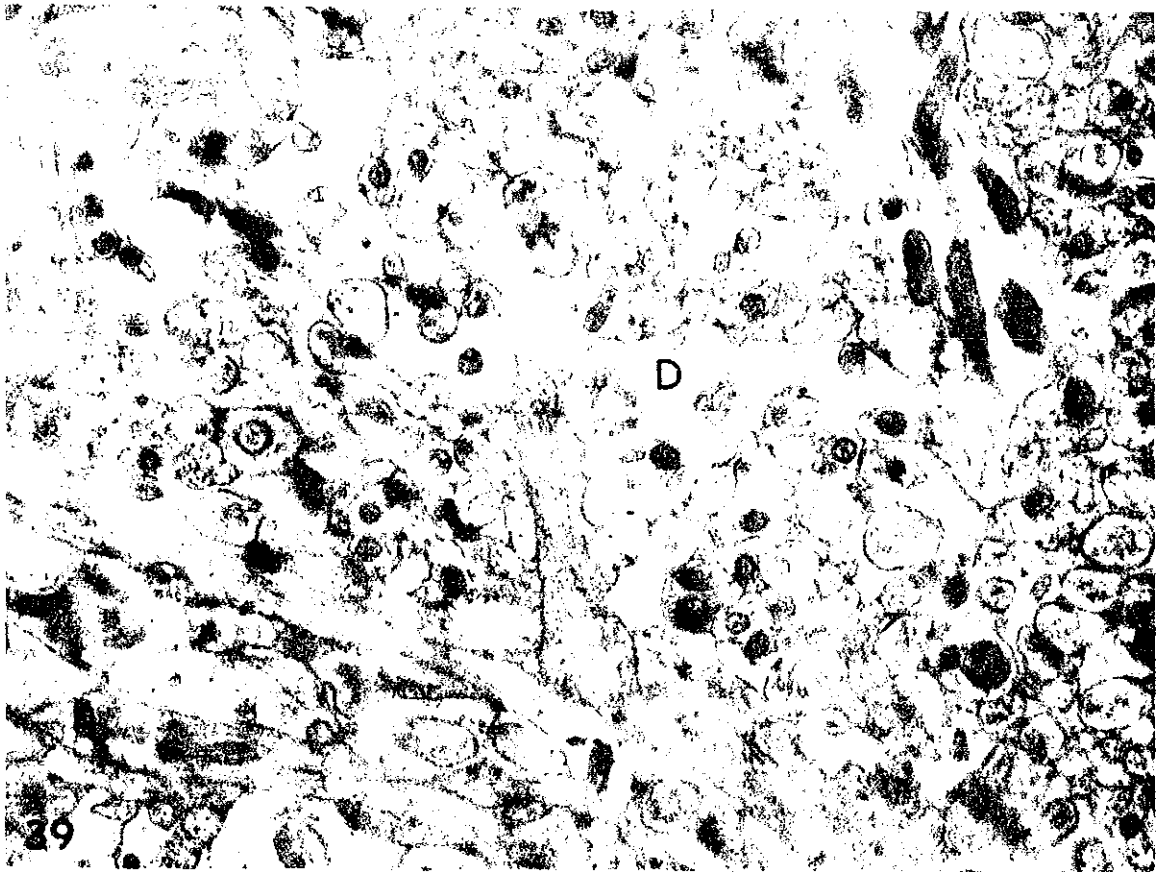
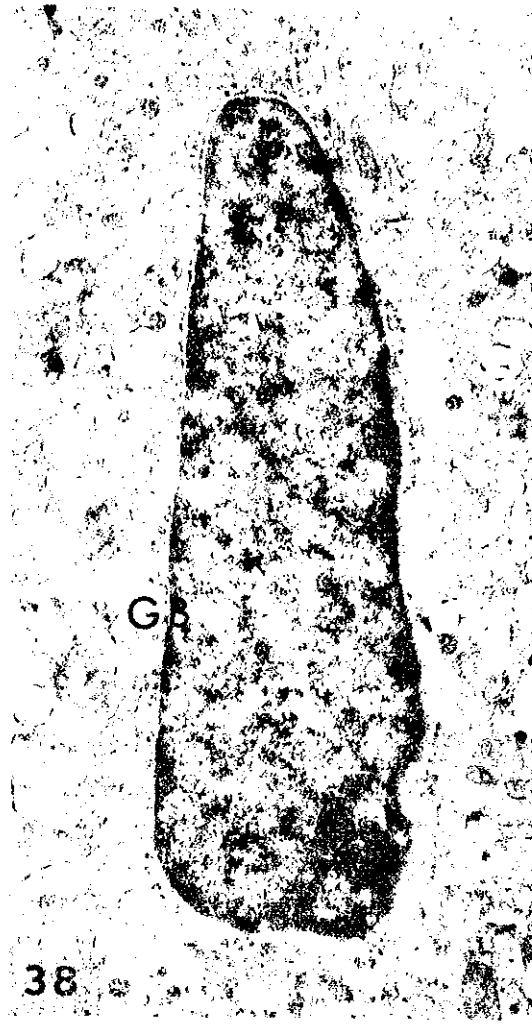
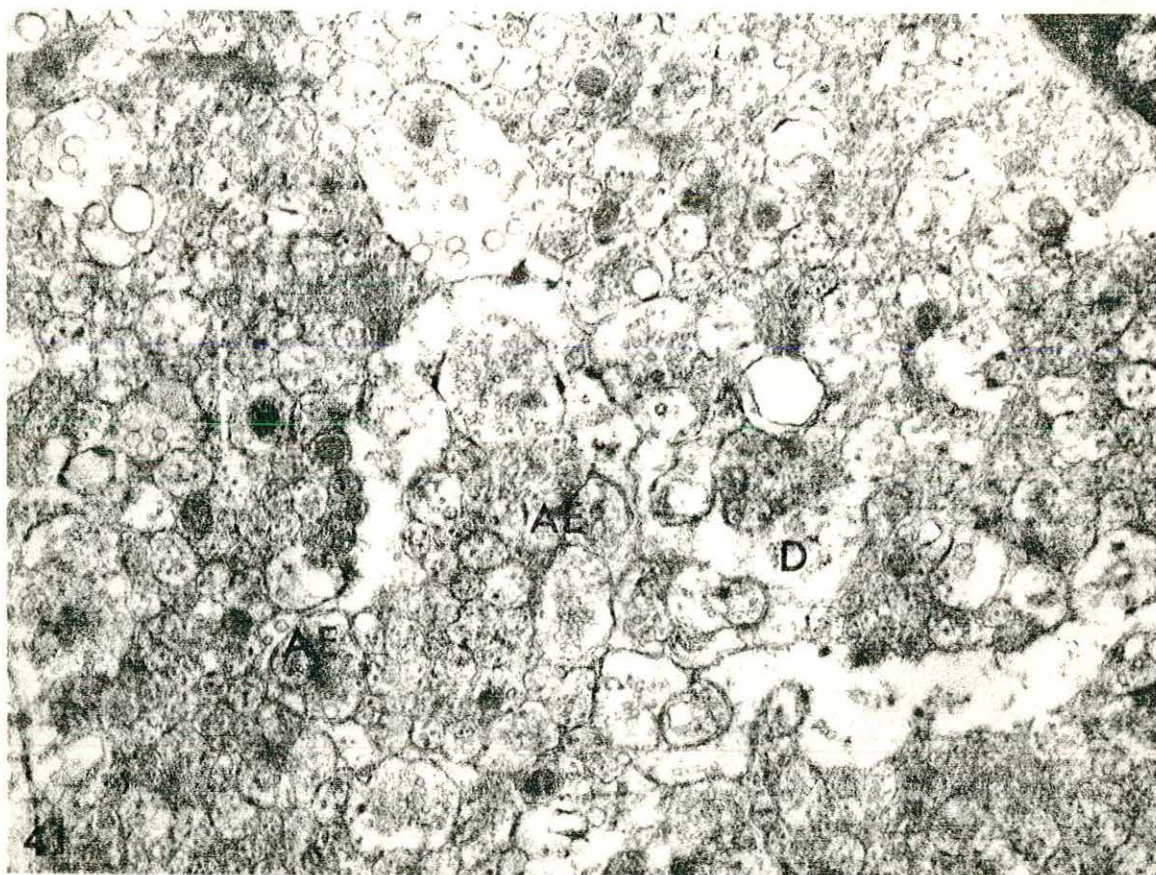
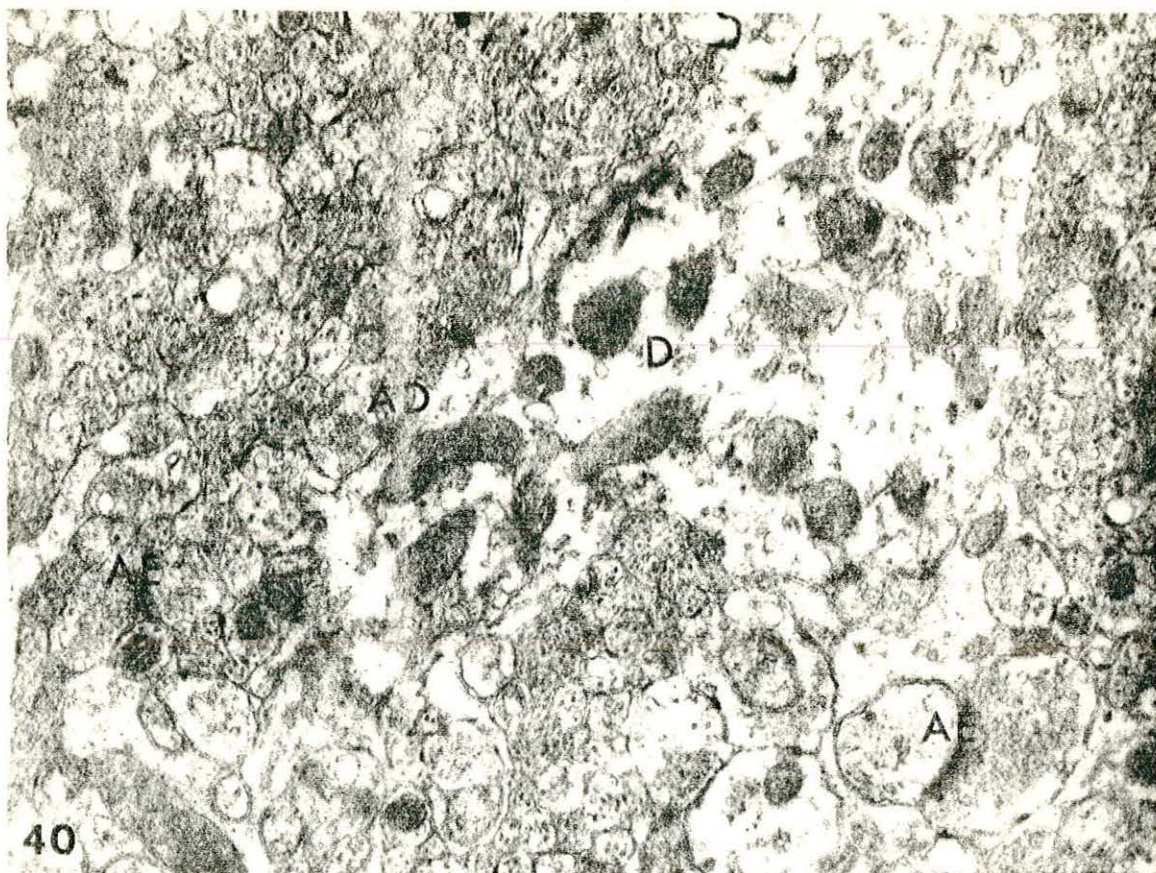


Fig. 38 Célula glial de Bergmann en capa molecular de corteza cerebelosa de rata de 15 días de edad con RCIU cuyas características son normales (GB). Acetato de uranilo y citrato de plomo (9,000 X).



Figs. 39 - 43 Aspecto del neuropilo de la región superficial de capa molecular de corteza cerebelosa de ratas de 20 a 35 días de edad de ambos grupos estudiados. No se encontraron diferencias cualitativas en los elementos del neuropilo de los animales con RCIU al compararlos con los correspondientes al grupo testigo. D = prolongación dendrítica; AD = sinapsis axo-dendrítica; AE = sinápsis axo-espinodendrítica. Fig. 39: rata de 20 días del grupo testigo (9,000 X); Fig. 40: rata de 25 días del grupo testigo (13,500 X); Fig. 41: rata de 25 días con RCIU (13,500 X); Fig. 42: rata de 30 días con RCIU (13,500 X); Fig. 43: rata de 35 días con RCIU (33,500 X). Acetato de uranilo y citrato de plomo.



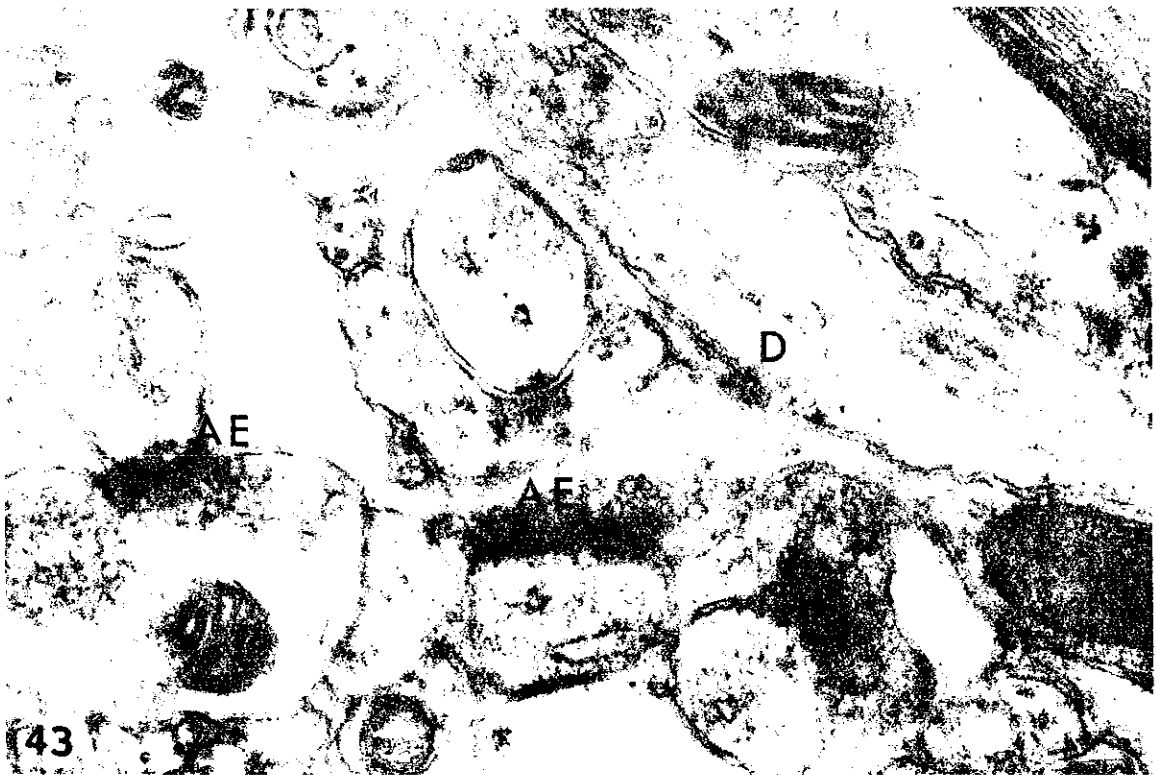
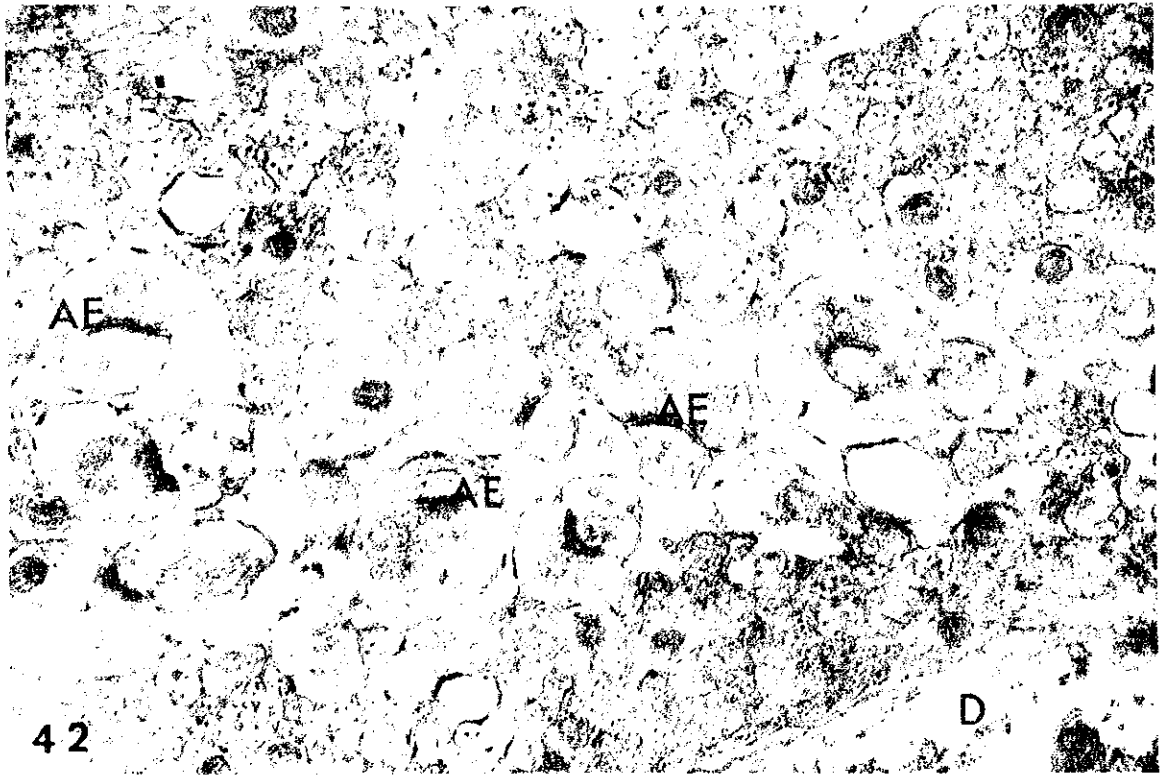


Fig. 44 Parte del soma de una célula de Purkinje en cerebelo de rata de 30 días con RCIU. No se aprecian alteraciones en los elementos subcelulares. N = núcleo; REG = retículo endoplásmico granular en su característica disposición de adosamiento de cisternas; m = mitocondrias; P = polirribosomas; G = cisternas moderadamente distendidas del aparato de Golgi; flechas = cisternas submembranales de retículo endoplásmico liso; asterisco = acantosoma. Acetato de uranilo y citrato de plomo (20,000 X).

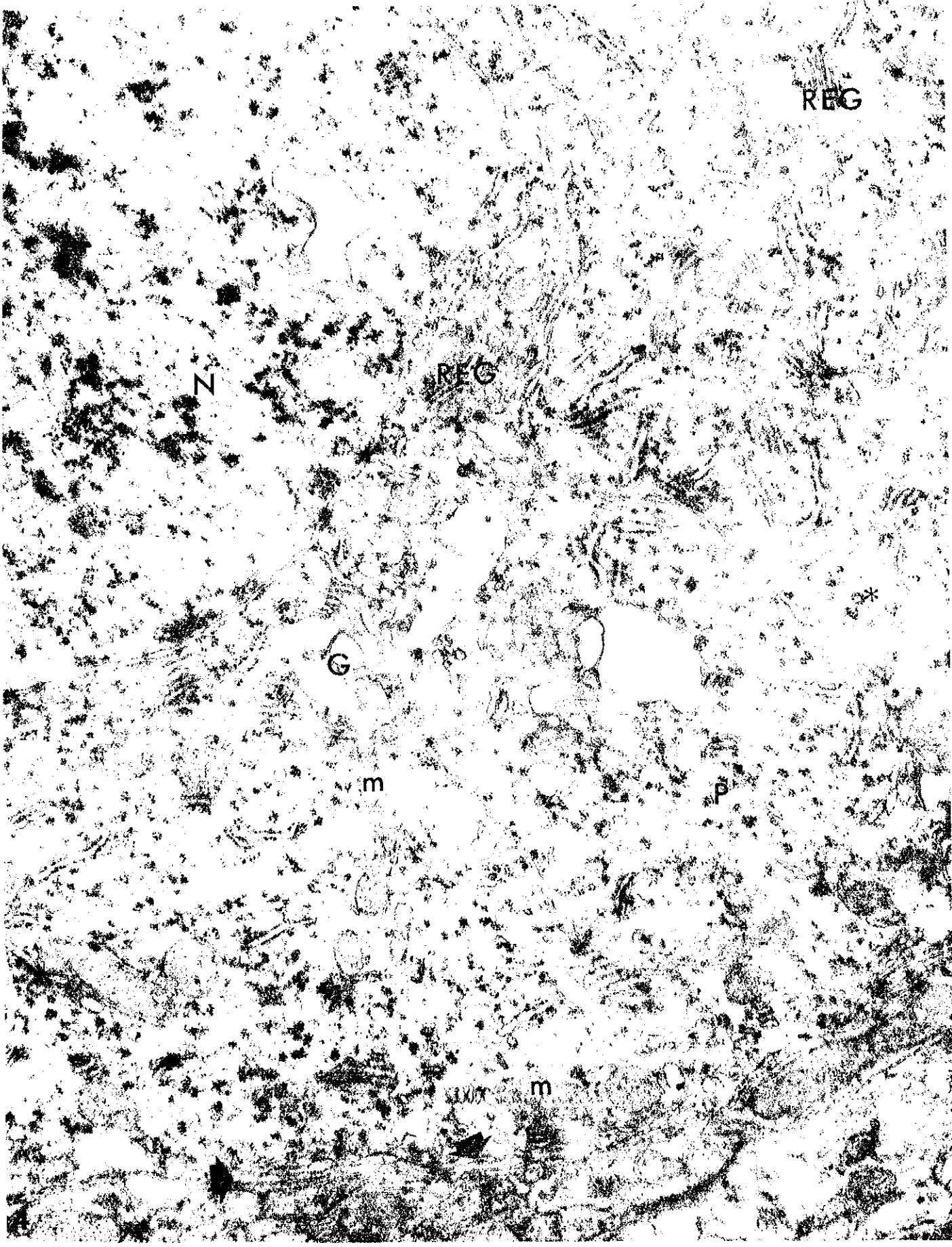
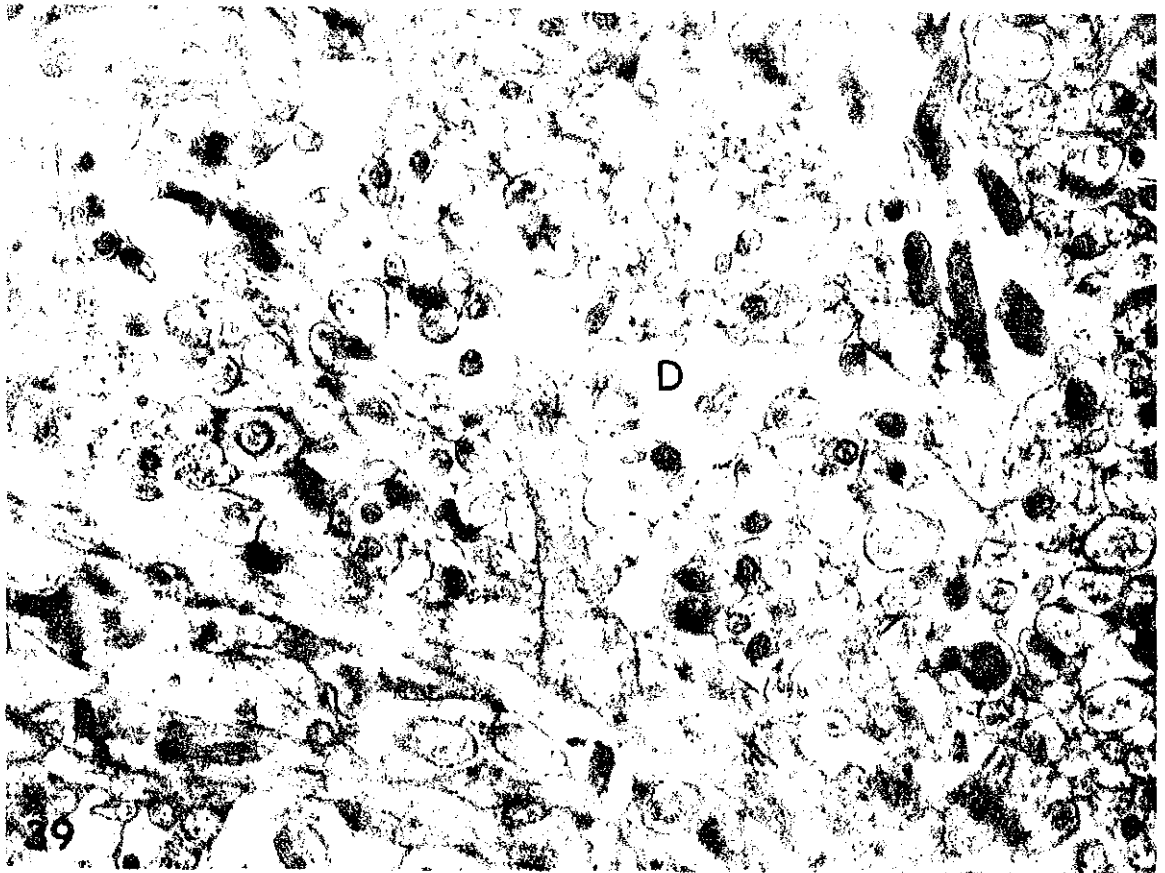


Fig. 45 Células granulares de corteza cerebelosa de rata de 35 días con RCIU cuyas características ultraestructurales son normales. N = núcleos; m = mitocondrias; G = aparato de Golgi; AS = sinápsis axo-somática; P = polirribosomas; M = fibras mielínicas; NP = neuropilo. Acetato de uranilo y citrato de plomo (7,000 X).

Fig. 46 Célula de oligodendroglia en capa molecular de corteza cerebelosa de rata de 35 días con RCIU que no presenta alteraciones ultraestructurales. Esta célula se encuentra en interacción directa con numerosas fibras amielínicas (a). N = núcleo; D = prolongación dendrítica de célula de Purkinje; R = adosamiento de cisternas submembranales de retículo endoplasmico liso. Acetato de uranilo y citrato de plomo (5,000 X).





INTRODUCCION

El retardo en el crecimiento en vida intrauterina en un período gestacional normal puede ser debido a varios factores. Estos se han agrupado en dos grandes categorías: Los factores inherentes al producto, denominados factores intrínsecos y los factores externos al producto, clasificados como factores extrínsecos (92). Los factores intrínsecos se refieren a malformaciones congénitas, errores congénitos del metabolismo y otros trastornos hereditarios (10). Al tomar en consideración los factores extrínsecos, Winick ha postulado la existencia de dos tipos de retardo en el crecimiento, el tipo 1, cuando éste es condicionado por una disminución en el aporte sanguíneo placentario a los productos; y el tipo 2, cuando es condicionado por una restricción alimenticia materna durante la gestación. Podemos considerar un tercer grupo de retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU), el cual está condicionado por factores hormonales o farmacológicos, como son los casos en que existe interferencia con la función tiroidea de los productos (16,54), las alteraciones resultantes en los fetos, consecutiva a la administración de prednisona a las madres durante la gestación (73, 74) o la inducción de retardo en el cre-

cimiento intrauterino severo de los productos al exponer a las ratas a condiciones de hipoxia (9.5% de concentración de oxígeno ambiental) del día 10 al día 22 de gestación (87). En todas estas condiciones, los productos nacen a término, pero muestran un peso menor al correspondiente a su edad gestacional.

Se ha demostrado que aproximadamente en el 3% de los embarazos en el humano, existe un retardo en el crecimiento en vida intrauterina, por lo que los productos nacen a término con un peso menor al correspondiente a su edad gestacional. Por otro lado, al considerar como un conjunto los niños con bajo peso al nacer y que han completado el tiempo normal de gestación, cerca de la tercera parte de esos casos se debe a un retardo en el crecimiento fetal condicionado por deficiencias nutricionales maternas o por trastornos vasculares placentarios (92). No obstante que en el tipo 1, los trastornos en el desarrollo son asimétricos, pues el cerebro es de los órganos menos afectados (92), en ambos tipos de RCIU existen serias alteraciones de las funciones neurológicas, principalmente relacionadas con el aprendizaje y la memoria (6, 57). Esto se ha corroborado tanto en estudios retrospectivos (9, 34, 38), como en estudios prospectivos (17-19, 51), principalmente en relación con la desnutri-

ción materna.

En base a que ambos tipos de trastornos debidos a retardo en el crecimiento fetal condicionado por factores extrínsecos se observan en el humano, diferentes investigadores se han preocupado por reproducir ambos tipos de RCIU en modelos experimentales con el empleo de animales de laboratorio.

Existen numerosos trabajos relacionados con el RCIU condicionado por restricción alimenticia a la madre durante la gestación (Tipo 2) en los que se han tomado en consideración parámetros generales del desarrollo de los productos (13,14,24,30,64,72), cambios morfológicos de elementos del sistema nervioso central (SNC) (15,32,33, 43,44,66,78,79), alteraciones bioquímicas generales en SNC (42,61-63,68,71,75,82,93), alteraciones bioquímicas particulares de sistemas de algunos neurotransmisores en el SNC (4,28,46,80), y cambios en el comportamiento de los productos en diferentes etapas del desarrollo postnatal (23,29,31,41,47,70).

Los trabajos publicados en que se investigan los efectos del RCIU con el empleo de modelos experimentales que condicionan una disminución del flujo sanguíneo placentario, son escasos y fundamentalmente comunican cam-

bios en parámetros bioquímicos (5,7,12,20,21,45,56,76,88). La mayoría de estos trabajos se refieren a las alteraciones de los productos recién nacidos que han sido obtenidos por cesárea al término de la gestación y en que el RCIU se produjo por ligadura de una arteria uterina en la etapa inicial del tercer tercio de la gestación (90). Este modelo de RCIU fue originalmente diseñado por Wigglesworth, en ratas albinas y se encontró que existía una disminución muy marcada en el peso corporal de aquellos animales correspondientes al cuerno del lado ligado en relación a los que se encontraban en el cuerno contralateral y que además servían como testigo (90). En algunas ocasiones se notó que la reducción en el peso corporal de los fetos provenientes del cuerno del lado ligado mostraban una disminución de la mitad del peso que tenían los animales testigo. También en este modelo se pudo observar que a partir del sitio de la ligadura hacia arriba, los pesos eran gradualmente mayores. Esto es, muy cerca de la ligadura los pesos de los animales eran menores e iban en aumento a medida que la posición de la implantación estaba más alejada del sitio de ligadura. En este modelo se contaba además con otro grupo de ratas, que se sometieron a una manipulación para simular los efectos que la ligadura pudiera ocasionar en los productos y se

registraron pesos muy similares a los encontrados en los cuernos contralaterales de los animales experimentales. Con ésto se determinó que los efectos en la disminución de peso de productos con ligadura eran debidos a la carencia de aporte o flujo sanguíneo a los mismos (90).

Son escasas las comunicaciones en que se estudia la evolución de las alteraciones en el período postnatal al emplear el modelo de RCIU por disminución del flujo sanguíneo placentario (1,12,21,27,85,86). Así, Tordet-Caridroit y colaboradores (12,86) han comunicado los cambios en el peso de algunos órganos en ratas con RCIU en correlación con el desarrollo de algunas enzimas hepáticas involucradas en la gluconeogénesis, tales como la glucosa 6-fosfatasa, fructosa 1-6, difosfatasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y deshidrogenasa láctica. Levitsky y colaboradores han referido también cambios en determinaciones de elementos relacionados con el metabolismo de los carbohidratos en condiciones de RCIU por ligadura de ambas arterias uterinas (56). Por otro lado, Dahlquist y Persson han estudiado el desarrollo postnatal de la actividad de la D- β -hidroxibutirato deshidrogenasa en el cerebro de ratas con RCIU (21), y Chanez y colaboradores han estudiado el efecto que tiene el RCIU condicionado por ligadura de una arteria y vena uterinas

el día 15 de la gestación, sobre el metabolismo de algunas aminas biogénicas en cerebro de rata en el desarrollo postnatal (11).

Es importante la realización de estudios con técnicas morfológicas con el empleo de este modelo de RCIU que permitan establecer correlaciones con los datos bioquímicos y funcionales que han sido obtenidos por otros investigadores.

HIPOTESIS

Si el retardo en el crecimiento fetal produce una disminución en la celularidad del sistema nervioso, conocida, en base a datos bioquímicos; y si el cerebelo es la estructura del sistema nervioso central que más se afecta en condiciones de retardo en el crecimiento fetal; luego entonces existen cambios estructurales en los elementos tisulares del cerebelo condicionados por el retardo en el crecimiento fetal, que puedan demostrarse con el empleo de técnicas morfológicas.

OBJETIVO GENERAL

Conocer los cambios estructurales en los elementos de la corteza cerebelosa de la rata durante el desarrollo postnatal, inducidos por RCIU producido por una reducción en el flujo sanguíneo placentario.

Objetivos particulares:

1. Conocer los cambios generales que el RCIU produce en los productos, cuando ese retardo es determinado por una disminución del flujo vascular placentario.
2. Conocer los cambios en el patrón de desaparición de la capa granular externa de la corteza cerebelosa inducidos por RCIU.
3. Conocer los cambios en la celularidad de la capa granular externa en el desarrollo postnatal en condiciones de RCIU.
4. Conocer los cambios en el índice mitótico postnatal en la capa granular externa de corteza cerebelosa producidos por RCIU.
5. Explorar las alteraciones ultraestructurales en los elementos tisulares de la corteza cerebelosa y en

particular aquellos relacionados con la capa granular externa, producidas por RCIU determinado por una disminución del flujo sanguíneo placentario.

MATERIAL Y METODOS

En el presente estudio se emplearon ratas Sprague-Dawley del sexo femenino de 2.5 a 3 meses de edad con un peso de 200 a 250 g, las cuales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (21°C), humedad ambiental relativa (45 a 55%) y períodos de luz y oscuridad de 12 x 12 hrs. Los animales se alimentaron con dieta comercial Purina para roedores y agua ad libitum.

Mediante toma de frotis vaginales, los cuales se tiñeron con la técnica de Papanicolaou para su estudio microscópico, se determinó el ciclo estral de las ratas, las cuales en la etapa de proestro se aparearon con machos adultos normales por un período de 8 a 10 horas. El primer día de la gestación se consideró cuando al día siguiente al apareamiento se encontraron espermatozoides en el frotis vaginal y se observó tapón mucoide en el introito de la vagina. Así, los animales cuidadosamente marcados se colocaron en cajas individuales y el día 15 de la gestación se dividieron en dos grupos experimentales (grupos I y II, respectivamente).

Grupo I: Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) intraperitoneal, se hizo laparotomía

y se ligaron con seda No. 0000 la arteria uterina izquierda y la primer ramificación en penacho al cuerno uterino izquierdo de acuerdo con la técnica de Wigglesworth (90). Se tuvo la precaución de no manipular en exceso los cuernos uterinos con los fetos dentro. Se suturó la incisión y se dejó progresar el embarazo hasta el día 21 o 22 de la gestación en que por operación cesárea se extrajeron los productos tanto del cuerno ligado como del cuerno contralateral (Fig. 1). El día preciso dependió de la presencia de sangre en el orificio vaginal, que indicaba inicio de trabajo de parto.

En la extracción de cada producto se anotó su posición en el cuerno uterino, se aspiraron las secreciones nasofaríngeas y se corroboró que respirara, para marcarlo y pesarlo. Su placenta correspondiente se lavó en solución salina fisiológica y se pesó para ser estudiada morfológicamente. Aproximadamente el 50% de los productos se sacrificaron recién nacidos (RN), después de conocer su peso corporal, para extraer el encéfalo y registrar el peso del cerebro y del cerebelo. El resto de los productos se fijaron por perfusión intracardiaca para estudio estructural del cerebelo.

Una vez extraídos todos los productos de ambos cuernos uterinos en cada rata, se contaron los sitios de implantación por cuerno para conocer el número de reabsor-

ciones en base a la presencia de cotiledones totales y el número de productos a término.

Grupo II: Bajo anestesia general con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) intraperitoneal, se realizó laparotomía y con seda No. 0000 se ligaron ambas arterias uterinas a nivel de la porción inferior de los cuernos uterinos, así como el primer penacho arterial a ambos cuernos uterinos de acuerdo a una variante al método de Wigglesworth (90). Se cuidó de no manipular en exceso los cuernos uterinos, se suturó la incisión quirúrgica y se dejó progresar el embarazo hasta el día del parto. Este ocurrió el día 21 o 22 de gestación y en ningún caso antes de estas fechas. Solamente se registraron los pesos de los productos y se marcaron cuidadosamente para los estudios de desarrollo postnatal. Las camadas se ajustaron a ocho productos por rata nodriza y los estudios se realizaron en animales RN, y a los 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días de edad. Se registraron los pesos de los animales en cada una de las edades mencionadas y aproximadamente el 50% de los productos en cada edad se sacrificaron por decapitación para extraer el encéfalo por craneotomía y así obtener el peso del cerebro y del cerebelo. El resto de los animales en cada grupo de edad se perfundieron por vía intracardiaca para su estudio estructural.

Grupos testigo: Se emplearon como testigo los:

- a) productos del cuerno contralateral del Grupo I experimental,
- b) productos de ambos cuernos uterinos de ratas a las que se practicó laparotomía en el día 15 de la gestación sin ligar arterias uterinas, y
- c) productos de ambos cuernos uterinos de ratas a las que no se les intervino quirúrgicamente, para ambos grupos experimentales.

ESTUDIO ESTRUCTURAL

La fijación del sistema nervioso central se hizo por perfusión intracardiaca vía ventrículo izquierdo, con incisión en aurícula derecha como vía de salida de las soluciones perfundidas (Figs. 2 y 3). Como solución lavadora se empleó Ringer-Krebs -fosfato-bicarbonato con heparina (1000 u/L) y procaina (1g/L), pH 7,4 con osmolaridad de 300 a 320 mOsmol/Kg durante 2 minutos y como solución fijadora se utilizó glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M pH 7.4, con una osmolaridad de la solución final de 400 a 420 mOsmol/Kg durante 10 minutos. Ambas soluciones se perfundieron a

temperatura ambiente y a una presión de 120-130 cm de agua de acuerdo a la técnica de Feria-Velasco y Karnovsky (26), (Fig. 3).

Para el presente estudio, tanto en los productos del Grupo experimental I como del Grupo experimental II, así como en sus respectivos animales testigo, inmediatamente después de la perfusión de la solución fijadora se hizo craneotomía y se extrajo el cerebelo para obtener una delgada rebanada de vermis cerebeloso y continuar la fijación mediante inmersión en la misma solución de glutaraldehído empleada en la perfusión, durante 60 minutos a temperatura ambiente. En microscopio estereoscópico se identificaron los lóbulos cerebelosos de acuerdo a la clasificación propuesta por Larsell (52) y se concentró la atención en los lóbulos V-VII en todas las edades estudiadas.

En todos los casos se tuvo cuidado que los cortes de los bloques fueran perpendiculares a la superficie pial con el fin de evitar errores de interpretación en las mediciones a realizar.

Los fragmentos así fijados, se postfijaron en tetróxido de osmio al 1% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 a 4°C durante 1.5 hrs. (67), se la-

varon en el mismo amortiguador de cacodilato de sodio y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. La infiltración se realizó con óxido de propileno y Epon 812 y la inclusión se hizo en Epon 812 con polimerización a 60°C durante 24 hr (58).

En un ultramicrotomo Reichert OmU-3 se obtuvieron cortes de 0.5 μm de espesor (cortes semifinos), los cuales se recogieron en portaobjetos de vidrio, se tiñeron con azul de toluidina, se montaron con resina sintética y se cubrieron con cubreobjetos para ser examinados en un microscopio de luz transmitida con sistema de microfotografía Zeiss FOMI-3.

Con objetivo de inmersión en aceite (objetivo 100 X) y en áreas de 3,600 μm^2 cada una y en cada grupo estudiado, se contaron las células de la capa granular externa de corteza cerebelosa y el número de mitosis por área en el material correspondiente a los días 1, 5, 10 y 15 de vida postnatal. Se tomaron microfotografías de áreas correspondientes con el objetivo de "seco fuerte" (objetivo 40 X), las cuales se amplificaron fotográficamente con el mismo factor de amplificación en todas las impresiones y se realizó la cuenta de celularidad y número de mitosis por área con el empleo de un contador granulomé-

trico automático Zeiss TGZ-3 y se hizo la comparación de los datos con las cifras obtenidas en las cuentas directas sobre las preparaciones.

En las microfotografías impresas en papel se midió el espesor de la capa granular externa de la corteza cerebral en todos los grupos experimentales estudiados y las cifras se compararon con las obtenidas de los grupos testigo correspondientes.

Para el estudio ultraestructural, los cortes finos se obtuvieron en un ultramicrotomo Reichert OmU-3, los cuales fueron de color dorado a plateado en el espectro de reflexión de la luz incidente (69). Estos se recogieron en rejillas de cobre cubiertas con una delgada película de Formvar y se contrastaron con citrato de plomo (89) y acetato de uranilo (81). La observación de los cortes se hizo en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM-10 equipado con un diafragma de lente objetivo de 30 μm de diámetro y con un voltaje de aceleración de los electrones de 60 Kv. Los negativos obtenidos se amplificaron fotográficamente para su estudio.

RESULTADOS

LIGADURA UNILATERAL

Cuando se realizó ligadura de la arteria uterina izquierda, el peso corporal de los productos se encontró significativamente disminuído al compararlo con el de los animales de los grupos testigo (Tabla I). Así, se encontró disminuído en un 22 a 26% (24.38% en promedio), mientras que no se encontraron diferencias significativas en el peso de la placenta en los animales con ligadura al compararlos con los de los grupos testigo (Tabla I). Aproximadamente el 50% de los animales recién nacidos se sacrificaron por decapitación para obtener el contenido intracraneano y pesar por separado el cerebro y el cerebelo con exclusión del tallo cerebral. Como se puede observar en la misma Tabla I, el peso del cerebro se encontró disminuído en un 9.46%, mientras que el cerebelo mostró una disminución de peso de aproximadamente un 27% del encontrado en los animales de los grupos testigo.

Después de la extracción de los productos, se contaron los sitios de implantación en cada cuerno uterino y se observó que en la mayoría de los cuernos uterinos de los animales intactos, de los animales manipulados y los cuernos contralaterales a los ligados en los animales

experimentales se encontró una o ninguna reabsorción, mientras que en la mayoría de los cuernos uterinos del lado ligado en los animales experimentales se encontraron más de dos reabsorciones por cuerno (Tablas II y III). Al agrupar los cuernos uterinos en base al número de reabsorciones por cuerno, se encontró que aproximadamente el 90% de los cuernos presentaron una o ninguna reabsorción, mientras que el 60% de los cuernos correspondientes al lado ligado presentaron de 2 a 5 reabsorciones (Tabla III).

En el estudio estructural del cerebelo en los productos con RCIU de este grupo experimental se observó una ligera disminución en tamaño, que por no ser lo suficientemente apreciable desde el punto de vista macroscópico, no se pudo cuantificar para análisis estadístico. Sin embargo, en el estudio microscópico del cerebelo y en particular de la corteza cerebelosa de los lóbulos estudiados (V-VII) se observó una diferencia significativa en el espesor de la capa granular externa en los grupos estudiados. Así, en el grupo experimental, la capa granular externa midió $100 \pm 9.2 \mu\text{m}$ en promedio mientras que en los animales de los grupos testigo midió $130 \pm 10 \mu\text{m}$ en promedio. Los hallazgos ultraestructurales en los elementos de la capa granular externa en este grupo de animales

fueron semejantes a los encontrados en los recién nacidos de los grupos en que se realizó ligadura de ambas arterias uterinas para producir el RCIU, por lo que se describirán en la parte correspondiente a ligadura bilateral.

LIGADURA BILATERAL

El peso de los productos al nacer, correspondientes al grupo experimental fue en promedio semejante al registrado en los productos obtenidos por cesárea del grupo en que solamente se practicó ligadura de una arteria uterina (4.83 ± 0.602 g), en tanto que en los grupos testigo, el peso fue ligeramente mayor (6.151 ± 0.582 g) al registrado en los animales de los grupos testigo en los experimentos con ligadura unilateral. En la figura 4 aparece graficado el incremento de peso de los grupos experimentales y testigo y se aprecia una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre ambos grupos en cada una de las edades estudiadas. En promedio se observó una reducción del 22,75% en el peso corporal, con una disminución más marcada en las primeras etapas postnatales (1,5 y 10 días de edad) y una reducción de la diferencia de los 15 a los 35 días de edad (Tabla IV).

Debido a que en los experimentos de ligadura de una

arteria uterina no se encontraron diferencias significativas en los parámetros estudiados entre los productos de ratas intactas y ratas a las que se hizo laparotomía el día 15 de la gestación con manipulación de los vasos uterinos sin ligarlos, en los experimentos de ligadura de ambas arterias uterinas se emplearon como testigo solamente animales provenientes de ratas intactas.

Con el propósito de evaluar la validez del modelo de ligadura bilateral para producir RCIU y con fines comparativos con los datos comunicados en la literatura y con los obtenidos en otros laboratorios de nuestro mismo grupo de trabajo (1), en algunos animales del grupo experimental y de los grupos testigo en las diferentes edades, se extrajo el cerebro y el cerebelo por craneotomía post-decapitación y se pesaron. Los datos aparecen graficados en las figuras 5 y 6, respectivamente y como se puede ver en la Tabla IV, la reducción más marcada en el peso del cerebelo al compararla con la reducción de peso del cerebro, se observó en los primeros días postnatales (1,5 y 10), en tanto que en edades subsecuentes la diferencia entre ambas estructuras se fue reduciendo de manera que en los días 30 y 35 de edad se observó una reducción de cerca del 10% en el peso del cerebro y del cerebelo en relación con sus respectivos testigo.

El exámen macroscópico del cerebelo en los diferentes grupos estudiados, una vez fijado por perfusión intravascular, no mostró datos importantes cuantificables y solamente se pudo apreciar una diferencia en volumen en las primeras etapas postnatales estudiadas correspondientes a lo mencionado en el párrafo anterior.

Al estudiar microscópicamente la corteza cerebelosa se observó que no había diferencias en el espesor de la capa granular externa en los grupos de animales estudiados (experimentales y testigo) en las diferentes edades, entre los lóbulos V, VI y VII de Larsell (52), por lo que en lo sucesivo solamente se va a hacer referencia a la capa granular externa sin especificación de lóbulo, tanto en los hallazgos con microscopio óptico como con microscopio electrónico.

En los animales recién nacidos se observó una diferencia significativa en el espesor de la capa granular externa con una disminución de cerca del 23% en el grupo experimental al comparar los datos con los del grupo testigo (Tabla V y Figs. 8 y 9). En edades subsecuentes, se observó una disminución progresiva del espesor de la capa granular externa en ambos grupos de animales estudiados (Tabla V). Sin embargo, al graficar los datos se obser-

varon diferencias en el nivel de la pendiente (Fig. 7) con desaparición de la capa granular externa para el día 20 de edad postnatal en los animales testigo, mientras que la desaparición de la capa granular externa se observó hacia el día 30 en la mayoría de los animales del grupo experimental (Tabla V). Las figuras 8 a 13 ilustran el retardo en la disminución de espesor de la capa granular externa en los animales con RCIU (Figs. 9, 11 y 13) al compararlos con lo observado en los animales del grupo testigo (Figs. 8, 10 y 12).

En la Tabla VI se refieren los datos de celularidad y número de mitosis en la capa granular externa de corteza cerebelosa en ambos grupos estudiados y a las edades en que el espesor de la capa permitió hacer una adecuada cuantificación de dichos parámetros. No obstante que se observó una ligera disminución en la celularidad en el grupo experimental a los 5 y 10 días de edad y una ligera disminución en el porcentaje de mitosis en la capa granular externa en el grupo experimental en los recién nacidos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros a las edades estudiadas, con excepción del número de mitosis en los animales recién nacidos en que hubo una reducción del 34% ($p < 0.001$) en el grupo experimental al compararlo con el grupo tes-

tigo de la misma edad. Las figuras 14 y 15 ilustran campos microscópicos típicos de la capa granular externa a los 10 días de edad en un animal normal y uno con RCIU, respectivamente.

En la tabla VII se observa la distribución de áreas al tomar como base el número de mitosis por área de capa granular externa de corteza cerebelosa durante el desarrollo postnatal, en condiciones de RCIU, comparadas con lo encontrado en los animales testigo.

Al estudiar las muestras con el microscopio electrónico de transmisión, los cambios más importantes se encontraron en los animales recién nacidos a nivel de los elementos tisulares de la capa granular externa. En estas células, las cuales por sus características estructurales, parecían corresponder a neuroblastos primitivos, se observaron cambios nucleares en los animales con RCIU al compararlos con las muestras correspondientes a los animales testigo. Estos consistieron en lo siguiente:

a) Forma: Cerca de la tercera parte de las células de la capa granular externa en el grupo de RCIU mostraron uno o dos núcleos de contorno irregular, con invaginaciones y redundancias de la envoltura nuclear (Figs. 20, 21 y 28), en tanto que éste fenómeno fue ocasional-

mente visto en las muestras de los grupos testigo (Figs. 16-19).

Conforme fue disminuyendo de espesor la capa granular externa, en etapas subsecuentes del desarrollo postnatal, la proporción de este cambio nuclear fue cada vez menor al estudiar el cerebelo de los grupos de animales con RCIU. En las figuras 22-25 se ilustran dibujos de contorno de la envoltura nuclear tomados directamente de las micrografías electrónicas originales, tanto de animales con RCIU, como de los animales testigo.

La figura 22 corresponde a contornos nucleares de células de capa granular externa de animales recién nacidos del grupo testigo. La mayoría de los núcleos fueron regulares y escasas células mostraron su núcleo con invaginación poco profunda.

Las figuras 23 y 24 muestran el tipo de cambios en la configuración de los núcleos que se observaron en cerca de la tercera parte de las células de la capa granular externa del cerebelo de animales recién nacidos con RCIU. Los núcleos son irregulares, bi o trilobulados y con invaginaciones profundas de la envoltura nuclear. Esto es claramente aparente tanto en el dibujo de la Fig. 25 como en las micrografías electrónicas de las Figs. 20, 21 y 28.

b) Contenido nuclear. Las diferencias más importantes en los elementos intranucleares se apreciaron a nivel de los grumos de heterocromatina. Estos fueron más numerosos y de disposición irregular en los animales con RCIU al compararlos con los animales de los grupos testigo. En el nucleólo o nucleólos (varias células mostraron dos nucleólos, principalmente en los animales recién nacidos de ambos grupos) no se encontraron diferencias estructurales en casos con RCIU cuando se compararon con los testigo.

c) Otras alteraciones. En los animales con RCIU, a pesar de que la mayoría de las células en mitosis no mostraron alteraciones, algunas de ellas fueron anormales como se ilustra en la figura 27 en que un neuroblasto en división celular parece contener una célula con cambios evidentes de degeneración celular. No se puede saber si se trata de una célula degenerada que ha sido fagocitada antes o durante la división celular, o se trata de una célula degenerada que ha sido incluida en una invaginación de la membrana plasmática, ya sea antes de iniciarse la división celular o durante el curso de ésta. En los animales del grupo testigo las células en división no presentaron alteraciones (Fig. 26).

En el citoplasma de las células primitivas de la

capa granular externa del cerebelo de animales recién nacidos del grupo testigo, se identificaron gran cantidad de acúmulos de ribosomas y polirribosomas, escasos elementos de retículo endoplásmico y moderada cantidad de mitocondrias (Figs. 16-19). En varios neuroblastos se identificó un centriolo (Figs. 16, 26 y 27), ocasionalmente dos centriolos con disposición en ángulo recto entre ambos y ocasionalmente se observó un cilio que emergía hacia el espacio intercelular.

Algunas células de la capa granular externa de cerebelo de animales recién nacidos con RCIU mostraron vacuolación citoplásmica (Figs. 21 y 28), aumento de cuerpos electrodensos esféricos (Fig. 28), así como cuerpos residuales y citosegresomas (Fig. 29).

En las etapas iniciales del desarrollo postnatal, hasta el día 5 de edad, se observó un espacio intercelular amplio entre las prolongaciones de las células de la capa granular externa del cerebelo. Esto se identificó tanto en los animales testigo (Fig. 30), como en los animales con RCIU (Fig. 31). Esta amplitud del espacio intercelular disminuyó progresivamente conforme aumentó la edad postnatal (Fig. 32). Algunas fibras nerviosas presentaron una expansión citoplásmica, generalmente de

tipo terminal que contenía formaciones vesiculares que variaban de 0.3 a 0.9 μm de diámetro, tanto en los animales testigo, como en condiciones de RCIU (Fig. 32).

Entre los días 5 y 15 se observaron imágenes correspondientes a los diferentes estadios de la sinaptogénesis y con los métodos de estudio empleados en el presente trabajo no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon las imágenes obtenidas de los animales con RCIU, con las correspondientes a los animales testigo (Figs. 33-37).

Las células de la glía de Bergmann se identificaron por su disposición y estructura características en la capa molecular de la corteza cerebelosa y en ambos grupos de material no se apreciaron alteraciones (Fig. 38).

Los elementos del neuropilo en las muestras correspondientes a los días 10, 15, 20, 25, 30 y 35 días de edad postnatal no presentaron cambios al compararse ambos grupos de animales. El número de contactos sinápticos progresivamente aumentó con la edad, en la capa molecular de la corteza cerebelosa, en donde se identificaron principalmente sinapsis axodendríticas y axoespi-nodendríticas (Figs. 39-43).

En los días 30 y 35 de edad postnatal, se identificaron claramente las características citológicas de los elementos tisulares de la corteza cerebelosa y en el examen realizado no se apreciaron alteraciones cualitativas en dichos elementos correspondientes al grupo de RCIU al compararlos con los testigo (Figs. 44-46).

DISCUSION

Es importante contar con modelos de laboratorio que permitan conocer los mecanismos que condicionan RCIU y así poder determinar sus causas y/o efectos en vida postnatal.

El procedimiento de Wigglesworth para producir RCIU mediante ligadura de una arteria uterina (90) o su variante con ligadura de ambas arterias uterinas, constituye un buen modelo de reducción de flujo sanguíneo a los fetos durante el desarrollo intrauterino en la rata. En estas condiciones, el aporte sanguíneo no se suspende totalmente, ya que los vasos anastomóticos provenientes de la arteria ovárica son de un calibre tal que permite el mantenimiento de un flujo adecuado (90).

No obstante que existen variaciones sobre el mismo modelo de RCIU en lo que se refiere al día en que se practica la ligadura de la arteria uterina, todos estos estudios tienen como finalidad poder establecer los cambios morfológicos y bioquímicos que se suceden por dicho retardo (5, 59, 65, 91). No se encontraron diferencias en los parámetros estudiados cuando se ligó una sola arteria uterina y cuando se ligaron ambas arterias uterinas. Esto

se puso de manifiesto al analizar peso corporal, peso de cerebro y de cerebelo de animales RN con RCIU en ambas condiciones experimentales.

Los datos obtenidos en peso corporal, peso de cerebro y peso de cerebelo en el presente trabajo, guardan cierto paralelismo con los datos comunicados por otros autores al emplear el mismo modelo de RCIU (5, 7, 11, 21, 45, 76, 86).

Como se puede ver en la Tabla IV existe un aumento en el porcentaje de reducción entre los RN y los animales de 5 días con RCIU en los tres pesos registrados, en tanto que este porcentaje de reducción en el peso corporal, de cerebro y de cerebelo, disminuyó progresivamente con la edad sin llegar a alcanzar valores normales en la última etapa estudiada en el presente trabajo (35 días de edad). Existen claras diferencias en el porcentaje de reducción de peso en el cerebelo al compararlo con el peso cerebral en los animales RN, de 5 días y de 10 días de edad. Así, se puede concluir que el cerebelo se encuentra más afectado en este parámetro que el cerebro por efecto del RCIU. En edades subsecuentes no se observan diferencias significativas entre el cerebro y el cerebelo en lo que se refiere al porcentaje de reducción en sus pesos (cerebelo; 10,05%; cerebro; 10,88% al día 35)

(Tabla IV).

Es importante señalar que el índice de reabsorciones de productos, guarda relación con el flujo sanguíneo a los cuernos uterinos. En condiciones normales existen una o ninguna reabsorción de productos por cuerno, en tanto que cuando se liga la arteria uterina, se observan 1, 2 y 3 reabsorciones por cuerno, como se puede observar en las Tablas II y III.

Durante el desarrollo del cerebelo, el cual se lleva a cabo en una etapa más tardía que el cerebro (60), los elementos tisulares primitivos que constituyen la capa granular externa juegan un papel muy importante. Estos elementos primitivos provienen del neuroepitelio primitivo del techo del cuarto ventrículo y de ahí migran sobre la superficie de las folias cerebelosas para constituir así una zona celular continua en vermis y hemisferios cerebelosos (50). Durante el desarrollo postnatal las células de esta capa granular externa proliferan y las más profundas se diferencian y migran hacia el interior de la corteza cerebelosa y dan origen así a las células granulares internas, células estrelladas, células en canasta y algunos tipos de células gliales (2). Esto da por resultado el que se tenga una progresiva reducción en el espesor de la capa granular externa hasta su desa-

parición durante el desarrollo postnatal. La época en que este último fenómeno se observa varía de una especie a otra. En la rata no se observan elementos de esta capa hacia el día 20 o 22 de vida postnatal en condiciones normales y alrededor de estas edades solamente se encuentran muy escasas células de esa capa y de manera aislada a nivel de los lóbulos del vermis (2).

Uno de los efectos más sobresalientes que el RCIU tiene sobre el desarrollo del cerebelo es precisamente un retardo en la desaparición de la capa granular externa, como ha sido demostrado por otros autores con el empleo de otros modelos de RCIU (39, 54, 84) y como se muestra en los resultados obtenidos en el presente trabajo. Asimismo, algunas condiciones que interfieren con la maduración postnatal del cerebelo, como son la restricción de nutrientes en vida postnatal inmediata, producen también un retardo en la desaparición de dicha capa granular externa (25).

En el presente trabajo la significativa disminución en el espesor de la capa granular externa en los animales recién nacidos con RCIU permite hacer pensar que la población inicial de células neurales primitivas se encuentra reducida en esas condiciones. Esto, aunado al re-

tardo en la migración de esos elementos, hace suponer la existencia de deficiencias en el establecimiento de circuitos interneuronales en la corteza cerebelosa en edades posteriores. Es necesario realizar estudios fisiológicos, bioquímicos y conductuales orientados a explorar funciones neurológicas sutiles en las que participen elementos particulares de la corteza cerebelosa para evaluar con precisión la repercusión de los cambios estructurales encontrados en el cerebelo con el modelo de RCIU empleado en el presente trabajo.

Los datos de celularidad e índice de mitosis en la capa granular externa de corteza cerebelosa encontrados en el presente trabajo, aunque ciertamente muestran diferencias entre los animales con RCIU y los testigo, éstas no son estadísticamente significativas, a excepción del índice de mitosis en los recién nacidos ($p < 0.001$). Es también en este grupo de animales donde se observa la disminución más importante en el número de células por área de capa granular externa de corteza cerebelosa en el grupo experimental (Tabla VI) y explica así el que a esa edad el espesor de la capa granular externa sea menor en los animales con RCIU que en los testigo.

Otros autores con el empleo de modelos de RCIU con-

dicionados por trastornos hormonales y metabólicos (hipotiroidismo) han comunicado hallazgos semejantes a los aquí mencionados en lo referente a espesor de capa granular externa al nacimiento, retardo en su desaparición, celularidad e índice de mitosis en dicha capa (53, 54).

Con estos datos y con lo comunicado por Brown y Vanucci (7) en su estudio sobre metabolismo oxidativo cerebral en condiciones de RCIU hace pensar que uno de los posibles mecanismos de alteración en la maduración de los elementos del SNC y en particular del cerebelo, sea al través de una interferencia en el desarrollo y maduración del sistema endócrino en estos modelos de RCIU.

Brown y Vanucci al emplear el modelo de Wigglesworth para producir RCIU encontraron los mismos cambios en peso corporal y peso cerebral comunicados en el presente trabajo y por otros autores (5, 11, 21, 45, 76, 86) y comunicaron una reducción del 25% en los niveles de glucosa sanguínea en el grupo experimental al nacimiento, mientras que los niveles de glucosa, glucógeno, lactato, ATP y fosfocreatina cerebrales no fueron diferentes a los encontrados en el grupo testigo (7). Esto sugiere que ni la hipoxia tisular, ni una disminución en la glucosa cerebral son los principalmente responsables de las alteraciones del desarrollo del sistema nervioso

central observados como consecuencia de la ligadura de los vasos uterinos.

El sugerir que el RCIU determine los cambios comunicados aquí en los elementos tisulares del cerebelo a través de interferencia en el funcionamiento del sistema endócrino y en particular de la glándula tiroides encuentra apoyo en lo comunicado por algunos autores en que al emplear modelos de desnutrición, inducen hipotiroidismo y retardo en la maduración de los productos (48). Estas condiciones son corregidas por la administración de tiroxina exógena, la cual ha mostrado tener efectos importantes sobre la maduración del cerebelo cuando se aplica localmente en el tejido cerebelar en fase embrionaria (35) y en el animal adulto (36). Legrand y colaboradores han demostrado la acción de la hormona tiroidea sobre la proliferación y maduración de los elementos tisulares del cerebelo de la rata en desarrollo (55) y otros autores han referido la participación de la tiroxina sobre la proliferación celular y síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en el cerebelo de ratas jóvenes desnutridas (22,37).

Por otro lado, Hajós y colaboradores han comunicado cambios cualitativos y cuantitativos de la organización

sináptica a nivel ultraestructural inducidos por deficiencia tiroidea en la rata (40) y Lauder ha demostrado claramente los efectos del hipotiroidismo experimental sobre el desarrollo del cerebelo de la rata y en particular sobre la cinética de proliferación celular en la capa granular externa (53) y sobre la migración de las células granulares desde esa capa (54).

Respecto a los hallazgos ultraestructurales comunicados en el presente trabajo, éstos son preliminares y no constituyen el objetivo fundamental del mismo. Sin embargo, las diferencias en el material examinado correspondiente a animales recién nacidos con RCIU y el grupo testigo, son muy claras, principalmente en relación con los elementos celulares de la capa granular externa de corteza cerebelosa. Las irregularidades e invaginaciones de la envoltura nuclear, la irregularidad en la disposición de los grumos de heterocromatina y las anomalías de las células en división, no encontradas en condiciones normales, sugieren de la existencia de cambios importantes en la biología de las células primitivas de la capa granular externa en cerebelo inducidos por el RCIU. Lo mismo se puede decir de las alteraciones citoplásmicas, en particular la vacuolación y aumento de los elementos lisosomales.

No obstante que algunos de estos cambios se pueden observar en condiciones normales, el contar con un grupo testigo con animales de las mismas edades permite establecer comparación y hacer evidentes los cambios inducidos por la variante experimental. Así, se tiene como ejemplo lo bizarro de algunos núcleos de células de capa granular externa, con invaginaciones de la envoltura nuclear, hallazgo que se ha observado en células de Purkinje normales durante etapas muy tempranas del desarrollo postnatal (3) y en neuroblastos de cerebro mantenidos en cultivo de tejidos (77). Es por ésto que si bien es cierto que cada uno de estos cambios en forma individual no son específicos, al tomarlos en conjunto resulta interesante su presencia, principalmente cuando se asocian al fenómeno de persistencia de la capa granular externa por un período mayor al normal. Algunas alteraciones patológicas como quistes poroencefálicos y tumores como el meduloblastoma, se asocian con cierta frecuencia a persistencia de la capa granular externa o capa de Obersteiner (8, 49, 83) y existen evidencias que es en esas células donde se originan ese tipo de tumores (8, 49, 83).

Aquellas condiciones que determinan un retardo en la desaparición de la capa granular externa y principalmente

las que se instalan en etapa prenatal, son de particular importancia pues los cambios inducidos pueden determinar un terreno propicio para el desarrollo de diferentes alteraciones patológicas.

El no haber encontrado diferencias ultraestructurales cualitativas entre los diferentes elementos tisulares estudiados en la corteza cerebelosa a las edades postnatales analizadas en el presente trabajo entre los animales con RCIU y los testigo, no implica que con sistemas cuantitativos de evaluación no se vean cambios en dichos elementos, atribuibles a los efectos del RCIU. Esto requiere de diseños particulares para obtención de los cortes, algunos métodos especiales de tinción y sistemas automatizados de procesamiento de datos.



CONCLUSIONES

La disminución del flujo sanguíneo a los cuernos uterinos en la rata produjo:

1. Aumento significativo de reabsorción de productos por cuerno.
2. Retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU) de los productos puesto en evidencia por la disminución significativa del peso corporal al llegar a término la gestación.
3. Reducción significativa del peso de cerebro y de cerebelo al nacer y durante el primer mes de vida postnatal en condiciones de RCIU.
4. Reducción significativa de la población celular de capa granular externa de corteza cerebelosa en los animales recién nacidos con RCIU.
5. Reducción significativa del índice de mitosis en la capa granular externa de corteza cerebelosa en el período postnatal inmediato en condiciones de RCIU.
6. Alteraciones estructurales en los elementos tis-

lares de la capa granular externa de corteza cerebelosa de los productos con RCIU al nacimiento.

7. Retardo en la migración y reducción en el número de las células en migración de la capa granular externa de corteza cerebelosa a capas más profundas de la misma, en los animales con RCIU.

REFERENCIAS

1. ALMODOVAR, C. y FERIA-VELASCO, A.: Efecto del retardo en el crecimiento intrauterino sobre la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico en cerebelo de rata durante el desarrollo postnatal. Mem.Soc.Mex.Cienc. Fisiol. 24: 18, 1981.
2. ALTMAN, J.: Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. III. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. J. Comp. Neur. 136: 269-294, 1969.
3. ALTMAN, J.: Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. J. Comp. Neurol. 145: 399-464, 1972.
4. BAYOUMI, R.A. y SMITH, W.R.D.: Some effects of dietary vitamin B₆ deficiency on γ -aminobutyric acid metabolism in developing rat brain. J. Neurochem. 19: 1883-1897, 1972.
5. BERNAL, A., MORALES, M., FERIA-VELASCO, A., CHEW, S. y ROSADO, A.: Effect of intrauterine growth retardation on the biochemical maturation of brain synaptosomes in the rat. J. Nutr. 104: 1157-1164, 1974.
6. BIRCH, H.G.: Malnutrition, learning and intelligence. Amer. J. Publ. Health, 62: 773, 1972.

7. BROWN, J.D. y VANUCCI, R.C.: Cerebral Oxidative metabolism during intrauterine growth retardation. *Biol. Neonate* 34:170-173, 1978.
8. BRZUSTOWICZ, R.J. y KERNOHAN, J.W.: Cell rests in the region of the 4th ventricle. *Arch. Neurol. & Psychiat.* 67:592, 1952.
9. CABAK, V. y NAJDANVIC, R.: Effect of undernutrition in early life on physical and mental development. *Arch. Dis. Child.* 40:532-534, 1965.
10. CANTU, J.M., GARCIA CRUZ, D., SANCHEZ CORONA, J., FRAGOSO, R., HERNANDEZ, A. y NAZARA, Z.: The 3-M slender boned nanism. A distinct autosomal recessive intrauterine growth retardation syndrome. *Am. J. Dis. Child.* 135:905-908, 1981.
11. CHANEZ, C., PRIAM, M., FLEXOR, M.-A., HAMON, M., BOURGOIN, S., KORDON Y MINKOWSKI, A.: Long lasting effects of intrauterine growth retardation on 5-HT metabolism in the brain of developing rat. *Brain Research* 207:397-408, 1981.
12. CHANEZ, C., TORDET-CARIDROIT, .C. y ROUX, J. M.: Studies on experimental hypotrophy in the rat. II. Development of some liver enzymes of gluconeogenesis. *Biol. Neonate* 18:58-65, 1971.
13. CHEEK, D.B., HOLT, A.B., LONDON, W.T., ELLENBERG, J. H., HILL, D.E. y SEVER, J.L.: Nutritional studies in the pregnant rhesus monkey.- The effect of protein - calorie or protein deprivation on growth of the fetal

- brain. Amer. J. Clin. Nutrition 29:1149-1157, 1976.
14. CHOW, B.F. y RIDER, A.A.: Implication of the effects of maternal diets in various species. J. Anim. Sci. 36: 167, 1973.
 15. CLARK, G.M., ZAMENHOF, S., MARTHENS, E.U., GRAVEL, L. y KRUGER, L.: The effect of prenatal malnutrition on dimensions of cerebral cortex, Brain Research. 54: 397-402, 1973.
 16. CLOS, J. y LEGRAND, J.: Effects of thyroid deficiency on the different cell populations of the cerebellum in the young rat. Brain Research 63:450-455, 1973.
 17. CRAVIOTO, J., BIRCH, H.G. y DeLICARDIE, E.R.: Influencia de la desnutrición en la capacidad de aprendizaje del niño escolar. Bol. Med. Hosp. Infantil (Méx.) 24: 217, 1967.
 18. CRAVIOTO, J., DeLICARDIE, E.R. y BIRCH, H.G.: Nutrition, growth and neurointegrative development: An experimental ecological study. Pediatrics 38:319, 1966.
 19. CRAVIOTO, J. y ROBLES, B.: Evolution of adaptive and motor behavior during rehabilitation from kwashiorkor. Amer. J. Orthopsychiat. 35:449, 1965.
 20. DAHLQUIST, G.: Cerebral utilization of glucose, ketone bodies and oxygen in starving infant rats and the effect of intrauterine growth retardation. Acta Physiol. Scand. 98:237-247, 1976.

21. DAHLQUIST, G. y PERSSON, B.: Effect of intrauterine growth retardation on the postnatal development of D- β -hydroxybutyrate dehydrogenase activity in the rat brain. *Biol Neonate* 28:353-364, 1976.
22. DAINAT, J. y REBIERE, A.: In vivo action of a single injection of thyroxine on the cerebellar protein synthesis and cellular multiplications, in normal and hypothyroid young rats. Study of the respective effects of the dose and time action of the hormone. *Acta Neurol. Scandinav.* 61:65-77, 1980.
23. DAS, J.P. y PIVATO, E.: Malnutrition and cognitive functioning. *Internat. Rev. Res. Mental Retardation* 8:195-223, 1976.
24. DEL ANGEL, A.R. y FERIA-VELASCO, A.: Efecto de la restricción protéica sobre el crecimiento de ratas adultas y en desarrollo (1a y 2a generación). *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 13:43-49, 1982.
25. DEL ANGEL, A.R., TAPIA ARIZMENDI, G. y FERIA-VELASCO, A.: Effects of food restriction during lactation on postnatal development of rat cerebellar cortex. (Enviado a publicación).
26. FERIA-VELASCO, A. y KARNOVSKY, M.J.: Optima preservación ultraestructural del sistema nervioso central por perfusión intravascular con glutaraldehído. *Arch. Invest. Med. (Méx)* 1:201-220, 1970.
27. FERIA-VELASCO, A. y TAPIA-ARIZMENDI, G.: Structural

changes in cerebellar cortex induced by intrauterine growth retardation in the rat. Ann. Proc. E.M.S.A. 39: 536-537, 1981.

28. FERNSTROM, J.D. y HIRSCH, M.J.: Brain serotonin synthesis: Reduction in corn-malnourished rats. J. Neurochem. 28:877-879, 1977.
29. FORBES, W.B., STERN, W.C., TRACY, C.A., RESNICK, O. y MORGANE, P.J.: Effect of chronic protein malnutrition on experimentally induced seizures in the rat. Exp. Neurol. 62:475-481, 1978.
30. FORBES, W.B., TRACY, C., RESNICK, O. y MORGANE, P.J.: Effects of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in rat. Brain Res. Bull, 2:131-135, 1977.
31. FORBES, W.B., TRACY, C.A., RESNICK, O. y MORGANE, P.J.: Effect of protein malnutrition during development on sleep behavior of rats. Exp. Neurol. 57:440-450, 1977.
32. GAMBETTI, P., AUTILIO-GAMBETTI, L., GONATAS, N.K., SHAFER, B. y STIEBER, A.: Synapses and malnutrition. Morphological and biochemical study of synaptosomal fractions from rat cerebral cortex. Brain Research 47: 477-484, 1972.
33. GAMBETTI, P., AUTILIO-GAMBETTI, L., RIZZUTO, N., SHAFER, B. y PFAFF, L.: Synapses and malnutrition: Quantitative ultrastructural study of rat cerebral

- cortex. *Exp. Neurol.* 43:464-473, 1974.
34. GARROW, J.S. y PIKE, M.C.: The long-term prognosis of severe malnutrition. *Lancet* 1: 1, 1967.
 35. GONA, A.G. y GONA, O.D.: Local action of thyroxine implants on cerebellar maturation in frog tadpoles. *Exp. Neurol.* 57:581-587, 1977.
 36. GONA, A.G.: Thyroid-induced maturation of the cerebellar cortex in the frog. En: *Thyroid hormones and Brain Development*. Ed. Grave, G.D. Raven Press, New York, pp. 107-117, 1977.
 37. GOURDON, J., CLOS, J., COSTE, C., DAINAT, J. y LEGRAND, J.: Comparative effects of hypothyroidism, hyperthyroidism and undernutrition on the protein and nucleic acid contents of the cerebellum in the young rat. *J. of Neurochem.* 21: 861-871, 1973.
 38. GRAHAM, G.G.: The effect of infantile malnutrition on growth. *Fed. Proc.* 26:139-143, 1967.
 39. GRIFFIN, W.S. T., WOODWARD, D.J. y CHANDA, R.: Malnutrition and brain development, cerebellar weight, DNA, RNA, protein and histological correlations. *J. Neurochem.* 28:1269-1279, 1977.
 40. HAJOS, F., PATEL, A.J. y BALAZS, R.: Effect of thyroid deficiency on the synaptic organization of the rat cerebellar cortex. *Brain Res.* 50:387-401, 1973.

41. HALAS, E.S., REYNOLDS, G.M. y SANDSTEAD, H.H.: Intra-uterine nutrition and its effects on aggression. *Physiol. Behav.* 19:653-661, 1977.
42. Hernández, R.J.: Effects of malnutrition and quipazine on rat cerebral cortex ATPase activity during development. *Dev. Neurosci*: 3: 277-282, 1980.
43. HILLMAN, D.E. y CHEN, S.: Vulnerability of cerebellar development in malnutrition. I. Quantitation of layer volume and neuron numbers. *Neuroscience* 6:1249-1262, 1981.
44. HILLMAN, D.E. y CHEN, S.: Vulnerability of cerebellar development in malnutrition. II. Intrinsic determination of total synaptic area on Purkinje cell spines. *Neuroscience* 6:1263-1275, 1981.
45. HOHENAUER, L. y OH, W.: Body composition in experimental intrauterine growth retardation in the rat. *J. Nutrition*, 99:23-26, 1969.
46. IM, H.S., BARNES, R.H., LEVITSKY, D.A. y POND, W.G.: Postnatal malnutrition and regional cholinesterase activities in brain of pigs. *Brain Research.* 63:461-465, 1973.
47. JALOWIEC, J.E., CHISHOLM, J.A., FORBES, W.B., MORGANE, P.J. y RESNICK, O.: Feeding and drinking in rats maintained on a low protein diet. *Brain Res. Bull* 2: 223-229, 1977.

48. JEN, C.K. y WEHMER, F.: Effects of thyroxine on infant development of undernourished rats. *Dev. Psychobiol.* 10:87-95, 1977.
49. KADIN, M.E., RUBINSTEIN, L.J. y NELSON, J.S.: Neonatal cerebellar medulloblastoma originating from the fetal external granular layer. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 29:583-600, 1970.
50. KERSHMAN, J.: The medulloblast and the medulloblastoma: A study of human embryos. *Arch. Neurol. & Psychiat.* 40:937, 1938.
51. KUGELMASS, I.N., POUILL, L.E. y SAMUEL, E.L.: Nutritional improvement of child mentality. *Amer. J. Med. Sci.* 208:631, 1954.
52. LARSELL, O.: The morphogenesis and adult pattern of lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J. Comp. Neurol.* 97:281-356, 1952.
53. LAUDER, J.M.: The effects of early hypo and hyperthyroidism on the development of rat cerebellar cortex. III. Kinetics of cell proliferation in the external granular layer. *Brain Research* 126:31-51, 1977.
54. LAUDER, J.M.: Granule cell migration in developing rat cerebellum. Influence of neonatal hypo and hyperthyroidism. *Develop. Biol.* 70:105-115, 1979.
55. LEGRAND, J., SELME-MATRAT, M., RABIE, A., CLOS, J. y LEGRAND, C.: Thyroid hormone and cell formation in

the developing rat cerebellum. *Biol. Neonate* 29:368-380, 1976.

56. LEVITSKY, L.L., SPECK, S.M. y SHULMAN, R.: Metabolic response of fasting in experimental intrauterine growth retardation. A comparison of two models. *Biol. Neonate* 30:11-16, 1976.
57. LIANG, P.H., HIE, T.T., JAN, O.H. y GLOK, L.T.: Evaluation of mental development in relation to early malnutrition. *Amer. J. Clin. Nutr.* 20:1290-1295, 1967.
58. LUFT, J.H.: Improvements in epoxy resin embedding methods, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414, 1961.
59. MANNIELLO, R.L., ADAMS, A.J. y FARRELL, P.M.: The influence of antenatal corticosteroids on hypoglycemia in newborn rats with intrauterine growth retardation. *Pediatric Research* 11:840-844, 1977.
60. MIALE, I.L. y SIDMAN, R.L.: An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exptl. Neurol.* 4:277-296, 1961.
61. MILLER, M., LEAHY, J.P., McCONVILLE, F., MORGANE, P. J. y RESNICK, O.: Effects of developmental protein malnutrition on tryptophan utilization in brain and peripheral tissues. *Brain Res. Bull.* 2:347-353, 1977.
62. MILLER, M., LEAHY, J.P., McCONVILLE, F., MORGANE, P. J. y RESNICK, O.: Utilization of ^{14}C -Tyrosine in brain and peripheral tissues of developmentally protein

- malnourished rats. *Brain Res. Bull.* 3:681-686, 1978.
63. MORAES e SANTOS, T.: Effect of maternal protein under nutrition on growth and development of rat brain progeny. *Nutr. Rep. Int.* 20:215-223, 1979.
64. MORGANE, P.J., MILLER, M., KEMPER, T., STERN, W., FORBES, W., HALL, R., BRONZINO, J., KISSANE, J., HAWRYLEWICS, E. y RESNICK, O.: The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neurosc. Behav. Rev.* 2:137-230, 1978.
65. NITZAN, M., ORLOFF, S. y SCHULMAN, J.D.: Placental transfer of analogs of glucose and amino acids in experimental intrauterine growth retardation. *Pediat. Res.* 13:100-103, 1979,
66. NORDBORG, C.: The influence of protein-calorie malnutrition on the development of paranodal regions in spinal roots. *Acta neuropath. (Berl.)* 40:253-257, 1977.
67. PALADE, G.E.: A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp. Med.* 95:285-298, 1952.
68. PATEL, A.J., BALAZS, R. y JOHNSON, A.L.: Effect of undernutrition on cell formation in the rat brain. *J. Neurochem.* 20:1151-1165, 1973.
69. PEACHY, L.D.: Thin sections. I. A study of section thickness and physical distortion produced during microtomy. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:233-242, 1958.