

DESARROLLO Y ENVEJECIMIENTO DE UN APRENDIZAJE ESPACIAL. IMPLICACION DE LOS CUERPOS MAMILARES

Jorge L. Arias (*); Azucena Begega;
Luis M. García-Moreno;
Sandra Rubio y Sara Fernández
Facultad de Psicología, Universidad de Oviedo

La línea de investigación que presentamos, se desarrolla en el Laboratorio de Psicobiología de la Universidad de Oviedo. Nuestro modelo de investigación es la rata blanca (*Rattus norvegicus*, cepa wistar) estudiando de ella un aprendizaje espacial a lo largo del desarrollo postnatal, estado adulto y durante el envejecimiento. Para sus estudio empleamos diferentes técnicas que van desde la microscopía óptica convencional, histoquímicas, microscopía electrónica, citoquímicas e inmunocitoquímicas, si bien, de todas estas técnicas solo vamos a presentar algunas de ellas por estar más avanzadas sus investigaciones. Esperamos que esto nos permita apreciar los avances que la actual metodología nos presenta, permitiendo un mejor acercamiento a la interpretación de posibles funciones, amén de abrirnos los ojos a nuevas ideas o planteamientos de futuras investigaciones que pueden ponerse en marcha.

Nuestro laboratorio se sustenta con Ayudas de Investigación que sufraga el Estado desde las distintas administraciones y mantiene a un grupo de investigadores con diferentes licenciaturas (psicólogos y biólogos) cuyo trabajo fructifica en tesis doctorales y tesinas o trabajos de investigación.

Nuestra infraestructura es muy escasa aunque suficiente para los actuales fines propuestos, estando compuesta por un:

- Laboratorio de Psicobiología
- Microscopio electrónico (JEOL)
- Analizador de imágenes (INCO 10)

En la actualidad mantenemos una serie de colaboraciones con diferentes Laboratorios tanto de Fisiología como de Farmacología y Cirugía.

CUERPOS MAMILARES

Estructura

Los Cuerpos Mamilares se encuentran en la parte basal del diencéfalo, ocupando el tercio caudal del hipotálamo; esta estructura ya ha sido descrita por los anatomistas de finales del siglo pasado, por estar perfectamente delimitada por un conjunto de fibras que la rodean en secciones frontales que permitió definirla al Profesor Cajal como Tubérculos mamilares.

Cajal los describió dividiéndolos en un núcleo central o mamilar medial y dos núcleos laterales situados a ambos lados del antes mencionado con forma de media luna o de uso; esta terminología llega a mantenerse hasta mediados del presente siglo.

Actualmente se mantiene la nomenclatura dada en el trabajo de Allen y Hopkins (1988) donde ya se consideran 8 núcleos pertenecientes al ahora denominado Complejo mamilar compuesto por:

- 1 Núcleo Mamilar Medial
- 2 Núcleos Mamilares Laterales
- 2 Núcleos Premamilares Ventrales
- 2 Núcleos Premamilares Dorsales
- 1 Núcleo Supramamilar

Introduciéndose para mayor complejidad del sistema unas subdivisiones dentro del núcleo mamilar medial (NMM):

- Pars medialis
- Pars lateralis
- Pars medianus
- Pars posterior

Pero al contrario de lo que nos pueda parecer esto ha facilitado su estudio.

Igualmente se ha demostrado que estas subdivisiones están relacionadas con las diferentes conexiones que se establecen entre estos núcleos y otros de las distintas zonas del encéfalo las cuales ya han sido ratificadas por otros autores mediante técnicas de marcaje selectivo y lesiones electrofólicas o con neurotóxicos, pudiendo afirmarse que este Complejo Mamilar recibe AFERENCIAS desde la formación hipocampal (Guillery, 1956; Swason y Cowan, 1977), la corteza prefrontal (Wouterlood y cols., 1987), y del tegmento mesencefálico (Shibata 1987).

Proyectando sus EFERENCIAS hacia el tálamo anterior (Seki y Zyo, 1984) y al mesencéfalo (Liu y cols, 1984), partiendo de la mayoría de sus neuronas proyecciones colaterales a ambas estructuras (tálamo y mesencéfalo) (Takeuchi y cols, 1985);

Funciones

En base a los estudios anteriormente citados, a los Cuerpos Mamilares se les ha implicado en una gran variedad de funciones cuya base neural ha sido pobremente entendida; estas funciones incluyen la memoria y el aprendizaje (Rosensstock y cols, 1977; Aggleton y Mishkin, 1985; Saravis y cols, 1990), comportamiento sexual (Lisk, 1966), comportamiento defensivo (Kriekhaus, 1967), regulación de la actividad autónoma (Faiers y cols, 1976), diabetes (Morales y Puerto, 1990).

Desarrollo embrionario

Es de destacar en el desarrollo embrionario del Complejo Mamilar su rápida organización y su generación secuencial, a diferencia de otras estructuras hipotálamicas vecinas (Altman y Bayer, 1978), formándose todos los núcleos de este complejo entre los días 13 y 18 del desarrollo embrionario.

Comportamiento

Nuestro primer acercamiento al estudio de estas estructuras partió de su implicación en un comportamiento espacial, empleando para ello el laberinto en T de agua, donde enseñamos a los animales a memorizar el lugar en donde se encontraba la plataforma de escape. Esto nos permitió, anotando los errores cometidos a lo largo de las distintas pruebas ejecutadas y en las diferentes edades estudiadas, observar cómo los animales cometían al principio de su desarrollo postnatal muchos errores que iban decreciendo hasta la edad de 42 días y a partir de aquí incrementaban, curiosamente, sus errores o por lo menos los mantenían (ver figura 1).

El estudio de este aprendizaje espacial con sus resultados sería suficiente, pero desde el punto de vista de la Psicobiología había que correlacionar el comportamiento con la estructura; siendo dos los caminos por nosotros seguidos, por un lado lesionar alguno de estos núcleos (ver figura 2) y por otro acercarnos al estudio celular de esa estructura.

Obviando los estudios de lesiones que hemos realizado y que nos permitieron centrar nuestro estudio en el núcleo mamilar medial (NMM), pasaremos a comentar nuestro resultados en el estudio celular de esta estructura o NMM.

Número celular

El NMM, ya descrito, está compuesto, como todo el sistema nervioso central, de células neuronales y gliales, pero la cuestión que todos los laboratorios se plantean es cómo realizar esta cuantificación, ya que métodos hay muchos.

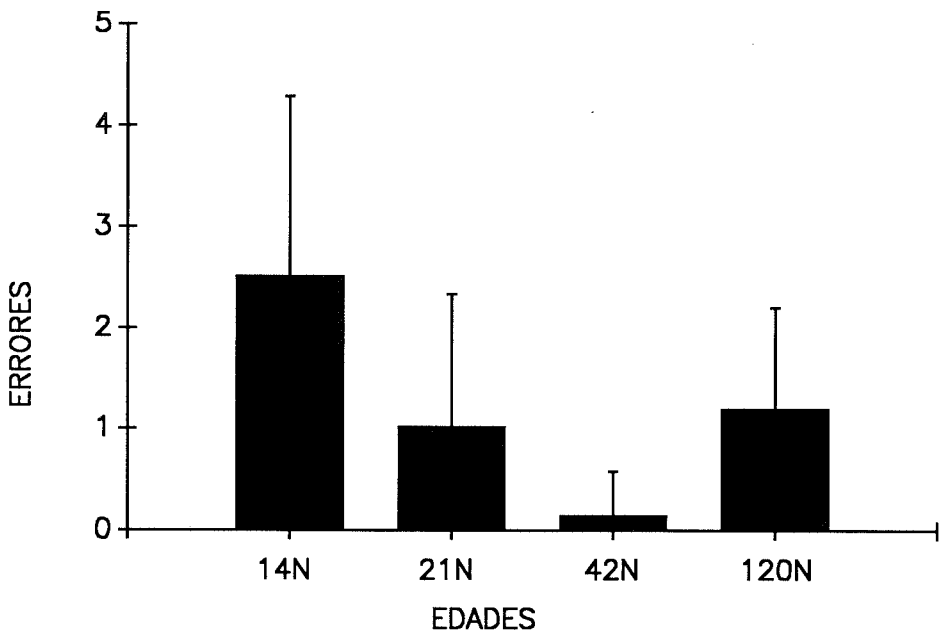


Figura 1. Promedio de errores cometidos en el laberinto según las diferentes edades. Obsérvese el gradual decremento hasta 42N y el posterior incremento en la edad adulta (120N).

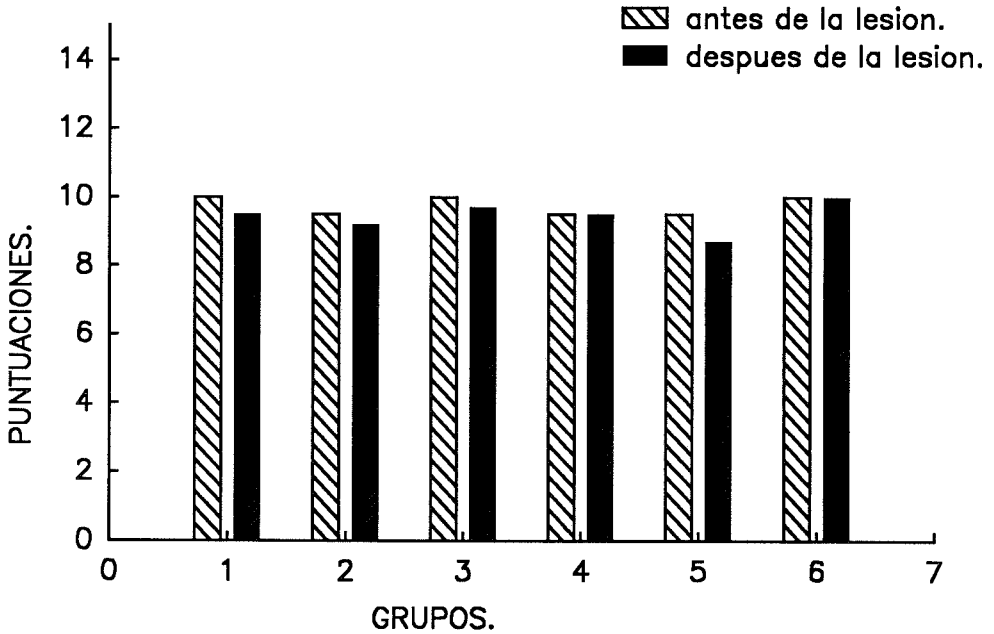


Figura 2. Número de errores antes y después de una lesión en los núcleos Mamilares Laterales.

Los métodos más frecuentemente utilizados hasta el momento (Floderus, Abercrombie, etc) (Haug, 1986) se basan en escoger secciones al azar y contar en ellas el número de neuronas presentes (ver figura 3).

Recientemente, otras técnicas basadas en los métodos estereológicos, con menos sesgo o, por decirlo de otra forma, más imparciales, permiten cuantificar el número de neuronas en el volumen total del núcleo, sin necesidad de introducir factores correctores como en los métodos anteriormente mencionados.

El fundamento de la estereología se basa en realizar un muestreo al azar pero sistemático (para más detalles ver Cruz Orive, 1987; Braendgaard, 1986) (ver figura 4)

Siguiendo este método se puede observar que el número de neuronas difiere según la metodología usada. Se refleja una disminución de células en el destete de los animales hasta el estado adulto, lo que permite correlacionar estas diferencias con el aprendizaje espacial antes mencionado. Se puede así establecer una relación muy interesante entre el número neuronal y el aprendizaje espacial estudiado.

Pero no todas las células nerviosas se comportan de la misma manera, tal es el caso de las células gliales, ya que ellas tardan más en alcanzar esa estabilidad.

Actividad celular

Resultado de las investigaciones anteriormente expuestas, nos interesó saber si esas neuronas que se encuentran en ese núcleo mamilar medial son realmente activas o por el contrario no reflejan incremento de actividad, es decir, tenemos menos neuronas pero su actividad no se ha incrementado por lo que no es uno de los núcleos importantes en este tipo de aprendizajes.

Para afrontar este tipo de estudios, nos hemos centrado en el estudio de uno de los orgánulos más representativos de la célula en cuanto a actividad sintética, el nucleolo y más concretamente el ADN_r como promotor del ARN_r y de los ribosomas.

Las técnicas para ello utilizadas son las de nitrato de plata, descritas por Goesens, 1984 y mejoradas por Krek y cols (1991), como marcados de las regiones de los organizadores nucleolares (NOR); posteriormente fueron estudiadas mediante anticuerpos específicos pudiendo hoy en día saber que lo que realmente estamos marcando con estas técnicas son las proteínas transcripcionales intervinientes, entre las que destaca la C23.

Nuestro estudio se centró en el análisis del número de nucleolos por célula (ver figura 5) y las superficies abarcadas por estos NOR (ver figura 6) en su relación con el área ocupada dentro de su núcleo celular, observando que se produce un incremento del tamaño del nucleolo acompañado de una disminución del número de nucleolos por célula neuronal a medida que avanzamos a lo largo del desarrollo postnatal y durante el envejecimiento, con claras fluctuaciones dignas de

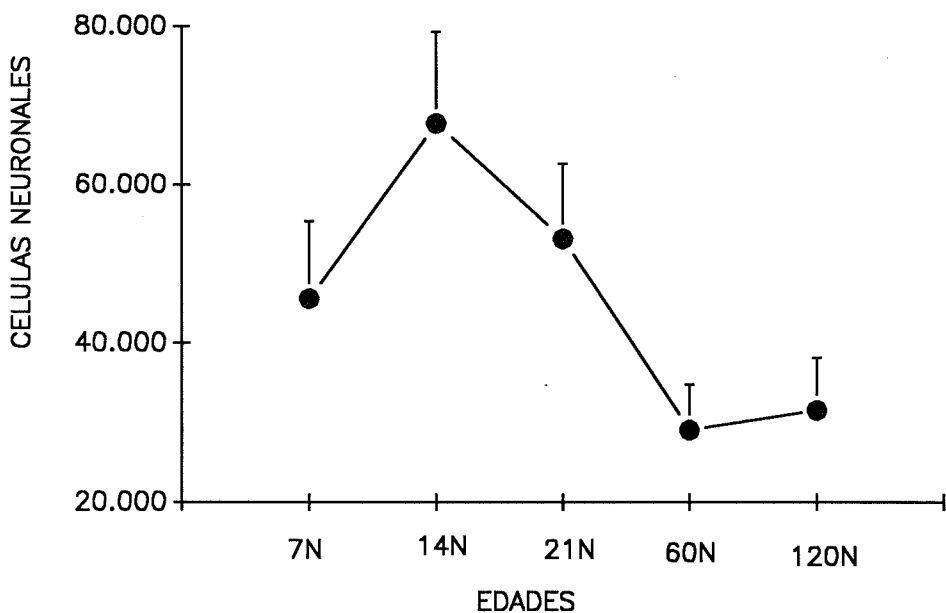


Figura 3. Cuantificación del número neuronal en el NMM por el método de Abercrombie.

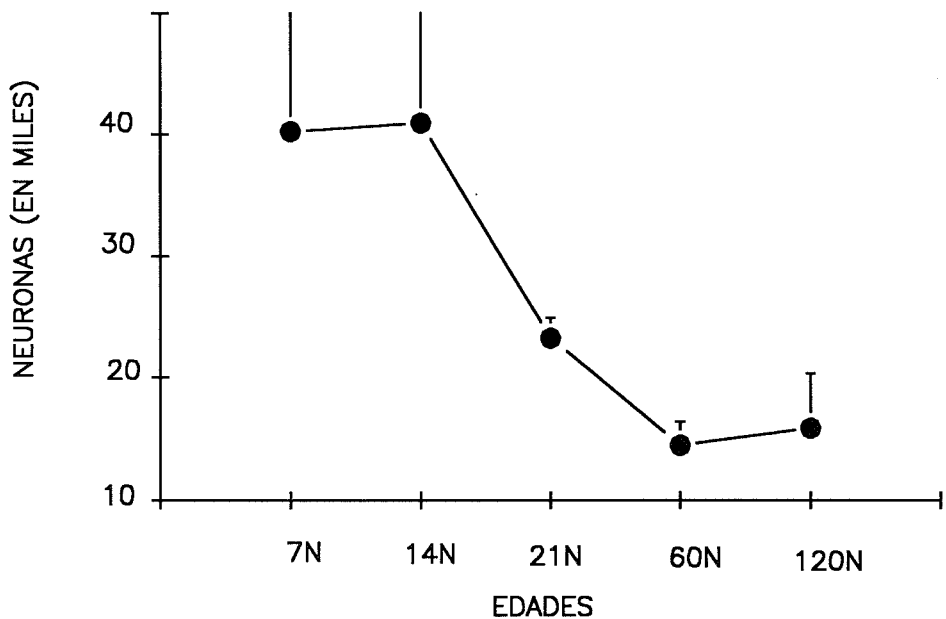


Figura 4. Cuantificación del número neuronal en el NMM empleando el disector óptico (método estereológico). Compárese con la figura 3 para apreciar la marcada sobreestimación que se produce con el método de Abercrombie.

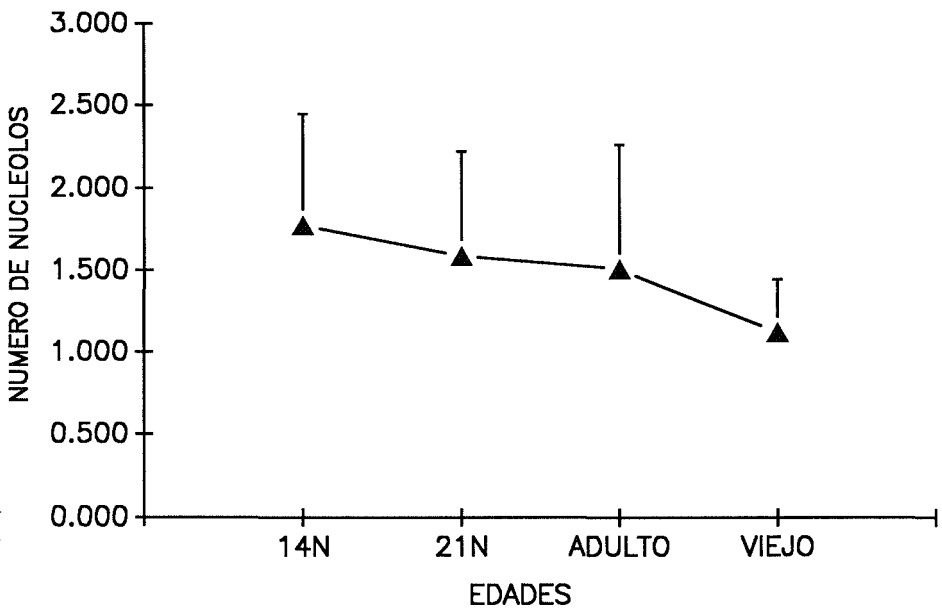


Figura 5. Promedio de nucleolos por núcleo en las neuronas del NMM. Se observa una progresiva disminución conforme avanzan en edad.

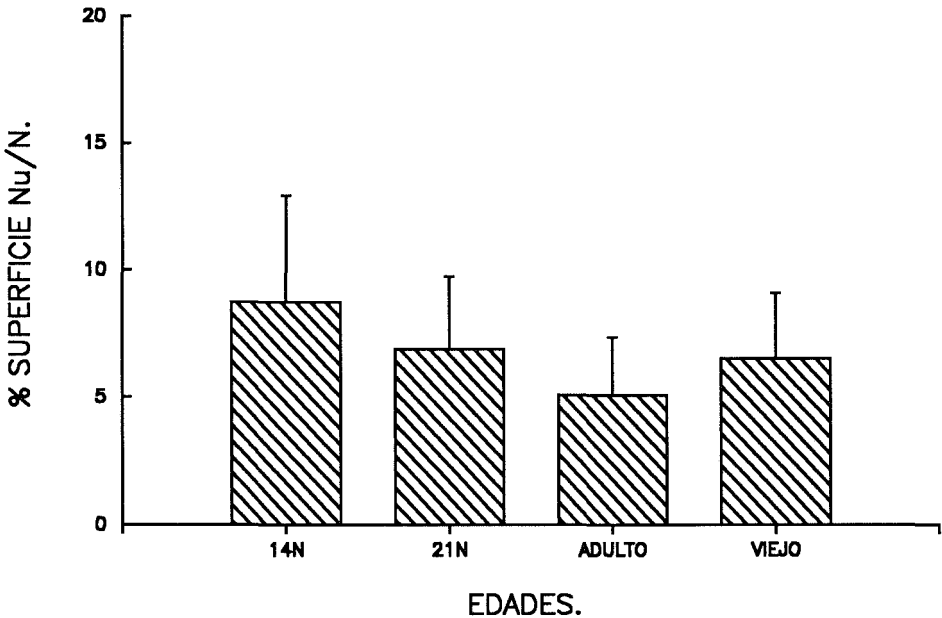


Figura 6. Relación entre superficie nucleolar y superficie nuclear en el NMM. Comparando con la figura 5 se observa la similitud en 14N, 21N y ADULTO, donde disminuye el número de nucleolos y el porcentaje de superficie que ocupan. No ocurre lo mismo en VIEJO, donde disminuye el número de nucleolos pero aumenta su superficie relativa.

estudios futuros; pero que nos están indicando como el tamaño de los nucleolos de por sí no puede ser un signo de actividad celular si no va acompañado de su relación con el área o volumen nuclear.

Pero ya sabemos que la actividad de una neurona no se tiene por qué reflejar exclusivamente en la actividad sintética, pues esta llevará consigo aparejado el incremento de la actividad mitocondrial como fábrica que lo es de la moneda energética por excelencia (ATP).

En este caso para acercarnos a estudiar la actividad enzimática de la citocromo oxidasa como último eslabón de la cadena respiratoria, obteniendo resultados que ponen de manifiesto una mayor actividad en la edad del destete, disminuyendo hasta los estados de envejecimiento.

Lateralidad del complejo mamilar

En estos núcleos del complejo mamilar existen simetrías muy destacadas como ocurre con el núcleo mamilar lateral y que ya se han publicado (Begega y cols, 1990; Arias y cols, 1990); el interrogante siguiente que se plantea es ¿existen diferencias entre estos núcleos a lo largo del desarrollo?.

Los resultados por nosotros obtenidos, demuestran que estos núcleos son muy simétricos, pero no se comportan de igual forma en cuanto al número de células gliales y neuronales (ver figura 7). Sin embargo, lo que es más importante, presen-

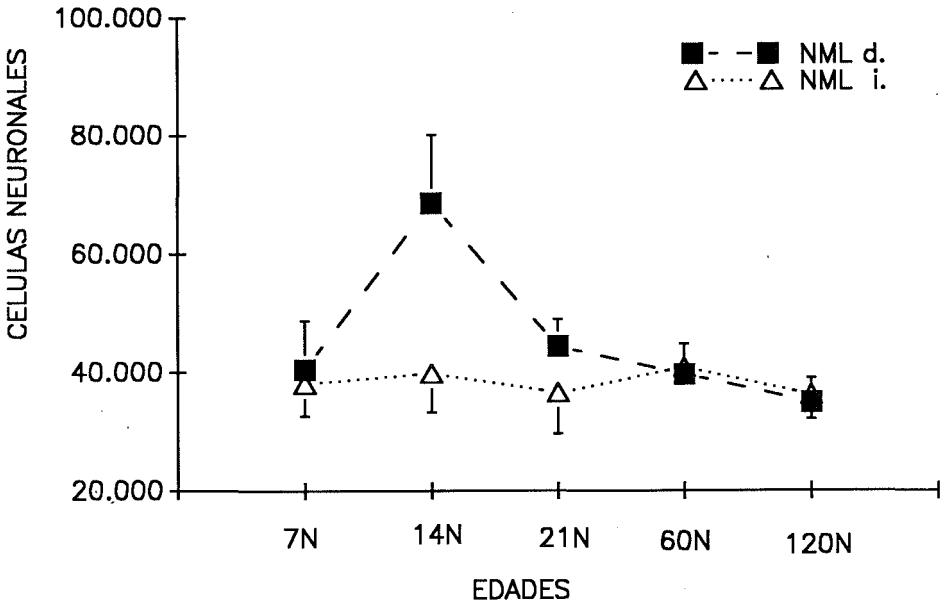


Figura 7. Número de neuronas en los núcleos Mamilares Laterales. Nótese la asimetría en dichos núcleos, sobre todo en 14N.

tan una diferencia en actividad entre ellos pudiendo decirse que el núcleo mamilar lateral derecho es más activo que su simétrico de la izquierda, reflejando momentos de máxima actividad a la edad de 21N (fecha del destete) como ocurría en el núcleo mamilar medial.

Aplicaciones

Cuando se trabaja en investigaciones de carácter básico, al llegar a este apartado realmente se plantea una reflexión: ¿es necesario encontrar más aplicaciones que las derivadas del conocimiento de las estructuras y de su papel en el funcionamiento integrado del organismo?

Con el número de datos obtenidos, ahora es posible relacionar estrechamente un comportamiento con una estructura y la fuerte implicación que ello tiene en un modelo comportamental.

Una de las patologías más frecuentes en humanos asociada con los cuerpos mamilares y el tálamo anterior, es el síndrome de Wernicke-Korsakoff (Victor, 1971; Brierly, 1977), el cual se desarrolla bien por ingesta de alcohol o falta de absorción de tiamina.

Nuestras investigaciones pueden ayudar a explicar aspectos tan importantes como la pérdida de orientación espacial propia de este síndrome.

Similares déficits de memoria ya se han encontrado en patologías como la de Alzheimer y/o Parkinson, (Terry y Davies, 1980; Freedman y Oscar-Berman, 1989) sería posible comprobar con nuestras técnicas, si estas estructuras están realmente dañadas no solo en modelos animales sino también en humanos.

No obstante hay que ser muy cautos a la hora de extrapolar datos y no caer en una excesiva simplificación de estos modelos, sin embargo, los modelos animales nos permiten confirmar hipótesis y comprender procesos que sería éticamente inviable hacerlo en humanos, por lo que debe concedérseles la importancia que merecen.

Agradecimientos

Queremos agradecer la experta ayuda técnica prestada para la realización de este trabajo a D. Laudino López y Dña. Piedad Burgos.

Este trabajo se ha desarrollado en su mayor parte gracias a una ayuda del FICYT y de la Universidad de Oviedo (DF90/20611).

REFERENCIAS

- 1.- Aggleton, J.P y M. Mishkin. (1985). Mammillary-body lesions and visual recognition in monkeys. *Exp. Brain Res.* 58: 190-197.
- 2.- Allen, G.V. y H.A. Hopkins. (1988). Mammillary Body in the rat: a cytoarchitectonic, Golgi, and ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.* 275:39-64.
- 3.- Altman, J. y S.A. Bayer. (1978). Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling pattern of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 182: 945-972.
- 4.- Arias, J.L; A. Begega y M. Braña. (1990). Observaciones cuantitativas sobre las células no neuronales y neuronales de los cuerpos mamilares durante el desarrollo postnatal. *Arch. Neurobiol* 53(6): 212-217.
- 5.- Begega, A; M.M. Alvarez; M. Braña y J.L. Arias. (1990). Implications of Mammillary bodies in Spatial Memory. *Psicothema*, 2(1): 17-24
- 6.- Braendgaard, H y H.J.G. Gundersen. (1986). The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J. Neurosc. Methods* 18:39-78.
- 7.- Brierley, J.B. (1977). The neuropathology of amnesic states. In: Whitty, C and O. Zangwill (eds). *Amnesia*, pp: 150-180. Butterwoth, London.
- 8.- Cruz-Orive, L (1987): Avances recientes en estereología y aplicación en Biología celular. *Act. Soc. Biología Celular*.
- 9.- Faiers, A.A; F.R. Calaresu y G.J. Mogenson. (1976). Factors affecting cardiovascular responses to stimulation of Hypotalamus in the rat. *Exp. Neurol.* 51: 188-206.
- 10.- Freedman, M y M. Oscar-Berman (1989). Spatial and visual learning deficits in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Brain and Cognition* 11: 114-126
- 11.- Goessens, G (1984). Nucleolar structure. *Int. Rev. Cytol* 87: 107.
- 12.- Guillery, R.W. (1956). Degeneration in the post-commissural fornix and the mammillary peduncle of the rat. *J. Anat* 90: 350-370.
- 13.- Haug, H. (1986). History of neuromorphometry. *J. Neurosc. Meth.* 18: 1-17
- 14.-Korek, G; H. Martin y K. Wenzelides (1991). A modified method for the detection of nucleolar organizer regions (AgNORs). *Act. Histochem* 90:155-157.
- 15.- Kriekhaus, E.E. (1967). The mammillary bodies: Their function and anatomical connections. *Acta Biol. Exp* 27:404-411.

- 16.- Lisk, R.D. (1966). Increased sexual behavior in the male rat following lesions in the mammillary region. *J. Exp. Zool.* 161: 129-136.
- 17.- Liu, R.; L. Chang y G. Wickern. (1984). The dorsal tegmental nucleus: An axoplasmic transport study. *Brain Res.* 310:123-132
- 18.- Morales, A; I. Cubero y A. Puerto. (1989). Mammillary polydipsia and diabetes insipidus: a study of rhythmicity of water intake. *Physiol. Behav.* 45: 911-915.
- 19.- Rosenstock, J; T.d.Field y E. Greene. (1977). The role of the mamillary bodies in spatial memory. *Esp. Neurol* 55: 340-352.
- 20.- Saravis, S; V. Sziklas y M. Petrides (1990). Memory for Places and the Region of the mamillary bodies in Rats. *Europeaan J. Neurosc*, vol2: 556-564.
- 21.- Seki, M y K. Zyo (1984). Anterior Thalamic afferents from the mamillar body and the limbic cortex in the rat. *J. Comp. Neurol* 229: 242-256.
- 22.- Shibata, H (1987). Ascending projections o the mammillary nuclei in the rat: A study using retrograde and anterograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *J. Comp. Neurol.* 264: 205-215.
- 23.- Swason, L y W.M. Cowan. (1975). Hippocampal-Hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not Ammon's horn. *J. Comp. Neurol* 172: 49-84
- 24.- Takeuchi, Y; G.V. Allen y D.A. Hopkins (1985). Transnuclear transport and axon collateral projections of the mammillary nuclie in the rat. *Brain Res. Bull.* 14: 453-468.
- 25.- Terry, R.D. y P. Davies (1980). Dementia of the Alzheimer type. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 77-95
- 26.- Victor, M; R.D. Adams y G.H. Collins. (1971). The Wernicke Korsakoff Syndrome. *Contemporary Neurology Series*, vol 7 Philadelphia, PA: F.A. Davies Co
- 27.- Wouterlood, F.G; H.W.M. Steinbusch; P.G.M. Luiten y J.G.J.M.Bol. (1987). Projections from the prefrontal cortex to histaminergic cell groups in the posteriro hypothalamic region of the rat. Anterograde tracing with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin combined with immunocytochemistry of histidina decarboxylase. *Brain. Res.* 406: 330-336