

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO EN TERAPIA OCUPACIONAL



La memoria emocional. Estudio de la aparición del tracto mamilotalámico en el cerebro de ratón.

Autor: Navarro Rodríguez, Nerea.

Nº expediente: 861

Tutor: Echevarría Aza, Diego.

Cotutora: Company Devesa, Verónica.

Departamento de Histología y Anatomía.

Curso académico 2017–2018.

Convocatoria de junio.

ÍNDICE DE CONTENIDOS:

	Página
• Resumen y palabras clave	1
• Abstract and key words	2
• Introducción	3
• Hipótesis del trabajo	6
• Objetivo	6
• Material y métodos	7
• Resultados	15
• Discusión	19
• Conclusiones	22
• Bibliografía	23



RESUMEN:

Introducción: El Circuito de Pápez es uno de los circuitos neuronales más conocidos del sistema límbico. Pápez atribuía una función a los cuerpos mamilares y al hipocampo en la emoción, ambas estructuras implicadas previamente en la memoria. El fascículo mamilotalámico (mTha) es un haz de fibras de doble sentido que se proyecta del cuerpo mamilar al tálamo, que a su vez conecta con la corteza del cíngulo, que conecta con el hipocampo y que finalmente a través del fornix conecta con la región mamilar, cerrando este circuito límbico.

Objetivo: Estudiar el nacimiento y desarrollo del mTha en el ratón mediante el uso de dos tipos de trazadores celulares (cristales de DiI e inyección de Biocitina).

Metodología: Se ha realizado efectuando cortes de hemisferios cerebrales de ratón en diferentes estadios de desarrollo (E15.5, E18.5 y P3) e implantado cristales DiI en unos casos y realizado la inyección iontoforética en otros para la detección de estas proyecciones.

Resultados: Hemos demostrado que los cristales de DiI colocados en la región mamilar difunden específicamente recorriendo la trayectoria del mTha. Sin embargo, otros tractos fueron detectados por la proximidad o contaminación del cristal. El mTha nace a E15.5 y se desarrolla a término en el nacimiento. Los resultados obtenidos para la inyección iontoforética con Biocitina no han resultado efectivos en esta experimentación.

Conclusión: La técnica de implantación de cristales de DiI se valida como más simple que la inyección de biocitina para el estudio de esta proyección límbica.

Palabras clave: Tracto mamilotalámico, Cristales de DiI, Biocitina.

ABSTRACT:

Introduction: The Papez circuitry is one of the most classical networks of the limbic system . Mr Pápez thought that the mammillary bodies and Hippocampus exerted a big important role in emotional behaviour, regions that previously were demonstrated to be important in memory. The mammillothalamic projection is a double direction fasciculus that connects the mammillary region with the anterior nuclei of the thalamus which in turn connect to the cingulate (limbic) cortex with in turn, connects to the hippocampus and this one to the mammillary bodies again, closing the circuit.

Objectives In this work we have studied the birth and development of mTha in the mouse embryo at E15.5, E18.5 and P3 validating two types of cell tracers, the implantation of DiI (hydrophobic) crystals and the injection of Biocytin (hydrophilic) in the mammilar región.

Methodology: by performing histological sections in the sagittal plane of mouse brains at different stages of development (E15.5, E18.5 and P3) we have implanted DiI (hydrophobic) crystals and / or performed the iontophoretic (hydrophilic) injection for detection of this projection.

Results: We have shown that DiI crystals placed in the mamillary region diffuse specifically by tracing the path of mTha. However, other tracts were detected by the proximity or contamination of the crystal. The results obtained for the iontophoretic injection with Biocytin have not been effective in these experiments.

Conclusions: The mTha is born at E15.5 and ends its development at birth. The technique of implantation of DiI crystals is validated as simpler than the injection of biocytin for the study of this limbic projection.

Keywords: mammillothalamic tract, DiI crystals, Biocytin.

INTRODUCCIÓN:

Bases anatómicas del diencefalo:

El encéfalo es la parte del sistema nervioso central situada dentro de la cavidad craneal. Durante el desarrollo embrionario se distinguen tres regiones cerebrales: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo.

El prosencéfalo posteriormente se dividirá en el prosencéfalo secundario y el diencefalo. Del prosencéfalo secundario se desarrolla por su parte ventral el territorio hipotalámico y por su parte dorsal deriva el telencéfalo, que es la estructura cerebral más voluminosa, y está conformado por ambos hemisferios telencefálicos y los ganglios de la base ⁽¹⁾.

El diencefalo se encuentra anatómicamente comprende, de rostral a caudal: pretálamo, tálamo y pretectum.

El tálamo es la estación base de la llegada de la información sensorial del cuerpo y el principal emisor de esta información a los diferentes lóbulos de la corteza cerebral regulando entre otros, nuestro estado de ánimo, la comunicación verbal y escrita y el resto de funciones cognitivas que nos reconocen como humanos. Todas estas funciones son mediadas y decodificadas por la corteza de asociación. El tálamo consta de numerosos núcleos los cuales se clasifican según la información aferente y eferente ⁽²⁾.

El grupo nuclear del tálamo anterior se ubica debajo de la cara dorsal y rostral del tálamo. Constituido por células de tamaño mediano, rodeadas por una cápsula de fibras mielínicas. El grupo nuclear anterior del tálamo forma parte del sistema límbico, relacionado con la conducta emocional y mecanismos de la memoria entre otros.

El diencefalo y el sistema límbico: Circuito de Pápez.

El sistema límbico representa un nivel superior de complejidad cerebral, responsable de la valoración de la experiencia. Incluimos un conjunto heterogéneo y variable de centros nerviosos, cuya función colectiva aparentemente subyace a los aspectos valorativos y motivacionales de nuestra mente.

La hipótesis de Pápez se basa en que el hipocampo, la circunvolución del cíngulo, el hipotálamo, los núcleos anteriores del tálamo y sus interconexiones constituirían un mecanismo armonioso encargado de funciones emocionales ⁽³⁾.

El Circuito de Papez es uno de los numerosos circuitos neuronales dentro de este sistema límbico. Este circuito está formado por estructuras telencefálicas, diencefálicas e hipotalámicas conectadas entre sí a modo de anillo. Arranca con el hipocampo a través de la fimbria y el fórnix, que proyecta en el hipotálamo ventral, en los cuerpos mamilares. Los núcleos mamilares a su vez proyectan también sobre los núcleos anteriores del tálamo mediante el **fascículo mamilotalámico**. Los núcleos anteriores poseen dianas corticales diferenciadas en la corteza límbica (cingular, retrosplenial, parahipocampal, perirrinal), y éstas proyectan a la corteza entorrinal, que cierra el circuito sobre el hipocampo. Papez fue el primer anatómico que sugirió el rol límbico (emocional) de esta circuitería circular y potencialmente emocional.

Papez utilizó su conocimiento de la conectividad entre el hipocampo, el diencefalo y las estructuras corticales asociadas para desarrollar las bases neuronales de la **emoción**. A pesar de que Papez atribuía un papel a los cuerpos mamilares y al hipocampo en la emoción, ambas estructuras habían sido previamente implicadas en la **memoria**. Por lo tanto, la memoria y la emoción son procesos íntimamente relacionados; todas las etapas del recuerdo, desde la codificación de información hasta su recuperación a largo plazo, son facilitadas por factores tipo emocional. Esta influencia es bidireccional, de modo que los recuerdos provocan con frecuencia la aparición de emociones, por ejemplo.

Los cuerpos mamilares son un par de eminencias pequeñas localizadas en la superficie ventral del prosencéfalo secundario y definen el límite caudal del hipotálamo. El **fascículo mamilotalámico** es un haz de fibras de doble sentido que se proyectan del cuerpo mamilar al grupo de núcleos anteriores del tálamo, que a su vez tienen conexiones recíprocas con la corteza del cíngulo. Este tracto asciende transversalmente por el tálamo por detrás de la zona limitans intertalámica (paralelo a ella) hasta alcanzar el complejo nuclear anterior. A través de esta vía llegan al tálamo información del hipocampo y que repercute en eferencias a la corteza cingular.

Neuropatología del Circuito de Pápez:

Si los núcleos mamilares son consideradas estructuras de relevo y su función principal es transferir información a los núcleos talámicos anteriores, las lesiones del tracto mamilotalámico deben ser funcionalmente equivalentes a las lesiones de los cuerpos mamilares. Por lo tanto, los cuerpos mamilares contribuyen a la función nemotécnica a través del tracto mamilotalámico⁽⁴⁾.

La proyección del tracto mamilotalámico parece ser crítica para el funcionamiento talámico anterior normal. Las lesiones talámicas en el complejo nuclear anterior y las lesiones del tracto mamilotalámico interrumpen el rendimiento en tareas de memoria espacial ⁽⁵⁾. El daño al hipocampo, cuerpos mamilares, núcleos talámicos anteriores y circunvolución del cíngulo puede provocar amnesia anterógrada en los pacientes, es decir, una incapacidad para establecer nuevos recuerdos episódicos ⁽⁶⁾.

La neuropatología del Síndrome de Korsakoff (SK) fue descrita por primera vez hace más de un siglo, y no existe una definición generalmente aceptada. La evidencia hasta la fecha muestra que se requiere daño al tálamo y al hipotálamo, en particular el núcleo talámico anterior y núcleo mamilar medial del hipotálamo. Es un síndrome residual en pacientes que sufrieron una encefalopatía de Wernicke ⁽⁷⁾. El síntoma más notorio es la amnesia global, que puede ser muy profunda ⁽⁸⁾.

El SK afecta principalmente a la **memoria declarativa** que se define como el almacenamiento y recuperación del material que está disponible para la conciencia y que puede expresarse mediante el lenguaje ⁽⁹⁾. Por el contrario, la memoria no declarativa o implícita, aquella que implica habilidades y asociaciones adquiridas y recuperadas a nivel inconsciente, resulta relativamente intacta en SK ⁽¹⁰⁾. Los déficits cognitivos en dominios no nemotécnicos pueden ocurrir en SK, la capacidad intelectual general, el enfoque atencional y la memoria a corto plazo generalmente están intactos en estos pacientes ⁽¹¹⁾.

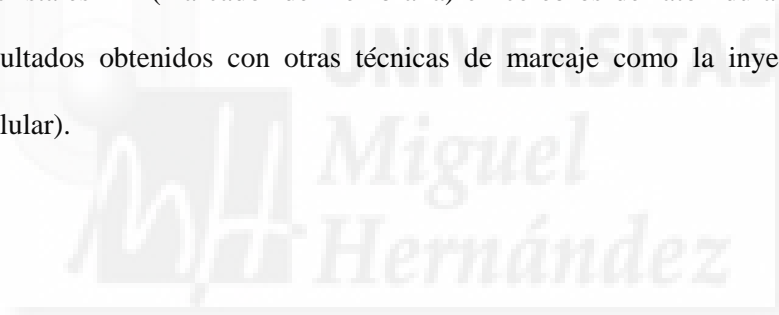
Por lo tanto, la emoción tiene efectos moduladores tanto en la memoria declarativa como en la no declarativa. Lo que hace que recordemos mejor o peor un suceso no es tanto su relevancia en la historia personal como la intensidad de las emociones que experimentamos cuando ese momento tuvo lugar.

HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Los marcadores hidrofóbicos (lipofílicos) e hidrofílicos son una herramienta básica para el estudio de la conectividad cerebral. Los cristales DiI, colocados en el territorio mamilar del hipotálamo y la inyección iontoforética en la misma área en cortes sagitales de hemisferios cerebrales de ratón embrionario y postnatales, son una buena estrategia para abordar el estudio de la anatomía del tracto mamilotalámico.

OBJETIVO:

Llevar a cabo un estudio anatómico experimental del desarrollo del tracto mamilotalámico mediante la implantación de cristales DiI (marcador de membrana) en cerebros de ratón durante su desarrollo y comparar los resultados obtenidos con otras técnicas de marcaje como la inyección de biocitina (marcador intracelular).



MATERIAL Y MÉTODOS:

El presente estudio se ha llevado a cabo durante el periodo de tiempo comprendido entre el 2 de octubre de 2017 y el 6 de abril de 2018 en el laboratorio 101, 102 y 138 del Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández.

Se ha realizado un estudio observacional descriptivo, consistente en el análisis de la citoarquitectura del tracto mamilotalámico seleccionando muestras de diencefalo de ratón ICR en tres estadios diferentes embrionarios (E15.5, E18,5) y uno postnatal P3.

Origen de las muestras:

Los animales fueron obtenidos del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche, en concreto del animalario de la Unidad de Sant Joan de dicho servicio. Este animalario sigue el control ISO 9001/2008 y mantiene una excelente calidad en sus instalaciones y mantenimiento de las líneas animales. La manipulación de los ratones fue llevada a cabo por profesional acreditado.

El estudio se ha efectuado siguiendo estrictamente la normativa que rige la experimentación con animales y el uso de organismos modificados genéticamente (Real Decreto 53/2013, Directiva 201/63/UE de la Unión Europea). Esta experimentación recibió el visto bueno del Órgano evaluador de proyectos de la Universidad Miguel Hernández de Elche y la aprobación de la Generalitat valenciana.

Criterios de selección:

Como únicos criterios de selección de los embriones se ha tenido en cuenta pertenecer a la cepa ICR y estar en el estadio de desarrollo necesario (E15.5, E18.5 y P3).

Cristales de DiI:

El primer marcador seleccionado para este estudio ha sido los cristales de DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate). Estos pertenecen a una familia de colorantes fluorescentes cuyo elemento común es la **carbocianina**. El DiI es una molécula fluorescente cuya

estructura química y su carácter altamente lipofílico facilita su inserción en la fracción lipídica de la membrana plasmática, difundiéndose libremente marcando la totalidad de la neurona y pudiendo mostrar así detalles morfológicos completos ⁽¹²⁾. Estas moléculas lipófilas son excelentes marcadores anterógrados o retrógrados en tejidos y células vivas o fijadas, sus propiedades de difusión y fluorescencia se mantienen en tejidos fijados con aldehído. Pues este marcador aprovecha la capacidad de las neuronas para transportar material desde sus terminales a sus cuerpos celulares ⁽¹³⁾.

Se trata pues, de moléculas con un alto grado de hidrofobicidad y fluorescencia emitiendo luz de una determinada longitud de onda, al ser estimuladas con luz ultravioleta, el DiI presenta una absorción máxima a 549 nm y una emisión máxima a 565 nm (fluorescencia roja – amarilla)

Procedimiento de inclusión de cristales DiI:

Con el objetivo de obtener las muestras se utilizaron embrionarias de E15.5 y E18.5 se utilizaron hembras preñadas a esos días a las que se sacrificó por dislocación cervical. Para las muestras postnatales (P3), se utilizaron ratones de 3 días de vida. A continuación, se procedió a aislar las muestras, y seguidamente fueron limpiados en una solución salina de PBS (Phosphate Buffered Saline).

El método de trazado que se emplea se realiza sobre material fijado, por lo que inmediatamente después de ser limpiados se procedió a su fijación en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS1x donde permanecieron a 4°C durante 24 horas. Tras la fijación, se lavaron las muestras en PBS1x (se realizaron 2 cambios de 40 minutos) y a continuación fueron deshidratados progresivamente en etano.

A continuación, preparamos 100ml de Agarosa al 4% para su uso como medio en el que incluir los cerebros de ratones. La agarosa se extrae de algas productoras de agar y, de igual forma que este, presenta una histéresis de gelificación importante, ya que gelifica en torno a 32 – 45°C y funde a temperaturas entre 80 – 95°C. Seguidamente, colocamos las muestras en membranas de cultivos bañadas en un medio con antibiótico para evitar que se infecten y las dejamos en una estufa a 37°C durante 24 horas.

Una vez fijado el encéfalo se procede a realizar la técnica de implantación y trazado propiamente dicha. Previamente al marcaje de la muestra, se realizó un corte sagital del encéfalo de los embriones para acceder más fácilmente al diencefalo.

A continuación, se procede a la colocación de cristales de DiI en la muestra situándolos en territorio mamilar. Es un proceso clave ya que la precisión en la aplicación es determinante para poder interpretar los resultados. El tamaño de los cristales debe ser pequeños para minimizar el área de difusión del colorante. Antes de colocar el cristal, el tejido debe estar seco con papel 3M para permitir que el colorante entre en contacto directo con este. Para la colocación de los cristales en la región del diencefalo que estudiamos, en este caso el diencefalo, se realiza con la ayuda de una lupa binocular de disección Leica MS5 (ver **Figura 1A**). A continuación, adherimos los cristales de DiI con una pipeta de cristal en cuya punta hemos pegado una aguja de tungsteno. El micro-cristal se adhiere al metal por su electricidad estática que se genera y se coloca o inserta en la región de interés. Tras la colocación de estos, dejamos los cortes en estufas de 37°C para su incubación durante 10 días. Durante este tiempo, el colorante se difunde previamente por las prolongaciones neuronales, desde el lugar de aplicación.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, procedemos a cortarlos en secciones más finas en un vibrátomo Leica VT1000S (ver **Figura 1B, 1C, 1D**). Los disponemos sobre el lateral del cerebro embrionario o postnatal para realizar cortes sagitales y comenzamos con cortes de 80 µm de grosor hasta llegar al tejido empezando por la línea media hasta la parte o región más lateral. Una vez en él, aumentamos a 350 µm de espesor que luego, fueron ordenados sobre un portaobjetos y cubiertos con un cubreobjetos en Glicerol Jelly, una dilución especial a base de gelatina, glicerina y phenol que se utiliza en histología para montar y observar el tejido histológico sin tener que deshidratar y por lo tanto perder el marcaje de fluorescencia del cristal y trazado de DiI. Por último, la observación se realiza en el microscopio de fluorescencia DM6000, usando los filtros adecuados de excitación/emisión correspondiente al di (H546/590), como se observa en la **Figura 1E, 1F**.

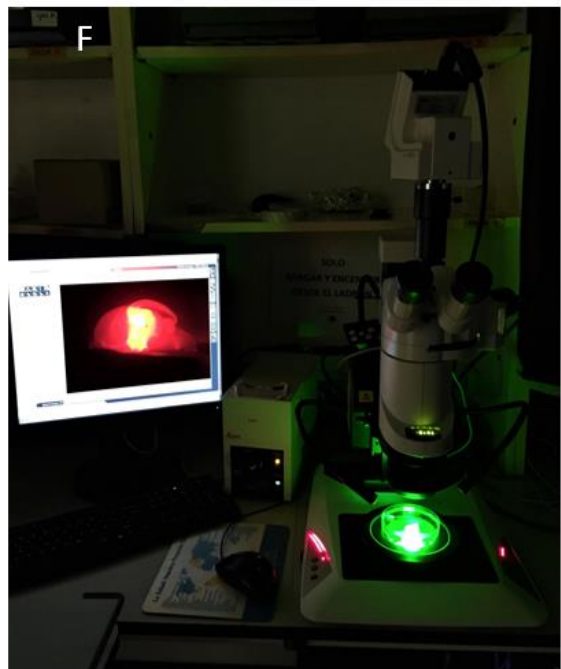
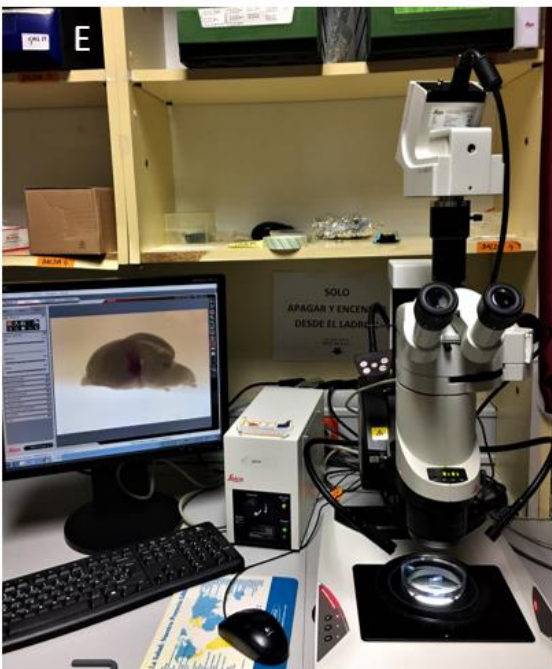
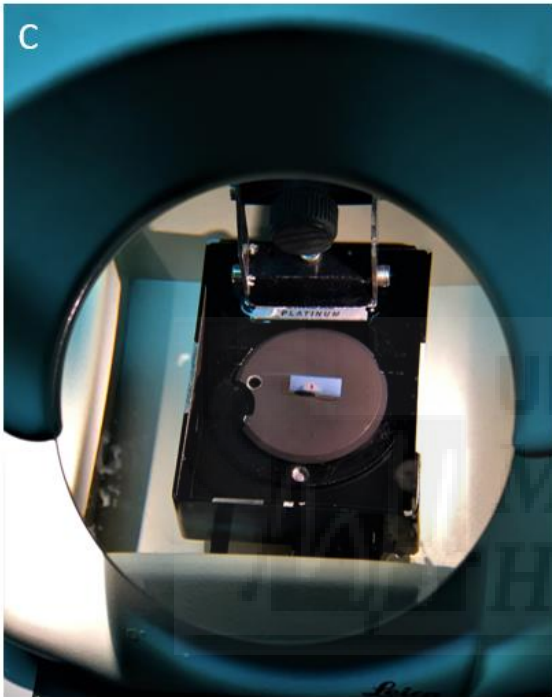
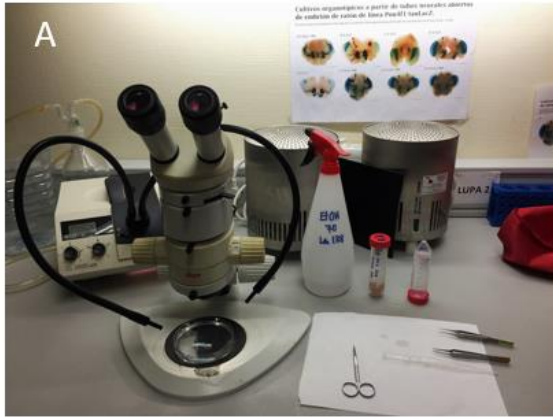


Figura 1: Equipamiento utilizado en este trabajo. **A)** Lupa binocular (Leica MS5). Lugar y herramientas de trabajo empleadas para la colocación de los cristales DiI en las muestras. **B, C y D)** Lugar y herramientas empleadas para la realización de cortes de las muestras. En estas imágenes se muestra de diferentes perspectivas el vibratomo (Leica VT1000S). **E)** Puesto y herramientas de trabajos empleadas para la detección de las muestras tras la colocación de los cristales DiI y el proceso de incubación necesario. **F)** Tiempo real en la pantalla del efecto de la aplicación del filtro de excitación/emisión (H 546/590).

Biocitina:

El segundo marcador utilizado en este estudio es la biocitina. Es un complejo de biotina de bajo peso molecular y donde el aminoácido lisina que se emplea como etiqueta inyectada intracelularmente o extracelularmente para identificar neuronas y proyecciones. Se trata de un marcador que penetra dentro de la célula (intracelular). Además, la aplicación extracelular de la biocitina puede usarse para el **trazado anterógrado** del tracto, es decir, desde el soma hacia los terminales axónicos ⁽¹⁴⁾.

La unidad de esta molécula para los estudios es basada tanto en su alto grado de solubilidad en agua como en alta afinidad de la biotina por la adivina, que permite detección sensible con fluorocromos marcados con adivina o enzimas cromogénicas. Este marcador permite, además, documentar las propiedades fisiológicas de las neuronas ⁽¹⁵⁾.

La inyección se realiza con microelectrodos (micropipetas de vidrio con puntas de diámetro muy reducido) cargados con una sustancia que presenta la carga eléctrica, biocitina en este caso, que será empleada como marcador. A través del microscopio de fluorescencia, y con la ayuda de un micromanipulador, se dirige a la punta del microelectrodo, al terreno mamilar del hipotálamo, y mediante la generación de una diferencia de potencial entre el microelectrodo y el baño donde se encuentra el tejido, se inyecta iontoforéticamente (mediante pulsos eléctricos) la sustancia (biocitina), que penetra en las células adyacentes y la rellena completamente. Esta metodología permite seleccionar las regiones cerebrales que se desea estudiar, la localización precisa y el tipo de neuronas.

Dependiendo del tiempo de inyección y del tiempo de incubación se consigue una anatomía extraordinaria. Posteriormente, se puede analizar la morfología neuronal a través del microscopio normal con luz visible.

El proceso de inyección iontoforética, incluye los pasos descritos a continuación (**Figura 2**).

Este método de trazado que se emplea se realiza sobre material vivo. Para ello, se disecan los embriones como realizamos anteriormente, pero se incluyen inmediatamente en agarosa al 2% en PBS 0.1M. Esta agarosa es especial porque tiene un bajo punto de fusión y se puede mantener líquida a 40°C (normalmente se mantiene líquida por encima de 65%). Este proceso requiere que las secciones de tejido (también cortadas en vibratomo) tengan que están dispuestas sobre unas membranas de policarbonato (Millicell 0.4 μm diámetro de poro) e incubadas en medio de cultivo compuesto de DMEM+ Penicilina + Estreptomina + Glutamina.

La preparación de la inyección de Biocitina consiste en microelectrodos de vidrio que contienen un 2% de biocitina en solución disuelta en PBS 0.1M fueron transmitidos a la corteza preliminar. Los electrodos de inyección se colocan mediante un micromanipulador en los hemisferios que fueron manipulados oblicuamente y vistos a través del microscopio.

La biocitina fue inyectada por iontoforesis (200ms por pulsos de voltaje positivos a una frecuencia de 2.5 Hz, 40nA) utilizando el estimulador de pulsos cuadrados. El tamaño de la inyección se controla fácilmente variando el tipo de electrodo y el tiempo de inyección. Se produce una inyección de 2 – 3 minutos. Una vez completadas las inyecciones, fueron fijados en PFA al 4%.

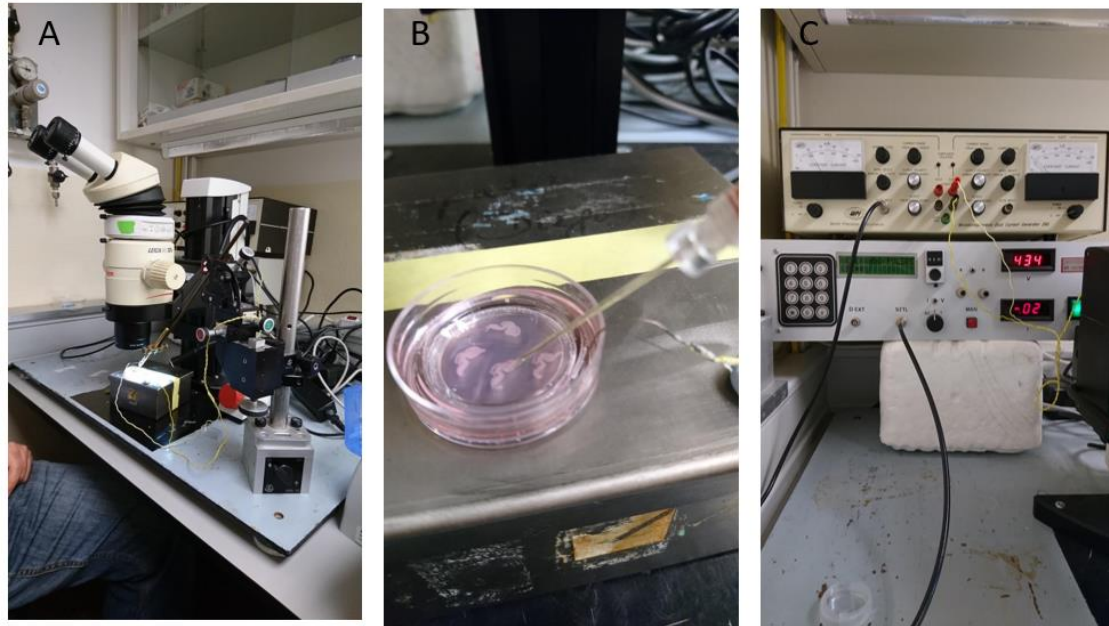


Figura 2: Setup de Iontoforesis e inyección de biocitina. A) Microscopio Leica MZ12 y manipulador donde se hace las inyecciones. B) Placa de Petri con los cortes de E15.5 durante la inyección iontoforética. C) Sistema de Iontoforesis.

Detección de la Biocitina cromogénica

Los cortes fueron procesados para histoquímica en placas de pocillos (grupo de 6 pozos de cultivo), usando la adivina-biotin-complejo (Kit ABC; Vectastain) y posterior revelado con DAB. Posteriormente, fueron lavados durante 10 minutos en PBS1x, seguido de un lavado de 5 minutos en glicerina 0.1M en PBS1x.

Después del enjuague final de 10 minutos en PBS1x, se incubaron las secciones durante 30 minutos en 0,5% de peróxido de hidrógeno en PBS1x a saturar la actividad de peroxidasa endógena.

Posteriormente, se lavaron los cortes 3 veces en PBS (1-5 minutos) y se bloquea en 1% suero normal de cabra (NGS) que contiene 0,2% de Triton X-100 en PBS1x durante al menos 60 minutos. Después de esto, se lavaron 3 veces en PBS1x (1 – 5 minutos) y se incubaron en una mezcla de avidina y peroxidasa de rábano picante biotinilada como se especifica en el kit Vectastain ABC, Vector

Laboratorios que contiene 0.1% de Triton X-100 en PBS1x para 60 minutos. Los cortes fueron luego lavados 3 veces por 10 minutos en PBS1x cada una.

Se reveló con 0,1% de diaminobenzidina (DAB) en presencia de peróxido de hidrógeno al 0,03% durante 25 minutos. El tejido se lavó cinco veces en PBS1x para detener la reacción de peroxidasa. Por último, los cortes fueron montados sobre portaobjetos, se dejó secar durante la noche en temperatura ambiente y se montó el cubreobjetos como se ha descrito anteriormente.



RESULTADOS:

Implantaciones de cristales de DiI:

En los primeros embriones utilizados E15.5 los cristales se pusieron en la región mamilar. Implantamos estos cristales en las dos mitades del embrión cortado sagitalmente (ver **Figura 3**). Después de esperar en oscuridad a 37 grados durante 7 días, pusimos el tejido en la lupa y observamos la longitud de onda determinada la tractografía que se podía distinguir a esa edad. En este estadio tan temprano no pudimos detectar el tracto mamilotalámico por lo que las neuronas que proyectan a los núcleos talámicos anteriores no están especificadas todavía.

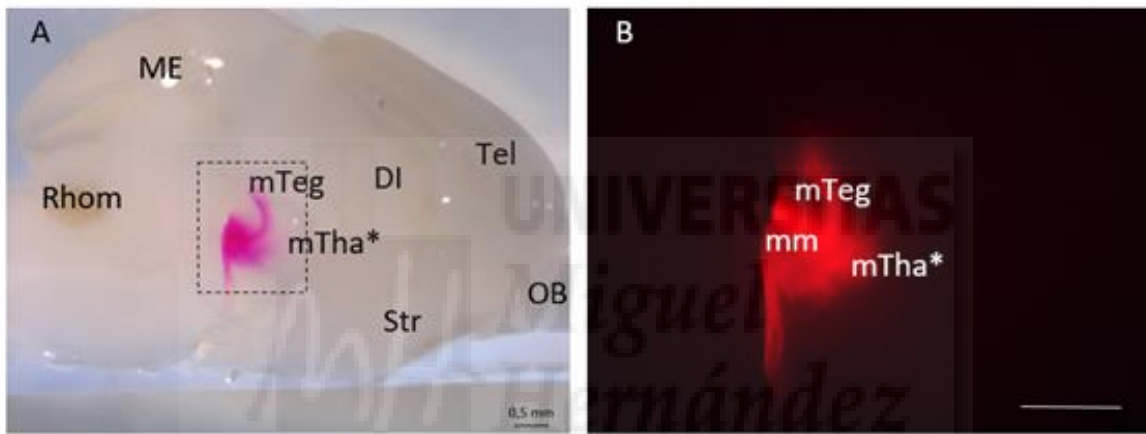


Figura 3: Ejemplo de implantación de cristales de DiI en una sección sagital del cerebro de un embrión de ratón de estadio embrionario 15.5. La **Figura 3A** observamos el cerebro inmerso en agarosa y cortado por la mitad longitudinal donde se observa la posición del cristal en el territorio mamilar (mm). En la **Figura 3B**, se ha realizado una magnificación de la región de inyección y se observa mediante luz ultravioleta y con filtro de longitud de onda 564nm. El asterisco en la proyección mamilotalámica (mTha) indica el no desarrollo de esta proyección a este estadio. La barra de escala en este caso es de 300µm.

Realizamos el mismo procedimiento para el siguiente estadio embrionario E18.5 analizado en este estudio. (ver **Figura 4A**). Tras el periodo de incubación, se procedió a la observación de la muestra en el microscopio-lupa de epifluorescencia Leica FLUO-16A, usando los filtros adecuados de excitación/emisión correspondiente al diI (H546/590). En este estadio pudimos observar las

proyecciones del tracto mamilotalámico, naciendo de los cuerpos mamilares realizando su recorrido transversal. En este estadio no llegamos a ver la formación completa del tracto ni de sus proyecciones aún no desarrolladas hasta el núcleo anterior del tálamo (ver **Figura 4B**).

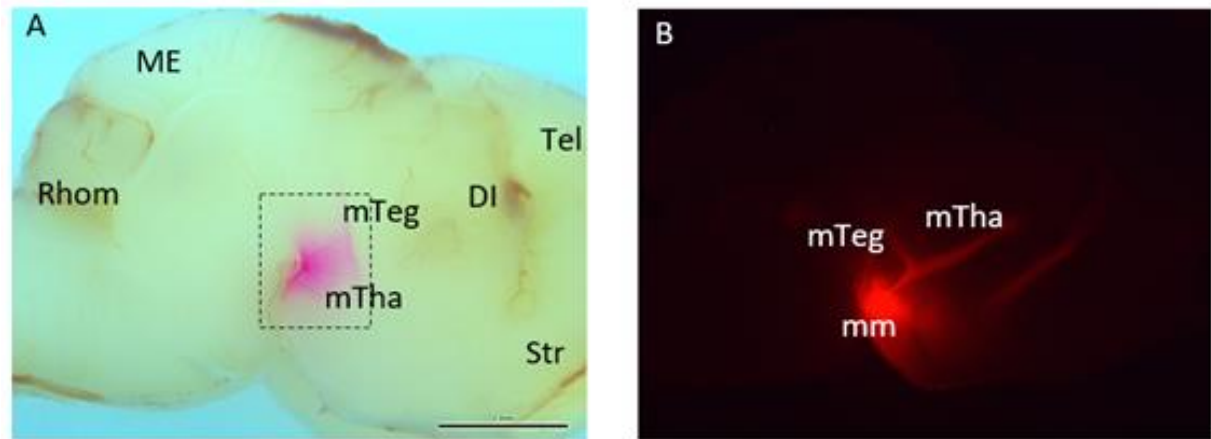


Figura 4A: Cristales Dil implantados en un embrión de ratón de estadio embrionario 18.5. En la **Figura 4B** observamos el desarrollo parcial del tracto mamilotalámico (inicio del desarrollo).

El ratón postnatal 3 (P3) es el último estadio analizado en este estudio (**Figura 5**). Se siguió el protocolo anteriormente mencionado. En este caso y dada la opacidad y grosor del tejido, cortamos el cerebro en cortes sagitales de unos 300 μ m de grosor. Posteriormente, analizamos las muestras bajo la lupa de fluorescencia y observamos que, el desarrollo del tracto mamilotalámico había llegado a su diana. Como siempre, otros tractos fueron advertidos por la proximidad del cristal o contaminación del mismo en otras regiones. En 3 de los casos pudimos advertir la detección del tracto retroflejo por la tinción de unas fibras provenientes de la Sustancia Negra (región de mayor producción de la dopamina ver **Figura 5B**, RF). Por otra parte, y rostral a ella, se observa como si fuera un espejo otra proyección paralela a la proyección mamilotalámica que es parte del fórnix (F), proyección proveniente del hipocampo y que forma parte del Circuito de Pápez.

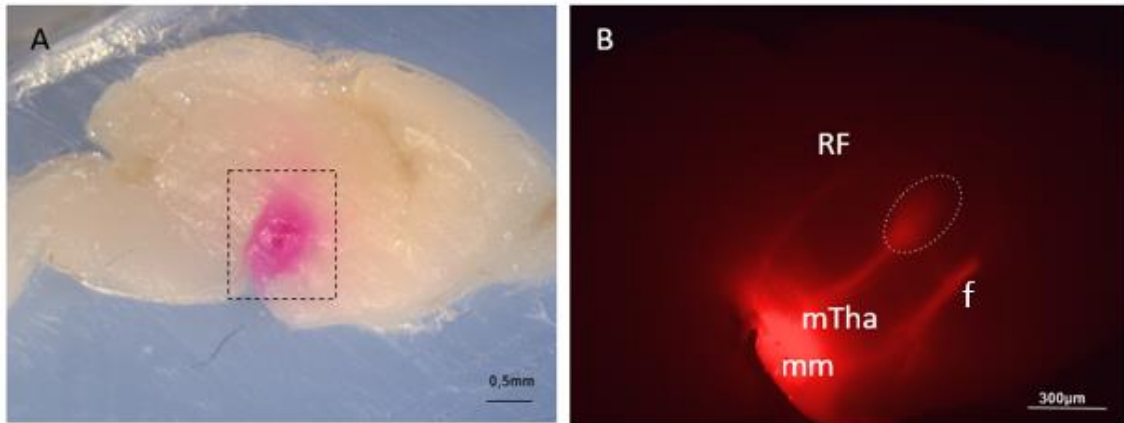


Figura 5: Implantación de cristales de DiI en ratones nacidos con 3 días. En la imagen A se observa antes de cortar en vibratomo, la implantación de cristales de DiI después de 7 días de incubación en PFA 4% y a 37°C. La imagen B es una ampliación de otro caso en el que se observa el marcaje de tres tractos: el retroflejo (RF), el mamilotalámico (mTha) y el fórnix (f).

Experimentos con Biotina: Inyección iontoforética.

He intentado hasta tres veces realizar las inyecciones iontoforéticas pero no he tenido éxito. El marcaje del tinte (la biocitina) se incorpora dentro de la célula de manera pasiva, utilizando para ello el sistema propio de la endocitosis. De esa manera se llena el interior de biocitina y se revela con el kit de abidina-biotina complex y luego con DAB.

Los resultados obtenidos no son demostrativos para esta experimentación. Al revelar el explante, encontramos células positivas (es decir, reveladas con DAB) por todo el tejido y no concentrado en la región mamilar como era deseado. De hecho, la detección de la biocitina se observa únicamente en la superficie del explante por ambos lados siendo el interior del mismo negativo. Es decir, que la biocitina se ha esparcido por todo el tejido (ver discusión). Interesantemente, hay un mayor marcaje en aquellos territorios donde se está el plexo coroideo.

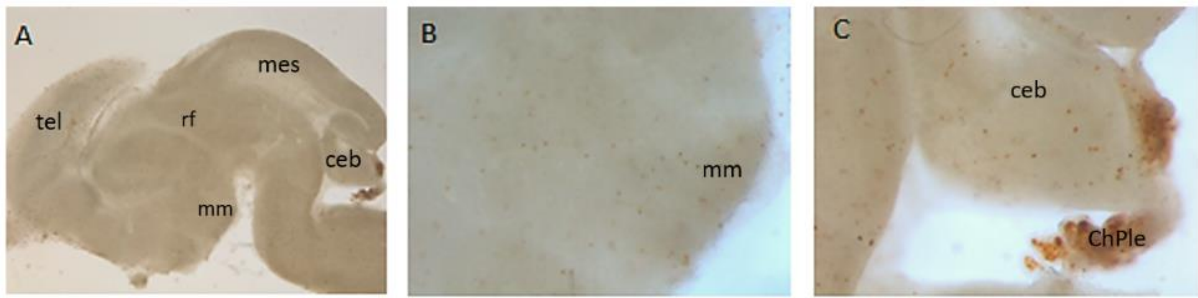


Figura 6: Resultados obtenidos tras la inyección de Biocitina en la región mamilar de un embrión de 15.5 cortado sagitalmente. **A)** Muestra un ejemplo de los cortes sagitales donde se ha realizado el experimento de inyección iontoforética. **B)** Aumento de la región mamilar donde se aprecian los cuerpos marcados con el DAB, se distinguen los puntos (células) positivas para DAB de manera ubicua. **C)** Representa el territorio del rombencéfalo donde se aprecia mucho mejor el plexo coroideo (PleCh) del IV ventrículo intensamente teñido para el DAB.



DISCUSIÓN:

En el presente TFG hemos buscado validar y comparar el uso de trazadores axonales para el estudio del desarrollo del fascículo mamilotalámico en el embrión de ratón. Por una parte, hemos utilizado un componente lipofílico que es el Dil (en forma de cristales), como herramienta de uso para trazar, seguir y describir la circuitería del SNC, en embriones y primeros estadios postnatales de ratón (E15.5, E18.5 y P3). Se trata de un trazador hidrófugo que se acopla a la membrana lipídica celular y se transporta de manera pasiva en un tejido muerto o fijado (también puede funcionar in vivo). Para ello, hemos seleccionado la detección del tracto mamilotalámico, implicando en este estudio como origen del tracto a los cuerpos mamilares (región mamilar) con destino en los núcleos anteriores del tálamo (región talámica). Este tracto es un ejemplo de aferencias y eferencias de ambas regiones y forma o cierra el Circuito de Pápez, circuito límbico y del control de las emociones que tanto necesita el terapeuta entender para abordar cualquier investigación aplicada a mejorar la calidad de vida de un usuario.

Con el objetivo de determinar la especificidad de este marcador nos hemos centrado en el estudio del marcaje anterógrado, mediante el análisis de la proyección proveniente de los cuerpos mamilares hacia los núcleos anteriores del tálamo. Hemos mostrado/evidenciado que la implantación del Dil en el origen de la formación de las proyecciones del tracto (región mamilar) provoca un marcaje anterógrado de las neuronas. Interesantemente esta proyección al tálamo no se origina tempranamente, sino que lo hace a partir de E15.5 por lo que forma parte de la regionalización secundaria del SNC como producto del desarrollo más complejo del cerebro embrionario.

La implantación de cristales de DiI requiere de una ejecución cuidadosa para evitar así la contaminación que producen los microcristales que pudieran caer en torno al lugar de implantación. Para evitar este tipo de contaminación, se debe realizar el implante mediante el uso de lupas de disección, microagujas de metal tungsteno y un buen pulso. Existen otros sistemas de aplicación de los cristales de DiI mediante la dilución de los mismos en etano. Sin embargo, es necesario la utilización de inyectores mecánica y de precisión para la inyección de pequeños pulsos de presión del DiI diluido.

En la actualidad, existen otros métodos para el marcaje de esta circuitería. En este estudio, el segundo método (marcaje) utilizado es mediante la inyección iontoforética (eléctrica) de la Biocitina. Este es un marcador que penetra dentro de la célula (intracelular) de manera pasiva y en tejido vivo y además, es utilizado como trazador anterógrado exclusivamente de una proyección. Se trata de una técnica que implica una resección laboriosa y costosa, pero tiene también sus ventajas en cuanto a tiempo y precisión del tracto a estudiar (ver **Tabla 1**).

Finalmente, los resultados obtenidos no son los esperados y, tras tres intentos mediante la inyección de biocitina, no hemos tenido un resultado exitoso. Tras el revelado nos hemos encontrado frente a la extensión de la biocitina por el tejido y no concentrada en la región mamilar como teníamos previsto. Esto es debido a que posiblemente el capilar con el que se hace la inyección estuviera roto y que, al inyectar la biocitina no se mantuviera en el sitio, sino que rebosara por el tejido o el medio de cultivo con lo que llevó a una contaminación de todo el material durante el tiempo de incubación en la estufa de 37°C.

En este estudio, hemos podido confirmar la mayor eficacia del DiI frente a otra técnica de marcaje como es la inyección iontoforética de la Biocitina. Los cristales DiI, al colocarlos en la región mamilar, podemos observar cómo traza la membrana lipídica de las neuronas en ambos sentidos; tanto hacia las terminaciones axonales como hacia el soma neuronal. Esta nos ofrece una imagen selectiva y precisa del tracto estudiado, permitiendo así realizar una descripción más exacta de la citoarquitectura del complejo. Sin embargo, y por falta de tiempo nos quedamos con ganas de valorar la eficacia de la inyección de iontoforesis y, por lo tanto, de saber las posibles ventajas que ofrece esta técnica según he leído en la literatura ⁽¹⁴⁾.

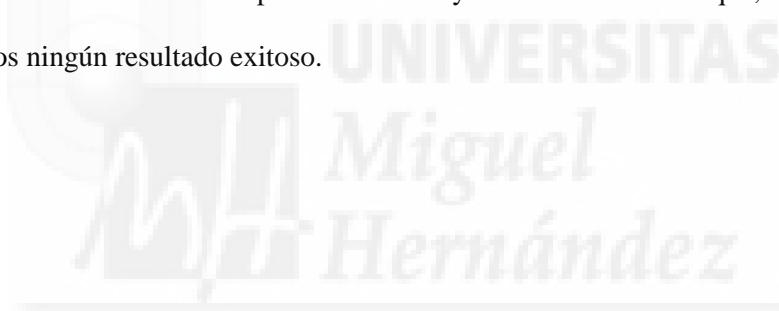
Tabla 1: Lista de características de los marcajes utilizados en este estudio.

Características	Cristales de DiI	Biocitina
Método de disolución	Alcohol	Agua
Estado de la muestra biológico	Fijado + in vivo	In vivo
Color	Rojo	Transparente
Estado	Cristal	Líquido
Experimentación	Aguja de tungsteno	Iontoforesis
Ubicación del marcador	Membrana lipídica	Intracelular (citoplasma)
Tipo de marcaje	Anterógrado y retrógrado	Retrógrado
Detección de los sustratos	Lámpara Ultravioleta (con filtros)	Cromógeno (DAB)
Tiempo de incubación	7 – 8 días	8 horas

CONCLUSIÓN:

En este estudio experimental de análisis del desarrollo del tracto mamilotalámico utilizando dos técnicas de marcaje distintas podemos concluir que:

- 1) El tracto mamilotalámico se desarrolla en el ratón a partir de 15 días embrionarios y no llega a su diana, el tálamo anterior, hasta estadios perinatales.
- 2) Los cristales de DiI son un buen método de estudio de la tractografía específica de este tracto, puesto que proporcionan una imagen precisa a nivel microscópico trazando el camino preciso que estos axones realizan durante su desarrollo.
- 3) La implantación de cristales de DiI conlleva un mayor tiempo en el proceso de incubación, pero, ha mostrado ser más simple frente a la inyección iontoforética que, tras tres intentos, no obtuvimos ningún resultado exitoso.



BIBLIOGRAFÍA:

- 1) Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M. Bulbo raquídeo bajo. En: Puelles López L, Martínez Pérez S, Martínez de la Torre M, editores. Neuroanatomía. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.
- 2) Perea-Bartolomé. M. V. y Ladera-Fernández, V. (2004). El tálamo: aspectos neurofuncionales. Revista de neurología, 38(7), pp. 697 - 693.
- 3) Cristina HB. Dr Christofredo Jakob: Historia de la Escuela Neurobiológica Germano – argentina. Rev. argent. radiol. [Internet]. 2010 [citado 22 de Feb 2018]; 74 (2):1-7. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-99922010000200003
- 4) Van der Werf YD, Witter MP, Uylings HB, Jolles J. Neuropsychology of infarctions in the thalamus: a review. Neuropsychologia. 2000;38:613–627.
- 5) Kim E, Ku J, Namkoong K, Lee W, Lee KS, Park JY, Lee SY, Kim JJ, Kim SI, Jung YC. Mammillothalamic functional connectivity and memory function in Wernicke's encephalopathy. Brain. 2009;132:369–376.
- 6) Aggleton JP, Vann SD, Denby C, Dix S, Mayes AR, Roberts N, Yonelinas AP. Sparing of the familiarity component of recognition memory in a patient with hippocampal pathology. Neuropsychologia. 2005;43:1810–1823.
- 7) Kopelman MD. El síndrome de Korsakoff. Br J Psiquiatría. 1995; 166 (2): 154-173.
- 8) Kopelman MD, Thomson AD, Guerrini I, Marshall EJ. El síndrome de Korsakoff: aspectos clínicos, psicología y tratamiento. Alcohol alcohol 2009; 44 (2): 148-154.
- 9) Hayes SM, Fortier CB, Levine A, Milberg WP, McGlinchey R. Implicit memory in Korsakoff's syndrome: a review of procedural learning and priming studies. Neuropsychology Review. 2012;22(2).

- 10) Oscar-Berman M. Function and Dysfunction of Prefrontal Brain Circuitry in Alcoholic Korsakoff's Syndrome. *Neuropsychol Rev.* 2012.
- 11) Kopelman MD. The Korsakoff Syndrome. *Br J Psychiatry.* 1995a;166:154–17.
- 12) Honig MG and Hume RI (1986) Fluorescent carbocyanin dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long – term cultures. *J. Cell Biol* 103: 171 – 187.
- 13) Godement P, Vanselow J, Thanos S and Bonhoeffer F (1987) A study in development visual systems with a new method of staining neurons and their processes in fiex tissue. *Development* 102: 697 – 713.
- 14) Sarha L, Joseph J, LoTurco, Laura K, Nisenbaum. In vitro biocytin injection into perinatal mouse brain: a method for tract tracing in developing tissue. *Journal of Neuroscience Methods* 97 (2000) 1 – 6.
- 15) Thomson AM, Armstrong WE. Biocytin-labelling and its impact on late 20th century studies of cortical circuitry. *Brain research reviews* (2011) 43 – 53.