



Revista Electrónica de Metodología Aplicada

1998, Vol. 3 nº 1, pp. 30-40

URL:<http://www3.uniovi.es/~Psi/REMA/v3n1/a3v3n1.wp5>

APLICACIONES DE LA ESTEREOLOGÍA EN PSICOBIOLOGÍA.

Azucena Begega *

Rubén Miranda *

Sandra Rubio *

Luis J. Santín **

Marcelino Cuesta ***

Jorge Luis Arias *

Facultad de Psicología

Universidad de Oviedo

e-mail: begega@correo.uniovi.es

* Laboratorio de Psicobiología. Facultad de Psicología. Universidad de Oviedo.

** Departamento de Psicología Básica, Psicobiología y Metodología. Facultad de psicología. Universidad de Málaga.

*** Area de Metodología de las Ciencias del Comportamiento. Facultad de Psicología. Universidad de Oviedo.

ABSTRACT.

The recent applications of the stereology in the neuroscience has permitted to accomplish unbiased estimates of numerous morphologic parameters of the Nervous System. This work intends to analyze the precision of the stereological estimations in two psicobiological studies: numerical and volumetric quantifications of nervous cells applying two stereological techniques: the optical fractionator and the Cavalieri's principle. The precision of these estimates depends on two sources on variation: the biological variation (intrinsic to the object of study) and the stereological (caused by the employed techniques). In the text is discussed how to optimize the efficiency of the estimates attending to these two sources of variation.

Key word: Optical fractionator, Cavalieri, quantitation.

1.- Introducción

En los últimos años ha habido un fuerte avance de los métodos de cuantificación estereológicos. Con ellos, fácilmente se pueden estimar parámetros tales como el volumen de un núcleo cerebral, el volumen de las células nerviosas, la longitud de las prolongaciones neuronales, etc.. Gracias a la aplicación de estos métodos, en el campo de los estudios biológicos y de las neurociencias, se han podido estudiar parámetros morfológicos con una gran precisión y fiabilidad.

La estereología es definida como un conjunto de métodos útiles para obtener información cuantitativa de carácter geométrico-estadístico de un objeto de interés, a partir de

secciones del objeto (Haug, 1986; Cruz- Orive, 1987).

En general, los métodos estereológicos gozan de una serie de ventajas metodológicas y prácticas de indudable interés para el estudio del sistema nervioso. Como ventajas metodológicas se podrían destacar por un lado, que son métodos insesgados, carentes de error sistemático, y por otro que la estimación de los parámetros no está influida ni por la forma del objeto, ni por su distribución y/o tamaño. Además, una clara ventaja metodológica y práctica es que los métodos estereológicos son altamente eficientes. En otras palabras, no exigen un gran esfuerzo para la cuantificación ya que con una muestra muy pequeña de sujetos y pocas secciones (alrededor de 6-7 secciones) se obtienen coeficientes de error y de variación aceptablemente bajos (Royert, 1991; West, 1993).

Alguno de los parámetros estereológicos de interés en los estudios psicobiológicos son la estimación numérica de poblaciones neuronales y gliales y las de volúmenes de estructuras cerebrales. Mediante estos estudios, se ha observado una disminución de neuronas pigmentadas en la sustancia negra en pacientes con Parkinson y en el núcleo basal de Meynert en el caso de pacientes con Alzheimer (Mann and Yates, 1979). En pacientes esquizofrénicos también se ha constatado una reducción de entre un 40%- 50 % en el número neuronal en los núcleos talámicos frente a los sujetos normales. Estos cambios estructurales pueden relacionarse con las disfunciones cerebrales y neurocognitivas observadas en estas patologías (Pakkenberg, 1992). De este modo, la cuantificación del número neuronal y del volumen del área, nos informaría de la existencia de cambios morfofuncionales cerebrales que pudieran relacionarse con deterioros de funciones cognitivas.

Metodológicamente, la estimación del número de células nerviosas en un determinado núcleo, puede realizarse empleando numerosos métodos estereológicos. De ellos, el fraccionador óptico es uno de los más recomendables. Este método se basa en la combinación de un muestreo sistemático de las secciones y el disector óptico (West, Slomianka and Gundersen, 1991; West, 1993b).

Previamente a la aplicación del fraccionador óptico se ha de proceder a una seriación sistemática de la estructura a cuantificar. Esta seriación permite conocer la distancia exacta entre las secciones que después será recogida en el cálculo de los parámetros estereológicos. De entre todas las secciones obtenidas se seleccionarán algunas, sobre las que se realizarán las cuantificaciones. Un requisito importante para realizar las cuantificaciones estereológicas de número neuronal/células nerviosas es el muestreo sistemático de la zona elegida y para ello la orientación de las secciones debe ser al azar (Royert, 1991; West, et al. 1991).

En el muestreo sistemático, la cuantificación no se realiza en todo el tejido sino que se contarán el número de células que se encuentren contenidas en disectores ópticos o cuadrantes (áreas específicas de tejido), que se hallan distribuidos sistemáticamente en una plantilla previamente diseñada. Esta plantilla, inicialmente, se coloca fuera de la zona cerebral de la sección y seguidamente, ésta se desplaza en una dirección determinada a priori hasta que se superpone sobre el núcleo de interés. Posteriormente, se tienen en cuenta sólo las neuronas, células gliales, etc., que se encuentren dentro de los disectores que forman parte de la plantilla; aquellas neuronas/ glías que no se encuentran en los disectores de la plantilla no son

cuantificadas. Así, se evita el sesgo de que el experimentador seleccione las áreas del tejido en las que aparezca la mayor densidad de partículas o aquellas que mejor se visualicen, ya que el conteo depende del lugar en el que se encuentren los disectores. Además el muestreo sistemático no provoca la sobreestimación numérica, pues se evita que un mismo campo sea cuantificado en repetidas ocasiones, como podría suceder con el muestreo al azar (Royert, 1991).

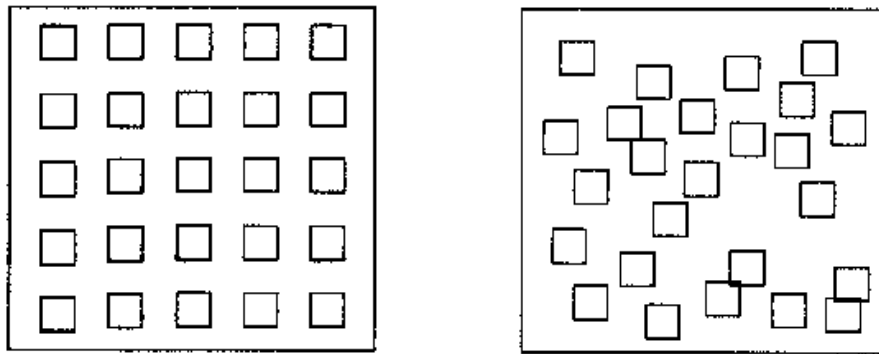


Figura 1. Muestreo sistemático y muestreo al azar (Royert,1991).

El disector óptico es una modificación del disector físico (Sterio,1985) con el que se calcula el número de neuronas contenidas en los disectores de la plantilla. Debido al espesor de las secciones se han de contar las neuronas contenidas en el grosor de los disectores, es decir, se ha de realizar un disección óptica desde el primer enfoque hasta el último, teniendo en cuenta las neuronas observadas a lo largo de los distintos planos de enfoque del tejido. Es necesario, por lo tanto, conocer el grosor exacto de los disectores cuantificados y esto se logra con un dispositivo acoplado al microscopio óptico llamado microcator.

El fraccionador óptico nos ofrece numerosas ventajas a la hora de trabajar; por un lado, los problemas de reducción del tejido debido a su proceso de deshidratación e inclusión previos a la cuantificación, no influyen en las estimaciones además de no ser necesario saber el volumen exacto de la estructura estudiada. Ésto permite eliminar numerosas fuentes de error en nuestros cálculos. Se considera que cuantificando en cada individuo un número de 100-200 neuronas sobre unas 10-20 secciones, es suficiente para obtener unos coeficientes de error aceptables para los estudios histológicos.

Como ya hemos mencionado, otro parámetro de interés en psicobiología, es la estimación del volumen total de áreas cerebrales determinadas. Para las estimaciones volumétricas también será necesario disponer previamente de una seriación de la estructura como en el fraccionador óptico y de una plantilla que en este caso estará formada por cuadrados de área conocida. Esta plantilla se colocará aleatoriamente sobre las secciones de la región de interés y se contará el número de intersecciones que caigan dentro del perfil de la estructura. Posteriormente será aplicado el principio de Cavalieri obteniéndose las estimaciones volumétricas. Este método es recomendado para regiones cerebrales irregulares (Rosen and Harry,1990; Korbo, Pakkenberg, Ladefoged, Gundersen, Arlien-Soborg and Pakkenberg, 1990; Korbo, Andersen, Ladefoged and Moller,1993).

En nuestro estudio pretendemos determinar la precisión de los métodos estereológicos elegidos, además de indicar cómo determinar las fuentes de variación en las estimaciones así como la forma de reducirlas. De esta forma constataríamos la eficacia y relevancia de los métodos estereológicos dentro del campo de las neurociencias.

2.- Cuantificación del volumen y del número de células nerviosas en el cerebro humano

En el primer estudio, hemos estudiado los Cuerpos Mamilares en humanos y los efectos que el envejecimiento ejerce sobre ellos. Se han realizado estimaciones estereológicas del número neuronal y glial totales y el volumen del núcleo mamilar medial. Para ello, hemos empleado dos métodos estereológicos: el fraccionador óptico y el principio de Cavalieri, respectivamente.

Los Cuerpos Mamilares o Tubérculos Mamilares como Cajal (1911) los denominó, forman parte del hipotálamo posterior y es una de las estructuras diencefálicas del sistema Límbico. Participan en la regulación de respuestas neurovegetativas y se han relacionado con la psicosis de Korsakoff. Entre los síntomas que presentan estos pacientes se encuentran severos deterioros de la memoria, recordando mejor aquellos acontecimientos remotos frente a los hechos recientes, apareciendo también alteraciones anímicas como la apatía, desgana, etc... (Kopelman, 1995; Tanaka, Miyazawa, Akaoka and Yamada, 1997).

2.1. Material y método

Los cerebros fueron proporcionados por el Hospital Central de Asturias, N= 15 hombres agrupados en 3 grupos de edad : n = 5 (17- 33 años); n=5 (53-58 años) y el grupo de ancianos n = 5 (72-88 años). Ninguno de los individuos mostró alteraciones neurológicas causantes de su muerte.

Después de la autopsia, los cerebros fueron mantenidos en formaldehído durante varios meses; posteriormente, se seleccionaron los Cuerpos Mamilares de cada cerebro humano para los estudios estereológicos.

Los Cuerpos Mamilares fueron incluidos en parafina y seccionados con un microtomo de rotación (Micron, Alemania). Las secciones de 10 μm de grosor elegidas para la cuantificación fueron entre 6-7 con una distancia entre ellas constante y conocida. Posteriormente se tiñeron con Hematoxilina-Giemsa (Sigma, España).

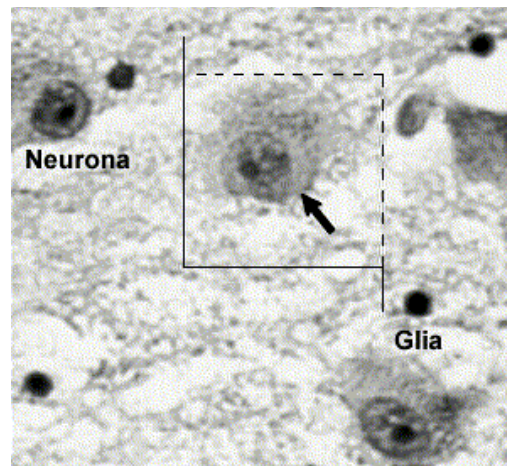


Figura 2. Neurona y astroglia cuantificadas dentro de un disector.

El número total de neuronas fue calculado empleando de la siguiente fórmula:

$$N_{(\text{total})} = F_1 \times F_2 \times Q \times F_3 .$$

F_1 hace referencia al cociente entre el número total de secciones de los Cuerpos Mamilares dividido entre el número empleado para la cuantificación. F_2 es el cociente entre el área total de los Cuerpos Mamilares (cuantificada por Cavalieri) entre el número de disectores cuantificados y el área de cada disector analizada en cada cerebro humano. Por último, F_3 es el cociente entre grosor de la sección cuantificado (en los distintos planos de la misma sección) y el grosor real de la sección. Y el parámetro Q se refiere al número total de neuronas cuantificado por individuo.

Para la estimación del volumen de los Cuerpos mamilares se empleó la misma muestra anteriormente descrita. Los cálculos volumétricos se realizaron sobre 6-7 secciones de los Cuerpos mamilares. Sobre estas secciones se superpuso, sin ninguna orientación pre-seleccionada, una plantilla de puntos. El volumen de núcleo mamilar se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Est}_{(v)} = T \times (a/p) \times \Sigma P.$$

En este caso, T representa la distancia media entre las secciones en donde el núcleo está presente. El parámetro (a/p) se refiere al área asociada con cada punto de la plantilla usada para la cuantificación del volumen. Finalmente ΣP es el número total de puntos cuantificados dentro del núcleo mamilar medial. Seguidamente se calcularon los coeficientes de error. Para ello, hemos utilizado la siguiente fórmula en el caso de las estimaciones volumétricas:

$$CE_{(\text{Volumen})} = \frac{\sqrt{\frac{3A + C - 4B}{12}}}{\Sigma P}$$

en donde ΣP : es la suma del número de puntos contados en las secciones elegidas para análisis cuantitativo; $A = \Sigma P_i^2$; $B = \Sigma P_i P_{(i+1)}$; $C = \Sigma P_{(i)} P_{(i+2)}$.

Para los coeficientes de error de las estimaciones del número neuronal se empleó la misma fórmula.

$$CE_{(N_{total})} = \sqrt{\frac{3A + C - 4B}{12 \sum N}}$$

En donde $\sum N$: es la suma del número neuronal contado en cada sección ; $A = \sum Qi^2$: hace referencia al cuadrado del número neuronal de cada sección; $B = \sum Qi Q_{(i+1)}$; $C = \sum Qi Q_{(i+2)}$.

Por último, se calcularon los coeficientes de variación total CV. Una vez calculadas estas dos fuentes de variación la intraindividual y la inter-individual se realizó un cociente entre CE^2 y CV^2 (West, 1993b).

Grupo	CE	CV	CE^2/CV^2
Jóvenes	neuronas (0.12)	0.49	0.059
	volumen (0.07)	0.28	0.062
	astroglia (0.062)	0.14	0.19
Adultos	neuronas (0.14)	0.45	0.09
	volumen (0.04)	0.19	0.04
	astroglia (0.077)	0.25	0.09
Ancianos	neuronas (0.15)	0.28	0.28
	volumen (0.06)	0.18	0.11
	astroglia (0.057)	0.47	0.14

Tabla 1. Coeficientes de error y variación. Coeficiente de precisión de los métodos estereológicos en el cálculo del número de neuronas, volumen y número de astroglia.

3.- Cálculo del número óptimo de secciones necesarias para las estimaciones de parámetros morfofuncionales

En este trabajo se pretende determinar el número de secciones necesarias en la cuantificación de parámetros morfofuncionales como los organizadores nucleolares (NORs) a fin de obtener unos coeficientes de error y variación aceptables ($\leq 25\%$) en el núcleo cerebral perteneciente al sistema vomeronasal o sistema accesorio olfatorio (bulbo olfatorio accesorio)(BOA) de rata.

Animales: se emplearon ratas macho *Rattus norvegicus* cepa Wistar (250-300grs.) divididos en dos grupos de $n = 7$.

3.1. Material y método

Tras una perfusión vascular, se extrajo el bulbo olfatorio accesorio de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1986). Este núcleo presenta una citoarquitectura similar al bulbo

olfatorio principal, observándose en varias capas concéntricas (plexo neural, capa glomerular, capa mitral, capa plexiforme y capa granular) (Segovia and Guillamón, 1993).

En este estudio se cuantificó la actividad de síntesis protéica de las células de la capa mitral. Para ello, se empleó la tinción de Galocianina crómica, que resalta los núcleos celulares, (Einarson, 1951) combinada con la tinción de impregnación argéntica que resalta los organizadores nucleolares del nucleolo neuronal. Esta capa mitral se encuentra delimitada dorsalmente por la capa plexiforme interna y ventralmente por la capa glomerular. En la capa mitral las neuronas se distribuyen irregularmente, presentando un soma con forma ovoidal o triangular.

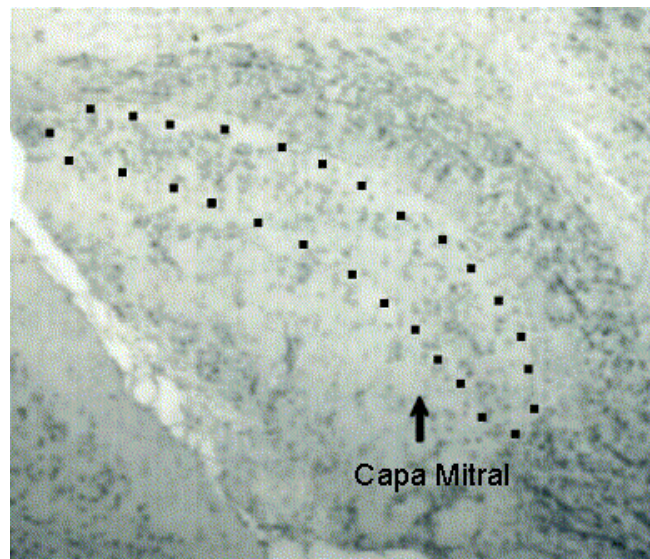


Figura 3. Delimitación de la capa mitral del BOA.

En este núcleo se cuantificaron los organizadores nucleolares (NORs), para evaluar la posible existencia de cambios morfofuncionales en machos castrados (el primer día postnatal) frente a machos adultos normales (grupo control). Estas regiones se encuentran dentro del nucleolo neuronal y presentan variaciones morfológicas en determinadas condiciones. Numerosos estudios han demostrado la sensibilidad de los NORs ante numerosos tratamientos experimentales como condiciones de desnutrición, administración periférica de drogas como diazepam, consumo crónico de alcohol. Con estos tratamientos aparecen variaciones en el área y en el número medio de los NORs /núcleo neuronal. (González-Pardo, Gutiérrez, Menéndez Paterson and Arias, 1994; García Moreno, Santín, Rubio, Cimadevilla, Gonzalez-Pardo and Arias, 1993).

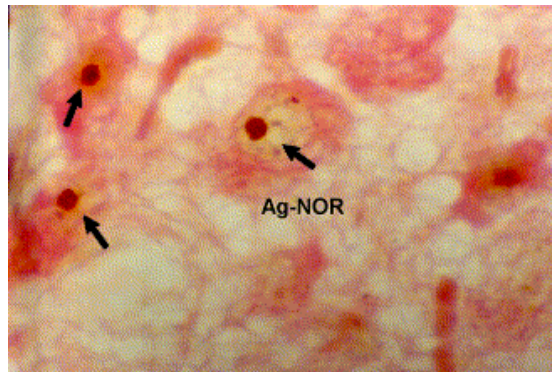


Figura 4. Visualización del Ag-NOR en neuronas.

Para el marcaje de NORs se utiliza la técnica de impregnación argéntica. Las regiones NORs están formadas por proteínas afines a la plata, siendo esta propiedad argirófila la que permite el marcaje de estas regiones con nitrato de plata, de ahí la denominación de Ag-NORs. Posteriormente fueron cuantificados varios parámetros: área de NORs, número medio y área del núcleo neuronal. La cuantificación se realizó en un programa analizador de imágenes (IMCO,2; LEICA QWIN). En este programa se implementó el muestreo sistemático en combinación con el fraccionador óptico.

La cuantificación de los NORs en las neuronas mitrales se realizó en dos fases:

Fase 1.- Inicialmente se seleccionaron 3 secciones del total de secciones obtenidas del BOA por rata. A partir de las cuales se calcularon los parámetros antes descritos en un número de células mitrales (150-160). Se procedió al cálculo del CE y CV y la razón entre CE^2 y CV^2 para cada parámetro.

Fase 2.- Se incrementó en dos secciones el número total de secciones cuantificadas por animal, calculando los coeficientes de error y de variación y la razón entre ellos (coeficiente de precisión). Pretendemos determinar el número de secciones y el número medio de neuronas necesarias para una estimación óptimo.

4.- Resultados

4.1. Número total de células nerviosas y el volumen del núcleo mamilar medial

Se ha empleado un MANOVA con la edad como variable independiente y con 3 variables dependientes (el número neuronal, número de astrocitos y volumen del núcleo mamilar medial). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el número de neuronas de los 3 grupos de edad ($F_{(2,12)} = 1.052$; $p = 0.379$). En el caso de los astrocitos tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($F_{(2,12)} = 0.848$, $p = 0.452$). Asimismo no hay cambios volumétricos dependientes de la edad ($F_{(2,12)} = 0.055$; $p = 0.947$). Los coeficientes de error (CE) éstos oscilan entre 0.04 a 0.14.

4.2. Número óptimo de secciones y neuronas

En el estudio de los posibles efectos de la castración en la funcionalidad de las células mitrales se ha encontrado que tanto el número y el área del NORs son sensibles a los efectos de la castración. Ambos parámetros muestran un descenso estadísticamente significativo (área de NOR: $t=3.126$; $p=0.008$; número de NOR : $p<0.001$). Estos resultados implican una inhibición en la actividad sintética de estas células en respuesta a la castración.

Teniendo en cuenta los coeficientes de error y variación total en el caso de la cuantificación sobre 3 secciones, la variación debida a las métodos estereológicos es de 37%-68%. Estos mismos cálculos realizados en la segunda fase en la que se incrementó el muestreo de la capa mitral al cuantificar dos secciones más, se produce una notable reducción de la variabilidad hasta unos porcentajes en torno al 19%, excepto en el número de NOR.

Parámetro	CE	CV	CE ² /CV ²
Área de Ag-NOR	3 secciones (0.13)	0.2	0.42
	5 secciones (0.08)	0.18	0.19*
Área de Núcleo	3 secciones (0.12)	0.2	0.37
	5 secciones (0.08)	0.18	0.19*
Nº de Ag-NOR	3 secciones (0.13)	0.15	0.68
	5 secciones (0.08)	0.12	0.51*

Tabla 2. Coeficientes de error y variación. Coeficiente de precisión de los métodos estereológicos de la cuantificación del área del núcleo neuronal y del área y nº de Ag-NOR.

5.- Discusión

En nuestro trabajo se pretende determinar la precisión de las estimaciones estereológicas. Es necesario para ello calcular los coeficientes de variación de las estimaciones realizadas. La varianza total observada CV^2 se encuentra formada por dos factores: uno que corresponde a la variabilidad individual, inherente o biológica, ICV^2 y el otro factor es el que corresponde a la variabilidad de las estimaciones estereológicas, CE^2 , es decir, $CV^2 = ICV^2 + CE^2$ (West, 1993b). Es necesario, en todo estudio estereológico, conocer cuál es la contribución de las cuantificaciones estereológicas a la varianza total. Si se obtiene un ICV^2 elevado (alta variabilidad entre los sujetos) el mejor modo para disminuirlo es incrementar el número de individuos de la muestra; pero si es el CE^2 (variación intraindividual) el que tiene más peso sobre la varianza total observada, indica que el muestreo estereológico no es el idóneo y la solución sería incrementar los campos / disectores muestreados o bien el número de secciones muestreadas. De este modo disminuirá la variabilidad intraindividual como hemos demostrado al incrementar en dos secciones la cuantificación del núcleo vomeronasal.

La razón CE^2/ CV^2 deberá ser inferior a 0.25 puesto que este valor nos indica la precisión del método estereológico empleado (West 1991, 1993). En nuestro caso, cuando se cuantifican únicamente 3 secciones, las estimaciones estereológicas contribuyen entre el 37%

y 68% a la variabilidad total observada; por tanto en algunos casos el factor estereológico es la fuente de variación más importante. Posteriormente un incremento de dos secciones a muestrear, provoca un incremento de la precisión de las estimaciones que se refleja en la disminución de la razón CE^2/CV^2 al valor 0.19; siendo en este caso la variabilidad biológica (ICV^2) el factor que más peso tiene sobre la variabilidad total. Sin embargo, hay que indicar que en el caso del parámetro número medio de Ag-NORs/ núcleo neuronal el coeficiente de precisión (CE^2/CV^2) es superior a 0.25 y por tanto se necesitaría aún un mayor número de secciones para poder obtener una mejora en la precisión de la estimación estereológica.

En neurobiología se ha considerado que la mayor contribución a la variación total viene determinada por las diferencias interindividuales. Este hecho se constata en el estudio que hemos realizado con sujetos humanos; pero, en el segundo trabajo son las estimaciones estereológicas, las que en un primer momento aportan un mayor porcentaje de variabilidad a las medidas obtenidas (68%). Por ello, consideramos imprescindible una vez obtenidos los datos, calcular las fuentes de variación y su contribución a la varianza total observada para poder determinar cuál es el peso/importancia de cada una, y por otra parte, incrementar o bien el número de sujetos de las muestras, si la variabilidad biológica sea la fuente de mayor peso, o bien incrementar el número de secciones muestreadas, si son las mediciones estereológicas las que contribuyen en mayor grado a la variabilidad total.

En muchos casos se considera que la cuantificación entre 100-200 células es suficiente para obtener coeficientes de error adecuados. En nuestro caso con 3 secciones se han cuantificado aproximadamente 167 neuronas. Al incrementar la muestra de secciones cuantificadas se han contado 300 neuronas aproximadamente. Con este nuevo valor numérico sí se logra una reducción considerable de las fuentes de error. De este modo se constata que no se puede fijar a priori el número idóneo de células a cuantificar, sino que se han de tener en cuenta las variaciones biológicas y estereológicas para hallar los tamaños muestrales adecuados (sujetos y secciones) para realizar las estimaciones estereológicas.

6.- Referencias

- Cajal S.R. (1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Vol 2. Madrid: Instituto Ramón y Cajal.
- Cruz-Orive, L.M. (1987). Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: the selector. *Journal of Microscopy*, 145,121-142.
- Einarson, L. (1951). On the theory of gallocyenin-chromalum staining and its application for quantitative estimation of basophilia. A selective staining for exquisite progressivity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*, 28, 82-102.
- García-Moreno, L.M., Santín, L.J., Rubio, S., González Pardo, H. and Arias, J.L. (1993). Effects of the ethanol and diazepam on Ag-NORs neuronal activity in the medial mammillary nucleus. *Psicothema*, 58 (1),125-133.
- González-Pardo, H., Gutierrez, J.M., Menéndez-Patterson, A. and Arias, J.L. (1994). Postnatal development of the argyrophilic nucleolar organizer regions in the mammillary body of undernourished rats. *Brain Research*, 654, 75:80.
- Haug, H. (1986). History of Neuromorphometry. *Journal of Neuroscience Methods*, 18,1-17.
- Kopelman, M.D. (1995). The Korsakoff syndrome. *British Journal Psychiatry*, 166, 154-173.

- Korbo, L., Pakkenberg, B., Ladefoged, O., Gundersen, H.J.G., Arlien-Soborg, P. and Pakkenberg, H. (1990). An efficient method for estimating the total number of neurons in rat brain cortex. *Journal of Neurosciencie Methods*, 31, 93-100.
- Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O. and Moller, A. (1993). Total number of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Research*, 609, 262-268.
- Mann, D.M.A. and Yates, P.O. (1979). The effects of aging on the pigmented nerve cell of the human locus coeruleus and substantia nigra. *Acta Neuropathologica*, 47, 93-97.
- Pakkenberg, B. (1992). Stereological quantitation of human brains from normal and schizophrenic individuals. *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, 137, 20-33.
- Paxinos, G. and Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic Press.
- Rosen, G.D. and Harry, J.D. (1990) . Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *Journal of Neuroscience Methods*, 35, 115-124.
- Royert, J.P. (1991). Stereology: a method for analyzing images. *Progress in Neurobiology*, 37, 433-474.
- Segovia, S. and Guillamón, A. (1993). Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Research Reviews*, 18, 51-74.
- Sterio, D.C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, 134, 127-136.
- Tanaka, Y., Miyazawa, Y., Akaoka, F. and Yamada, T. (1997). Amnesia following damage to the mammillary bodies. *American Academy of Neurology*, 48, 160-165.
- West, M.J. and Gundersen, H.J.G. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the Human Hippocampus. *J. Comp. Neurol.*, 296, 1-22.
- West, M.J., Slomianka, L. and Gundersen, H.J.G. (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *The Anatomical Record*, 231, 482-497.
- West, M.J. (1993). New stereological methods for counting neurons. *Neurobiology of Aging*, 14, 275-285.
- West, M.J. (1993b). Regionally specific loss of Neurons in the aging human Hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 14, 287-293.
- Wilkinson, A. and Davies, J. (1978). The influence of age and dementia on the neuron population of the mamillary bodies. *Age and Ageing*, 7, 151-159.