

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**



**MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN NEUROCIENCIAS**  
*2018-2019*

**EFFECTOS DEL ESTRÉS TEMPRANO SOBRE EL  
CEREBELO**

**EFFECTS OF EARLY STRESS ON THE CEREBELLUM**

Trabajo empírico

**ALBA GUTIÉRREZ MENÉNDEZ**

Oviedo, junio 2019



## Índice

1. Resumen.....	4
2. Abstract .....	5
3. Introducción .....	6
4. Materiales y método.....	9
4.1 <i>Sujetos</i> .....	9
4.2 <i>Procedimiento</i> .....	10
4.2.1 Procedimiento de SM.....	10
4.2.2 Entrenamiento de memoria de referencia espacial en el MWM.....	10
4.3 <i>Obtención de los tejidos</i> .....	11
4.4 <i>Procesamiento histológico</i> .....	12
4.5 <i>Procedimientos de cuantificación</i> .....	12
4.6 <i>Análisis estadísticos</i> .....	14
5. Resultados .....	16
5.1 <i>Memoria de referencia en el MWM</i> .....	16
5.2 <i>Actividad COX</i> .....	20
5.3 <i>Actividad c-Fos</i> .....	22
6. Discusión.....	24
7. Referencias.....	29
8. Anexos.....	35

## 1. Resumen

Una situación de estrés temprano incrementa el riesgo de anomalías en el desarrollo encefálico y está asociado con trastornos psicológicos. La separación maternal es un modelo animal establecido de estrés temprano que produce cambios en el desarrollo del Sistema Nervioso Central. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la separación maternal en ratas sobre el cerebelo, tanto a nivel conductual como fisiológico. Para ello, se emplearon 35 ratas, un grupo compuesto por machos (n=8) y hembras (n=7) fue sometido a separación maternal durante 21 días y el resto (9 machos y 8 hembras) constituyó el grupo control. La memoria de referencia espacial fue evaluada mediante el Laberinto acuático de Morris y, empleando la técnica histoquímica de la citocromo c-oxidasa y la inmunocitoquímica de la c-Fos, se determinó la actividad metabólica y la activación de genes de expresión temprana respectivamente. Los resultados mostraron que ambos grupos presentaron una adecuada memoria espacial. A pesar de no existir diferencias conductuales, el grupo experimental mostraba una menor actividad metabólica en el núcleo medial del cerebelo, así como un menor número de células positivas c-Fos en los tres núcleos profundos cerebelosos. Dichos resultados ponen de relieve la necesidad de un mayor estudio de los efectos del estrés temprano en el cerebelo.

**Palabras clave:** cerebelo, c-Fos, citocromo c-oxidasa, estrés temprano, separación maternal.

**Índice de abreviaturas:** COX: citocromo c-oxidasa; GC: glucocorticoides; INT: núcleo interpósito del cerebelo; LAT: núcleo lateral del cerebelo; MED: núcleo medial del cerebelo; MS21: grupo experimental separación maternal 21 días; MWM: laberinto acuático de Morris; ND: núcleo dentado del cerebelo; NF: núcleo fastigial del cerebelo; OMS: Organización Mundial de la Salud; SM: separación maternal; S.E.M.: error típico.

## 2. Abstract

An early stress situation increases the risk of abnormal brain development and it is associated with psychological disorders. Maternal separation is an established animal model of early stress that produces changes in the development of the Central Nervous System. The objective of this study was to evaluate the effect of maternal separation on the cerebellum in rats, both behaviourally and physiologically. We used 35 rats of which one group, composed of males (n=8) and females (n=7), was subjected to maternal separation for 21 days and the other (9 males and 8 females) was taken as a control group. Spatial reference memory was assessed using Morris Water Maze and the metabolic activity and the expression of immediate early genes were determined, respectively, using the histochemical technique of cytochrome c-oxidase and the immunocytochemistry of c-Fos. Results showed that both groups perform successfully the spatial memory task. Although there were not behavioural differences, the experimental group showed lower metabolic activity in the medial nucleus of the cerebellum, as well as lower number of c-Fos positive cells in the three deep nucleus of the cerebellum. These results highlight the need for more studies on the effects of early stress on the cerebellum.

**Keywords:** cerebellum, c-Fos, cytochrome c-oxidase, early stress, maternal separation.

### 3. Introducción

En la actualidad la violencia se ha convertido en un problema social cuyo incremento es alarmante. Dicho problema afecta a muchos ámbitos, incluida la infancia. Sin embargo, no parece un asunto novedoso ya que existen restos infantiles encontrados de la época romano-cristiana que muestran traumas repetidos no accidentales pudiendo representar el primer caso documentado de maltrato infantil (1)

La OMS definió el maltrato infantil como *“todas las formas de malos tratos físicos y emocionales, abuso sexual, descuido, negligencia o explotación comercial o de otro tipo, que originen un daño real o potencial para la salud del niño, su supervivencia, desarrollo o dignidad en el contexto de una relación de responsabilidad, confianza o poder.”* En el año 2016 en España, se notificaron 17.149 casos de maltrato infantil entre los cuales destaca la negligencia como la tipología de maltrato más frecuente (2)

La negligencia se define como el abandono o descuido de las obligaciones en los cuidados de un infante que conllevan la desatención de sus necesidades básicas (3). El estrés temprano producido en dichas situaciones, hace que sea considerado un factor de riesgo para el desarrollo de ciertas anomalías en la estructura y función cerebral, además de estar asociado con trastornos psicológicos en la adultez (4).

Como respuesta ante situaciones estresantes, se produce la activación del eje hipotalámico-hipofisario- adrenal cuya función continúa con la producción de glucocorticoides (GC) por parte de las glándulas adrenales (5). Los receptores de GC se encuentran distribuidos por todo el encéfalo (6), siendo prácticamente ubicuos.

La separación maternal (SM) es un modelo establecido de estrés temprano (7) el cual ha permitido constatar que tras un período de estrés se producen cambios en el

hipocampo y en las regiones frontales, desarrollando déficits cognitivos a largo plazo (4).

A pesar de la existencia de una abundante bibliografía sobre las consecuencias de la SM en el cerebro y en el Sistema Nervioso Central, apenas existen estudios dedicados a examinar la asociación entre la SM y el cerebelo. El cerebelo tiene una densidad muy alta de receptores de GC durante el desarrollo (8) por lo que sería especialmente interesante estudiar los efectos de los GC, producidos tras reiterados eventos de SM, en el cerebelo y en las funciones que este desempeña.

Tradicionalmente, el cerebelo se ha relacionado con el control y la coordinación motora, pero la creciente evidencia experimental indica que el cerebelo está implicado en funciones cognitivas superiores y emocionales tales como procesos de aprendizaje (aprendizajes asociativos, sensorio-motor y condicionamiento emocional) y con procesos de orden superior como es la cognición espacial (9). Estas funciones son posibles gracias a la conexión cerebelo-tálamo-corteza a través de la cual el cerebelo proyecta hacia áreas parietales, temporales y prefrontales de la corteza motora primaria, al giro cingulado y a la región parahipocampal (10). Pacientes con lesiones en el vermis cerebelar y en el lóbulo posterior del cerebelo muestran alteraciones cognitivas y conductuales que afectan a las capacidades ejecutivas, a la fluidez verbal, al razonamiento abstracto y a la organización visoespacial (10). Además, investigaciones recientes, resaltan la importancia que podría tener el cerebelo en el desarrollo de ciertos trastornos psicológicos, señalando al cerebelo como un órgano cognitivo clave (8).

La SM induce un aumento significativo de apoptosis neuronal en el cerebelo de crías de roedor macho (8). Además, hallazgos recientes muestran cómo el cerebelo está involucrado en los sistemas de navegación, en la exploración de un nuevo entorno y en la adquisición del conocimiento espacial en relación con la orientación personal. Dichos

hallazgos proceden de pruebas conductuales realizadas con roedores en el laberinto acuático de Morris (MWM) (11). Ratones cerebeloectomizados muestran alteración de la memoria espacial y ratas con destrucción de la vía olivo-cerebelosa presentan problemas viso-motores y deficiencias en el aprendizaje y la memoria espacial. Dichos datos muestran el papel relevante de la corteza cerebelosa y de sus aferencias en el desempeño de las tareas espaciales (12).

Por consiguiente, debido a la importancia del cerebelo en las funciones cognitivas, el objetivo principal de este trabajo fue el estudio del efecto de la SM en ratas sobre el cerebelo y la evaluación del mismo a dos niveles:

- Conductual, mediante el test de memoria de referencia usando el MWM.
- Fisiológico, mediante el estudio de la actividad metabólica de la corteza y de los núcleos internos del cerebelo, empleando la histoquímica de la citocromo c-oxidasa (COX), y de la activación de genes de expresión temprana mediante la inmunocitoquímica de la c-Fos.



## 4. Materiales y método

### 4.1 Sujetos.

Fueron utilizadas 32 ratas adultas de la cepa Wistar de ambos sexos las cuales fueron alojadas en jaulas de plástico (Tecniplast-Letica, Madrid) cuyas dimensiones eran 34x20x21 cm y fueron mantenidas en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C, 65-70% de humedad y tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua.

Con el fin de estudiar el efecto de la SM en el cerebelo y examinar cómo afecta diferencialmente a ambos sexos, los animales fueron divididos en 4 grupos: dos grupos controles, uno compuesto por ratas macho (n=9) y otro compuesto por ratas hembras (n=8) y dos grupos experimentales los cuales fueron sometidos a SM durante 21 días, el primero constituido por ratas macho (machos MS21) (n=8) y el segundo por ratas hembras (hembras MS21) (n=7).

La manipulación animal y los procedimientos utilizados en este estudio fueron realizados de acuerdo con las directrices de la Directiva del Parlamento Europeo y el Consejo de la Unión Europea 2010/63/UE. La Legislación Nacional, de acuerdo con esta Directiva, se define en el Real Decreto N° 53/2013 relativo al empleo de animales de investigación. El estudio fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Oviedo.

## 4.2 Procedimiento.

### 4.2.1 Procedimiento de SM.

Las camadas fueron asignadas al azar a dos grupos, control y experimental. En el día postnatal 1 los animales de cada camada fueron contados. Si la camada superaba los 10 animales eran ajustadas a 10 manteniendo el equilibrio entre machos y hembras.

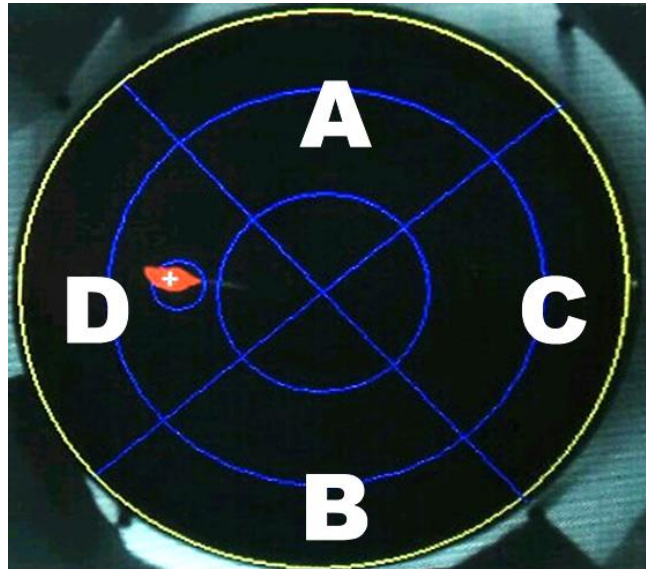
El procedimiento de SM llevado a cabo fue el descrito por Banqueri, M et al. (13) (*Ver Anexo 1*).

### 4.2.2 Entrenamiento de memoria de referencia espacial en el MWM.

La prueba conductual del MWM se llevó a cabo dos veces, en los días postnatales 35 a 40 (adolescencia) y en los días 95-100 (adulthood) con el fin de evaluar el aprendizaje a largo plazo. Dichas pruebas fueron realizadas entre las 10:00 am y las 14:00 pm siguiendo procedimientos idénticos (*Ver Anexo 2*) (*Figura 1 y 2*).



**Figura 1.** Laberinto acuático de Morris (MWM). Tanque circular situado en el centro de una sala iluminada rodeado por pistas distales aloécnicas con el fin de guiar el animal hacia la plataforma.



**Figura 2.** Esquema de los cuadrantes imaginarios (A, B, C y D) del MWM usados para llevar a cabo el procedimiento. Imagen extraída del programa EthoVision Pro.

### **4.3 Obtención de los tejidos.**

#### *4.3.1. Sacrificio.*

El sacrificio de los animales fue realizado mediante el método de decapitación 90 minutos después de la finalización del último ensayo en el MWM. En ese momento fueron extraídos los encéfalos, pesados en una balanza de laboratorio (Shimadzu, modelo AUW220D) y seccionados, separando cerebro y cerebelo.

#### *4.3.2. Conservación de órganos.*

Los cerebelos extraídos fueron congelados mediante la utilización de isopentano (Sigma-aldrich, Madrid, España) y a continuación fueron almacenados en congelador a -40°C.

#### 4.3.3. *Procesamiento del tejido.*

Los cerebelos congelados fueron cortados usando un criostato (LEICA CM1900) a una temperatura aproximada de -15°C y con un grosor de 30µm. De cada cerebelo fueron realizadas dos series de secciones, una para realizar la técnica histoquímica COX y la otra destinada a la inmunocitoquímica de la c-Fos.

### **4.4 Procesamiento histológico.**

#### 4.4.1. *Tinción histoquímica COX.*

El procedimiento llevado a cabo para el tratamiento del tejido fue el descrito por Rubio, S. et al. (14) (*Ver Anexo 3*).

#### 4.4.2. *Tinción inmunocitoquímica de la proteína c-Fos.*

El procedimiento llevado a cabo para el tratamiento del tejido fue el descrito por Méndez, M. et al. (15) (*Ver Anexo 4*).

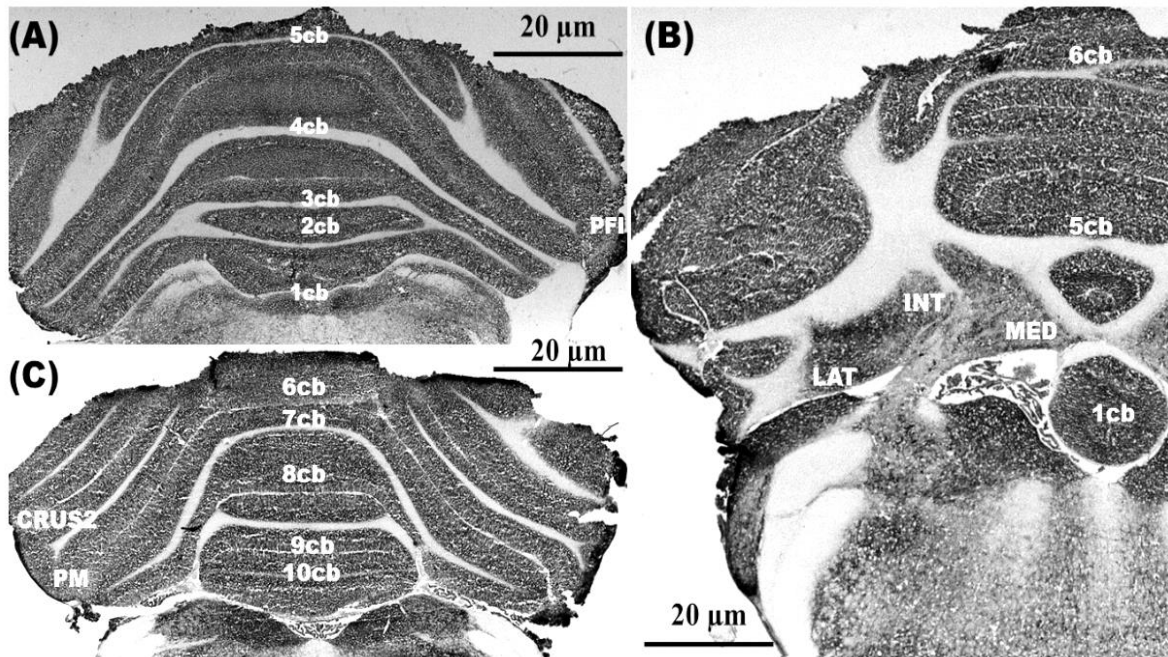
### **4.5 Procedimientos de cuantificación.**

#### 4.5.1. *Cuantificación de la actividad metabólica del cerebelo.*

La cuantificación de la actividad de la COX fue realizada mediante un análisis densitométrico analizando las imágenes de las regiones de interés de los cerebelos siguiendo el procedimiento descrito por Banqueri, M. et al. (16) (*Ver Anexo 5*). Para ello fue utilizado un ordenador equipado con el software de análisis específico MCID Core 7.0 (MCID, Interfocus Imaging Ltd., Linton, Inglaterra).

Las estructuras objeto de estudio, definidas según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (17), fueron la corteza anterior del cerebelo, bregma -10.08mm (Figura 3A),

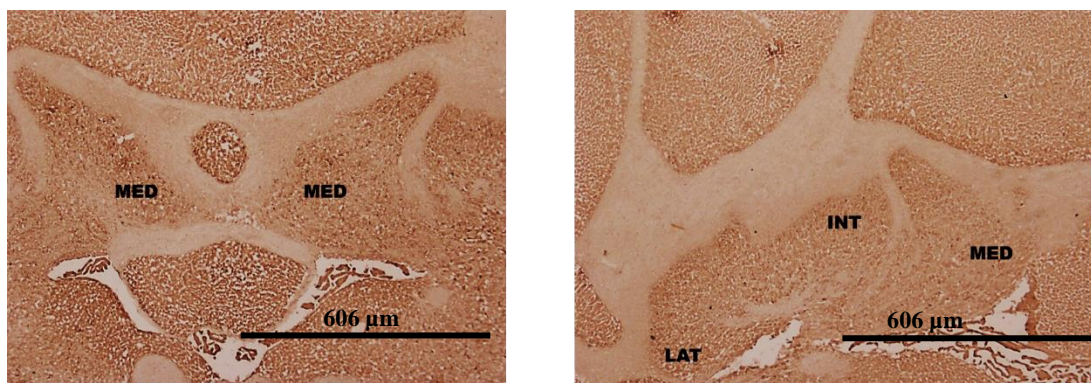
la corteza media y los núcleos internos del cerebelo, bregma -11.40mm (Figura 3B) y la corteza posterior, bregma -12.84mm (Figura 3C).



**Figura 3.** Regiones de cuantificación de la actividad citocromo c-oxidasa (COX) en el cerebelo: (A) Cortezas anteriores del cerebelo. (B) Cortezas y núcleos localizados en la parte media del cerebelo. Núcleo medial (MED); núcleo interpósito (INT) y núcleo lateral (LAT). (C): Cortezas posteriores del cerebelo.

#### 4.5.2. Cuantificación de la proteína c-Fos.

El número total de núcleos positivos para la proteína c-Fos fueron cuantificados en 3 secciones con 60 µm de distancia entre ellas localizadas en el bregma -11.40mm (Figura 4) según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (17). Las regiones cuantificadas en dicho bregma fueron: el núcleo medial (MED), el núcleo interpósito (INT) y el núcleo lateral (LAT).



**Figura 4.** Regiones de cuantificación de células positivas c-Fos.

La cuantificación fue realizada mediante un muestreo sistemático de cada una de las regiones seleccionadas tal y como fue descrito por Méndez, M. et al. (15) (*Ver Anexo 6*). El conteo de los núcleos positivos de c-Fos fue realizado utilizando un microscopio (Leica DFC490) acoplado a un ordenador con el programa informático *Leica application suite* (Leica, Alemania).

#### **4.6 Análisis estadísticos.**

Los datos obtenidos en este trabajo fueron analizados mediante el software estadístico SigmaStat (Systat Software Inc. Versión 3.0., California). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

##### *4.6.1. Memoria de Referencia espacial en el MWM.*

Respecto a las pruebas conductuales realizadas, en primer lugar, se analizaron las latencias de escape hacía la plataforma oculta usando un ANOVA intrasujeto de un factor para cada grupo y día. Cuando encontramos diferencias, el test de Tukey se empleó con el fin de realizar comparaciones múltiples. Empleamos la prueba no paramétrica para medidas repetidas de Friedman cuando no se cumplía la asunción de normalidad. El análisis de la permanencia en cada uno de los 4 cuadrantes (A, B, C, D) del MWM fue realizado mediante un ANOVA intrasujeto de un factor para cada grupo

y día. Se empleó el test de Tukey como prueba a posteriori, mientras que la prueba de Friedman se utilizó en caso de incumplimiento de la normalidad.

#### 4.6.2. *Actividad COX.*

La actividad metabólica de las regiones cerebelosas fue evaluada mediante un ANOVA de dos factores [*Tratamiento* (Control, MS21) x *Sexo* (M, H)], empleando el test de Tukey como prueba a posteriori para establecer comparaciones.

#### 4.6.3. *Actividad c-Fos.*

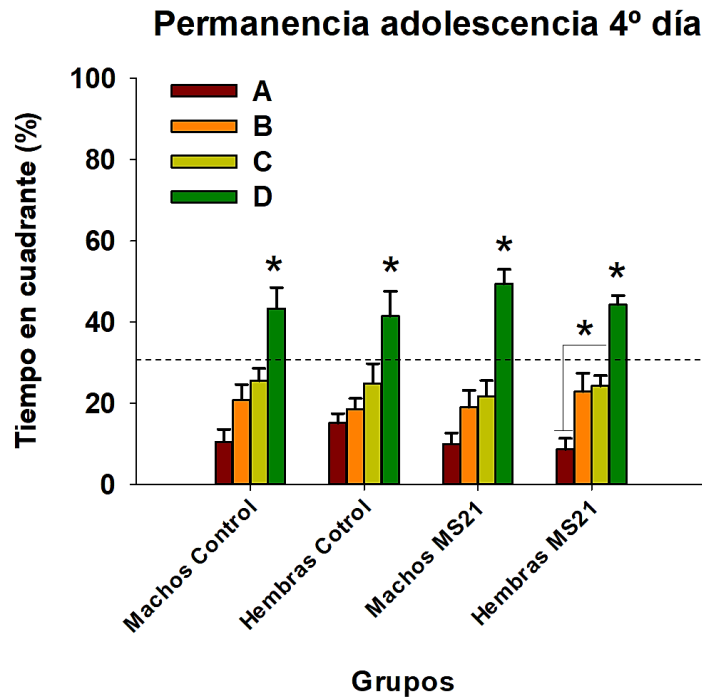
El número de células positivas para la c-Fos fue expresado como el promedio de células positivas de c-Fos/ $\mu\text{m}^2$  para las 3 secciones consecutivas de cada región cerebelosa explorada. Con este valor realizamos un ANOVA de dos factores [*Tratamiento* (Control, MS21) x *Sexo* (M, H)], utilizando el método Holm-Sidak para efectuar las comparaciones múltiples.

## 5. Resultados

### 5.1. Memoria de referencia en el MWM.

En cuanto a la evaluación de la memoria de referencia en la adolescencia, se muestran únicamente los resultados obtenidos el último día, el cuarto día, con el fin de observar si ha existido aprendizaje. El análisis de dichos resultados mostró como el grupo machos control presentaban diferencias estadísticamente significativas entre los cuadrantes ( $F_{(3,21)} = 9.395, p < 0.001$ ) siendo la permanencia en el cuadrante D superior al 30% del tiempo total del ensayo, superior a 7,5s. La permanencia en el resto de cuadrantes no superó dicho criterio. Mismos resultados se encontraron en el grupo hembras control ( $F_{(3,21)} = 5.584, p = 0.006$ ); en el grupo de machos MS21 ( $F_{(3,21)} = 16.580, p < 0.001$ ) y en el grupo hembras MS 21 ( $F_{(3,21)} = 16.302, p < 0.001$ ). En este último grupo también se encontraron diferencias significativas entre el cuadrante A con respecto al B y al C, existiendo una menor permanencia en el cuadrante A. Estos resultados muestran como todos los grupos aprendieron correctamente la tarea ya que todos ellos permanecieron un porcentaje mayor al 30% del tiempo total (7,5s) en el cuadrante D (objetivo) en comparación con el resto de cuadrantes (Figura 5).

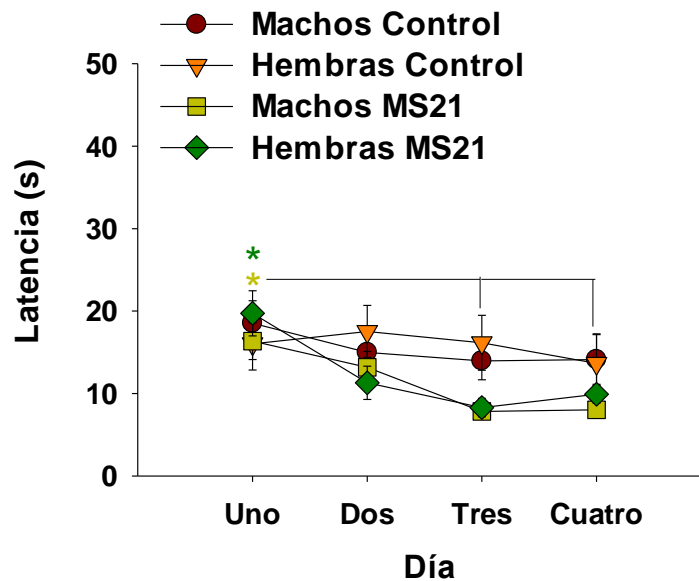




**Figura 5.** Permanencia de los grupos controles y experimentales adolescentes en los diferentes cuadrantes (A, B, C, D) el último día del test. D es el cuadrante reforzado. La probabilidad aleatoria o de azar (permanencia inferior o igual al 30% de tiempo en cada cuadrante) está representada con una línea discontinua. \* $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.E.M.

Respecto a la evaluación de la memoria de referencia en la adultez, el análisis de las latencias mostró que no existían diferencias significativas a lo largo de los días en el grupo machos control ( $\chi^2_{(3)} = 0.000$ ,  $p = 1.00$ ) ni en el de las hembras ( $\chi^2_{(3)} = 4.146$ ,  $p = 0.246$ ), pero sin embargo si existían diferencias en el grupo machos MS21 ( $\chi^2_{(3)} = 14.169$ ,  $p = 0.003$ ) y también en el de hembras MS21 ( $F_{(3,30)} = 8.262$ ,  $p < 0.001$ ). En el grupo compuesto por machos las diferencias de latencias se dieron en el primer día cuando se comparaba con el tercero y con el cuarto y en el caso de las hembras las diferencias se dieron entre el primer día con el resto de los días (Figura 6).

## Latencias de escape



**Figura 6.** Latencias de escape a lo largo de los cuatro días de entrenamiento en los grupos controles y experimentales, \* $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.E.M.

Respecto al análisis de la permanencia en cuadrantes, el grupo machos control presentó diferencias estadísticamente significativas los cuatro días (Uno:  $F_{(3,27)} = 14.757$ ,  $p < 0.001$ ; Dos:  $F_{(3,27)} = 17.024$ ,  $p < 0.001$ ; Tres:  $F_{(3,27)} = 13.927$ ,  $p < 0.001$ ; Cuatro:  $F_{(3,27)} = 12.078$ ,  $p < 0.001$ ), encontrando una permanencia mayor al 30% del tiempo total (7,5s) en el cuadrante D (cuadrante objetivo) en comparación con el resto de los cuadrantes en los que la permanencia se mantuvo por debajo del criterio de probabilidad de azar (Figura 7A). En el caso del grupo hembras control se encontraron los mismos resultados, existiendo diferencias estadísticamente significativas los cuatro días (Uno:  $F_{(3,18)} = 13.092$ ,  $p < 0.001$ ; Dos:  $F_{(3,18)} = 18.877$ ,  $p < 0.001$ ; Tres:  $\chi^2_{(3)} = 13.870$ ,  $p = 0.003$ ; Cuatro:  $F_{(3,18)} = 41.787$ ,  $p < 0.001$ ) permaneciendo todos los días un tiempo superior al establecido (7,5s) en el cuadrante D (Figura 7B).

En cuanto al grupo de machos MS21 se encontraron diferencias significativas todos los días (Uno:  $\chi^2_{(3)} = 19.932$ ,  $p < 0.001$ ; Dos:  $F_{(3,35)} = 13.180$ ,  $p < 0.001$ ; Tres:  $F_{(3,33)} = 8.193$ ,  $p < 0.001$ ; Cuatro:  $F_{(3,33)} = 28.600$ ,  $p < 0.001$ ), existiendo una permanencia superior al 30% del tiempo total únicamente en el cuadrante D. Examinando las diferencias entre cuadrantes, se encontró una mayor permanencia en el cuadrante D con respecto únicamente al cuadrante A el primer día, mientras que en los siguientes días la permanencia en el cuadrante D fue mayor al resto de cuadrantes (Figura 7C). Finalmente, en el grupo hembras MS21 también se encontraron diferencias significativas todos los días (Uno:  $F_{(3,21)} = 9.362$ ,  $p < 0.001$ ; Dos:  $F_{(3,21)} = 13.072$ ,  $p < 0.001$ ; Tres:  $F_{(3,21)} = 12.068$ ,  $p < 0.001$ ; Cuatro:  $\chi^2_{(3)} = 14.550$ ,  $p = 0.002$ ) encontrando, al igual que los machos, una permanencia superior al 30% únicamente en cuadrante D. Examinando las diferencias entre cuadrantes, el primer día existía una mayor permanencia en el cuadrante D en comparación con el resto de los cuadrantes, el segundo día había una mayor permanencia en D en comparación con el cuadrante A y B y en el tercero existía una mayor permanencia en D cuando se comparaba con A y C. El cuarto día únicamente existía mayor permanencia en D cuando se comparaba con B (Figura 7D).

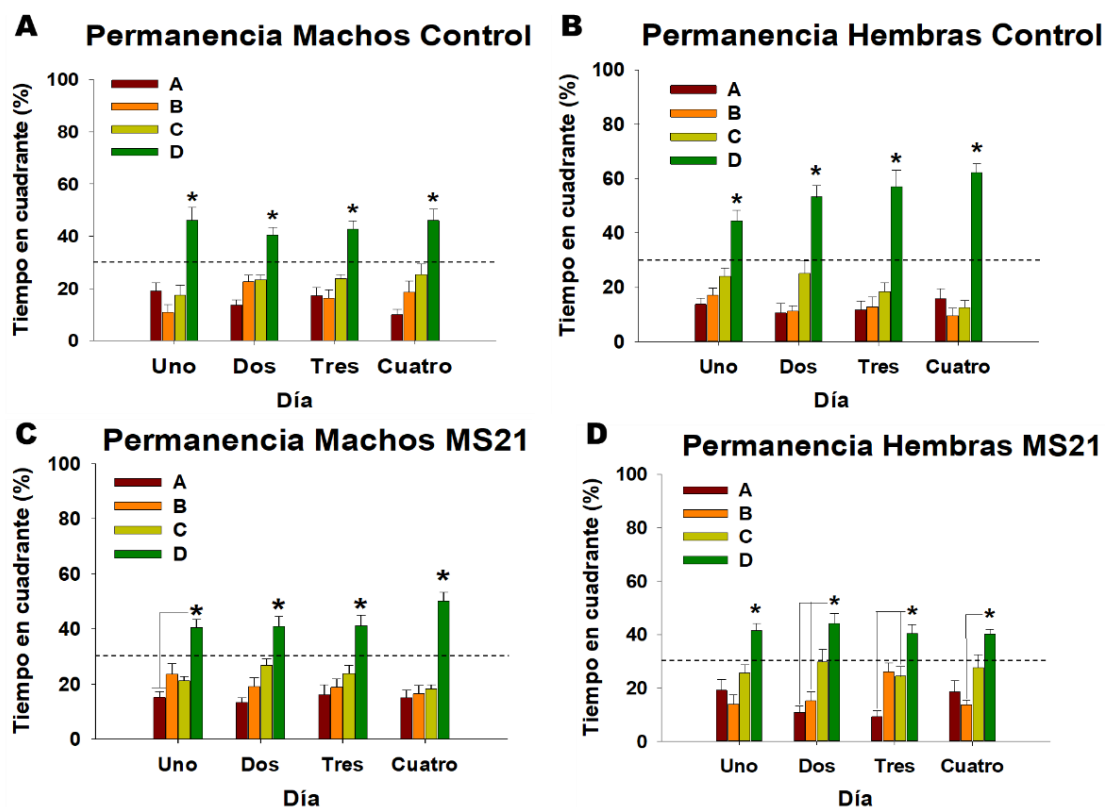
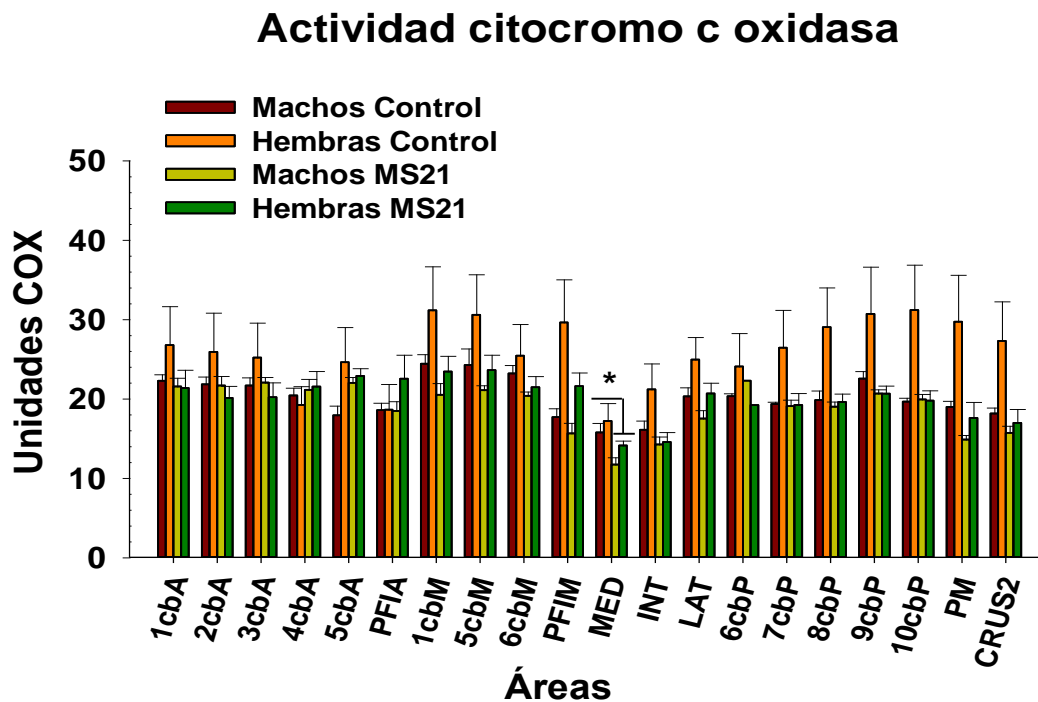


Figura 7. Permanencia de los grupos controles y experimentales en los diferentes cuadrantes (A, B, C, D) en la adultez. D es el cuadrante reforzado. La probabilidad aleatoria o de azar (permanencia inferior o igual al 30% de tiempo en cada cuadrante) está representada con una línea discontinua. \* $p < 0.05$ . Media  $\pm$  S.E.M.

## 5.2. Actividad COX.

La densitometría óptica analizada de las diferentes partes de interés del cerebelo no mostró diferencias entre los grupos en la corteza anterior (1cbA:  $F_{(1,23)}=1.011$ ,  $p=0.325$ ; 2cbA:  $F_{(1,23)}=1.011$ ,  $p=0.325$ ; 3cbA:  $F_{(1,23)}=0.732$ ,  $p=0.401$ ; 4cbA:  $F_{(1,19)}=0.587$ ,  $p=0.453$ ; 5cbA:  $F_{(1,10)}=1.23$ ,  $p=0.733$ ; PF1a:  $F_{(1,15)}=0.520$ ,  $p=0.482$ ). Tampoco existían diferencias en las cortezas de la parte media del cerebelo ni en los núcleos interpósito y lateral (1cbM:  $F_{(1,23)}=2.625$ ,  $p=0.119$ ; 5cbM:  $F_{(1,23)}=2.215$ ,  $p=0.150$ ; 6cbM:  $F_{(1,14)}=0.974$ ,  $p=0.340$ ; PF1m:  $F_{(1,13)}=0.938$ ,  $p=0.350$ ; INT:  $F_{(1,23)}=3.728$ ,  $p=0.066$ ; LAT:  $F_{(1,23)}=3.170$ ,  $p=0.088$ ) pero si se encontraron diferencias en el núcleo medial (MED:  $F_{(1,23)}=5.117$ ,  $p=0.033$ ) donde la

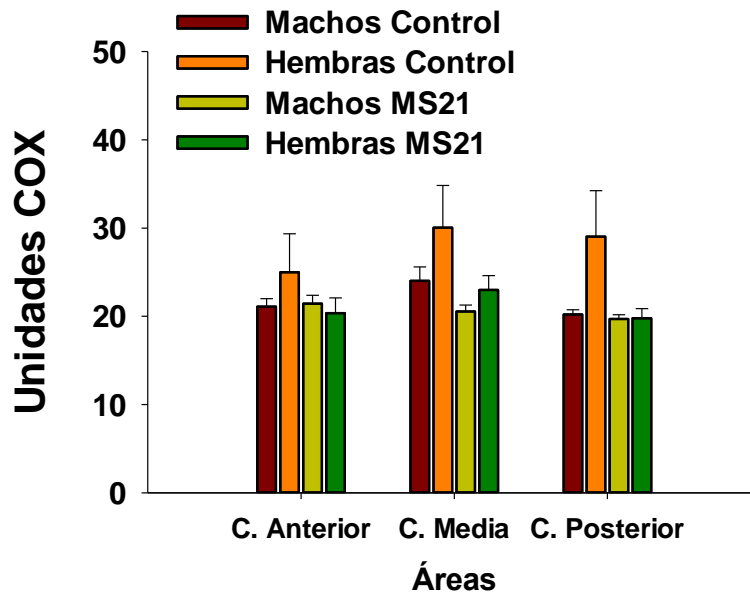
actividad metabólica del grupo experimental era significativamente menor que la del grupo control. Por último, no existían diferencias significativas en la corteza posterior del cerebelo (6cbP:  $F_{(1,3)}= 0.0312, p=0.871$ ; 7cbP:  $F_{(1,20)}= 1.200, p=0.286$ ; 8cbP:  $F_{(1,24)}= 2.898, p=0.102$ ; 9cbP:  $F_{(1,24)}= 2.859, p=0.104$ ; 10cbP:  $F_{(1,24)}= 2.683, p=0.114$ ; PM:  $F_{(1,21)}= 3.948, p=0.060$ ; CRUS2:  $F_{(1,20)}= 3.131, p=0.092$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Unidades de actividad citocromo c oxidasa (Media  $\pm$  S.E.M) en los grupos controles y MS21 en las regiones de interés del cerebelo. \* $p < 0.05$ .

A continuación, se tomaron las cortezas en conjunto y se analizó si existían diferencias entre las cortezas anteriores, medias y posteriores de ambos grupos, no encontrándose diferencias en ninguna de dichas subdivisiones cerebelosas (C. Anterior:  $F_{(1,23)}= 0.651, p=0.428$ ; C. Media:  $F_{(1,23)}= 2.856, p=0.105$ ; C. Posterior:  $F_{(1,24)}= 2.505, p=0.127$ ) (Figura 9).

## Actividad COX

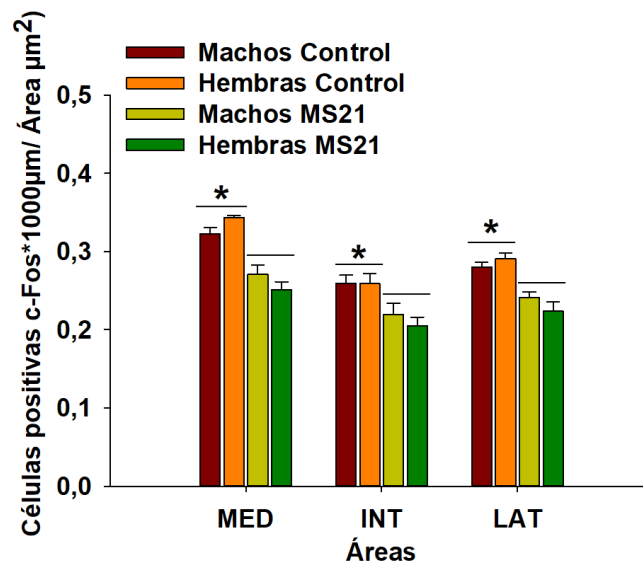


**Figura 9.** Unidades de actividad citocromo c oxidasa (Media  $\pm$  S.E.M) en los grupos controles y MS21 tomando el conjunto de cortezas cerebelosas.

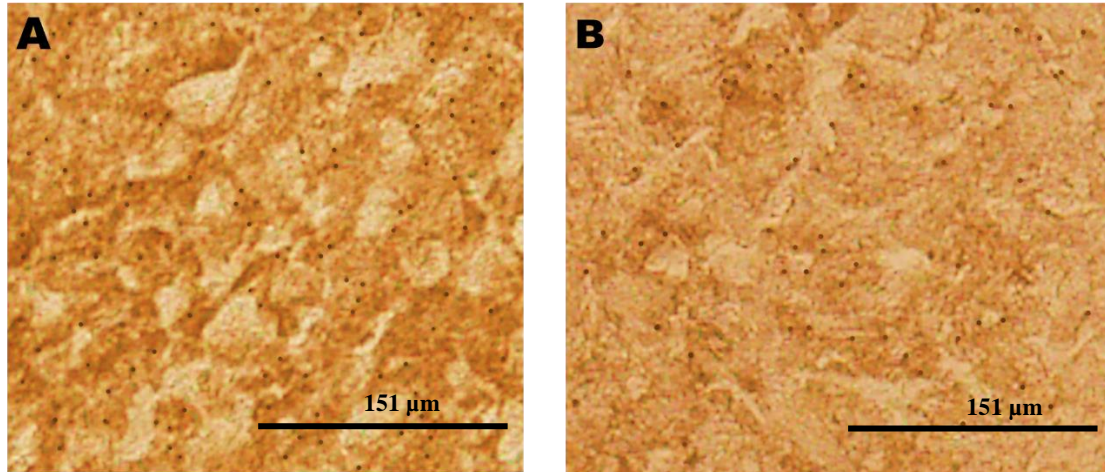
### 5.3. Actividad c-Fos.

Los resultados del ANOVA mostraron diferencias significativas entre los grupos en el núcleo medial (MED:  $F_{(1,21)} = 69.148$ ,  $p < 0.001$ ), en el núcleo interpósito (INT:  $F_{(1,21)} = 14.667$ ,  $p < 0.001$ ) y en el núcleo lateral (LAT:  $F_{(1,21)} = 42.037$ ,  $p < 0.001$ ), siendo el grupo experimental el que presentaba un menor número de células positivas c-Fos en todas las estructuras (Figura 10) (Figura 11).

## Actividad c-Fos



**Figura 10.** Número de células c-Fos (células positivas c-Fos / $\mu\text{m}^2$ ) presentes en las zonas medias del cerebelo del grupo control y experimental; \* $p < 0.05$ . Media  $\pm$  SEM.



**Figura 11.** Inmunocitoquímica de la proteína c-Fos. (A): sección cerebelosa del grupo control. (B) Sección cerebelosa del grupo experimental.

## 6. Discusión

El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos del estrés temprano en un modelo animal de SM de 21 días, tanto a nivel conductual como fisiológico.

Conductualmente, se analizó la memoria de referencia espacial. Fisiológicamente, se estudió el metabolismo oxidativo cerebral y la cuantificación de las células positivas para la proteína c-Fos, proteína que expresan los genes de activación temprana.

La exposición a estrés temprano afecta a importantes procesos del desarrollo como la neurogénesis, la poda y la mielinización. Es por ello que se han identificado numerosas consecuencias neurobiológicas tras episodios de estrés temprano que incluyen la reducción del cuerpo calloso, el desarrollo atenuado del hipocampo y la amígdala y una actividad reducida del vermis cerebeloso (18).

La SM es un modelo experimental que priva a las crías de sus madres (19). Dicha separación durante los períodos críticos del desarrollo puede causar la interrupción de la organización citoarquitectónica de varias regiones del encéfalo, incluido el cerebelo (20), induciendo alteraciones conductuales y cognitivas (21).

Numerosos estudios sugieren que tras un protocolo de SM se produce un deterioro de la memoria espacial (22) si la SM se produce durante el periodo crítico de desarrollo del hipocampo, desde el día postnatal 14 al día postnatal 21 (23). En nuestro estudio todos los grupos adultos, tanto controles como experimentales, presentan preservada la memoria de referencia evaluada en el MWM ya que todos ellos cumplen el criterio de aprendizaje (permanencia en cuadrante D superior al 30% del tiempo total). Dichos resultados podrían indicar que no existe una afectación de la memoria espacial y la correcta ejecución de la tarea puede deberse al recuerdo a largo plazo de la posición de la plataforma tras realizar correctamente la prueba en la adolescencia. Así, recordaban



dónde se localiza la plataforma y por ello permanecían más tiempo en el cuadrante de salida. Además, las latencias de los grupos experimentales disminuyeron a lo largo de los días y fueron sutilmente menores que las de los grupos controles lo cual nos indica que su nado fue correcto y su coordinación tampoco estaba afectada. Dichos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios en los que muestran cómo la SM no tuvo efecto sobre el aprendizaje espacial y el recuerdo en el MWM (24).

Numerosas investigaciones han sugerido que el cerebelo está involucrado en el aprendizaje espacial siendo el encargado de la adquisición de las estrategias de exploración (11). En nuestro estudio, las ratas adolescentes fueron capaces de adquirir el aprendizaje espacial de la localización de la plataforma reforzada, por lo que no mostraron alteración en las estrategias de exploración.

Los estudios previos muestran los efectos de la SM sobre el metabolismo oxidativo únicamente del cerebro (25), sin atribuir al cerebelo el papel significativo que tiene en los procesos cognitivos. Este estudio, el cuál evalúa la actividad cerebelosa, permite constatar que, tras un periodo de SM, se producen cambios en el metabolismo oxidativo de áreas concretas. Así pues, el grupo experimental mostró una menor actividad metabólica oxidativa en el núcleo medial del cerebelo. Dicho núcleo también es conocido como núcleo fastigial (NF) y se localiza cerca de la línea media, sobre el techo del cuarto ventrículo (26). Este núcleo participa en el control motor ocular y del eje axial y proximal y regula actividades viscerales tales como la alimentación, la defecación y micción, la circulación y respiración, la inmunidad e, interesantemente, tiene un papel relevante en los estados afectivos y emocionales (26). Además, la creciente evidencia experimental indica que el NF inhibe los procesos apoptóticos producidos tras un accidente isquémico e inhibe reacciones inflamatorias participando en la neuroprotección endógena (26,27). También interviene en los comportamientos

depresivos asociados al accidente isquémico (28). Lesiones en el NF y en el vermis cerebeloso producen una desregulación del estado de ánimo conocido clínicamente como “*síndrome afectivo-cognitivo-cerebeloso*” o “*síndrome de Schmahmann*” (29).

Las neuronas del NF reciben proyecciones aferentes de múltiples estructuras cerebrales tales como el hipotálamo, la formación reticular, el núcleo vestibular, los núcleos pontinos, los núcleos de rafé, etc. e incluso de la médula espinal (28). Además, recibe aferencias inhibitorias del vermis cerebeloso (26), zona del cerebelo que conecta con la corteza motora (30) formando “el cerebelo límbico” (29). Respecto a las eferencias, sus axones se proyectan hacia la formación reticular, el tronco del encéfalo, corteza motora primaria y al hipotálamo (27).

En nuestro estudio hemos encontrado que el grupo experimental presentaba una menor actividad metabólica oxidativa en el NF. Además, este grupo sometido a estrés temprano, tal y como mostraron Banqueri, M. et al. (13), presentaba ansiedad, la cual que puede ser debida a una menor actividad del NF producida por una disfunción de este núcleo tras un período de estrés temprano. Estos resultados concuerdan con los encontrados en otros estudios en los que observaron que la estimulación crónica del NF podría producir una disminución de la ansiedad y un mejor estado de ánimo (29), siendo útil también en pacientes con ciertos trastornos como la depresión. Además, parece existir cierta atrofia cerebelosa en trastornos del estado de ánimo (31). Creciente evidencia científica muestra la existencia de una fuerte asociación entre el estrés temprano y trastornos depresivos, de ansiedad y otros trastornos psicológicos en humanos (32). El desarrollo de dichos trastornos puede deberse a una disfunción en el NF del cerebelo que, tal y como se observó en nuestros animales, esté influyendo en el desarrollo de síntomas afectivos y emocionales.

La cuantificación de las células positivas c-Fos mostró diferencias entre los grupos en los tres núcleos profundos del cerebelo: el núcleo lateral, el núcleo interpósito y el núcleo medial siendo el grupo experimental el que presentaba un menor número de células positivas c-Fos.

El núcleo lateral del cerebelo, también conocido como núcleo dentado (ND), está involucrado en funciones motoras y está fuertemente relacionado con el procesamiento de funciones cognitivas y emocionales. Lesiones en dicho núcleo producen déficits cognitivos en tareas de aprendizaje con roedores. Además su estimulación produce sensaciones subjetivas de miedo (29).

El INT está relacionado con las funciones motoras, concretamente, con el control motor distal. Las lesiones en dicho núcleo producen una reducción del número de linfocitos que sugiere un posible papel del INT en la acción inmunológica (33).

A pesar de encontrar un menor número de células positivas c-Fos en los núcleos cerebelosos de los animales MS21, esto no afectó a la ejecución del MWM y la actividad metabólica oxidativa del ND e INT no difirió con la del grupo control. Dichos genes de expresión temprana se activan ante demandas de aprendizaje y son considerados marcadores de áreas relacionadas con la conducta realizada (34). En nuestro estudio, la reducción de proteína c-fos en NF, INT y ND en el grupo separado en comparación con el control sugiere que, dichos núcleos podrían estar involucrados en otros aspectos conductuales, distintos a la memoria espacial, que no han sido evaluados en este estudio. Tal y como se expuso previamente, estudios anteriores de nuestro equipo mostraron la existencia de mayor ansiedad en el grupo MS21 (13), por lo que quizás es la conducta emocional una gran candidata a correlacionar con la disfunción de estos núcleos.

Este estudio muestra como la SM tiene efectos sobre el cerebelo, estructura involucrada no exclusivamente en aspectos motores. Estudios anteriores han indicado como la SM en el cerebelo de roedores produce alteraciones transitorias en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro, en las moléculas asociadas a la mielina (20) y, además, aumenta la expresión de GC en el INT (35).

La limitación más relevante de este estudio es que la prueba conductual utilizada no es la más adecuada para reflejar los posibles déficits cognitivos y emocionales derivados del deterioro cerebeloso. Por tanto, muestra la necesidad de realizar posteriores estudios empleando diferentes métodos conductuales con el fin de clarificar los posibles déficits cognitivos-emocionales y/o conductuales asociados a la función cerebelosa.

Estos resultados indican la gran necesidad de estudiar los efectos del estrés temprano en el cerebelo, ese órgano tan desconocido como relevante.

## 7. Referencias

1. Wheeler SM, Williams L, Beauchesne P, Dupras TL. Shattered lives and broken childhoods: Evidence of physical child abuse in ancient Egypt. *Int J Paleopathol* [Internet]. 2013 Jun;3(2):71–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpp.2013.03.009>
2. Observatorio de la Infancia. (2017). Boletín de datos estadísticos de medidas de protección a la infancia (datos 2015).
3. Sanmartín J, Iborra I, Rodríguez A, Serrano A, Martínez P, García Y. Informe sobre la situación del menor (víctima e infractor) en la Comunitat Valenciana. *Cent Reina Sofía*. 2011;422.
4. Hedges DW, Woon FL. Early-life stress and cognitive outcome. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 2011 Mar 24;214(1):121–30. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-010-2090-6>
5. JACOBSON L, SAPOLSKY R. The Role of the Hippocampus in Feedback Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis\*. *Endocr Rev* [Internet]. 1991 May;12(2):118–34. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-12-2-118>
6. Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2009 Jun 29;10(6):434–45. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrn2639>
7. O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, Codling C, Ceolho AM, Quigley EMM, et al. Early Life Stress Alters Behavior, Immunity, and Microbiota in Rats: Implications for Irritable Bowel Syndrome and Psychiatric Illnesses. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2009;65(3):263–7. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.06.026>

8. López-Gallardo M, Llorente R, Llorente-Berzal A, Marco EM, Prada C, Di Marzo V, et al. Neuronal and glial alterations in the cerebellar cortex of maternally deprived rats: Gender differences and modulatory effects of two inhibitors of endocannabinoid inactivation. *Dev Neurobiol* [Internet]. 2008 Oct;68(12):1429–40. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/dneu.20672>
9. Rodríguez F, Durán E, Gómez A, Ocaña FM, Álvarez E, Jiménez-Moya F, et al. Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. *Brain Res Bull* [Internet]. 2005 Sep;66(4–6):365–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923005000389>
10. Amores-Villalba A, Mateos-Mateos R. Revisión de la neuropsicología del maltrato infantil: la neurobiología y el perfil neuropsicológico de las víctimas de abusos en la infancia. *Psicol Educ* [Internet]. 2017 Jul;23(2):81–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pse.2017.05.006>
11. Leggio MG, Molinari M, Neri P, Graziano A, Mandolesi L, Petrosini L. Representation of actions in rats: The role of cerebellum in learning spatial performances by observation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2000;97(5):2320–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.040554297>
12. Hilber P. Influence of the Cerebellum in Anticipation and Mental Disorders. In: *Anticipation and Medicine* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 137–46. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45142-8\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-45142-8_8)
13. Banqueri M, Méndez M, Arias JL. Behavioral effects in adolescence and early adulthood in two length models of maternal separation in male rats. *Behav Brain*

- Res [Internet]. 2017 May;324:77–86. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432816309585>
14. Rubio S, Begega A, Méndez M, Méndez-López M, Arias JL. Similarities and differences between the brain networks underlying allocentric and egocentric spatial learning in rat revealed by cytochrome oxidase histochemistry. *Neuroscience* [Internet]. 2012 Oct;223:174–82. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452212008147>
  15. Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Arias JL. Working memory impairment and reduced hippocampal and prefrontal cortex c-Fos expression in a rat model of cirrhosis. *Physiol Behav* [Internet]. 2008 Oct;95(3):302–7. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938408002023>
  16. Banqueri M, Méndez M, Arias JL. Spatial memory-related brain activity in normally reared and different maternal separation models in rats. *Physiol Behav* [Internet]. 2017 Nov;181(September):80–5. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.007>
  17. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates, Sixth Edition* (2007).
  18. Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM. The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2003 Jan;27(1–2):33–44. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763403000071>
  19. Oliveira SA, Fontanelli BAF, Stefanini MA, Chuffa LGA, Teixeira GR, Lizarte FSN, et al. Interaction of maternal separation on the UCh rat Cerebellum.

- Microsc Res Tech [Internet]. 2014 Jan;77(1):44–51. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.22311>
20. Miki T, Yokoyama T, Kusaka T, Suzuki S, Ohta K, Warita K, et al. Early postnatal repeated maternal deprivation causes a transient increase in OMpg and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination. *J Neurol Sci* [Internet]. 2014 Jan;336(1–2):62–7. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2013.10.007>
  21. Wang Q, Shao F, Wang W. Maternal separation produces alterations of forebrain brain-derived neurotrophic factor expression in differently aged rats. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2015 Sep 1;8(September):1–8. Available from:  
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2015.00049>
  22. Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology* [Internet]. 2007 Apr;32(3):256–66. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645300700008X>
  23. Cao X, Huang S, Cao J, Chen T, Zhu P, Zhu R, et al. The timing of maternal separation affects morris water maze performance and long-term potentiation in male rats. *Dev Psychobiol* [Internet]. 2014 Jul;56(5):1102–9. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/dev.21130>
  24. Grace L, Hescham S, Kellaway LA, Bugarith K, Russell VA. Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. *Metab Brain Dis* [Internet]. 2009 Dec 10;24(4):643–57. Available from:  
<http://link.springer.com/10.1007/s11011-009-9162-5>
  25. Spivey JM, Padilla E, Shumake JD, Gonzalez-Lima F. Effects of maternal



- separation, early handling, and gonadal sex on regional metabolic capacity of the preweanling rat brain. *Brain Res* [Internet]. 2011;1367:198–206. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.038>
26. Zhang X-Y, Wang J-J, Zhu J-N. Cerebellar fastigial nucleus: from anatomic construction to physiological functions. *Cerebellum & Ataxias* [Internet]. 2016 Dec 3;3(1):9. Available from: <http://cerebellumandataxias.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40673-016-0047-1>
  27. Golanov E, Regnier-Golanov A, Britz G. Integrity of Cerebellar Fastigial Nucleus Intrinsic Neurons Is Critical for the Global Ischemic Preconditioning. *Brain Sci* [Internet]. 2017 Sep 21;7(12):121. Available from: <http://www.mdpi.com/2076-3425/7/10/121>
  28. Zhang L, Zhao M, Sui R-B. Cerebellar Fastigial Nucleus Electrical Stimulation Alleviates Depressive-Like Behaviors in Post-Stroke Depression Rat Model and Potential Mechanisms. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 2017;41(4):1403–12. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/467940>
  29. Huguet G, Kadar E, Temel Y, Lim LW. Electrical Stimulation Normalizes c-Fos Expression in the Deep Cerebellar Nuclei of Depressive-like Rats: Implication of Antidepressant Activity. *The Cerebellum* [Internet]. 2017 Apr 19;16(2):398–410. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12311-016-0812-y>
  30. Coffman KA, Dum RP, Strick PL. Cerebellar vermis is a target of projections from the motor areas in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011 Sep 20;108(38):16068–73. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1107904108>

31. Ketter TA, Kimbrell TA, George MS, Dunn RT, Speer AM, Benson BE, et al. Effects of mood and subtype on cerebral glucose metabolism in treatment-resistant bipolar disorder. *Biol Psychiatry* [Internet]. 2001 Jan;49(2):97–109. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322300009756>
32. Heim C, Binder EB. Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene–environment interactions, and epigenetics. *Exp Neurol* [Internet]. 2012 Jan;233(1):102–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.10.032>
33. Peng Y-P, Qiu Y-H, Qiu J, Wang J-J. Cerebellar interposed nucleus lesions suppress lymphocyte function in rats. *Brain Res Bull* [Internet]. 2006 Dec;71(1–3):10–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923006002371>
34. Kovács KJ. Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int* [Internet]. 1998 Oct;33(4):287–97. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197018698000230>
35. Wilber AA, Wellman CL. Neonatal maternal separation-induced changes in glucocorticoid receptor expression in posterior interpositus interneurons but not projection neurons predict deficits in adult eyeblink conditioning. *Neurosci Lett* [Internet]. 2009 Sep;460(3):214–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394009007356>

## 8. Anexos

### *Anexo 1. Procedimiento de SM utilizado.*

Las camadas experimentales fueron separadas de la madre 4 horas al día, de 10:00 a 14:00, desde el día postnatal 1 al día postnatal 21 incluido.

La camada completa fue trasladada a una jaula con serrín nuevo mezclado con serrín de su caja hogar y esta fue situada en una incubadora a  $30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  y con una humedad aproximada del 60%. Durante este paso la madre fue trasladada a una nueva jaula para impedir que observara el proceso. Al finalizar el tiempo de separación establecido, los animales de cada camada fueron colocados de nuevo en el nido y la madre fue devuelta a su caja hogar. En cuanto al grupo control, los animales permanecieron con su madre 24 horas al día.

El procedimiento de SM finalizó el día postnatal 21 en el cual los animales fueron destetados y segregados por sexos. Estos fueron alojados en jaulas de plástico estabulados en grupos de 4-6 animales por jaula.

## ***Anexo 2. Protocolo utilizado para evaluar la memoria de referencia mediante la utilización del laberinto acuático de Morris.***

El MWM es una prueba de aprendizaje espacial en la cual los animales son entrenados diariamente para encontrar una plataforma de escape en una piscina circular llena de agua (Hilber, P. (2017). *Cham: Springer International Publishing*, 137-46). Dicho test fue diseñado por Morris y es el paradigma más utilizado para evaluar la memoria espacial (Méndez, M. (2008). *Behav Brain Res*, 188 (1): 32-40).

El test conductual fue llevado a cabo en un tanque cilíndrico de fibra de vidrio negro de 150 cm de diámetro y 75 cm de altura (Figura 1). Dicha piscina fue rellena con agua alcanzando 30 cm de profundidad y cuya temperatura era de  $22 \pm 2$  °C y fue colocada en una sala de 16 m<sup>2</sup> iluminada (dos lámparas halógenas de 4.000 lx).

Alrededor del tanque, a 30 cm, fueron colocados dos paneles negros muy juntos en los que fueron colocados diferentes pistas: un triángulo naranja, dos líneas azules y una cruz rayada amarilla y negra (Figura 1). En el interior de la piscina fue introducida una plataforma negra cilíndrica de 10 cm de diámetro y 28 cm de altura, sumergida dos centímetros. El comportamiento del animal en el MWM fue registrado utilizando una cámara (Sony V88E) conectada a un ordenador equipado con el programa EthoVision Pro y situada encima del tanque.

La piscina estaba dividida en cuatro cuadrantes imaginarios (cuadrantes A, B, C y D) (Figura 2). El protocolo utilizado fue el de memoria de referencia descrito por Banqueri, M. et al. (Banqueri, M. (2017). *Physiol. Behav*, 181: 80-85) con una duración de 5 días y fue realizado en la adolescencia y en la adultez:

El primer día fue llevada a cabo la habituación que consistía en 4 ensayos en los cuales los animales fueron introducidos en la piscina orientados a la pared. En el centro

del tanque fue colocada una plataforma negra cilíndrica visible. Cada ensayo contaba con una duración máxima de 60 s (menos si el animal alcanzaba la plataforma) y si tras esos 60 s no encontraba la plataforma por sí mismo, era guiado por el experimentador. Tras alcanzar la plataforma el animal permanecía en la misma durante 15 s y tras este tiempo era colocado en un cubo negro durante 30s, a la espera del siguiente ensayo. La habituación finalizó tras realizar la salida desde los cuatro cuadrantes.

Durante los siguientes 4 días los animales fueron sometidos a 6 ensayos cada día en los que la plataforma estaba oculta en el centro del cuadrante D (cuadrante objetivo). En los primeros 4 ensayos el animal fue liberado de cara a la pared en cada cuadrante de la piscina de manera pseudo-aleatoria y se le permitía nadar hasta llegar a la plataforma oculta o hasta que hubieran transcurrido 60 s. Si el animal no alcanzaba la plataforma oculta después de este tiempo, se le colocaba en la plataforma durante 15 s. En cada ensayo fue registrada la latencia de llegada a la plataforma (s) y fue calculada la media del día de entrenamiento para cada animal. Diariamente, al final de la sesión, la plataforma era recogida y el animal era introducido en el cuadrante opuesto, cuadrante C, también orientado hacia la pared. En este ensayo de transferencia del aprendizaje, cuya duración era de 25 s, fue registrado el tiempo de permanencia en cada uno de los cuadrantes. Una permanencia mayor al 30% del tiempo total del ensayo de transferencia (7,5s) en el cuadrante D respecto a los otros tres era considerada como criterio de aprendizaje ya que supera la probabilidad de permanencia por azar. Inmediatamente después de este ensayo de transferencia, fue realizado un ensayo de recuerdo. Los animales fueron introducidos de nuevo en la piscina, pero en este caso la plataforma estaba oculta en su posición habitual con el fin de que el animal percibiese que podía escapar.

### **Anexo 3. Protocolo realizado para la tinción histoquímica COX.**

La COX es un complejo proteico transmembrana localizado en la membrana mitocondrial interna (*Wong-Riley, M. (1989). Trends Neurosci, 12 (3):94-101*), enzima clave en el metabolismo aeróbico ya que activa el aceptor de electrones terminal de la cadena respiratoria mitocondrial, contribuyendo al mantenimiento de un gradiente de protones y por tanto a la síntesis de ATP (*Brunori, M. (1987). Eur J Biochem, 169 (1): 1-8*). Dicho complejo fue utilizado como marcador de la actividad metabólica regional siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación:

En primer lugar, las muestras fueron fijadas mediante una solución de glutaraldehído al 25% diluido en 784 mL de tampón fosfato (pH 7,6) con sacarosa al 10%, durante 5 minutos. A continuación, pasaron por tres lavados de tampón fosfato (0,1M, pH 7,6) con sacarosa al 10% permaneciendo 5 minutos en cada uno y por un lavado en tampón TRIS (0,05M y pH 7,6) durante 8 minutos. El tampón TRIS fue elaborado tres días antes utilizando 363 mL/L de agua purificada; 3,4 mL/L de ácido clorhídrico (HCl) (Prolabo, Francia); 5 mL/L de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Madrid, España); 6g/L de Trizma base (Sigma, EE. UU.); sacarosa al 10% (Sigma, Alemania) y 0,276 g/L de cloruro de cobalto hexahidratado (Aldrich, Alemania).

A continuación, las secciones fueron mantenidas en tampón fosfato 0,1M con pH 7,6 durante 5 minutos y se incubaron durante 1 hora en una solución de tinción a 37°C en oscuridad y con agitación continua. Dicha solución fue previamente preparada en oscuridad con 800 mL/L de tampón fosfato con pH 7,6; 0,06 g/L de citocromo c oxidasa (Sigma-Aldrich, Madrid, España); 0,016 g/L de catalasa (Sigma, España); 40g/L de sacarosa (Sigma, Alemania); 2 mL/L de dimetil-sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y 0,4 g/L de diaminobencidina (Sigma-Aldrich, Madrid,

España). La reacción fue bloqueada introduciendo las secciones en fijador formol compuesto por 720 mL de tampón fosfato (0,1M, pH 7,6) con sacarosa al 10% y 80 mL de formaldehído al 37% (Prolabo, Francia) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, los portaobjetos fueron deshidratados pasando por una cadena de alcoholes de creciente graduación (30%, 50%, 70%, 80%, 96% I, 96% II, 100% I y 100% II) permaneciendo 5 minutos en cada uno de ellos y fueron introducidos 10 minutos en xileno (Avanter, Polonia). Para finalizar fueron montados usando cubreobjetos y Entellan (Merck, Alemania).

Para cuantificar la actividad enzimática y controlar la posible intensidad variable de las tinciones entre diferentes baños, se incluyeron en cada baño los homogenados previamente cortados. Dichos homogenados procedían de encéfalos estándar de rata Wistar con 10, 30,40 y 60  $\mu\text{m}$  de grosor y fueron usados como control de la densidad óptica.

#### ***Anexo 4. Protocolo realizado para la tinción inmunocitoquímica de la proteína c-Fos.***

c-Fos es un gen de expresión temprana expresado en el núcleo de las neuronas en respuesta a la estimulación neuronal (Méndez, M. (2008). *Behav Brain Res*, 188 (1): 32-40). El procedimiento realizado fue el siguiente:

En primer lugar, las muestras fueron fijadas usando paraformaldehído tamponado al 4% (0,1M pH 7,4) durante 30 minutos en continua agitación y a continuación, pasaron por dos baños de 10 minutos cada uno de tampón fosfato (PBS) (0,01M pH 7,4). Posteriormente, fueron incubadas durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS (0,01M, pH 7,4) con el fin de eliminar la actividad de la peroxidasa endógena y fueron lavadas dos veces con PBS (0,01M, pH 7,4) con una duración de 10 minutos cada uno. A continuación, las muestras fueron sumergidas durante 10 minutos en continua agitación, en una solución de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EE.UU) al 1% con PBS (0,01M, pH 7,4) y seguidamente fueron lavadas durante 10 minutos utilizando PBS (0,01M, pH74). Después de bloquear durante 30 minutos con una solución de PBS (0,1M pH 7,4) que contenía albúmina de suero bovino al 3%, las muestras fueron incubadas a 4°C en una solución de anticuerpo primario c-Fos ABE475 (1:7.500) (Santa Cruz Biotech., EEUU) diluido en una solución de PBS (0,01M, pH7,4), albúmina de suero bovino y Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, EE. UU) durante 24 horas en la cámara húmeda.

Al día siguiente, las muestras fueron sumergidas en dos baños de 10 minutos cada uno de PBS (0,01M pH 7,4) en continua agitación y fueron incubadas en anticuerpo secundario c-Fos (1:480) (Pierce antigoat) disuelto en solución de incubación, durante 2 horas en la cámara húmeda. Posteriormente, fueron realizados dos lavados de PBS (0,01M, pH7,4) durante 10 minutos cada uno y fueron tratadas con una con una solución de complejo avidina-biotina peroxidasa (Vectastain ABC kit elite



ultrasensitivo, Pierce EEUU) durante 1 hora en la cámara húmeda. Después de dos lavados en PBS (0,01M, pH7,4) las secciones fueron tratadas con un kit comercial de diaminobenzidina (DAB) incrementada con níquel (Pierce, EE. UU) durante 3 minutos en total oscuridad. A continuación, la reacción fue bloqueada mediante dos lavados de PBS (0,01M, pH 7,4) y las muestras fueron deshidratadas pasando por una cadena de alcoholes de creciente graduación (70%, 80%, 96% y 100%) permaneciendo 5 minutos en cada uno de ellos y fueron introducidas 10 minutos en xileno (Avanter, Polonia). Para finalizar fueron montadas usando cubreobjetos y Entellan (Merck, Alemania).

### ***Anexo 5. Procedimiento realizado para la evaluación de la actividad de la COX.***

Con el objetivo de realizar la evaluación de la actividad de la COX en las diferentes regiones de interés del cerebelo, se utilizó el equipo mostrado a continuación compuesto por un iluminador de alta precisión, una cámara digital, dos monitores y un ordenador con el software específico para el análisis de las imágenes:



En primer lugar, fueron realizadas diez mediciones de cada uno de los distintos grosores (10, 30,40 y 60  $\mu\text{m}$ ) de los controles de densidad óptica teñidos con COX para así poder establecer comparaciones y considerar posibles variaciones de la tinción.

A continuación, en cada imagen de cerebelo fueron tomadas cuatro medidas en tres secciones diferentes consecutivas para la misma área de estudio y el mismo animal, obteniendo doce medidas por región. En total, fueron realizadas 8.400 mediciones. Tras esto, se realizó un promedio de las medidas tomadas para obtener una media por región para cada animal. Los valores de densidad óptica fueron convertidos en unidades de actividad de COX usando la ecuación de regresión basada en la densidad óptica de los estándares y su actividad enzimática determinada previamente mediante

espectrofotometría. Se obtuvo una curva de regresión entre la densidad óptica de cada sección de homogenado y la actividad COX de dicha sección, cuyos valores medios de actividad fueron 4,87 para el valor medio de densidad óptica de 0,367 en el grosor de 10  $\mu\text{m}$ ; 14,62 para el valor medio de densidad óptica de 0,406 en 30  $\mu\text{m}$ ; 19,49 para el valor de 0,429 en 40  $\mu\text{m}$  y 29,24 para el valor de 0,470 para 60  $\mu\text{m}$ . Empleando dicha curva de regresión calculada, los valores de densidad óptica obtenidos en cada región cerebelosa fueron convertidos en unidades de actividad COX (micromol de citocromo c-oxidado/min/g tejido a 23°C).

***Anexo 6. Procedimiento realizado para la evaluación de los núcleos positivos de c-Fos.***

El número total de núcleos positivos para la proteína c-Fos fueron cuantificados utilizando el equipo que se muestra a continuación compuesto por un microscopio Leica y un ordenador con un software específico:



La cuantificación fue realizada usando cuadros de marcaje sobrepuestos sobre cada región. El área de contaje fue de  $250 \times 250 \mu\text{m}$ . Como criterio de cuantificación, los núcleos c-Fos fueron definidos como elementos circulares teñidos en negro con borde definido dentro de los núcleos celulares de neuronas. El contaje medio de las tres secciones fue calculado para cada región y sujeto y después cada valor fue dividido entre el área de contaje, en este caso  $62.500 \mu\text{m}^2$ .