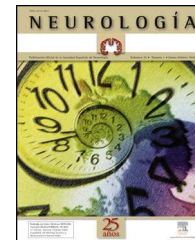




NEUROLOGÍA

www.elsevier.es/neurologia



ORIGINAL

Activación del cerebelo por estimulación olfativa en ratas macho sexualmente inexpertas



L.I. García*, P. García-Bañuelos, G.E. Aranda-Abreu, G. Herrera-Meza, G.A. Coria-Avila y J. Manzo

Centro de Investigaciones Cerebrales, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México

Recibido el 12 de febrero de 2014; aceptado el 15 de febrero de 2014

Accesible en línea el 4 de abril de 2014

PALABRAS CLAVE

Cerebelo;
Fos;
Conducta sexual;
Estimulación olfativa;
Capa granular;
Señales sexuales

Resumen

Introducción: El cerebelo es una estructura que se ha vinculado con múltiples funciones, tales como control motor, cognición, memoria y procesamiento emocional. En cuanto a su relación con los sistemas sensoriales no está claro el papel que desempeña en relación con el sentido del olfato. Suponemos que las ratas macho sexualmente inexpertas presentarán un incremento en la actividad neuronal del vermis cerebelar tras ser estimuladas con olor de hembra receptiva y almendra.

Métodos: Comparamos la actividad de la capa granular del vermis cerebelar mediante la inmunorreactividad a Fos tras estimulación olfativa. Esta estimulación se realizó durante 60 min en cámaras cúbicas de acrílico con un doble fondo. Los estímulos fueron aserrín limpio, con esencia de almendra y proveniente de la cama de hembras receptoras. Finalmente los machos fueron anestesiados con pentobarbital sódico intraperitoneal. El tejido cerebelar fue fijado con paraformaldehído para su posterior análisis inmunohistoquímico.

Resultados: El número de células inmunorreactivas a Fos en todos los lóbulos del vermis cerebelar de los grupos estimulados con almendra y hembra receptiva fue similar, pero mayor comparado con el grupo de aserrín limpio.

Conclusiones: La estimulación olfativa del sistema olfatorio principal (almendra) y accesorio (hembra receptiva) incrementa la producción de proteína Fos en la capa granular de la corteza cerebelar del vermis de ratas macho sexualmente inexpertas.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: luisgarcia@uv.mx (L.I. García).

KEYWORDS

Cerebellum;
Fos;
Sexual behaviour;
Olfactory
stimulation;
Granular layer;
Sexual cues

Activation of the cerebellum by olfactory stimulation in sexually naive male rats**Abstract**

Introduction: The cerebellum has been linked to multiple functions, such as motor control, cognition, memory, and emotional processing. As for its involvement in the sensory systems, the role of the cerebellum in the sense of smell remains unclear. We suggest that sexually naive male rats will present increased neuronal activity in the cerebellar vermis after being stimulated with almond odour or oestrous odour from receptive females.

Methods: We compared activity in the cerebellar vermis using Fos immunoreactivity after olfactory stimulation. Stimulation took place during 60 min in a cube-shaped acrylic chamber with a double bottom. Stimuli were clean woodchip bedding, bedding with almond extract, and bedding taken from a cage of receptive females. Male rats were subsequently anaesthetised with intraperitoneal sodium pentobarbital. Cerebellar tissue was fixed with paraformaldehyde for later immunohistochemical analysis.

Results: The number of Fos immunoreactive cells in all lobes of the cerebellar vermis was similar between groups stimulated with almond extract and with oestrous odour, and higher than in the clean woodchip group.

Conclusions: Stimulation of the main olfactory system (almond) and the accessory system (oestrous odour) increases Fos protein production in the granular layer of the cortex of the cerebellar vermis in naive male rats.

© 2014 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

El cerebelo es una estructura que ha sido ampliamente estudiada, y se le adjudican múltiples funciones como son el control motor, el procesamiento cognitivo^{1,2} y el sensorial³⁻⁵. Se conoce ampliamente la relación que tiene el cerebelo con los sentidos de la visión, el oído y el tacto⁶⁻¹⁰. Estudios de neuroimagen en humanos y en primates no humanos han demostrado que el cerebelo tiene gran actividad durante la estimulación olfativa con olores relacionados con la alimentación^{3,11} y con la conducta sexual¹², mientras que en ratas mediante inmunohistoquímica se observó que dicha actividad se ve incrementada ante estímulos relacionados con la conducta reproductiva^{13,14}. Hemos mostrado previamente que la ejecución de la conducta sexual de ratas macho resulta en un incremento en el número de neuronas inmunoreactivas a Fos (ir-Fos) en el cerebelo. En machos que alcanzan una eyaculación el número de neuronas activadas es similar al de machos con estimulación sin contacto¹³. En estas pruebas los machos pudieron ver, escuchar y oler el incentivo animal. Dicha estimulación sensorial produce la activación de un gran número de células granulares, indicando que las señales sexuales disparan la actividad de esas neuronas. Aunque estos estudios vinculan el cerebelo con la estimulación sensorial, poco se sabe de la influencia que el olfato tiene sobre este. El objetivo de este trabajo es determinar y comparar la expresión de la proteína Fos del vermis cerebelar de ratas macho sexualmente inexpertas, después de ser estimuladas olfativamente con aserrín limpio, aserrín con olor a almendra y aserrín proveniente de la cama de hembras receptoras. Suponemos que los estímulos de almendra y hembra receptiva incrementarán el número de células ir-Fos.

Materiales y método**Sujetos y alojamiento**

Se usaron 18 ratas macho sexualmente inexpertas (250 a 350 g) y 6 hembras ovariectomizadas (200 a 250 g) de la cepa Wistar. Los animales se alojaron (por sexo) en cajas de acrílico transparente (44 × 34 × 20 cm; 6 por caja), con una capa de aserrín de aproximadamente 3-4 cm de espesor en su base. Se mantuvieron en un cuarto con temperatura aproximada de 22 ± 2 °C y ciclos de luz oscuridad invertidos (12 × 12 h). El acceso al agua purificada y alimento (Rismart®) fue *ad libitum* hasta el día de la prueba. Todos los procedimientos quirúrgicos y de manipulación se llevaron a cabo bajo la política de la Sociedad de Neurociencias en el uso de animales en investigación neurocientífica.

Estimulación olfativa

La estimulación olfativa de las ratas macho fue llevada a cabo de acuerdo a lo descrito por Portillo y Paredes¹⁵, utilizando aserrín estéril (Rismart®, México) como vehículo en una cámara de acrílico cúbica (30 × 30 × 30 cm). La cámara contó con un fondo doble y los animales se introdujeron en la parte superior, teniendo como base una capa de acrílico horadado de 4 mm de grosor, elevándolos 5 cm de la base inferior. Entre las 2 bases se colocó un recipiente con el estímulo olfativo (80 g): aserrín limpio en el caso del grupo control (CTRL, n = 6), aserrín con esencia de almendra (ALM, n = 6) o aserrín proveniente de la cama de hembras receptoras (ovariectomizadas con estro inducido) (HREC, n = 6). Una vez que fueron introducidos los machos se les dio un periodo de habituación de 10 min, posterior al cual se empezó la

estimulación introduciendo el recipiente con el aserrín. Los machos permanecieron 60 min más dentro de la cámara con el estímulo.

Inmunohistoquímica

Al final de la estimulación olfativa los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), posteriormente se procedió a la perfusión transcardiaca con solución salina (0,9%; 300 ml), seguida de paraformaldehído al 4% (pH 7,4; 400 ml) en un *buffer* de fosfato (PB por sus siglas en inglés). Se extrajo el cráneo y se obtuvo el cerebelo completo para mantenerse las siguientes 12 h en fijación en el paraformaldehído. El vermis fue aislado y crioprotejido sucesivamente con 10, 20 y 30% de sacarosa (PB 0,1 M, 10 ml). Se realizaron cortes sagitales de 40 μ m en un criostato (Leica CM1850). Se analizaron 3 cortes de la parte central del vermis.

Los cortes fueron sometidos a una prueba de inmunorreactividad a Fos de acuerdo a lo descrito por Manzo et al.¹³; se incubaron en el primer anticuerpo (Ac) policlonal Fos a una dilución de 1:2.000, en solución PBT 0,3% y 3% de suero normal de cabra (NGS). Se incubó durante 48 h a 4°C. Se agregó el segundo Ac contra conejo (Ac puente o secundario) en PBT 0,3% a una dilución de 1:250, incubándose durante 90 min en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se aplicó el complejo avidina-biotina (Kit AB) en PB 0,1 M a una dilución de 1:200 durante 90 min en agitación constante a temperatura ambiente. Finalmente se reveló en 20 ml de PB 0,1 M con 5 gotas de di-amino-benzidina (0,1 mg/100 ml), 4 gotas de níquel (0,05 mg/5 ml) y 3 gotas de peróxido de hidrógeno al 30%. Finalmente los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados y dejados secar 2 días para después ser deshidratados y limpiados con xileno (Fisher). Terminado el proceso se aplicó Permount (Fisher scientific) y el cubreobjeto para su análisis posterior.

Análisis histológico y estadístico

Imágenes digitalizadas de los cortes histológicos del cerebelo se obtuvieron y analizaron a través de un microscopio (AX70 Olympus Optical Co., LTD, Japón) conectado a un ordenador con el programa Image Pro Plus 6.7 (Media Cybernetics). Bajo un objetivo de 40 \times , delimitando un área de 20.000 μ m², se contabilizaron las células granulares de regiones (proximal, medial y distal) de cada lóbulo cerebelar obteniendo un promedio de 3 cortes por animal. Los datos fueron analizados estadísticamente con el programa Statistica (Stat soft™) y JMP 6 (SAS 2005). Fueron sometidos a una prueba de normalidad, la cual fallaron, por lo que se clasificaron por ranqueo (Rank test) con la finalidad de poder analizarlos con pruebas estadísticas paramétricas¹⁶. Se empleó un modelo de ANOVA anidado siguiendo un modelo lineal generalizado (GLM), ya que los datos fueron ordenados de forma jerarquizada. El modelo queda representado con la siguiente fórmula: $y = \text{Grupo} + \text{Animal} [\text{Lóbulo}] + \text{Lóbulo} [\text{Región}] + G \times L + G \times R + L \times R + G \times L \times R + \text{el Error}$. Donde y es la variable respuesta y G , L y R son el Grupo, el Lóbulo y la Región respectivamente. Las Regiones (proximal, medial y distal) fueron anidadas dentro de Lóbulo, y éste a

su vez anidado en Animal, como se sugiere en el análisis con pseudorepeticiones¹⁷. Se realizó un análisis *post hoc* de Tukey para conocer las diferencias entre los lóbulos de los grupos.

Resultados

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($F_{2,1349} = 146,6$, $p < 0,0001$). El análisis *post hoc* (Tukey) reveló que el CTRL (media = $124,02 \pm 1,39$) posee el menor número de células ir-Fos, con respecto a los grupos ALM (media = $150,03 \pm 1,39$) y HREC (media = $155,13 \pm 1,39$). El grupo HREC presentó la cantidad mayor de células ir-Fos (fig. 1).

El análisis de la interacción grupo-lóbulo señaló una diferencia significativa ($F_{18,1349} = 1,6555$, $p = 0,0458$). La prueba *post hoc* reveló que todos los lóbulos del grupo CTRL fueron significativamente diferentes de aquellos correspondientes

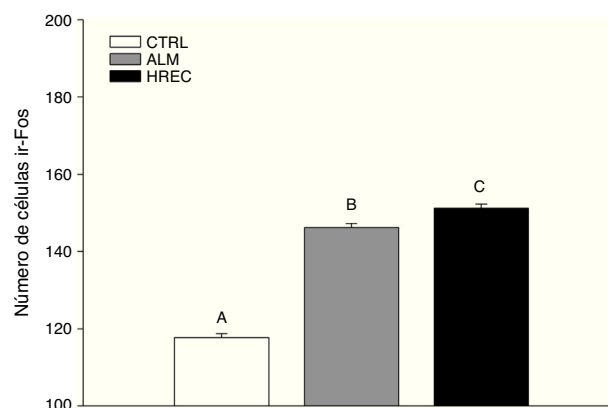


Figura 1 Número total (media \pm ee) de neuronas ir-Fos de los grupos control (CTRL), almendra (ALM) y hembra receptiva (HREC), después de la estimulación olfativa. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ($p < 0,0001$).

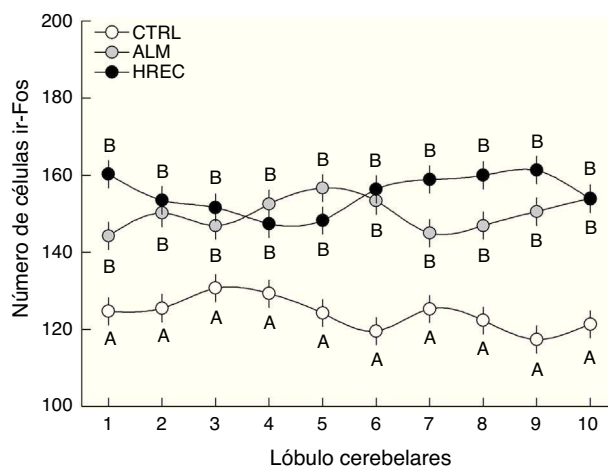


Figura 2 Número de células (media \pm ee) ir-Fos en la capa granular de cada lóbulo, después de la estimulación olfativa. Los lóbulos de los grupos ALM y HREC son significativamente mayores que aquellos del grupo CTRL ($p = 0,04$). Aunque se observa un patrón de activación diferente entre los lóbulos de los grupos ALM y HREC, no llegan a presentar diferencias estadísticas.

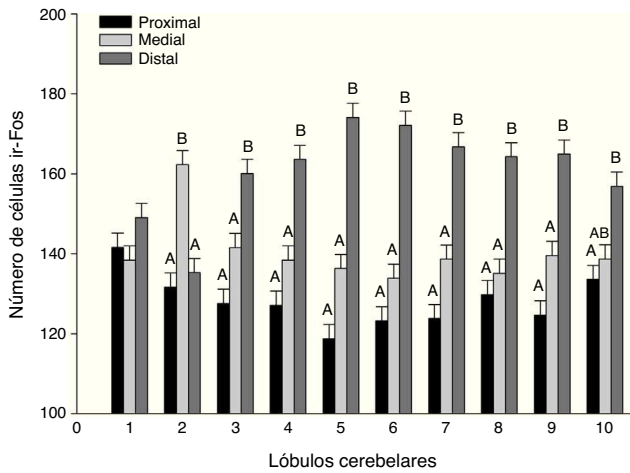


Figura 3 Fig 3 Activación neuronal en tres regiones de los lóbulos del vermis cerebelar (media ± ee). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre las regiones (CTRL, ALM y HREC agrupados).

a los grupos ALM y HREC. Sin embargo, entre estos últimos no existió diferencia significativa, solo una tendencia en los lóbulos 1, 7, 8 y 9 (fig. 2).

En un análisis global de los 3 grupos estimulados se encontraron diferencias significativas entre las regiones de los lóbulos ($F_{20,1349} = 21,02$, $p < 0,0001$), donde la región distal mostró el mayor número de células ir-Fos, con respecto a la medial y proximal en casi todos los lóbulos (fig. 3). En el análisis de la interacción región-lóbulo de cada uno de los grupos se encontró la misma tendencia de actividad, con valores significativamente diferentes entre las regiones ($p < 0,0001$) (fig. 4).

Discusión

Nuestros resultados muestran un incremento en la actividad de la corteza cerebelar durante la estimulación olfativa en ratas macho sexualmente inexpertas. De acuerdo a lo descrito por Portillo y Paredes¹⁵ y Lledo et al.¹⁸ usamos como estímulos el olor a almendra (ALM) y a hembra receptiva (HREC) que activan los sistemas olfativos principal y accesorio (vomeronasal) respectivamente. Observamos que sin importar la naturaleza del estímulo, o el sistema olfatorio activado, se produjo un incremento en la actividad de la capa granular de la corteza del vermis cerebelar con respecto al grupo control (aserrín limpio), idea apoyada por otros estudios^{3,11,19}.

A pesar de que los 2 estímulos (almendra y hembra receptiva) tuvieron efecto aumentando significativamente en la actividad de la corteza cerebelar con respecto al grupo control, existe un patrón, sin presentar diferencias significativas, en la magnitud con que se da la activación neuronal en cada grupo. Esta diferencia puede ser explicada debido a un incremento del interés por parte de las ratas macho en el olor de hembra receptiva, lo cual a su vez aumenta el movimiento exploratorio y la actividad olfatomotora, la cual ha sido explorada con anterioridad, mostrando que es capaz de activar el cerebelo sin la necesidad de un odorante presente^{3,11}.

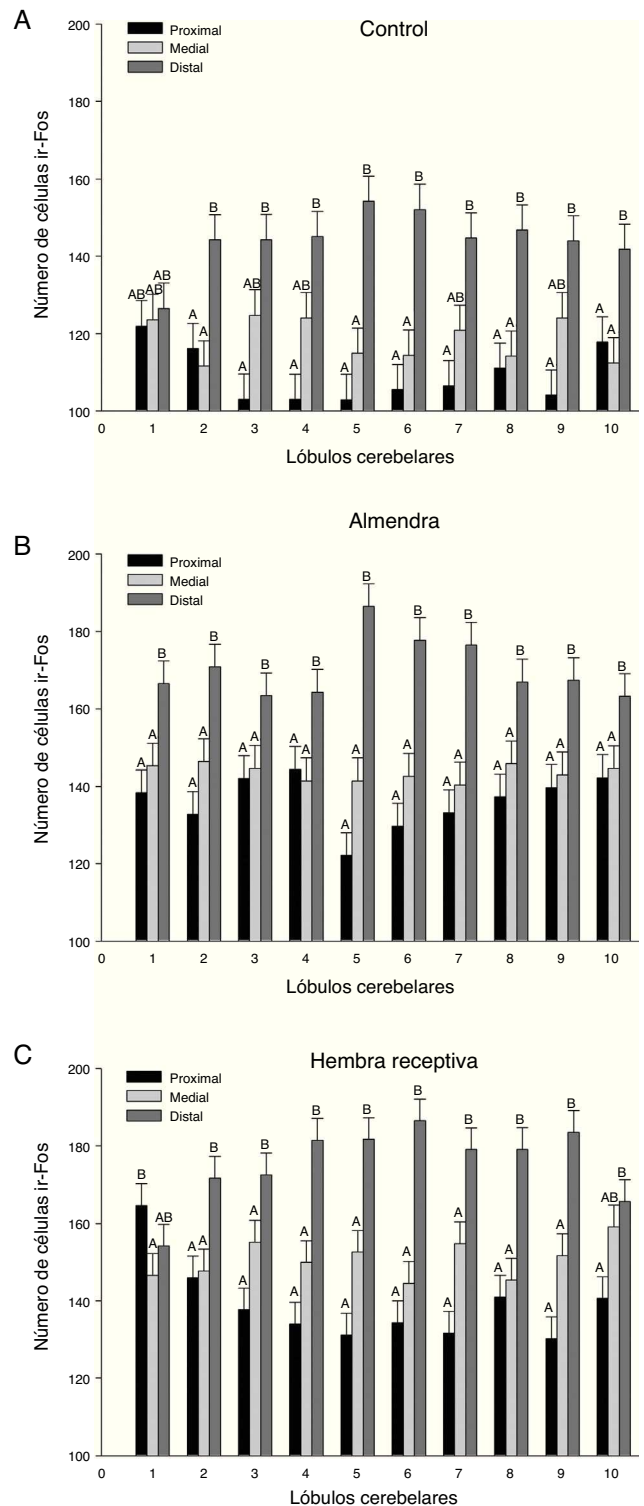


Figura 4 Representación gráfica de las neuronas ir-Fos encontradas en las 3 regiones (proximal, medial y distal) analizadas para cada grupo. A. Control. B. Almendra. C. Hembra receptiva. Las diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre las regiones de los lóbulos se representan con letras. Las regiones que no comparten letras iguales presentan diferencias entre sí.

Por otro lado, Manzo et al.¹³ demostraron que el cerebelo de ratas macho podía ser activado por la estimulación multisensorial (vista, olfato y audición) provista por ratas hembras receptoras, y que dicha actividad cerebelar no se veía alterada por el desempeño motor llevado a cabo por los sujetos durante la cópula. Otra posible explicación es que el cerebelo esté desempeñando un papel en la expectativa de la recompensa sexual instintiva creada por la percepción de la información sensorial provista por la secreción de hembras receptoras. La función cerebelar en las emociones y la expectativa de la recompensa sexual ya ha sido confirmada anteriormente^{13,14}. Sin embargo, se desconoce la actividad del cerebelo de ratas sexualmente expertas estimuladas con olores relacionados con la conducta sexual.

Por otro lado, los cortes sagitales de la región medial del vermis cerebelar muestran a nivel lobular patrones de activación neuronal distintos en cada uno de los grupos experimentales. Sin embargo, la falta de significación en los resultados del efecto «interacción grupo-lóbulo» nos impide señalar qué lóbulos son más sensibles a un tipo de estímulo. Pese a esto, existen tendencias que sugieren una regionalización en la parte medial del vermis cerebelar de acuerdo a la clase del estímulo percibido. Los lóbulos 1, 7, 8 y 9 de los sujetos correspondientes al grupo HREC poseen claramente una mayor cantidad de células ir-Fos comparados con los mismos lóbulos de los sujetos pertenecientes al grupo ALM. Esto podría significar que dichos lóbulos son más susceptibles a ser activados por proyecciones provenientes del sistema olfatorio accesorio que por el principal.

A su vez los lóbulos 2, 3, 4 y 10, que mostraron una cantidad similar de células inmunorreactivas entre ambos grupos, podrían estar desempeñando el papel de controlar el aspecto olfatomotor.

El bulbo olfatorio principal, junto con el núcleo olfatorio anterior, como ha sido descrito por Lledo et al.¹⁸, envían eferencias a la corteza piriforme, tubérculo olfatorio, amígdala cortical y corteza entorrinal. Por su lado, el ATV posee neuronas que proyectan sus axones a la corteza piriforme, a la corteza cerebelar y a los núcleos cerebelares laterales^{20,21}. En el caso del bulbo olfatorio accesorio envía fibras originadas en su capa mitral hacia la amígdala posterolateral y medial; en esta se origina la ruta amigdalofugal, que conecta con los núcleos ventromediales hipotalámicos y el área preóptica; la amígdala posterolateral proyecta, vía la estría terminalis, hacia la cama del núcleo de la estría terminalis y el área preóptica media¹⁵. La posible interacción entre el sistema vomeronasal y el cerebelo puede estar dado por 2 rutas: 1) a través de las fibras hipotalamocerebelosas; 2) o a través del ATV, que recibe aferencias desde la amígdala medial.

El enlace entre ambos sistemas olfatorios y el cerebelo, a través del ATV, figura como una posibilidad prometedora, ya que concuerda con la información provista en este experimento. La ruta corteza piriforme-ATV-cerebelo, correspondiente al sistema olfatorio principal, apoya la idea propuesta por Sobel et al.³ de que los lóbulos cerebelares anteriores regulan el aspecto olfatomotor de la olfacción. Además, Ikai et al.²⁰ describieron aferencias cerebelares provenientes del ATV que innervaban en la corteza cerebelosa de rata, lo que corresponde a lo observado por Sobel et al.³ en varios lóbulos cerebelares en humanos. Esto también es coherente con lo observado en nuestro experimento,

donde los lóbulos 2 y 3 del vermis cerebelar muestran un aumento significativo ante los 2 estímulos. Por otro lado, el sistema vomeronasal estaría conectado vía amígdala medial-ATV-cerebelo¹⁴, ruta apoyada por los resultados de Manzo et al.¹³, quienes demostraron que el lóbulo 7 del vermis cerebelar en ratas macho es más sensible a la estimulación multisensorial que puede proveer una rata hembra receptiva. Este resultado sustenta nuestros hallazgos, donde el lóbulo 7 de la región medial del vermis cerebelar mostró una mayor activación en los sujetos pertenecientes al grupo HREC, en comparación con el grupo ALM. El circuito núcleo fastigial-amígdala medial-ATV-cerebelo^{3,14,20} nos sugiere la existencia de un mecanismo de retroalimentación¹⁴, que pudiese estar regulando la sensibilidad del cerebelo como consecuencia de la estimulación del sistema vomeronasal. Esto a su vez proveería una explicación de la disminución en los niveles de células ir-Fos en el vermis del cerebelo de las ratas macho tras copular sucesivamente, considerando que la estimulación sensorial es persistente¹³. Es por lo anterior que sugerimos investigar el lóbulo 7 del vermis cerebelar como una posible región sensible a la información proveniente del sistema vomeronasal.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Nieto A, Wollman T, Barroso J. *Cerebelo y procesos cognitivos*. Murcia: Universidad de Murcia; 2004.
- Apps R, Garwicz M. Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6:297–311.
- Sobel N, Prabhakaran V, Hartley CA, Desmond JE, Zhao Z, Glover GH, et al. Odorant-induced and sniff-induced activation in the cerebellum of the human. *J Neurosci*. 1998;18:8990–9001.
- Vaillancourt DE, Mayka MA, Corcos DM. Intermittent visuomotor processing in the human cerebellum, parietal cortex and premotor cortex. *J Neurophysiol*. 2006;95:922–31.
- Zhu JN, Yung WH, Chow BKC, Chan YS, Wang JJ. The cerebellar-hipothalamic circuits: Potential pathways underlying cerebellar involvement in somatic-visceral integration. *Brain Res Rev*. 2006;52:93–106.
- Snider RS, Eldred E. Cerebral projections to the tactile, auditory, and visual areas of the cerebellum. *Anat Rec*. 1948;100:82.
- Bloedel JR. Cerebellar afferent systems: A review. *Prog Neurobiol*. 1973;2:3–68.
- Huang CM, Liu GL. Auditory responses in the posterior vermis of the cat: Buried cerebellar cortex. *Brain Res*. 1991;553:201–5.
- Stein JF, Glickstein M. Role of the cerebellum in visual guidance of movement. *Physiol Rev*. 1992;72:967–1017.
- Gao JH, Parsons LM, Bower JM, Xiong J, Li J, Fox PT. Cerebellum implicated in sensory acquisition and discrimination rather than motor control. *Science*. 1996;272:545–7.
- Ferdon S, Murphy C. The cerebellum and olfaction in the aging brain: A functional magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*. 2003;20:12–21.
- Ferris CF, Snowdon CT, King JA, Sullivan Jr JM, Ziegler TE, Olson DP, et al. Activation of neural pathways associated with sexual arousal in non-human primates. *J Magn Reson Imaging*. 2004;19:168–75.

13. Manzo J, Miquel M, Toledo R, Mayor-Mar JA, Garcia LI, Aranda-Abreu GE, et al. Fos expression at the cerebellum following non-contact arousal and mating behavior in male rats. *Physiol Behav.* 2008;93:357–63.
14. Paredes-Ramos P, Pfaus JG, Miquel M, Manzo J, Coria-Avila GA. Sexual reward induces Fos in the cerebellum of female rats. *Physiol Behav.* 2011;1:143–8.
15. Portillo W, Paredes RG. Sexual incentive motivation, olfactory preference, and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm Behav.* 2004;46:330–40.
16. Conover WJ, Iman RL. Rank transformation as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *Am Stat.* 1981;3:124–9.
17. Lazic SE. The problema of pseudoreplication in neuroscientific studies: Is it affecting your analysis? *BMC Neurosci.* 2010;11:5.
18. Lledo PM, Gheusi G, Vincent JD. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev.* 2005;85:281–317.
19. Mainland JD, Jhonson BN, Khan R, Ivry RB, Sobel N. Olfactory impairments in patients with unilateral cerebellar lesions are selective to inputs from the contralesional nostril. *J Neurosci.* 2005;25:6362–71.
20. Ikai Y, Takada M, Shinonaga Y, Mizuno N. Dopaminergic and nondopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat project, respectively, to the cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei. *Neuroscience.* 1992;51:719–28.
21. Ikai Y, Takada M, Mizuno N. Single neurons in the ventral tegmental area that project to both the cerebral and cerebellar cortical areas by way of axon collaterals. *Neuroscience.* 1994;61:925–34.