

El ejercicio forzado previene la anergia inducida por la depleción de dopamina

Estudios comparando la selección entre actividad física o la ingesta de alimentos dulces

PILAR BAYARRI
bayarri@uji.es

XAVIER ROS
al225774@alumail.uj.es

LAURA LÓPEZ-CRUZ
lcruz@uji.es

NOEMÍ SAN MIGUEL
nsanmigu@uji.es

LIDÓN MONFERRER
lidon.monferrer@edu.uji.es

MERCÈ CORREA
correa@uji.es

Resumen

Disfunciones relacionadas con el esfuerzo como la anergia y la fatiga son síntomas centrales de la depresión y otros trastornos. El sistema dopaminérgico (DA) mesolímbico desempeña un papel crítico en la activación de la conducta. Sin embargo, se ha demostrado que la depleción DA no cambia la preferencia cuando no se requiere realizar esfuerzo en la adquisición del reforzador. Aun así, cuando una concentración alta de sucrosa requiere trabajo, los roedores con depleción DA reducen el esfuerzo necesario para obtener la concentración preferida pero aún así compensan consumiendo sucrosa menos dulce de libre acceso. En el presente estudio, hemos desarrollado una tarea en un laberinto en T para ratones que nos permita evaluar la preferencia entre tres diferentes tipos de reforzadores situados cada uno en uno de los brazos: actividad física como la condición de refuerzo que requiere un alto esfuerzo, un plato con bolitas de sucrosa de libre acceso, y un agujero en el que se localiza un olor neutro. Los ratones muestran preferencia, de manera innata, por el ejercicio físico y esto es dependiente de las condiciones homeostáticas del animal (si está hambriento o saciado). Por otro lado, observamos un incremento de la preferencia por rodar en la rueda de actividad cuando la comida dulce se devalúa (se le añade un sabor amargo). Los animales que reciben tetrabenazina, un depletor DA que inhibe de manera reversible el transportador vesicular de monoaminas de tipo 2 (VMAT2), demostraron reducir su preferencia por el ejercicio físico, pero aumentaron el consumo de sucrosa de libre acceso. Así pues la reducción de DA produce sín-

tomas de anergia (falta de energía) aunque no de anhedonia (falta de apreciación de las propiedades gustativas apetecibles de la sucrosa).

Palabras clave: dopamina, tetrabenacina, actividad física, anergia, ratones.

Abstract

Effort-related dysfunctions such as anergia and fatigue are core symptoms of depression and other disorders. Dopamine (DA) systems play a critical role in behavioral activation. However, previous studies have shown that DA depletion does not change sucrose consumption or preference when no effort is involved in procuring this reinforcer. Nevertheless, when the preferred sucrose concentration requires work, rodents with DA depletions reduce the work output for the preferred highly concentrated sucrose drink but compensate by consuming more of the less sweet but freely available sucrose fluid. In the present studies, we have developed mice T-maze tasks for the assessment of preference between three different type of reinforcers: engagement in physical activity as the high effort reinforcing condition, a dish with freely available sucrose pellets, and a non-social (neutral) odor in the third arm. Mice show an important preference by the physical exercise, and this preference depends on the animal's homeostatic conditions (satiety or hunger). Moreover, preference for the running wheel increases when the sweet food is devalued. In the present studies, tetrabenazine, a selective and reversible vesicular monoamine transporter-2 (VMAT2) inhibitor reduced preference for physical exercise, but increased sucrose consumption. Thus the reduction of DA produces symptoms of anergy (lack of energy) but not anhedonia (lack of enjoyment of the sucrose taste).

Keywords: dopamine, tetrabenazine, physical activity, anergia, mice.

Introducción

Los beneficios en la salud física y mental de realizar actividad física han sido ampliamente demostrados (Dishman *et al.*, 2006). Por el contrario, se ha observado que la falta de actividad puede contribuir al desarrollo de depresión y de obesidad (Lambert 2006). Uno de los síntomas más comunes y debilitantes de muchos desórdenes psicológicos es la sensación de fatiga mental o falta de energía que lleva a la indiferencia y apatía como mecanismo adaptativo (Tylee *et al.*, 1999; Stahl 2002).

En modelos animales se ha demostrado que el ejercicio puede tener efectos neuroprotectores y neurotróficos (Dishman *et al.*, 2006; Zigmond *et al.*, 2009). Estos datos han llevado tanto a investigadores como a clínicos a sugerir que el ejercicio puede ser usado como terapia preventiva o tratamiento para una variada lista de patologías mentales o neurológicas (Dishman *et al.*, 2006; Salamone *et al.*, 2010). Además, en estudios con roedores, la actividad física, como correr en una rueda de actividad, puede ser reforzante en sí misma y se ha demostrado que el ejercicio continuado en rueda tiene claros efectos neuroprotectores.

Numerosos estudios clínicos en los últimos años han demostrado que la anergia es un aspecto crítico de la depresión, ciertos tipos de obesidad mórbida, la retirada de drogas y otros

desórdenes psiquiátricos (Tylee *et al.*, 1999; Stahl 2002; Salamone *et al.* 2006, 2010). Sin embargo, a pesar de los numerosos datos clínicos demostrando la importancia de la anergia en la depresión, las bases biológicas de este síntoma son ampliamente desconocidas y por ello es uno de los síntomas que menos se trata (Stahl 2002). Los datos apuntan a la implicación de los sistemas centrales de DA en estos procesos (Willner 1983; Stahl 2002; Salamone y Correa 2012). En pacientes depresivos, la eficacia en la reducción de la anergia producida por los fármacos antidepresivos como el bupropión, con potentes efectos sobre la recaptación de DA (Rampello *et al.*, 1991), es mayor que la eficacia de antidepresivos clásicos como la fluoxetina que actúa en mayor medida sobre la recaptación de serotonina (Stahl 2002).

Los datos preclínicos obtenidos en la investigación con animales también han demostrado que los sistemas cerebrales de DA, en especial el núcleo accumbens (Nacb), están implicados en los aspectos activadores, vigorizadores o energizantes de la motivación (Salamone y Correa, 2002; 2012). Esto es importante si tenemos en cuenta que los organismos deben estar muy activos y ejercer esfuerzo para aproximarse a la obtención de estímulos biológicamente relevantes. Para ello, no sólo deben tomar decisiones relacionadas con la cualidad de los estímulos, sino también con la cantidad de esfuerzo que deben invertir para conseguirlos realizando así una valoración de los costes/beneficios implicados entre estímulos y respuestas instrumentales de aproximación. La interferencia con la DA del Nacb modifica el resultado de esta valoración de manera que el individuo elige los estímulos que implican un menor coste de respuesta (Salamone y Correa 2002, 2012).

Para el estudio del papel de la DA en el componente activacional de la motivación, nuestro laboratorio ha utilizado la tetrabenazina (TBZ) para reproducir la falta de energía. Tetrabenazina (TBZ) es un fármaco que reduce la liberación de DA al bloquear selectivamente a VMAT2, un transportador vesicular de monoaminas necesario para que la DA sea liberada al espacio extracelular. Esta depleción transitoria de los niveles de DA es un modelo farmacológico muy próximo a la reducción anómala de DA presente en la anergia.

Desde hace años se han desarrollado modelos animales conductuales para la toma de decisiones basadas en el esfuerzo, que han sido útiles en el estudio de la anergia inducida por lesiones quirúrgicas en las neuronas de DA del Nacb o el antagonismo de los receptores de DA (Salamone *et al.*, 1994; Cousins *et al.*, 1996; Pardo *et al.*, 2012). Para comprobar el efecto de la depleción de DA inducida por tetrabenazina en la conducta manifiesta de los sujetos, en el laboratorio se ha diseñado un paradigma que permite conocer la preferencia de los ratones por estímulos inicialmente reforzantes en presencia de estímulos de carácter neutral: se trata de un laberinto en T en el que el animal opta libremente y sin restricciones por uno de los tres estímulos presentes en el laberinto. En este procedimiento, uno de los brazos contiene bolas de comida palatable (sucrosa) y agua con sucrosa al 5 %; un estímulo oloroso de carácter neutral en otro brazo; y por último, el animal puede optar por realizar ejercicio físico en una rueda de actividad. En estudios con roedores, la actividad física, como correr en una rueda de actividad, puede ser reforzante en sí misma. Además, se ha demostrado que el ejercicio continuado en rueda tiene claros efectos neuroprotectores. Por ejemplo, 15 días de ejercicio voluntario en rueda protege del efecto hipolocomotor que produce el estrés en ratones (De Chiara *et al.*, 2010).]

El presente estudio tiene como objetivo estudiar estrategias preventivas, iniciadas durante el final de la infancia y principio de la adolescencia, que permitan impedir el desarrollo de síntomas motivacionales como la anergia en la edad adulta. Dichas estrategias conductuales irán dirigidas a potenciar la actividad del sistema neural de DA. Para ello se implementará un programa de ejercicio físico forzado en un grupo de ratones durante una hora al día y, en el otro grupo, se estudiará el sedentarismo. Tras este periodo de entrenamiento, los animales recibirán el depletor de DA o una solución control y serán evaluados en sus preferencias en el laberinto en T.

Métodos

a. *Sujetos*

Todos los experimentos se llevaron a cabo con ratones macho Swiss CD1 (30-45g) procedentes de Janvier (Francia). Los ratones fueron estabulados en grupo con comida de laboratorio estándar y agua disponible ad libitum. La temperatura de la colonia se mantuvo a 22 ± 1 °C con el periodo de luz de 8:00 a 20:00 horas. Todos los procedimientos experimentales cumplían con la European Community Council directive (86/609/ECC) para el uso de animales de laboratorio con el «Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research» (National Research Council 2003).

b. *Drogas*

Se inyectó tetrabenacina (TBZ, Sigma-Aldrich, España), disuelta en una solución 0,2 % de ácido tartárico (pH= 4.0) que se empleó también como solución control (vehículo). Las dosis son: 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg se administraron 120 minutos antes de la realización de cada test. Todas las soluciones fueron administradas intraperitonealmente (IP).

c. *Procedimiento conductual*

El grupo de ejercicio forzado (EF) se entrenó diariamente en ruedas de actividad cerradas y en movimiento constante con pausas programadas. La velocidad de las ruedas (7-5 m/minuto) y el tiempo de la sesión experimental (60 minutos con pausas cada 10 minutos) se establecieron en base a los niveles de actividad locomotora voluntaria observados en nuestro laboratorio en ratones bajo condiciones normales, asegurándonos así la ausencia de estrés. El grupo control sedentario se introdujo en las mismas ruedas que los EF pero, en este caso, permanecían paradas.

El test para evaluar las preferencias se realizó en un laberinto con 3 brazos: uno vacío donde sólo hay un agujero con un olor artificial (los roedores pasan cantidades significativas de tiempo olfateando el medio y la presencia de un agujero es un estímulo que atrae esta conducta de exploración), otro brazo donde hay una rueda de actividad y un tercero donde hay una solución con sucrosa al 5 % y pellets (bolitas de comida dulce). Una vez al día, los animales se introdujeron en el laberinto y durante un único ensayo de 15 minutos distribuyeron su tiempo entre los 3 brazos del laberinto.

Los roedores fueron entrenados hasta que alcanzaron niveles basales estables de tiempo rodando e ingesta de pellets, después de lo cual comenzaron los tests farmacológicos.

d. *Diseño experimental*

El estudio responde a un diseño de medidas repetidas, ya que cada animal recibió todas las dosis del fármaco, incluida la dosis vehículo a modo de control, en orden aleatorio (un tratamiento por semana). Para determinar el efecto de la tetrabenacina, evaluamos las variables respuesta tiempo rodando (segundos que el animal corre en la rueda de actividad, RW), tiempo comiendo (segundos que el animal emplea comiendo pellets) y tiempo olfateando (segundos que el animal olfatea el algodón impregnado en perfume).

Para analizar el efecto de las manipulaciones farmacológicas (administración de TBZ) en el paradigma conductual se empleó un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA) para cada una de las variables evaluadas y para cada grupo (N=8 en grupo

control y N=7 en grupo ejercicio forzado). Cuando los resultados fueron significativo, se realizó el test LSD de Fisher para conocer que dosis diferían estadísticamente de la dosis control (vehículo). En el estudio de la devaluación de la comida, se empleó una t de student para muestras dependientes.

Resultados

El ANOVA de medidas repetidas no reveló efectos significativos del factor dosis en los animales de ejercicio forzado ($F=0.81$, $df=3$, $p=n.s$) en la variable tiempo rodando. Sin embargo, si se encontraron efectos significativos en esta variable en los animales de la condición control ($F=4.99$, $df=3$, $p<0.01$). Las comparaciones post hoc mostraron que todas las dosis de tetrabenacina (0.5, 1.0 y 2.0 mg/kg) disminuyeron el tiempo que los animales del grupo control, emplearon rodando en la RW. (Figura 1)

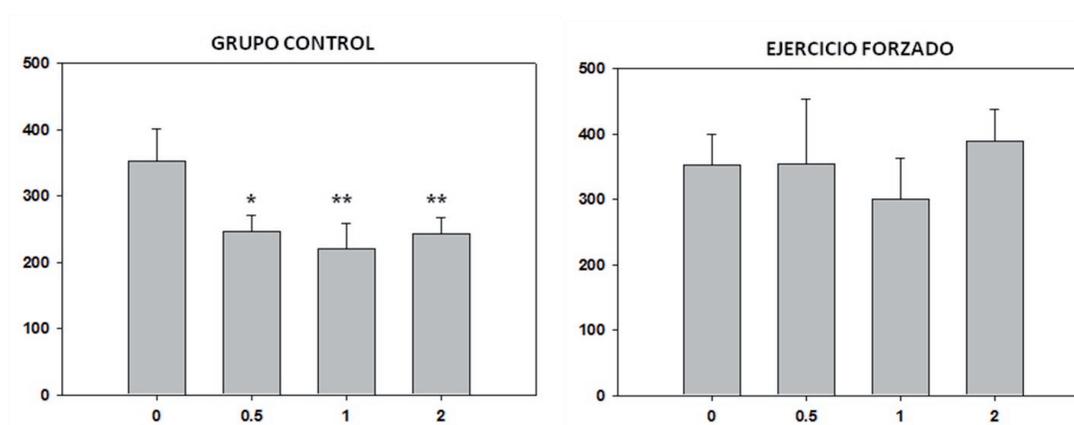


Figura 1. Tiempo rodando en rueda de actividad (RW) en función de la dosis de tetrabenacina (TBZ: 0.0,0.5,1.0,2.0 mg/kg) en el grupo control (izquierda) y grupo de ejercicio forzado (derecha). Media \pm SEM de segundos acumulados en RW. (** $p<0.01$, * $p<0.05$, diferencias significativas respecto a la dosis control 0 mg/kg)

En cuanto a la variable tiempo comiendo, el ANOVA de medidas repetidas no mostró efectos significativos del factor dosis en los animales del grupo control ($F=0.82$, $df=3$, $p= n.s$) aunque se observa una tendencia de incremento en el tiempo empleado comiendo al administrar TBZ. Tampoco hay evidencia de que la dosis de TBZ fuera efectiva en esta variable para la condición de ejercicio forzado ($F=0.61$, $df=3$, $p= n.s$). (Figura 2)

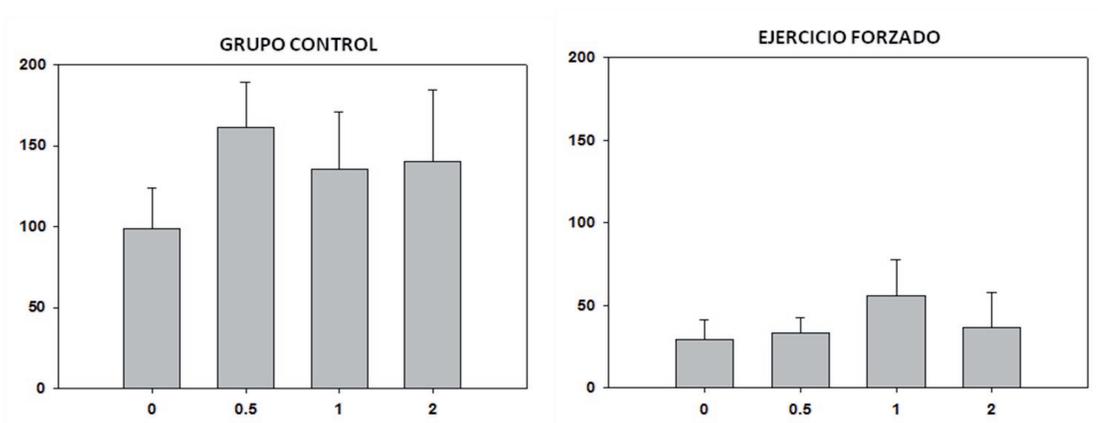


Figura 2. Tiempo comiendo en función de la dosis de tetrabenacina (TBZ: 0.0,0.5,1.0,2.0 mg/kg) en el grupo control (izquierda) y grupo de ejercicio forzado (derecha). Media \pm SEM de segundos acumulados comiendo pellets (bolitas de comida dulce)

El ANOVA de medidas repetidas no mostró efectos significativos del factor dosis en los animales del grupo control ($F=1,18$, $df=3$, $p= n.s$) en la variable tiempo olfateando. De la misma manera, no se encontraron efectos significativos en esta variable en los animales expuestos a ejercicio forzado ($F=0,45$, $df=3$, $p=n.s$). (Figura 3)

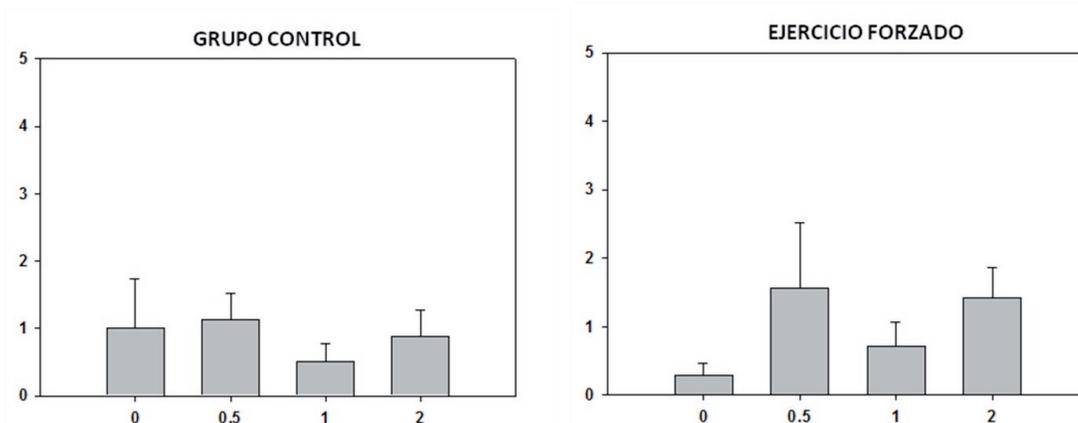


Figura 3. Tiempo olfateando en función de la dosis de tetrabenacina (TBZ: 0,0,0,5,1,0,2,0 mg/kg) en el grupo control (izquierda) y grupo de ejercicio forzado (derecha). Media \pm SEM de segundos acumulados oliendo

Devaluación de la comida mediante pellets con sabor amargo

Para validar el paradigma conductual empleado se realizó un experimento de devaluación del alimento rociando los pellets administrados en el test con una solución amarga (1g/l de cafeína). Para ello se empleó una muestra de 7 animales de la misma estirpe, pero diferentes a los que realizaron los test farmacológicos. La prueba t para muestras dependientes mostró un incremento significativo en al variable tiempo rodando en la condición ($t= -4,39$,

$p < 0,01$) de devaluación respecto a la línea base. Por otra parte, se observó una disminución significativa en el tiempo comiendo ($t = 2,36$, $p < 0,05$). (Figura 4). La prueba t no mostró diferencias en la variable tiempo olfateando entre la línea base y el test de devaluación ($t = 92$, $p = n.s$). (Figura 5)

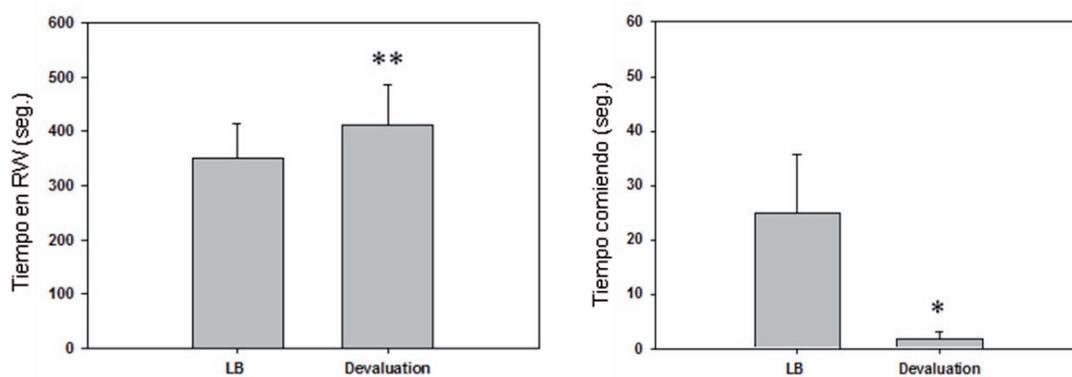


Figura 4. Tiempo en RW (izquierda) y tiempo comiendo (derecha) en línea base (LB) o tras la devaluación del alimento. Media \pm SEM de segundos acumulados en cada condición. (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, diferencias significativas respecto a LB)

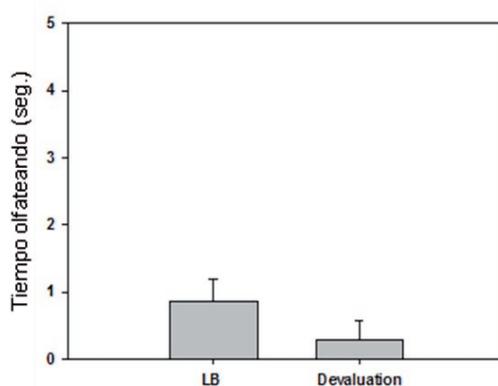


Figura 5. Tiempo olfateando en LB o tras la devaluación del alimento. Media \pm SEM de segundos acumulados en cada condición

Discusión y conclusiones

Como bien se ha descrito anteriormente, la actividad de correr en una rueda de actividad, puede ser reforzante en sí misma para los roedores. Este hecho lo hemos comprobado una vez más, mediante este experimento, dónde vimos que en condiciones normales los roedores pasan la mayoría del tiempo en la rueda de actividad, es decir, que prefieren permanecer más

tiempo realizando una actividad física que cualquiera de las otras opciones alternativas que no requieren esfuerzo.

Los resultados obtenidos reflejan que la depleción dopaminérgica reduce la elección de realizar esfuerzo físico en los animales con poca experiencia de ejercicio físico, pero no en los animales con alta experiencia. Es decir, que se produce un cambio en la elección en los animales sin previa experiencia en ejercicio forzado, dejando de la lado refuerzos que requieren la realización de esfuerzo por estímulos más sedentarios, que implican un menor coste de respuesta. Aunque no se observa un incremento significativo en la ingesta de comida al administrar tetrabenacina, sí que vemos una tendencia creciente que posiblemente sería significativa incrementando el número de la muestra. Además, lo destacable es que se reduce el tiempo que los animales permanecen rodando pero no ocurre de la misma manera con el tiempo empleado en comer, por tanto la motivación por la alimentación permanece intacta.

Estos estudios básicos en animales son potencialmente relevantes para la comprensión de disfunciones psiquiátricas tales como la anergia, cuyas bases biológicas son aun poco conocidas, y la selección de estilos de vida pasivos en los seres humanos.

Referencias bibliográficas

- Cousins, M. S., Atherton, A., Turner, L. y Salamone, J. D. (1996). Nucleus accumbens dopamine depletions alter relative response allocation in a T-maze cost/benefit task. *Behavioural Brain Research* 74:189-197.
- De Chiara, V., Errico, F., Musella, A., Rossi, S., Mataluni, G., Sacchetti, L. et al. (2010). Voluntary exercise and sucrose consumption enhance cannabinoid CB1 receptor sensitivity in the striatum. *Neuropsychopharmacology*. 35(2):374-87.
- Dishman, R. K., Berthoud, H. R., Booth, F. W., Cotman, C. W., Edgerton, R., Fleshner, M. R. et al. (2006). 17. Neurobiology of exercise. *Obesity* 14: 345-356
- Lambert, K. G. (2006). Rising rates of depression in today's society: consideration of the roles of effort based rewards and enhanced resilience in day-to-day functioning. *Neurosci Biobehav Rev*. 30:497-510.
- Pardo, M., Lopez-Cruz, L., Valverde, O., Ledent, C., Baqi, Y., Müller, C. E., Salamone, J. D. y Correa, M. (2012). Adenosine A2A receptor antagonism and genetic deletion attenuate the effects of dopamine D2 antagonism on effort-based decision making in mice. *Neuropharmacol* 62: 2068-2077.
- Rampello, L., Nicoletti, G., Raffaele, R. (1991). Dopaminergic hypothesis for retarded depression: a symptom profile for predicting therapeutical responses. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 84, 552-554.
- Salamone, J. D., Cousins, M. S. y Bucher, S. (1994). Anhedonia or anergia? Effects of haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. *Behavioral Brain Research*. 65: 221-229.
- Salamone, J. D. y Correa M. (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behavioral Brain Research*. 137: 3-25.
- Salamone, J. D., Correa, M., Mingote, S. M., Weber, S. M. y Farrar, A. M. (2006). Nucleus Accumbens Dopamine and the forebrain circuitry involved in behavioral activation and effort-related decision making: implications for understanding anergia and psychomotor slowing in depression. *Curr Psychiat Rev* 2, 267-280.

- Salamone, J. D., Correa, M., Farrar, A. M., Nunes, E. J. y Collins, L. E. (2010). Role of dopamine/adenosine interactions in the brain circuitry regulating effort-related decision making: Insights into pathological aspects of motivation. *Future Neurology*. 5(3): 377-392.
- Salamone, J. D. y Correa, M. (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*. 2012 Nov 8;76(3):470-85. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.021. Review.
- Stahl, S. M. (2002). The psychopharmacology of energy and fatigue. *Journal of Clinical Psychiatry*. 63: 7-8.
- Tylee, A., Gastpar, M., Lepine, J. P. y Mendlewicz, J. (1999). DEPRES II (Depression Research in European Society II): a patient survey of the symptoms, disability and current management of depression in the community. *Int Clin Psychopharmacol* 14:139-151.
- Zigmond, M. J., Cameron, J. L., Leak, R. K., Mirnics, K., Russell, V. A., Smeyne, R. J. et al. (2009). Triggering endogenous neuroprotective processes through exercise in models of dopamine deficiency. *Parkinsonism Relat Disord* 3: S42-45.