

Efecto de la modulación dopaminérgica en la preferencia por reforzadores activos en ratones con una mutación en el factor de transcripción Pitx3

MIREIA VERDEJO-PENYARROCHA
al374537@uji.es

ANDREA MARTÍNEZ-VERDÚ
averdu@uji.es

RÉGULO OLIVARES-GARCÍA
rolivare@uji.es

PAULA MATAS-NAVARRO
pmatas@uji.es

CARLA CARRATALÁ-ROS
ccarrata@uji.es

Resumen

La conducta motivada está caracterizada por altos niveles de activación, vigor y persistencia. La dopamina del núcleo accumbens (NACb) está implicada en regular este componente energizante de la motivación, incluida la toma de decisiones relacionada con el esfuerzo. Alteraciones en la activación conductual, como la anergia, se han observado en la depresión y en la enfermedad de Parkinson. El factor de transcripción Pitx3 es necesario para el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Su deficiencia produce la pérdida progresiva de estas neuronas, dando lugar a una baja dopamina estriatal. En el presente estudio, evaluamos el efecto de la mutación en este factor en ratones machos y hembras knockout (KO) Pitx3-aphakia y sus controles (WT) en medidas de activación conductual y toma de decisiones basada en esfuerzo. Utilizamos test de natación forzada (FST), laberinto en T de 3 opciones y rueda de actividad (RW). Los KO corrieron menos que los WT en RW y en laberinto en T y tendieron a realizar más conductas pasivas en comparación con los WT. En el FST apareció una tendencia opuesta, aunque no significativa: los KO escalaban más tratando de escapar y pasaban menos tiempo inmóviles. Estos resultados sugieren que la mutación en el Pitx3 afecta al componente vigorizante de la conducta motivada, observando en los KO un patrón menos activo que los WT. Esto tiene implicaciones para el desarrollo de futuros tratamientos de síntomas como fatiga o la anergia observados en gran variedad de psicopatologías caracterizadas por bajos niveles de dopamina.

Palabras clave: Motivación, dopamina, núcleo accumbens, anergia

Abstract

Motivated behavior is characterized by high levels of activation, vigor, and persistence. Nucleus accumbens dopamine (NACb) is involved in regulating this energizing component of motivation, including effort-related decision making. Alterations in behavioral activation, such as anergia, have been observed in depression and Parkinson's disease. The transcription factor Pitx3 is necessary for the development of dopaminergic neurons in the midbrain. Its deficiency produces the progressive loss of these neurons, leading to low striatal dopamine. In the present study, we evaluated the effect of the mutation in this factor in male and female Pitx3-aphakia knockout (KO) mice and their controls (WT) on measures of behavioral activation and effort-based decision making. We used forced swimming test (FST), T-maze 3 choice task and running wheel (RW). KOs ran less than WTs in RW and T-maze and tended to perform more passive behaviors compared to WTs. An opposite but not significant trend appeared in the FST: KOs climbed more trying to escape and spent less time immobile. These results suggest that the mutation in Pitx3 affects the invigorating component of motivated behavior, observing a less active pattern in KO than in WT. This has implications for the development of future treatments of symptoms such as fatigue or anergia observed in a wide variety of psychopathologies characterized by low levels of dopamine.

Key Words: Motivation, dopamine, nucleus accumbens, anergia

Introducción

La activación conductual es un aspecto crítico de la motivación, ya que nos permite iniciar y mantener una conducta dirigida a un objetivo, que a menudo requiere altos niveles de activación vigor y persistencia (Salamone et al. 2016). Cuando se producen déficits en este componente se observa sintomatología como la anergia, la fatiga o el retardo psicomotor, muy común en algunas patologías psicológicas y neurológicas como la depresión la esquizofrenia o la enfermedad de Parkinson (Salamone y Correa 2002, 2012; Salamone et al. 2016).

Se ha demostrado que el sistema dopaminérgico mesolímbico juega un papel clave en esta activación y realización de esfuerzo. En concreto, la dopamina del núcleo accumbens está implicada en regular el componente energizante de la conducta motivada, incluyendo la toma de decisiones basada en el esfuerzo tanto en humanos como en roedores (Salamone y Correa 2002, 2012). Por tanto, cuando se produce una reducción de los niveles de dopamina o un antagonismo en los receptores de dopamina en esta área se observa un sesgo de bajo esfuerzo en los animales evaluados en estas tareas de toma de decisiones basadas en el esfuerzo (Salamone et al. 2018).

El factor de transcripción Pitx3 es un factor crítico para la diferenciación y supervivencia las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo durante el desarrollo (Smidt,

Smits y Burbach 2004; Li, Dani y Le 2010). Se expresa de forma restrictiva en el cristallino y el mesencéfalo. Por tanto, la deficiencia en la expresión del Pitx3 hace que este subgrupo de neuronas dopaminérgicas se pierda progresivamente por apoptosis durante el desarrollo fetal (en la sustancia negra) y postnatal (en el área tegmental ventral), dando lugar a una baja dopamina estriatal (Van den Munckhof et al. 2003). Aunque se ha observado que esta pérdida no se produce por igual en ambas áreas, sino que se ha demostrado que la vía nigroestriatal se ve más afectada por esta mutación en el Pitx3 que la vía mesolímbica (Hwang et al. 2003; Smidt, Smits y Burbach 2004; Smits et al. 2005). Por tanto, los datos sugieren que el Pitx3 es un factor crítico especialmente para regular el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y se ha propuesto que la actividad neuronal restante del área tegmental ventral podría actuar como mecanismo compensatorio a la profunda pérdida de dopamina nigroestriatal (Smits et al. 2005).

El objetivo del estudio ha sido caracterizar el efecto de la mutación en el factor de transcripción Pitx3 en los ratones Ko Pitx3-aphakia (caracterizados por bajos niveles de dopamina (Smidt, Smits y Burbach 2004)), en comparación con sus controles, sobre la preferencia por reforzadores activos en la tarea del laberinto en T de 3 opciones, así como su activación conductual inducida por condiciones estresantes en test de natación forzada, y la actividad física voluntaria en la rueda de actividad.

En primer lugar, se empleó el Laberinto en T de tres opciones, que es una tarea de toma de decisiones basada en el esfuerzo, que permite al roedor interaccionar libremente con 3 reforzadores con diferentes requerimientos de esfuerzo. Es decir, permite examinar la preferencia relativa de los roedores por reforzadores activos (como la rueda de actividad) vs. reforzadores sedentarios (como unos *pellets* dulces y un aroma neutro) (Correa et al. 2016, 2020; López-Cruz, Salamone y Correa 2018; Carratalá-Ros et al. 2020). En segundo lugar, se empleó el test de natación forzada. Se trata de un modelo empleado para medir estados depresivos (*depressive-like*) en el cual se introduce al roedor en un recipiente profundo con agua y se examinan las conductas de nado, escalada e inmovilidad (Armario, Gavaldà y Martí 1988). Esto nos permite evaluar la activación conductual inducida por condiciones estresantes (Carratalá-Ros et al. 2020). Y, por último, se empleó la rueda de actividad para medir la actividad física voluntaria de los roedores en ausencia de otros reforzadores. Esta prueba es útil para caracterizar el nivel de actividad de cada roedor, ya que a pesar de que la rueda de actividad suele ser un estímulo altamente preferido por los roedores, como se observa por la cantidad de tiempo que suelen pasar en interacción con ella, no todos los roedores se caracterizan por el mismo nivel de activación o vigor.

Método

Animales

Se emplearon un total de 37 ratones adultos machos y hembras de la estirpe C57BL6 cedidos por Dra. Moratalla del Instituto Cajal, Madrid. Como grupo experimental se emplearon ratones Aphakia ($\kappa\kappa$), caracterizados por bajos niveles de dopamina (Smidt, Smits y Burbach 2004). Y como grupo control se emplearon roedores sin esta

mutación en el factor de transcripción Pitx3 (WT). En los estudios 1 y 2 se utilizaron 12 hembras (8 KO y 4 WT) y 10 machos (5 KO y 5 WT), mientras que en el estudio 3 se emplearon 10 hembras (4 KO y 6 WT) y 5 machos (2 KO y 3 WT). La diferencia en el tamaño de la muestra entre los experimentos radica en la dificultad de obtener estos roedores modificados genéticamente.

Los roedores estaban alojados en cajas de dos en dos, con pienso estándar para roedores de laboratorio y agua disponible *ad libitum*. La colonia se mantuvo a una temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un periodo de luz-oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos experimentales cumplieron con la directiva 2010/63 / UE del Parlamento Europeo. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados.

Procedimientos experimentales

LABERINTO EN T DE TRES OPCIONES

El laberinto de T de tres opciones es un paradigma conductual que permite evaluar la preferencia relativa por reforzadores con diferentes requerimientos de esfuerzo en los roedores. Se trata de una estructura con tres brazos en cada uno de los cuales se sitúa un reforzador diferente. Es decir, en uno de ellos se coloca una rueda de actividad (considerada el reforzador activo), y en los otros dos brazos se encuentran unos pellets dulces y un aroma, en este caso un olor floral (considerados los reforzadores sedentarios). Por tanto, se introduce al roedor en la zona central del aparato y se le deja interaccionar libremente con los tres estímulos durante 15 minutos. En este estudio se recogió el tiempo en interacción con cada estímulo, que es la principal variable dependiente.

TAREA DE NATACIÓN FORZADA

El test de natación forzada se considera un modelo de desesperanza y se usa para evaluar estados depresivos. Consiste en un recipiente cilíndrico lleno de agua a un nivel que al roedor no le permite tocar el fondo. Se introduce al roedor en el agua y se miden las conductas de nado, de escalada y de inmovilidad durante 6 minutos. Estas son medidas de activación conductual o su ausencia como indicadores del vigor empleado para escapar de una situación estresante.

RUEDA DE ACTIVIDAD

La rueda de actividad (Ugo Basile SL) es un paradigma que se emplea para medir la actividad física voluntaria y espontánea de los roedores. Se trata de una rueda de actividad situada en una caja de plexiglás, conectada a un dispositivo que registra la cantidad de vueltas que realiza el animal. Se introduce al roedor en la caja, y se registra el número de vueltas que da la rueda en 2 horas.

Experimentos

- Experimento 1: Efecto de la mutación genética del factor de transcripción Pitx3 en ratones Aphakia (KO), en comparación con sus controles (WT), en la preferencia por reforzadores activos vs. sedentarios en el laberinto en T de tres opciones. Se emplearon 22 ratones adultos C57BL6 tanto hembras (N = 12) como machos (N = 10). De las 12 hembras 8 pertenecían a la condición KO y 4 eran WT. En cuanto a los 10 machos 5 de ellos eran KO y 5 WT.
- Experimento 2: Efecto de la mutación genética del factor de transcripción Pitx3 en ratones Aphakia (KO), en comparación con sus controles (WT), en la actividad voluntaria en la rueda de actividad. Se emplearon los mismos 22 ratones C57BL6 adultos, hembras (N = 12) y machos (N = 10) una semana después de haber finalizado el experimento 1. De nuevo, de las 12 hembras 8 pertenecían a la condición KO y 4 eran WT. Y en cuanto a los 10 machos, 5 de ellos fueron KO y 5 WT.
- Experimento 3: Efecto de la mutación genética del factor de transcripción Pitx3 en ratones Aphakia (KO), en comparación con sus controles (WT), en las conductas de escalada, natación e inmovilidad en el test de natación forzada. Se emplearon 15 ratones C57 adultos, hembras (N = 10) y machos (N = 5). De las 10 hembras 4 pertenecían al grupo KO y 6 al grupo experimental. Y en cuanto a los 5 machos 2 de ellos fueron KO y 3 WT.

Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos extraídos de los experimentos se empleó la prueba *t* de Student para muestras independientes. El software empleado fue el Graph Pad Prism 8. Los datos se expresaron como medias \pm SEM, y la significación fue establecida como $p < 0.05$.

Resultados

- Experimento 1: *Laberinto en T de tres opciones*
Para las hembras, la prueba *t* de Student para muestras independientes mostró una disminución significativa en el tiempo corriendo en la rueda en el grupo experimental respecto al grupo control ($t(10) = 3.756$, $p < 0.01$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el tiempo comiendo ($t(10) = 1.593$, $p = 0.1423$), ni en el tiempo olfateando ($t(10) = 2.109$, $p = 0.0611$) (figura 1).
Para los machos, aunque la tendencia fue la misma que para las hembras, la prueba *t* de Student para medidas independientes no mostró diferencias estadísticamente significativas ni para el tiempo comiendo ($t(8) = 1.653$, $p = 0.1369$), ni el tiempo corriendo ($t(8) = 1.856$, $p = 0.1006$), ni el tiempo olfateando ($t(8) = 1.177$, $p = 0.2731$) (figura 2).

Laberinto en T de tres opciones: Hembras

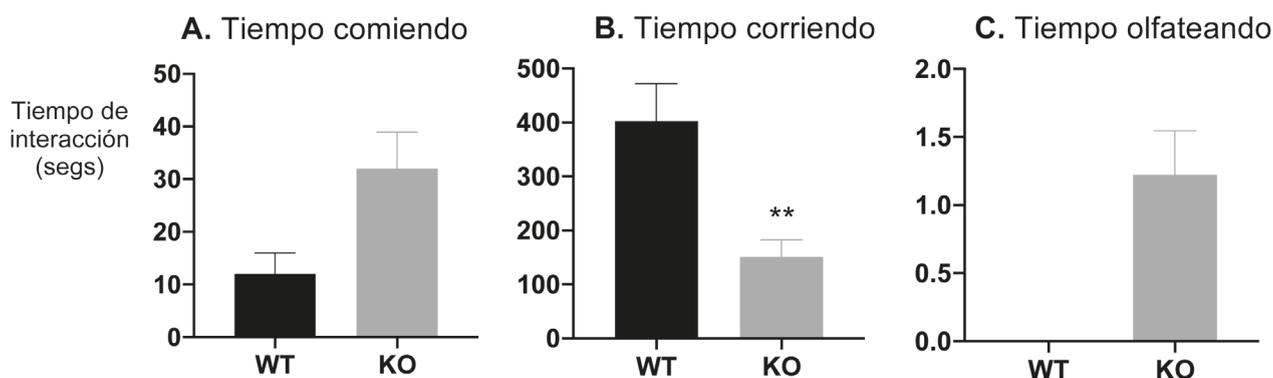


Figura 1. Efecto de la mutación en el factor de transcripción Pitx3 en las hembras en el tiempo comiendo (A), el tiempo corriendo (B) y el tiempo olfateando (C), en el laberinto de T de tres opciones, evaluado durante 15 minutos. Las barras representan la media (\pm SEM) de interacción con cada reforzador en segundos. ** $p < 0.01$ significativamente diferente respecto al grupo control.

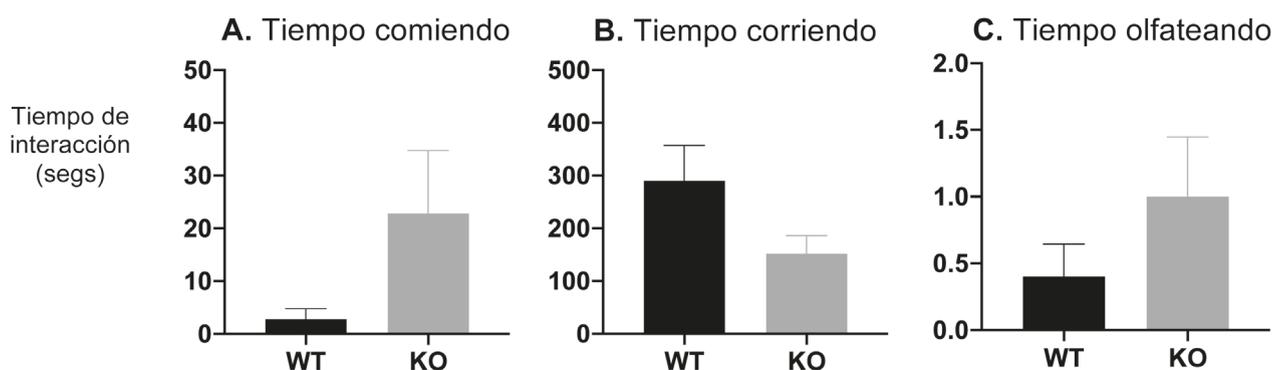


Figura 2. Efecto de la mutación en el factor de transcripción Pitx3 en los machos en el tiempo comiendo (A), el tiempo corriendo (B) y el tiempo olfateando (C), en el laberinto de T de tres opciones, evaluado durante 15 minutos. Las barras representan la media (\pm SEM) de interacción con cada reforzador en segundos.

• Experimento 2: Rueda de actividad

Tras realizar la prueba estadística *t* de Student para muestras independientes, en las hembras se encontró una disminución significativa en el número de vueltas en la rueda de actividad en grupo experimental respecto a sus controles ($t(10) = 3.577$, $p < 0.01$). En cambio, aunque la tendencia fue la misma, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de los machos ($t(7) = 1.102$, $p = 0.3069$) (figura 3).

Rueda de actividad

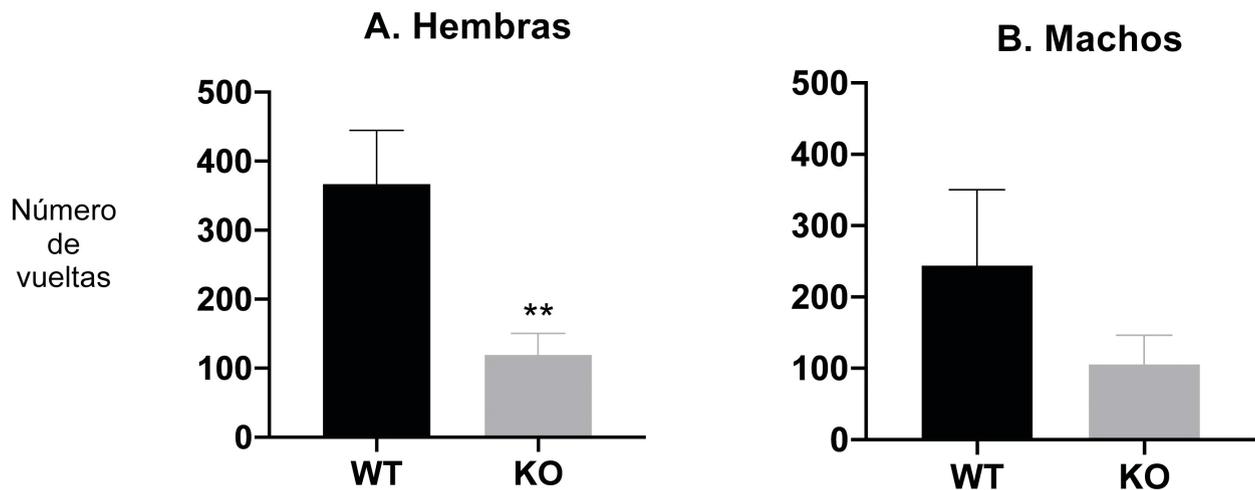


Figura 3. Efecto de la mutación en el factor de transcripción Pitx3 en el número de vueltas en hembras (A) y en machos (B), en la rueda de actividad, evaluada durante 2 horas. Las barras representan la media (\pm SEM) de actividad en número de vueltas. ** $p < 0.01$ significativamente diferente respecto al grupo control.

- Experimento 3: *Test de natación forzada*

Cuando analizamos los datos con la prueba t de Student para medidas independientes en este caso, juntando para el análisis a los machos y las hembras, observamos que no hay diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables; inmovilidad ($t(12) = 1.166$, $p = 0.1028$), natación ($t(12) = 0.2722$, $p = 0.7901$) y escalada ($t(12) = 1.109$, $p = 0.2890$) (figura 4).

Test de natación forzada: hembras y machos

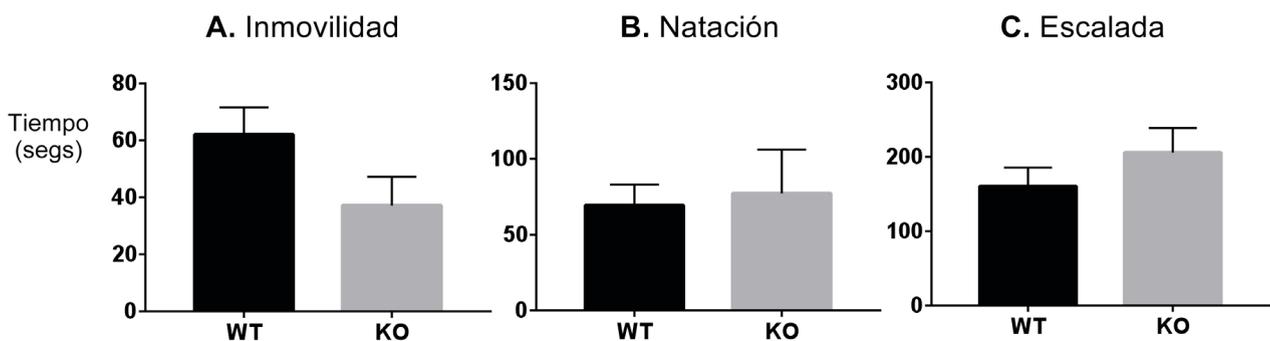


Figura 4. Efecto de la mutación en el factor de transcripción Pitx3 en las hembras y los machos en el tiempo de inmovilidad (A), el tiempo de natación (B) y el tiempo de escalada (C), en el test de natación forzada, evaluado durante 6 minutos. Las barras representan la media (\pm SEM) del tiempo realizando cada conducta en segundos.

Discusión y conclusiones

En el presente estudio se evaluó el efecto de la mutación en el factor de transcripción Pitx3 en roedores Ko Pitx3-Aphakia, en comparación con un grupo control de ratones nacidos de las mismas camadas y que no mostraban la mutación. Todos estos animales se evaluaron en diferentes paradigmas que permiten analizar la activación conductual voluntaria bajo diferentes condiciones de elección libre de reforzadores o en condiciones de estrés.

En el Laberinto en T de 3 opciones, observamos una tendencia que, aunque no es estadísticamente significativa, muestra como tanto las hembras como los machos ko pasan menos tiempo corriendo en comparación con sus controles. Y a su vez, observamos que pasan más tiempo comiendo y olfateando que los wt. Es decir, aunque el grupo experimental sigue pasando más tiempo corriendo que en interacción con los otros reforzadores, si lo comparamos con el grupo control, lo que observamos es un incremento por la preferencia relativa de reforzadores más sedentarios en estos ratones con niveles reducidos de dopamina. Estos resultados coincidirían con investigaciones previas utilizando este laberinto en las que la reducción farmacológica de los niveles de dopamina (López-Cruz et al. 2018; Carratalá-Ros et al. 2020) que ponen de manifiesto que interferencias en la transmisión dopaminérgica producen un sesgo de bajo esfuerzo en los roedores, cuando estos son evaluados en tareas de toma de decisiones basadas en el esfuerzo (Salamone et al. 2018). En este caso, se ve reflejado a través de una mayor preferencia relativa por reforzadores sedentarios en comparación con el grupo control. Respecto a las diferencias por sexo, como se ha comentado, tanto los machos como las hembras muestran este patrón similar en la preferencia relativa por los distintos reforzadores. Tanto las hembras como los machos ko pasan más tiempo comiendo y olfateando respecto a sus controles. Y estos a su vez, tanto machos como hembras, pasan más tiempo corriendo que sus respectivos ko.

Si observamos los datos extraídos del paradigma de rueda de actividad, encontramos un patrón parecido. Los grupos control de ambos sexos son los que realizan un mayor número de vueltas respecto a los ratones ko, aunque solamente encontramos resultados estadísticamente significativos en el caso de las hembras. Es decir, ambos grupos son capaces de correr, sin embargo, los ratones KO Pitx3-Aphakia parecen hacerlo en menor medida que su grupo control. Estos resultados también se encuentran en relación con lo esperado entre las depleciones dopaminérgicas y los déficits en la activación conductual (Salamone et al. 2018). En cuanto a las diferencias por sexo, de nuevo son los machos control los que realizan un menor número de vueltas en comparación con las hembras control.

Por tanto, lo que estaríamos observando es que la deficiencia en el factor de transcripción Pitx3 se caracterizaría a nivel conductual por un patrón de activación voluntariamente más pasivo en estos animales ko, ya que, como hemos podido observar en el Laberinto en T de tres opciones, a pesar de que en valores absolutos siguen prefiriendo la rueda, en comparación con sus controles parecen correr menos y seleccionar más los reforzadores sedentarios. Lo que concuerda con lo observado en el paradigma de la rueda de actividad, cuyos resultados muestran esta tendencia menos activa en comparación con los controles.

Sin embargo, cuando estudiamos la activación conductual inducida por condiciones estresantes, como en el caso del test de natación forzada, vemos una tendencia diferente, aunque no estadísticamente significativa. En este caso, los resultados se presentaron agrupados, debido al tamaño de la muestra de los machos. A pesar de la falta de resultados estadísticamente significativos en las tres variables, podemos observar una leve tendencia de los ratones KO, a pasar más tiempo escalando, y menos tiempo inmóviles en comparación con los controles. Es decir, paradójicamente en este caso no observaríamos ese patrón más pasivo en el caso de los KO, que si se ha encontrado en los experimentos anteriormente descritos. Por tanto, lo que observamos es que, en condiciones estresantes, el grupo experimental muestra un patrón levemente más activo que el grupo control, expresado a través de un mayor tiempo de nado y escalada, y un menor tiempo de inmovilidad.

Este estudio es relevante para la caracterización de sintomatología amotivacional como la anergia o la fatiga y su relación con las proyecciones dopaminérgicas nigroes-triatales y mesolímbicas. Además, esta investigación podría tener implicaciones futuras en la evaluación de posibles tratamientos farmacológicos para estos síntomas que son muy comunes en algunas patologías psiquiátricas y neurológicas como la depresión o la enfermedad de Parkinson, es decir, patologías que se caracterizan por bajos niveles de dopamina.

Referencias bibliográficas

- Armario, Antonio, Amadeu Gavaldà y Octavi Martí. 1988. "Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate". *European Journal of Pharmacology*, 158(3): 207-212.
- Carratalá-Ros, Carla, Laura López-Cruz, Noemí SanMiguel, Patricia Ibáñez-Marín, Andrea Martínez-Verdú, John D. Salamone y Mercè Correa. 2020. "Preference for exercise vs. more sedentary reinforcers: validation of an animal model of tetrabenazine-induced anergia". *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13(289).
- Correa, Mercè, Marta Pardo, Pilar Bayarri, Laura López-Cruz, Noemí San Miguel, Olga Valverde, Catherine Ledent y John D. Salamone. 2016. "Choosing voluntary exercise over sucrose consumption depends upon dopamine transmission: effects of haloperidol in wild type and adenosine A2AKO mice". *Psychopharmacology*, 233(3): 393-404.
- Correa, Mercè, Marta Pardo, Carla Carratalá-Ros, Andrea Martínez-Verdú y John D. Salamone. 2020. "Preference for vigorous exercise versus sedentary sucrose drinking: an animal model of anergia induced by dopamine receptor antagonism". *Behavioural pharmacology*, 31(6): 553-564.
- Hwang, Dong-Youn, Paul Ardayfio, Un Jung Kang, Elena V. Semina y Kwang-Soo Kim. 2003. "Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice". *Molecular Brain Research*, 114(2): 123-131.
- Li, Jia, John A. Dani y Weidong Le. 2009. "The role of transcription factor Pitx3 in dopamine neuron development and Parkinson's disease". *Current topics in medicinal chemistry*, 9(10): 855-859.

- López-Cruz, Laura, John D. Salamone, y Mercè Correa. 2018. "Caffeine and selective adenosine receptor antagonists as new therapeutic tools for the motivational symptoms of depression". *Frontiers in pharmacology*, 9(526).
- Salamone, John D. y Mercè Correa. 2002. "Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine". *Behavioural brain research*, 137(1-2): 3-25.
- Salamone, John D. y Mercè Correa. 2012. "The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine". *Neuron*, 76(3): 470-485.
- Salamone, John D., Mercè Correa, Samantha Yohn, Laura López-Cruz, Noemí SanMiguel y Luisa Alatorre. 2016. "The pharmacology of effort-related choice behavior: Dopamine, depression, and individual differences". *Behavioural Processes*, 127: 3-17.
- Salamone, John D., Mercè Correa, Jen-Hau Yang, Renee Rotolo y Rose Presby. 2018. "Dopamine, effort-based choice, and behavioral economics: basic and translational research". *Frontiers in behavioral neuroscience*, 12(52).
- Smidt, Marten P., Simone M. Smits y J. Peter H. Burbach. 2004. "Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra". *Cell and tissue research*, 318: 35-43.
- Smits, Simone M., Daniel S. Mathon, J. Peter H. Burbach, Geert M.J. Ramakers y Marten P. Smidt. 2005. "Molecular and cellular alterations in the Pitx3-deficient midbrain dopaminergic system". *Molecular and Cellular Neuroscience*, 30(3): 352-363.
- Van den Munckhof, Pepijn, Kelvin C. Luk, Line Ste-Marie, Jane Montgomery, Pierre J. Blanchet, Abbas F. Sadikot y Jacques Drouin. 2003. "Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons". *Development*, 130(11): 2535-2542.