

Impacto del ejercicio físico sobre los sistemas dopaminérgicos: relevancia para la elección de reforzadores activos y la prevención de la anergia en modelos animales.

Xavier Ros García (53384920B)

Tutora: Mercè Correa Sanz

CONVOCATORIA JUNIO 2015

GRADO EN PSICOLOGÍA

Índice de Contenidos

Abstract	2
Resumen	2
Extended Summary	3
Introducción	6
Materiales y Métodos	15
Sujetos	15
Materiales	15
Procedimiento Conductual	16
Análisis estadísticos	17
Discusión y Conclusiones	22
Apéndices estadísticos	30

Abstract

Introduction Sedentary Modern lifestyles are associated with an increased risk of pathologies such as obesity, cardiovascular diseases or depression, while physical activity has demonstrated to improve brain health and has beneficial effects on depression, whose core symptoms includes anergia, fatigue and effort-related dysfunctions. Dopamine (DA) systems play a critical role in behavioral activation and effort-based decision-making. Previous studies have shown that DA depletion can change the preference for reinforcers that require effort, but the impact of previous physical activity in the preference for active or sedentary reinforcers is still unknown.

Objective The aim of this study is to investigate if forced or voluntary exercise can change the innate preference for active versus sedentary reinforcers in a mice T-maze task previously used for the assessment of anergia induced change in preferences.

Materials and Methods We have used a mice T-maze task for the assessment of preference between three types of reinforcers: physical activity in a running wheel (RW), freely available sucrose pellets and a neutral non-social odor in the third arm.

Results In general, all animals shown a marked innate preference by the RW. However, animals previously forced to exercise spent less time running, and remained more time eating and sniffing the neutral odor than the voluntary exercise group. Latency to RW was also higher, and proportion RW selection as a first choice was lower, than voluntary exercise group.

Conclusions Running in a RW is reinforcing for mice, but this innate preference could be modified by different factors. Compared with voluntary, forced exercise can induce a small avoidance by running. However, both forms of exercise are usefull for the prevention of DA depletion induced anergia. Animal studies could be important to understand and prevent effort-related dysfunctions in humans.

Key words: Dopamine; exercise; mice; anergia; depression.

Resumen

Introducción Los modernos estilos de vida sedentarios se asocian a un incremento en el riesgo de padecer enfermedades como obesidad, enfermedades cardiovasculares y depresión, mientras que la actividad física ha demostrado tener efectos beneficiosos en la depresión, cuyos síntomas centrales incluyen anergia, fatiga y disfunciones relacionadas con el esfuerzo. Los sistemas de dopamina (DA) juegan un papel crítico en la activación conductual y la toma de decisiones basadas en el esfuerzo. Estudios previos han demostrado que la depleción de DA puede cambiar

las preferencias de los ratones por reforzadores que requieren esfuerzo, pero el impacto de la actividad física previa sobre esta preferencia aún se desconoce.

Objetivo El objetivo del presente estudio es investigar si el ejercicio forzado o voluntario puede cambiar la preferencia innata por reforzadores activos versus sedentarios en una tarea en ratones con un laberinto en T previamente utilizado para la evaluación de los cambios en las preferencias inducidos por anergia.

Materiales y Métodos Para evaluar la preferencia, hemos utilizado un laberinto en T con tres reforzadores: Actividad física en una rueda, bolas de sacarosa de libre acceso y un olor neutro no social en el tercer brazo.

Resultados En general, todos los animales mostraron una clara preferencia por la RW. Sin embargo, los animales previamente forzados al ejercicio pasaron menos tiempo corriendo y más tiempo comiendo y olfateando que los animales de ejercicio voluntario. También la latencia a la RW fue mayor, y la proporción de RW como primera elección menor, que en el grupo de actividad voluntaria.

Conclusiones Correr en una rueda de actividad es reforzante para los ratones, pero esta preferencia innata puede ser modificada por diferentes factores. Comparado con el voluntario, el ejercicio forzado puede inducir una ligera evitación del ejercicio. Los estudios en animales pueden ser importantes para entender y prevenir disfunciones relacionadas con el esfuerzo en humanos.

Palabras clave: Dopamina; ejercicio; ratones; anergia; depresión.

Extended Summary

Introduction

Physical exercise is an important factor in lifestyle, and it can improve cognition, alleviate depression and decrease weight. Sedentary lifestyles are associated with an increased risk of pathologies such as obesity, cardiovascular diseases or depression. Therefore, in the recent years, there has been increasing the interest in studying the mechanisms underlying the control of physical exercise.

Although depression is defined as an affective disorder, some alterations in depression are energy-related disorders like fatigue and anergia. Evidence suggests that dopamine (DA) systems play a critical role in behavioral activation. Previous studies have shown that tetrabenazine (TBZ) induced DA depletion in mice can change the preference for reinforcers

that require effort, shifting preferences towards sedentary reinforcers. Thus, DA is critical in regulation on exertion of effort and effort-related decision-making.

However, animal studies suggest that previous exercise could also change that preferences. Previous studies have demonstrated that both forced and voluntary exercise can be useful in prevention DA depletion-induced anergia. However, they do not produce exactly the same effects.

The objective of this study is to investigate if forced or voluntary exercise can change the innate preference for active (running wheel, RW) versus sedentary (freely available sucrose pellets) natural reinforcers, in a T-maze task previously used for the assessment of anergia induced change in preferences.

Materials and Methods

Animals. Male Swiss CD1 mice (n=40) from Janvier (France) were randomly assigned to each physical exercise group.

Materials. All animals were housed in collective cages (3-4 animals per cage) with free available water and chow. Animals selected to Voluntary RW group were housed in enrichment condition with 24 hours free wheel running access while rest of animals were housed in standard conditions without wheel running access. In order to train Forced RW condition animals we use the Forced Exercise / Walking Wheel System for Mice (Model 80800A*C). To assess the posterior preferences to stimuli, T-maze with three type of reinforcers was used: physical activity in a wheel running, a dish with freely available sucrose pellets and water, and a non-social odor in the third arm.

Behavioral Procedures. Forced RW (n=10) group was daily trained during 60 minutes. Blocked RW group (n=10) was enclosed 60 minutes in the same conditions but wheels were blocked. Voluntary RW group (n=8) was trained with freely available RW while Without RW group (n=12) was not trained (this group remained in standard housing conditions). After a 9 week training period, animals were tested with the T-maze test.

Statistical Analyses. To analyze the impact of the previous condition of physical activity in the preference for each stimuli, one way ANOVA was used. When ANOVA was significant, *post hoc* LSD Fisher test was employed. Kruskal-Wallis test and chi square tests were used for RW latency and first choice, respectively.

Results

Time in arm. One way ANOVA showed a significant effect of previous condition on time in RW arm. Fisher LSD test showed that Voluntary RW condition animals spent significantly more time in the RW arm than Forced RW group. There was no effect on time in food arm or odor arm.

Frequency to arm. One way ANOVA showed a significant effect of previous condition on frequency to odor arm. Fisher LSD test showed that Voluntary RW condition animals do significantly more crossings to the odor arm than Forced RW group. There was no effect on time in food arm or RW arm.

Time of stimuli interaction. One way ANOVA showed a significant effect of previous condition on time running. Fisher LSD test showed that Voluntary RW condition animals spent significantly more time running than Forced RW group. There was no effect on time eating or sniffing.

RW Latency. Kruskal-Wallis test did not reveal significant differences between previous condition in the RW latency.

Percentage First Choice. Chi-square test revealed significant differences between previous condition in the first choice (RW vs Sucrose Pellets). However, there were not differences between forced and voluntary groups.

Discussion and Conclusions

The results of the present study indicate that there are differences in innate preferences of mice for different type of reinforcers depending on the type of exercise previously made. Although mice spend most of the time in the RW, our results showed that Forced RW animals run less than Voluntary RW animals. Forced RW animals spend more time eating and sniffing than Voluntary RW animals, indicating a change in their preferences towards sedentary reinforcers. Although latency results were not significant, we observed that forced groups take more time to start running, and cross more times into odor arm, indicating the lower interest by the RW. This trend is observed also in the lower proportion of animals that selected RW as a first choice.

This results show that compared with voluntary, forced exercise can induce a small avoidance by running. However, both voluntary and forced exercise are usefull for the prevention of DA depletion induced anergia.

Considering the growing incidence of sedentary lifestyles, animal studies could be important to prevent and understand effort-related dysfunctions in humans.

Introducción

Impacto del ejercicio físico sobre la salud

El ejercicio físico es un elemento muy importante en el estilo de vida, pudiendo mejorar la salud tanto mental como física a lo largo de todo el ciclo vital (Hillman, Erickson & Kramer, 2008). Su potencial para disminuir el peso corporal, aliviar la depresión, mejorar la cognición o combatir el envejecimiento ha sido ampliamente estudiado, e incluso se ha establecido una relación entre la cantidad de actividad física y diversas causas de mortalidad (Löllgen, Böckenhoff & Knapp, 2009). Por ejemplo, existen múltiples pruebas de que una actividad física insuficiente asociada al estilo de vida sedentario, propio de las sociedades modernas, es uno de los factores principales que contribuyen a incrementar el riesgo de padecer enfermedades como la diabetes tipo 2, osteoporosis, cáncer, enfermedades cardiovasculares o depresión (Dishman et al., 2006). Específicamente entre niños del mundo desarrollado, la falta de ejercicio es una de las principales causas de obesidad, mientras que su práctica mejora no solamente su salud física, sino también su rendimiento académico (Hillman et al., 2008).

Precisamente la obesidad y otros trastornos relacionados con la inactividad están incrementando a un ritmo muy alarmante en las sociedades occidentales, por lo que es importante entender los mecanismos involucrados en la regulación de la conducta relacionada con la actividad física (Knab & Lightfoot, 2010).

Ejercicio físico y salud cerebral

Durante los últimos años de manera particular, ha aumentado el interés científico y público en estudiar los efectos de la actividad física en la salud mental (Kramer & Erickson, 2007). Los datos epidemiológicos procedentes de estudios de intervención con ejercicio en humanos, demuestran los efectos positivos de la actividad física y el ejercicio voluntario en la salud mental (Collins & Fitterling, 2009). El *fitness* parece tener una influencia positiva tanto en las redes cerebrales que se encargan de aspectos cognitivos tales como memoria a corto plazo o control atencional, como en la estructura del tejido cerebral, especialmente en regiones prefrontales, temporales y parietales, y también en la sustancia blanca anterior (Kramer & Erickson, 2007). En la misma línea, Van Praag (2009) demuestra que el ejercicio aeróbico aumenta la resiliencia del cerebro a la pérdida de memoria y a la atrofia del hipocampo. No obstante, gran parte de las evidencias actuales derivadas de la investigación en humanos han sido desarrolladas a partir de estudios con pequeñas muestras y por tanto, difícilmente generalizables (Chalder et al., 2012). Además, factores ambientales como la accesibilidad al ejercicio, tiempo, etc., además de los personales, juegan papeles principales (Kramer & Erickson, 2007), por lo que se requieren más estudios en este sentido.

El fenómeno de los beneficios de la actividad física también ha sido estudiado utilizando el

modelo animal (Van Praag, 2008), y los datos han empezado a revelar importantes mecanismos celulares y moleculares mediante los que la actividad física puede influenciar la función y estructura del cerebro y, por lo tanto, la actividad cognitiva (Kramer & Erickson, 2007). El ejercicio también promovería la protección del cerebro ante las enfermedades neurodegenerativas (Ploughman, 2008) o la recuperación después de lesiones (Duman, Schlesinger, Russell & Duman, 2008). Por este motivo, el ejercicio físico se está proponiendo actualmente como una intervención conductual para mejorar los problemas neurológicos retrasando la pérdida neuronal causada por las enfermedades neurodegenerativas (Yoon et al., 2007).

Los estudios que han examinado la intensidad del ejercicio que se requiere para optimizar sus resultados positivos en la función cerebral sugieren que la moderación es importante: en un modelo de lesión cerebral, el incremento sustancial de neurotrofinas ocurre con ejercicio prolongado de baja intensidad, mientras que la elevada intensidad aumenta la corticosterona (Ploughman, 2008). Carro y colaboradores (2001) demostraron que el ejercicio moderado (un kilómetro al día) mejora la recuperación funcional de las neuronas en cerebros lesionados en roedores, tanto si el ejercicio comienza antes de la lesión como si se inicia posteriormente. La actividad puede incrementar los niveles de BDNF dependiendo de la intensidad del ejercicio, pero demasiado vigor puede reducir esta elevación (Chan et al., 2008).

El tipo de ejercicio también es muy importante. Así el ejercicio voluntario produce efectos diferentes en algunos aspectos al ejercicio forzado (Leasure & Jones, 2008). Los datos parecen señalar que los efectos de ambos modelos de ejercicio son capaces de producir neuroprotección (Hayes et al., 2008), pero no son equivalentes (Ang & Gomez-Pinilla, 2007; Leasure & Jones, 2008; Hayes et al., 2008; Ridgel et al., 2009; Kinni et al., 2011). Por ejemplo, se sabe que el ejercicio físico voluntario facilita procesos neuroadaptativos y neuroprotectores tales como la neurogénesis, la supervivencia celular, la activación de los sistemas antioxidantes o la plasticidad neuronal (Van Praag 2009; Devi & Kiran, 2004), así como funciones cognitivas y algunos tipos de aprendizaje y memoria, incluyendo el aprendizaje motor a nivel de la médula espinal (Dishman et al., 2006).

Estudios de ejercicio físico voluntario llevados a cabo en roedores indican que, a largo plazo, el ejercicio voluntario produce neuroplasticidad en el NAc y el ATV (Greenwood et al., 2011) y tiene efectos ansiolíticos y antidepresivos (Duman et al., 2008). Otros estudios señalan que el ejercicio forzado parece tener un efecto mayor en la neuroprotección (Kinni et al., 2011). Sin embargo, otros estudios señalan que es el ejercicio forzado, pero no el voluntario, el que ejerce el efecto neuroprotector en el cerebro en modelos de Parkinson (Ridgel et al., 2009) o lesión cerebral de la arteria cerebral media (Hayes et al., 2008). Por ejemplo, se han demostrado los efectos compensatorios que el ejercicio físico forzado parece tener sobre la muerte neuronal en las estructuras y conexiones dopaminérgicas del cerebro medio y los ganglios basales tras

lesiones inducidas con 6-OHDA, MPTP (Yoon et al., 2007; Petzinger et al., 2007) o tras la inflamación inducida por LPS (Lipopolisacárido) activando la señalización de BDNF en estas áreas (Wu et al., 2011). Los efectos protectores del ejercicio forzado han sido observados incluso cuando el ejercicio comienza tras la lesión (Tajiri et al., 2010).

Todos estos procesos neurogénicos del sistema nervioso central tienen importantes implicaciones para el tratamiento de la obesidad, depresión y otros trastornos neurológicos, incluso también para el deterioro cognitivo asociado a la edad (Dishman et al., 2006). En los últimos años se ha propuesto que un déficit en esta neurogénesis adulta puede estar involucrado de manera particular en el trastorno depresivo mayor (Kodama, Fujioka & Duman, 2004). Por otro lado, debido a que el ejercicio físico es capaz de aumentar la plasticidad cerebral y la neurogénesis adulta, es una terapia que ha recibido especial atención (Blumenthal et al., 2007), y que podría considerarse una estrategia coadyuvante, sobre todo en los casos en que otros tratamientos para el trastorno depresivo no son efectivos (Collins & Fitterling, 2009).

Impacto del ejercicio físico en la depresión

Parece existir una relación positiva entre la actividad física y la disminución de la incidencia de los trastornos mentales (Wiles et al., 2007). En el caso de la depresión, la evidencia acumulada señala que la actividad física y el ejercicio regular podrían reducir la depresión (Chalder et al., 2012; Dishman et al., 2006). Por ejemplo, Blumenthal et al. (2007) observaron que la eficacia del ejercicio físico en pacientes con trastorno depresivo mayor podría ser comparable con la eficacia de los antidepresivos, y que ambos resultaban ser mejor que el placebo. Por otro lado, se ha observado que la inactividad física se asocia a un incremento del riesgo y prevalencia de depresión (Collins & Fitterling, 2009). Por ejemplo, en el Alameda County Study se observó que la incidencia de depresión aumentó en un 70 por ciento en aquellas personas que realizaban poca actividad física (Camacho, Roberts, Lazarus, Kaplan & Cohen, 1991). Gracias a esta acumulación de evidencias, la actividad física ha sido recomendada como parte de las directrices de tratamiento de la depresión por el NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence) en Reino Unido (Chalder et al., 2012).

No obstante, y a pesar de la tendencia general de los estudios, la relación entre ejercicio físico y depresión no es tan clara. Por ejemplo, en un estudio más reciente en humanos, Chalder et al. (2012) advierten que la terapia de intervención con ejercicio físico, además del cuidado habitual, no mejora los síntomas de la depresión ni reduce el consumo de antidepresivos comparado con el cuidado habitual a solas. Además, la asociación entre actividad física y bienestar general es evidente, pero la mayoría de estudios que se realizan para demostrar específicamente la relación entre actividad física y depresión utilizan únicamente datos transversales, los cuales no son suficientes para determinar relaciones de causalidad (Collins &

Fitterling, 2009), al mismo tiempo que impiden observar el fenómeno a lo largo del tiempo para estudiar si dicha relación se mantiene (Wiles et al., 2007). Por este motivo los estudios con animales son especialmente útiles, ya que permiten manipular las variables para establecer relaciones más poderosas, al tiempo que permiten observar el efecto a lo largo del tiempo.

En dichos estudios con animales, el ejercicio físico crónico en ruedas de actividad ha demostrado prevenir las consecuencias conductuales de la indefensión aprendida, que es un paradigma utilizado como modelo animal de depresión (Dishman et al., 2006). Así mismo, en ratones el ejercicio crónico demostró tener un efecto antidepresivo en 3 pruebas diferentes: test de indefensión aprendida (LHT), test de natación forzada (FST) y la prueba de suspensión de la cola (TST) (Duman et al. 2008). En los tres casos, las respuestas de los animales previamente ejercitados eran similares a aquellos que fueron tratados con fármacos antidepresivos. Los autores demostraron también que los efectos conductuales observados en los test no se debían a que el ejercicio mejorara los niveles basales de actividad motora o la locomoción, sino que se debían exclusivamente al efecto antidepresivo, ya que precisamente dicho efecto fue observado cuando la actividad locomotora de los ratones era menor en relación con los controles sedentarios (Duman et al. 2008).

No obstante, y aunque en los últimos años se han publicado numerosos estudios que relacionan el ejercicio físico con una mejora de la depresión (Chalder et al., 2012; Dishman et al. 2006; Löllgen et al., 2009; Chan, Tong & Yip, 2008; Collins & Fitterling, 2009; Camacho et al., 1991; Blumenthal et al., 2007; Duman et al., 2008; Brené et al., 2007), aún no se ha estudiado su relación específica con los síntomas motivacionales relacionados con el esfuerzo que se dan en la depresión y en otras patologías (Stahl, 2002).

Componente motivacional de la depresión: Papel de la dopamina (DA) en el enlentecimiento psicomotor y la anergia.

Aunque se considera un trastorno afectivo cuyos síntomas centrales son el afecto negativo y las alteraciones del humor, algunas de las manifestaciones clínicas más comunes en la depresión son cansancio, indiferencia, fatiga y otros problemas relacionados con la falta de energía (Maurice-Tison et al., 1998; Pae et al., 2007; Kennedy, 2008). Este grupo de síntomas han sido denominados de diversas maneras, como “anergia”, “fatiga” o “enlentecimiento psicomotor” (Salamone et al., 2006), y no son exclusivos del trastorno depresivo. De hecho, la apatía es el problema más común en trastornos cerebro-vasculares y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, demencia de Lewy, demencia fronto-temporal, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, etc. (Nodel et 2014). La anergia es tan común como el estado de ánimo deprimido y ambos síntomas se presentan al mismo tiempo en un 75% de los pacientes deprimidos (Tylee & Gandhi, 2005). A

pesar de que los síntomas motivacionales pueden ser potencialmente resistentes al tratamiento (Stahl, 2002), la apatía es uno de los síntomas menos investigados, por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson, pese a que su frecuencia es mucho mayor en la población con la enfermedad que en la población estándar (Nodel et al., 2014).

Aunque tradicionalmente se ha asociado la reducción en los niveles de DA con el síntoma de anhedonia que puede aparecer en la depresión, numerosos estudios revelan que la reducción de la DA en pacientes psiquiátricos tiene más relación con un enlentecimiento psicomotor y una escasa interacción con el ambiente (Schmidt et al. 2001). En el caso de la enfermedad de Parkinson, por ejemplo, cuya causa es una muerte neuronal progresiva de las células dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc), la apatía es un síndrome que también suele diagnosticarse en ausencia de otros signos de depresión (Nodel et al., 2014), lo que sugiere que este síntoma es el nexo común entre la enfermedad de Parkinson y la depresión y que depende, presumiblemente, de una disfunción del sistema dopaminérgico. En este sentido, el enlentecimiento motor en pacientes deprimidos es muy similar también a la bradicinesia que se observa en la enfermedad de Parkinson (Caligiuri y Ellwanger 2000).

Las neuronas dopaminérgicas se localizan en el área tegmental ventral (VTA) y en la SNpc, áreas ambas situadas en el mesencéfalo, que proyectan sus axones a través de tres vías principales: la vía mesolímbica, que va desde VTA hacia el núcleo accumbens (NAcc), situado en la parte ventral del cuerpo estriado, la vía mesocortical, que va desde VTA hacia la corteza prefrontal, en particular la corteza cingulada anterior (ACC) y la vía nigroestriatal, desde la SNpc hacia el cuerpo estriado. Mientras que la vía nigroestriatal está más involucrada en funciones motoras (Salamone, 1992), la vía mesolímbica está más relacionada con procesos motivacionales de activación conductual, así como de la toma de decisiones relacionada con el esfuerzo (Salamone & Correa, 2002; 2012). La DA en el NAcc parece regular la respuesta de aproximación a un estímulo relevante en función del esfuerzo necesario para realizar la acción y sopesando el beneficio potencial (Salamone & Correa, 2012). Pero en este proceso de toma de decisiones basada en el esfuerzo no sólo participa el NAcc, también hay otras áreas corticales y límbicas involucradas. Por ejemplo, las lesiones o inactivación del ACC, tanto como la inactivación de la amígdala basolateral (BLA), producen efectos similares a la alteración dopaminérgica en el NAcc (Salamone & Correa, 2012). En humanos también se ha demostrado que la información sobre la demanda de esfuerzo que llega al NAcc viene del ACC dorsal, al menos en parte (Botvinick et al., 2009).

Se ha observado que pacientes de Parkinson cuya apatía no responde a la medicación dopaminérgica, tienen una mayor atrofia del NAcc bilateral y de la zona dorsolateral de la cabeza del núcleo caudado (Carriere et al. 2014). Además, existía una correlación positiva entre nivel de atrofia del NAcc izquierdo y la severidad de la apatía. En otro estudio de neuroimagen

se comprobó que el decremento de volumen del NAcc se asocia con la apatía, pero no con otros parámetros de depresión, en pacientes infectados con VIH (Paul et al., 2014). En el NAcc, la DA actúa a través de dos familias de receptores: receptores tipo D1 (D1R) y receptores tipo D2 (D2R). Se ha observado en estudios de neuroimagen que un decremento de la disponibilidad de D2R en el estriado, incluyendo el NAcc, es un fenotipo común a los trastornos en los que se aprecia una disregulación de la motivación, como la obesidad (Wang et al. 2009), la adicción (Volkow et al. 2011a) y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) (Volkow et al., 2011b).

En general, estos estudios demuestran que los niveles de D2R correlacionan con ciertas características como la búsqueda de sensaciones y el grado de motivación (Tomer et al. 2008). Terapias que actúen sobre los D2R podrían tener éxito en esta clase de trastornos, ya que la sobreexpresión de los D2R en el NAcc (pero no en el estriado dorsal) de los ratones adultos consigue aumentar la motivación sin alterar la conducta consumatoria, logrando incrementar sus niveles de respuesta operante cuando los requisitos aumentan y haciendo que los animales incrementen el esfuerzo para conseguir una recompensa mejor pero más costosa (Trifilieff et al. 2013).

Los datos sobre la disregulación dopaminérgica en pacientes con trastorno depresivo mayor incluyen, por ejemplo, concentraciones más reducidas de ácido homovanílico (HVA) (metabolito de la DA) en el líquido cefalorraquídeo, reducción de la absorción de L-DOPA a través de la barrera hematoencefálica o la regulación al alza de los transportadores de DA (Soskin et al. 2013). Existen estudios que demuestran que, cuando se añaden psicoestimulantes a los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), las mejoras se producen específicamente en los síntomas de fatiga y apatía (Fava et al., 2007; Ravindran et al., 2008), lo que sugiere que los antidepresivos serotoninérgicos no son efectivos para el tratamiento de los síntomas motivacionales.

El bupropión (antidepresivo que actúa bloqueando el DAT e incrementando los niveles extracelulares de DA), no solamente mejora específicamente la apatía en pacientes con depresión, siendo más efectivo que los inhibidores de la recaptación de serotonina (5-HT), para tratar los síntomas motivacionales de los pacientes depresivos (Papakostas et al., 2006), sino que también mejora este síntoma en otras patologías orgánicas del sistema nervioso central (Corcoran, Wong & O'Keane, 2004). Ciertos autores han sugerido que el ejercicio podría tener un efecto similar al de los psicoestimulantes y sería una estrategia útil en pacientes depresivos que no responden a los ISRS (Trivedi et al. 2011).

Efecto del ejercicio sobre el sistema dopaminérgico

Comprender las bases moleculares de la actividad física voluntaria resulta importante (Roberts et al., 2014), sobre todo para mejorar la salud pública y prevenir trastornos, (Bowen, Hamilton,

& Lightfoot, 2012; Dishman et al., 2006) pues, aunque la fisiología del ejercicio ha sido objeto de muchos estudios durante los últimos años, la genética y la biología de los factores que se encargan de su regulación no han sido suficientemente investigados (Knab et al., 2009). Estudiar el impacto del ejercicio físico sobre el sistema dopaminérgico utilizando modelos de roedores en ruedas de actividad puede ser útil para averiguar no sólo cómo el sistema de DA regula la actividad física voluntaria, sino también para demostrar si este sistema es dependiente o independiente de la actividad física (Bowen et al., 2012; Knab et al., 2009; Dishman et al., 2006).

Los beneficios del ejercicio han sido mayoritariamente estudiados en modelos animales de Parkinson inducido mediante la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) aplicada en la SNcp. Por ejemplo, en roedores previamente expuestos a ejercicio forzado en ruedas de actividad había un aumento de la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en la SNcp, así como de las fibras que se proyectaban hacia el estriado (Yoon et al. 2007).

En un modelo animal de ejercicio en ruedas de actividad para roedores se ha encontrado que el ejercicio voluntario habitual produce cambios plásticos en los sistemas dopaminérgicos de los ganglios basales, incluyendo la zona ventral (Foley & Fleshner 2008), e induce cambios en la actividad del ACC de forma similar a la que ofrecen los fármacos antidepresivos (Prakash et al. 2007). Asimismo, el ejercicio puede disminuir la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas a las neurotoxinas y reducir la oxidación de DA en el citosol (Tillerson, Caudle, Reveron & Miller, 2003).

Por otro lado, se ha observado que la menor liberación de DA o la pérdida de sus receptores parece estar relacionada con la menor actividad física asociada a la edad (Ingram, 2000), mientras que el ejercicio físico podría aumentar la expresión de los receptores de DA D2 en el estriado (MacRae et al., 1987).

En ratones, el sistema dopaminérgico ha demostrado estar implicado en el control de la actividad física voluntaria en ruedas de actividad (Knab et al., 2009). Las diferencias basales existentes entre los roedores cuyos niveles de actividad voluntaria son altos y aquellos cuyos niveles son bajos (animales también llamados “couch potato” en Knab & Lightfoot, 2010) han sido objeto de diversas investigaciones (Schumacher et al. 1994; Rhodes & Garland, 2003; Knab et al., 2009; Knab & Lightfoot, 2010; Mathes et al., 2010; Roberts et al., 2011; 2014). El efecto del ejercicio físico voluntario en dos cepas de ratones que se distinguían entre sí por sus niveles innatos de ejercicio en la rueda de actividad: la cepa C57 que corre mucho de manera natural, los ratones de la cepa C3H no lo hacían tanto, demuestra que existen diferencias significativas en la expresión de los genes para los D1R y para la tirosina hidroxilasa (TH) entre los ratones muy activos y los poco activos: Los ratones con altos niveles de actividad tienen una menor expresión de los genes de TH y D1R (Knab et al. 2009; Rhodes y Garland, 2003) pero no

de los D2R (Rhodes y Garland, 2003). El antagonismo de los receptores D1 (SCH 23390) reduce la distancia de los ratones control, pero no de los altamente activos, sugiriendo que los D1R podrían ser importantes en la motivación para escoger la conducta de correr en la rueda de actividad (Knab y Lightfoot 2010). Los ratones muy activos muestran una disregulación dopaminérgica que resultaba en un fenotipo hiperactivo no solo en la rueda de actividad, sino también en las cajas donde vivían (Mathes et al. 2010). Así los ratones muy activos disminuyeron su rendimiento en la rueda, al tiempo que los menos activos lo aumentaron, en respuesta al metilfenidato (bloquea el DAT). Igualmente, los ratones más activos disminuyeron su rendimiento, mientras que éste no se alteró en los controles, en respuesta a cocaína y GBR 12909 (ambos inhibidores de la recaptación de DA). De acuerdo con estos resultados, los autores afirmaron que dicha disregulación dopaminérgica puede estar a la base del exceso de actividad física y los fenotipos hiperactivos comórbidos con otros trastornos como la anorexia o el TDAH (Mathes et al. 2010). Sin embargo, la interpretación que más tarde ofrecen Roberts et al. (2011) es que los animales altamente activos son potencialmente hipersensibles al refuerzo que supone correr en las ruedas de actividad, por lo que el agonismo (SKF 82958) y también el antagonismo (SCH 23390) de los D1R resulta en un decremento de la actividad debido a la saciación de este reforzador, porque sus niveles de D1R en el NAcc son ya óptimos. Al contrario de Rhodes y Garland (2003), en este estudio no se encontraron diferencias en la expresión de ARN mensajero de los D1R entre los más y menos corredores. Además, demostraron que los fármacos que actúan sobre los D1R disminuyendo la actividad de los ratones de altos niveles de actividad no afectan a la actividad de los menos activos, lo que implica que deberían existir diferencias entre ambos tipos de animales en la activación o funcionamiento de los D1R en el NAcc, pero dichas diferencias no están en la expresión de ARNm de los D1R (Roberts et al., 2011). En un estudio posterior, Roberts et al. (2014) afirmaban que el ejercicio voluntario en edades tempranas es capaz de inducir neuroplasticidad. Específicamente, las ratas poco activas mostraban una falta de plasticidad en los mecanismos de transcripción relacionados con la DA (Roberts et al. 2014).

En la mayoría de los anteriores experimentos se han utilizado ruedas de actividad donde los roedores pueden correr libremente, ya que estos métodos han sido considerados el mejor modelo para estudiar la actividad física voluntaria porque, entre otros motivos, la mayor parte de las evidencias que indican el papel del sistema dopaminérgico en los niveles de actividad física ha sido obtenida en estudios de este tipo (Knab & Lightfoot, 2010). La actividad física voluntaria se define comúnmente como una actividad intencionada que supone un gasto importante de energía, por lo que se distingue de otros tipos de locomoción en que existe una intención o motivación implícita (Knab et al., 2009), por lo que puede ser útil para estudiar problemas relacionados con la falta de motivación.

En relación al estudio del impacto de la anergia en la toma de decisiones basada en el esfuerzo, se ha sugerido que las tareas de elección basadas en las diferencias de esfuerzo entre diferentes opciones de conducta pueden ser utilizadas como modelos animales para estudiar los síntomas motivacionales de la depresión (Salamone y Correa 2002; 2012). En estos paradigmas, el animal debe escoger entre opciones que requieren un esfuerzo alto versus otras opciones que son menos costosas, pero también menos recompensantes (Salamone et al. 2007). La tendencia a escoger el trabajo que requiere altos niveles de energía para conseguir una buena recompensa cambia en roedores cuando se altera el sistema dopaminérgico. En muchas tareas, tanto dosis bajas de antagonistas de DA como la depleción o antagonismo dopaminérgico en el NAcc provoca un cambio en la elección, haciendo que los animales escojan un estímulo menos recompensante a cambio de realizar un esfuerzo menor (Salamone et al., 1991, 2007; 1994; 1997; Trifilieff et al., 2013; Nunes et al., 2013). Una de las tareas de toma de decisiones basadas en el esfuerzo diseñada por Salamone y colaboradores (1994) para ratas y adaptada para ratones (Pardo et al., 2013), consiste en un laberinto en T con barrera donde el animal podía escoger dos alternativas de reforzador: un brazo de libre acceso con baja densidad de comida palatable versus la otra alternativa, en que podía realizar un esfuerzo mayor (escalando una barrera) para conseguir una cantidad doble de comida palatable. El antagonismo de los D2R en el NAcc, por ejemplo, cambia la elección de los animales haciendo que pasen de realizar mucho esfuerzo a escoger conductas que requieren menor esfuerzo, en un paradigma operante en que deben escoger entre apretar 5 veces una palanca para conseguir comida apetecible o escoger la comida estándar que tienen todos los días en sus cajas, que está disponible sin realizar el trabajo (Salamone et al., 2007). En un experimento con el mismo procedimiento, Nunes et al. (2013) utilizaron el fármaco tetrabenazina (TBZ), que provoca síntomas depresivos en humanos por su inhibición selectiva del VMAT-2 (transportador vesicular de monoaminas), que resulta en una depleción de DA. La TBZ ha demostrado producir cambios en la elección de conductas que requieren altos niveles de energía hacia otras más sedentarias en diferentes paradigmas como el laberinto en T con barrera (Yohn et al., 2014) y cajas operantes de elección concurrente en ratas (Nunes et al., 2013). Estos resultados concuerdan con los datos que indican que bupropión, un antidepresivo que actúa bloqueando los DAT, es efectivo para el tratamiento del enlentecimiento psicomotor y la fatiga, ambos síntomas que aparecen en la depresión (Nunes et al., 2013; Papakostas et al., 2006; Corcoran et al., 2004).

En lo que respecta al ejercicio físico, éste ha demostrado tener un efecto protector de la expresión de parkinsonismo inducido por agentes dopaminérgicos como el 6-OHDA o el MPTP en roedores (Yoon et al., 2007; Wu et al., 2011; Tajiri et al., 2010). Datos preliminares de nuestro laboratorio también ha demostrado que el ejercicio tiene un efecto protector en la sintomatología anérgica inducida por TBZ en ratones en un modelo de elección de reforzadores

basado en las preferencias por reforzadores activos (rueda de actividad) versus sedentarios (comida dulce) (Correa et al., 2014).

Sin embargo, desconocemos el impacto del ejercicio previo en las preferencias de los animales por ambos tipos de reforzadores. Dado que el posible cambio en las preferencias innatas, no sólo puede afectar al impacto de la TBZ sobre la elección de reforzador, sino que además puede estar reflejando cambios en los sistemas dopaminérgicos que sustentan la implicación del individuo en conductas activas y en búsquedas activas por reforzadores, en el presente trabajo, estudiamos si el ejercicio físico forzado o el voluntario cambian las preferencias innatas por los reforzadores activos versus los sedentarios en un modelo de laberinto en T para ratones como el utilizado en el estudio de anergia inducida por TBZ (Correa et al., 2014).

Materiales y Métodos

Sujetos

Los experimentos se han llevado a cabo con ratones macho Swiss CD1, de entre 30 y 45 gramos de peso, procedentes de Janvier S.A. (Francia). Los animales fueron estabulados en grupos de 3 o 4 con comida estándar de laboratorio y agua disponible ad libitum. La temperatura de la colonia se mantuvo a 22 ± 2 °C con un periodo de luz de 8:00 a 20:00 horas. Todos los procedimientos experimentales han cumplido 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) y con la Normativa del Comité de Bienestar Animal de la U.J.I.

Materiales

Cajas de estabulación

Para el grupo de RW Voluntaria, las condiciones de estabulación consistieron en cajas de ambiente enriquecido de plexiglás (60 x 38 x 20 cm) con cuatro ruedas de actividad de acceso las 24 horas.

Para el resto de grupos (RW Forzada, RW Bloqueada y Sin RW), las condiciones de estabulación fueron estándar, y consistieron en cajas de plexiglás (36.5 x 20.5 x 14 cm) sin ruedas de actividad.

Sistema de Ruedas de Ejercicio Forzado

El sistema de ruedas para el ejercicio forzado (Modelo 80800A*C) consiste en un sistema de guías (86.11 x 56.52 x 27.62 cm) sobre el que se apoyan hasta un máximo de 20 ruedas de

actividad de 15.11 cm de altura y 5.72 cm de anchura. Cada rueda gira en su propia pista apoyada en topes antideslizantes acolchados, e incorpora una escotilla en el lateral para la introducción de los animales. El sistema cuenta con un dispositivo digital que permite ajustar el programa de entrenamiento a una velocidad, tiempo de ejercicio, tiempo de reposo y número de ciclos determinados.

Laberinto en T.

El test para evaluar las preferencias se realizó en un laberinto en T con 3 brazos: un brazo donde hay un agujero con un algodón impregnado de un olor artificial no social, otro brazo donde hay una rueda de actividad y un tercero donde hay pellets de sucrosa al 50%. Por lo tanto, los animales pueden elegir entre un reforzador que requiere activación conductual, un reforzador de alta palatabilidad pero sedentario y un estímulo neutro. 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. La presencia de dicho estímulo se utiliza para comprobar que los animales no cambian de preferencia de la rueda de actividad a la comida por eliminación.

Procedimiento Conductual

a) Entrenamiento

RW Forzada vs RW Bloqueada

Tras llegar al laboratorio, los animales fueron aleatoriamente asignados al grupo de actividad forzada (RW Forzada) o al grupo control sedentario (RW Bloqueada).

El grupo de RW Forzada se entrenó diariamente en ruedas de actividad cerradas y en movimiento constante con pausas programadas. El entrenamiento diario se realizaba durante 60 minutos: 30 minutos a una velocidad de 7 metros/minuto y 30 minutos a una velocidad de 5 metros/minuto. Los animales tenían un período de descanso de 1 minuto cada 10 minutos. El grupo RW Bloqueada se introdujo en las mismas ruedas que los ratones del grupo RW Forzada pero, en este caso, permanecían paradas durante los 60 minutos.

La velocidad de las ruedas y el tiempo de la sesión experimental 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. La distancia total recorrida por sesión fue de 360 metros, por lo que no se consideró estresante debido a que los animales corren voluntariamente 705 metros en 60 minutos.

RW Voluntaria vs Sin RW

Al llegar al laboratorio, los animales fueron asignados aleatoriamente al grupo de rueda de actividad voluntaria (RW Voluntaria) o al grupo de condición estándar (Sin RW).

El grupo de RW Voluntaria fue estabulado en un ambiente enriquecido con cuatro ruedas de actividad disponibles durante las 24 horas, mientras que el grupo control (Sin RW) fue estabulado en condiciones normales sin acceso a ejercicio físico.

b) Test

Tras un período de 9 semanas de entrenamiento, comenzó la fase de test en el laberinto en T, para observar las preferencias de los animales de los 4 grupos por cada uno de los 3 estímulos utilizados (Rueda de actividad, Estímulo oloroso neutro y Comida). 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. El día 5 se grabó la sesión y se evaluaron las preferencias. Se dejaron 4 días de exploración previa a la determinación de la preferencia para asegurar que los animales conocían todos los componentes del laberinto en T y no mostraban neofobia a ninguno de ellos.

La variable dependiente principal fue el tiempo que los ratones pasaban en contacto directo con cada uno de los estímulos. También se evaluaron el tiempo que pasaban en el compartimento donde estaba cada estímulo y el número de veces que entraban en cada compartimento, así como la latencia en la primera elección y el porcentaje de animales que tenían la rueda como primera elección.

Análisis estadísticos

Para analizar el efecto de la condición previa de ejercicio físico (Sin RW; RW Voluntaria; RW Bloqueada; y RW Forzada) se empleó un análisis de varianza de un factor (ANOVA de un factor) para cada una de las variables evaluadas (Tiempo en cada compartimento, Tiempo en interacción con cada estímulo y Frecuencia de acceso a cada compartimento) en cada grupo (n=12 en el grupo de Sin RW; n=8 en el grupo de RW Voluntaria; n=10 en el grupo de RW Bloqueada; y n=10 en el grupo de RW Forzada). Cuando el ANOVA era estadísticamente significativo, se realizaba un test post hoc LSD de Fischer para conocer qué condiciones diferían estadísticamente. Para el análisis de la variable Latencia a RW se realizó la prueba Kruskal-Wallis para estadísticos no paramétricos, y para el análisis de porcentaje de primera elección se realizó una prueba Chi cuadrado.

Resultados

Tiempo en Compartimentos:

El ANOVA de un factor no mostró efectos significativos del factor Condición en la variable Tiempo en Compartimento de Comida [$F(3,36)=1.12$, $p=0.35$] ni en la variable Tiempo en Compartimento de Olor [$F(3,36)=1.32$, $p=0.28$]. Sin embargo, sí reveló un efecto significativo para el Tiempo en Compartimento de la Rueda [$F(3,36)=3.88$, $p<0.05$]. La prueba *post hoc* LSD de Fisher mostró que la condición RW Voluntaria era estadísticamente diferente al grupo de la condición RW Forzada [$p<0.01$] (Figura 1).

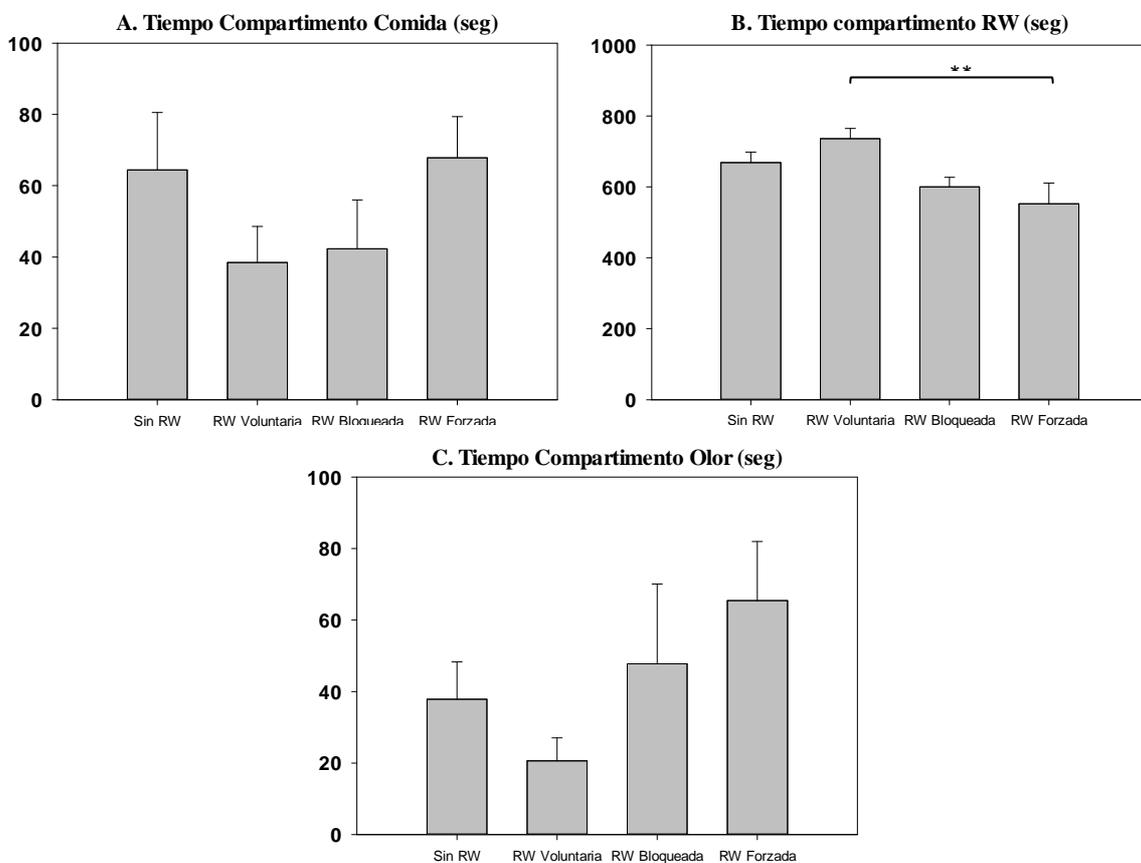


Figura 1. Media \pm SEM de los segundos acumulados en el compartimento de comida (A), compartimento de la rueda (B) y compartimento de olor (C) en función de la condición de ejercicio físico (Sin RW, RW Voluntaria, RW Bloqueada y RW Forzada), (** $p<0.01$, diferencias significativas entre grupos).

Frecuencia a Compartimentos:

El ANOVA de un factor no mostró efectos significativos del factor Condición en la variable Frecuencia al Compartimento de Comida [$F(3,36)=1.43$, $p=0.25$] ni en la variable Frecuencia al Compartimento de la RW [$F(3,36)=0.70$, $p=0.55$]. Sin embargo, sí reveló diferencias significativas en el Frecuencia al Compartimento del Olor [$F(3,36)=3.88$, $p<0.05$]. La prueba *post hoc* LSD de Fisher mostró que la condición RW Voluntaria era estadísticamente distinta al grupo de la condición RW Forzada [$p< 0.01$] (Figura 2).

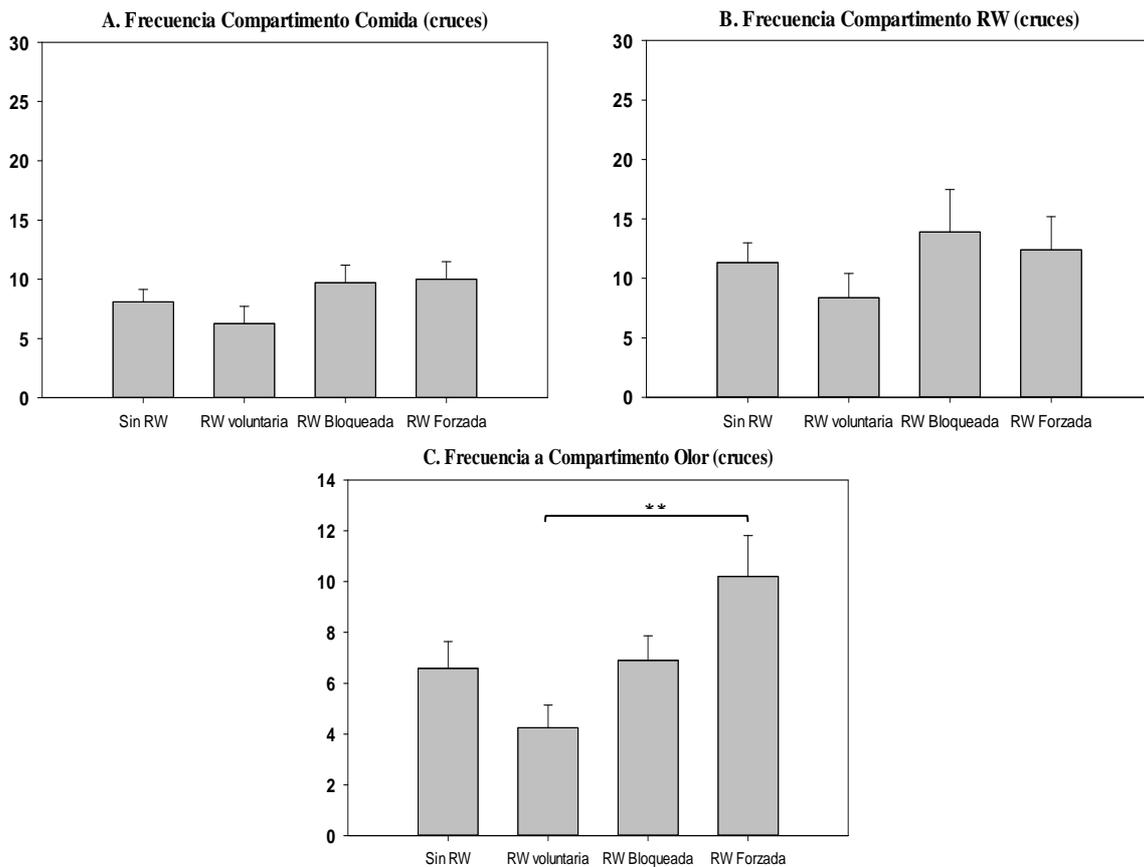


Figura 2. Media \pm SEM de los cruces o entradas acumuladas al compartimento de comida (A), compartimento de la rueda (B) y compartimento de olor (C) en función de la condición de ejercicio físico (Sin RW, RW Voluntaria, RW Bloqueada y RW Forzada), (** $p<0.01$, diferencias significativas entre grupos).

Tiempo en Interacción con los Estímulos:

El ANOVA de un factor no mostró efectos significativos del factor Condición en la variable Tiempo Comiendo [$F(3,36)=1.69$, $p=0.19$] ni en la variable Tiempo Oliendo [$F(3,36)=1.71$, $p=0.18$]. Sin embargo, sí reveló diferencias significativas en Tiempo Corriendo [$F(3,36)=6.17$, $p<0.01$]. La prueba *post hoc* LSD de Fisher mostró que la condición RW Voluntaria era estadísticamente diferente al grupo de la condición RW Forzada [$p<0.01$] (Figura 3).

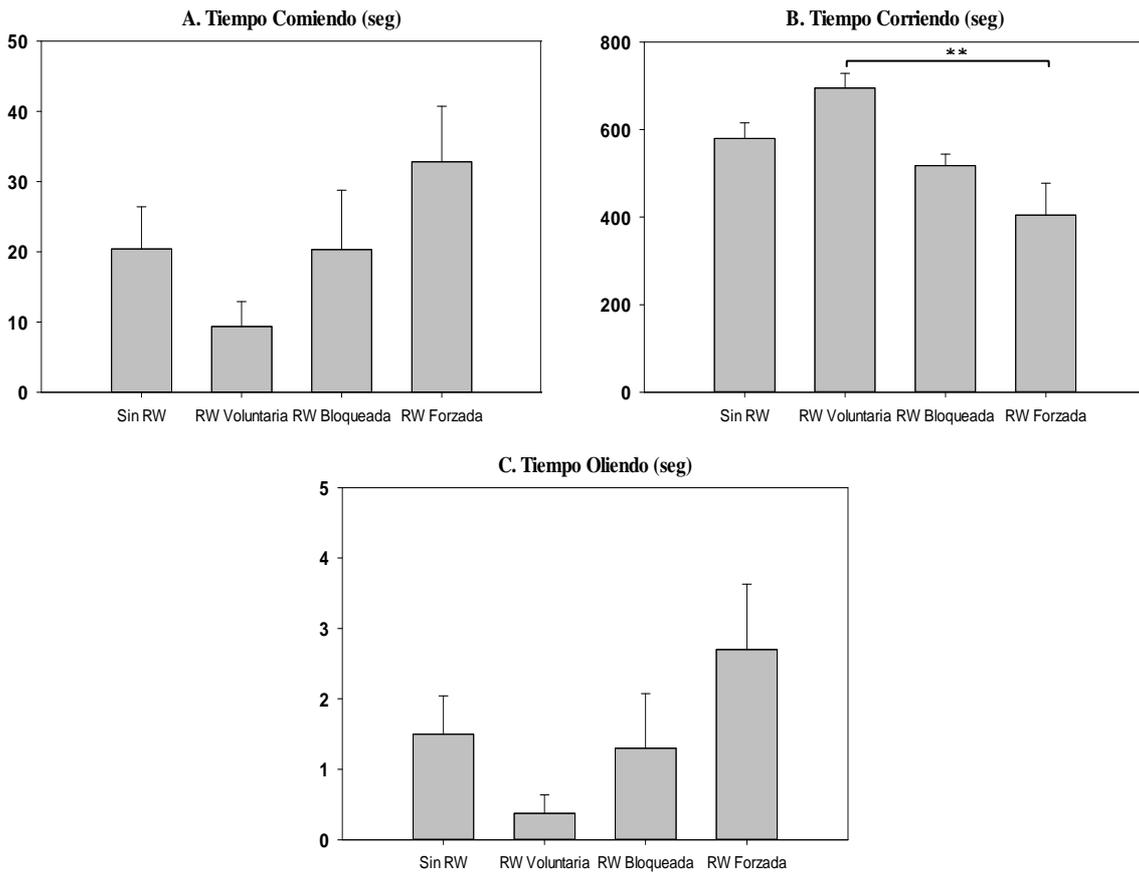


Figura 3. Media \pm SEM de los segundos acumulados comiendo pellets (A), corriendo en la RW (B) y oliendo el estímulo neutro (C) en función de la condición de ejercicio físico (Sin RW, RW Voluntaria, RW Bloqueada y RW Forzada), (** $p<0.01$, diferencias significativas entre grupos).

Latencia a la RW:

El test Kruskal-Wallis no mostró efectos significativos del factor Condición en la variable Latencia a RW [$H(3, N=38)=1.37, p=0.71$] (Figura 4).

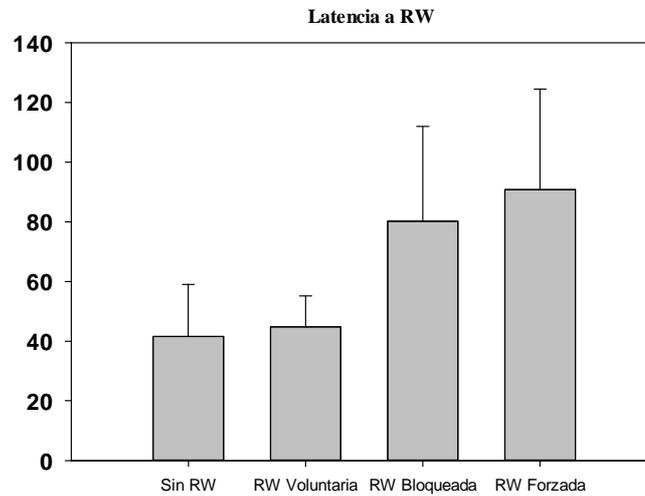


Figura 4. Media \pm SEM de los segundos acumulados hasta la primera interacción con la rueda de actividad.

Proporción de animales cuya primera elección es RW:

Para analizar las diferencias entre las 4 condiciones en relación a la proporción de animales cuya primera elección es la RW vs la comida, se utilizó la prueba no paramétrica de bondad de ajuste Chi cuadrado comparando cada condición (RW Voluntaria; Sin RW; RW Bloqueada; RW Forzada). El valor observado fue mayor que el valor esperado, indicando que existían diferencias significativas entre las condiciones en la proporción de animales cuya primera elección fue RW vs Comida ($\chi^2=14.16, df=3, p<0.01$) (Figura 5).

En cambio, la comparación entre el grupo de RW Voluntaria vs el grupo de RW Forzada en el porcentaje de animales cuya primera elección fue RW no resultó significativa, ya que el valor obtenido fue menor al valor esperado en la prueba de bondad de ajuste Chi cuadrado ($\chi^2=0.76, df=1$).

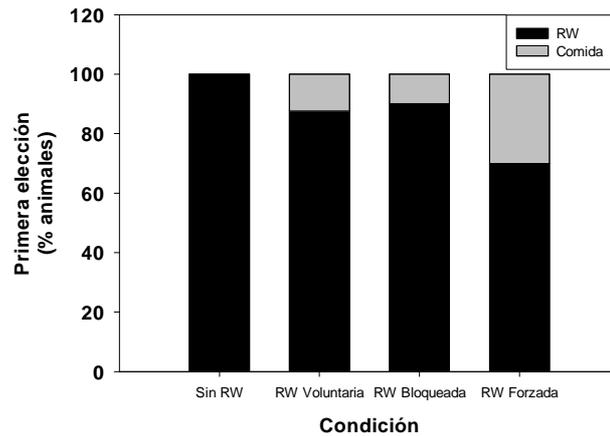


Figura 5. Proporción de animales que han escogido como primera opción la comida o la RW.

Discusión y Conclusiones

Los resultados del presente estudio indican que existen diferencias en las preferencias innatas de los ratones por diferentes tipos de reforzadores en función del tipo de ejercicio físico previamente realizado. Para los roedores, correr en una rueda de actividad puede ser un estímulo reforzante en sí mismo. Los resultados obtenidos en este experimento refuerzan esta idea, ya que en condiciones normales los ratones 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 que no requieren esfuerzo (comida palatable y olor no social).

Pero esta preferencia innata por la rueda de actividad puede ser modulada por diferentes factores. En concreto, se observa que existen diferencias significativas en el tiempo que los animales pasan corriendo entre el grupo de RW Voluntaria vs el grupo de RW Forzada, aunque dichos grupos no difieren significativamente de sus respectivos controles (Sin RW y RW Bloqueada).

Los animales del grupo de RW Voluntaria pasan más tiempo en el compartimento de la rueda, y también pasan más tiempo corriendo en ella, comparado con el grupo de RW Forzada. En este último grupo observamos una ligera evitación del uso de la rueda y del tiempo en el compartimento de la misma, al tiempo que observamos una tendencia, aunque no significativa, a invertir más tiempo en el compartimento de la comida y pasar más tiempo comiendo y explorando el compartimento del estímulo oloroso. Estos resultados podrían indicar un cambio en la preferencia de los animales del grupo forzado hacia reforzadores sedentarios.

En comparación con los grupos control también observamos una tendencia, aunque no significativa, que es consistente con el cambio en las preferencias comentado anteriormente: mientras el grupo de actividad voluntaria pasó más tiempo corriendo y menos tiempo comiendo

y oliendo respecto al grupo Sin RW, los animales del grupo RW Forzada corrieron durante menos tiempo y ocuparon más tiempo comiendo y oliendo que sus controles de RW Bloqueada.

Aunque la latencia no dio resultados significativos, se pudo observar una tendencia a que los grupos forzados tardaran más tiempo a escoger la rueda, lo cual puede indicar una ligera evitación. Esta tendencia también se observa en el porcentaje de animales que en el grupo de forzada tienden a elegir en menor medida la rueda en el laberinto en T como primera opción. Este grupo de animales de forzada demostró un mayor interés por la opción del olor neutro, entrando más veces que el grupo de voluntaria a explorar este estímulo.

La falta de significación estadística en algunos parámetros donde claramente se observa una tendencia diferente entre los grupos experimentales podría resolverse ampliando el número de sujetos incluidos en el estudio, lo que ampliaría la potencia de los análisis estadísticos, por lo que se requieren más estudios en este sentido.

Estos resultados son importantes para el estudio de los efectos de las distintas formas de actividad física (forzada vs voluntaria) sobre el sistema dopaminérgico. Estos dos tipos de ejercicio han sido utilizadas indistintamente en muchos estudios, aunque no son idénticas en muchos parámetros (Leasure & Jones, 2008), como reflejan los presentes datos. Así en estudios realizados en nuestro laboratorio, nueve semanas de entrenamiento voluntario como el realizado en los presentes experimentos, resultó efectivo en atenuar los efectos anérgicos producidos por la depleción dopaminérgica con TBZ, sólo en el caso del ejercicio forzado pero no del voluntario. Hubo que extender el entrenamiento voluntario hasta 20 semanas para encontrar estos efectos protectores del ejercicio sobre la anergia.

Teniendo en cuenta la creciente incidencia de los estilos de vida sedentarios, los estudios básicos en animales podrían ser relevantes para comprender y prevenir algunas disfunciones psiquiátricas cuyas bases biológicas son poco conocidas tales como la anergia, o la selección de estilos de vida pasivos en los seres humanos.

Bibliografía

- Ang, E. T., & Gomez-Pinilla, F. (2007). Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Current medicinal chemistry*, 14(24), 2564-2571.
- Blazquez, P. M., Fujii, N., Kojima, J., & Graybiel, A. M. (2002). A network representation of response probability in the striatum. *Neuron*, 33(6), 973-982.
- Blumenthal, J. A., Babyak, M. A., Doraiswamy, P. M., Watkins, L., Hoffman, B. M., Barbour, K. A., ... & Sherwood, A. (2007). Exercise and pharmacotherapy in the treatment of major depressive disorder. *Psychosomatic medicine*, 69(7), 587.
- Botvinick, M. M., Huffstetler, S., & McGuire, J. T. (2009). Effort discounting in human nucleus accumbens. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 9(1), 16-27.
- Bowen, R., Hamilton, A., & Lightfoot, J. (2012). Pharmacological manipulation of the dopaminergic system affects wheel-running activity in differentially active mice. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 26(1), 119.
- Brené, S., Bjørnebekk, A., Åberg, E., Mathé, A. A., Olson, L., & Werme, M. (2007). Running is rewarding and antidepressive. *Physiology & behavior*, 92(1), 136-140.
- Caligiuri, M. P., & Ellwanger, J. (2000). Motor and cognitive aspects of motor retardation in depression. *Journal of affective disorders*, 57(1), 83-93.
- Camacho, T. C., Roberts, R. E., Lazarus, N. B., Kaplan, G. A., & Cohen, R. D. (1991). Physical activity and depression: evidence from the Alameda County Study. *American journal of epidemiology*, 134(2), 220-231.
- Carriere, N., Besson, P., Dujardin, K., Duhamel, A., Defebvre, L., Delmaire, C., & Devos, D. (2014). Apathy in Parkinson's disease is associated with nucleus accumbens atrophy: A magnetic resonance imaging shape analysis. *Movement Disorders*, 29(7), 897-903.
- Carro, E., Trejo, J. L., Busiguina, S., & Torres-Aleman, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *The Journal of Neuroscience*, 21(15), 5678-5684.
- Chalder, M., Wiles, N. J., Campbell, J., Hollinghurst, S. P., Haase, A. M., Taylor, A. H., ... & Lewis, G. (2012). Facilitated physical activity as a treatment for depressed adults: randomised controlled trial. *BMJ*, 344, e2758.
- Chan, K. L., Tong, K. Y., & Yip, S. P. (2008). Relationship of serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and health-related lifestyle in healthy human subjects. *Neuroscience letters*, 447(2), 124-128.
- Collins, K. A., & Fitterling, H. L. (2009). Physical exercise and depression. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 76(2), 204-214.
- Corcoran, C., Wong, M. L., & O'Keane, V. (2004). Bupropion in the management of apathy. *Journal of Psychopharmacology*, 18(1), 133-135.
- Cotman, C. W., & Berchtold, N. C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in neurosciences*, 25(6), 295-301.

- Dackis, C. A., & O'Brien, C. P. (2001). Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. *Journal of substance abuse treatment*, 21(3), 111-117.
- Devi, S. A., & Kiran, T. R. (2004). Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary vitamin E in aging rat brain. *Neurobiology of aging*, 25(4), 501-508.
- Dishman, R. K., Berthoud, H. R., Booth, F. W., Cotman, C. W., Edgerton, V. R., Fleshner, M. R., ... & Zigmond, M. J. (2006). Neurobiology of exercise. *Obesity*, 14(3), 345-356.
- Duman, C. H., Schlesinger, L., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2008). Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain research*, 1199, 148-158.
- Ernst, C., Olson, A. K., Pineda, J. P., Lam, R. W., & Christie, B. R. (2006). Antidepressant effects of exercise: evidence for an adult-neurogenesis hypothesis?. *Journal of psychiatry & neuroscience*, 31(2), 84.
- Fava, M., Thase, M. E., DeBattista, C., Doghramji, K., Arora, S., & Hughes, R. J. (2007). Modafinil augmentation of selective serotonin reuptake inhibitor therapy in MDD partial responders with persistent fatigue and sleepiness. *Annals of Clinical Psychiatry*, 19(3), 153-159.
- Foley, T. E., & Fleshner, M. (2008). Neuroplasticity of dopamine circuits after exercise: implications for central fatigue. *Neuromolecular medicine*, 10(2), 67-80.
- Greenwood, B. N., Foley, T. E., Le, T. V., Strong, P. V., Loughridge, A. B., Day, H. E., & Fleshner, M. (2011). Long-term voluntary wheel running is rewarding and produces plasticity in the mesolimbic reward pathway. *Behavioural brain research*, 217(2), 354-362.
- Guezennec, C. Y., Abdelmalki, A., Serrurier, B., Merino, D., Bigard, X., Berthelot, M., ... & Peres, M. (1998). Effects of prolonged exercise on brain ammonia and amino acids. *International journal of sports medicine*, 19(5), 323-327.
- Hayes, K., Sprague, S., Guo, M., Davis, W., Friedman, A., Kumar, A., ... & Ding, Y. (2008). Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta neuropathologica*, 115(3), 289-296.
- Hillman, C. H., Erickson, K. I., & Kramer, A. F. (2008). Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nature reviews neuroscience*, 9(1), 58-65.
- Ingram, D. K. (2000). Age-related decline in physical activity: generalization to nonhumans. *Medicine and science in sports and exercise*, 32(9), 1623-1629.
- Kennedy, S. H. (2008). Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. *Dialogues in clinical neuroscience*, 10(3), 271.
- Kinni, H., Guo, M., Ding, J. Y., Konakondla, S., Dornbos, D., Tran, R., ... & Ding, Y. (2011). Cerebral metabolism after forced or voluntary physical exercise. *Brain research*, 1388, 48-55.

- Knab, A. M., & Lightfoot, J. T. (2010). Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine system?. *International journal of biological sciences*, 6(2), 133.
- Knab, A. M., Bowen, R. S., Hamilton, A. T., Gullledge, A. A., & Lightfoot, J. T. (2009). Altered dopaminergic profiles: implications for the regulation of voluntary physical activity. *Behavioural brain research*, 204(1), 147-152.
- Kodama, M., Fujioka, T., & Duman, R. S. (2004). Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biological psychiatry*, 56(8), 570-580.
- Kramer, A. F., & Erickson, K. I. (2007). Effects of physical activity on cognition, well-being, and brain: Human interventions. *Alzheimer's & Dementia*, 3(2), S45-S51.); (Van Praag, H. (2008). Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular medicine*, 10(2), 128-140.
- Leasure, J. L., & Jones, M. (2008). Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*, 156(3), 456-465.
- Löllgen, H., Böckenhoff, A., & Knapp, G. (2009). Physical activity and all-cause mortality: an updated meta-analysis with different intensity categories. *International journal of sports medicine*, 30(3), 213-224.
- MacRae, P. G., Spirduso, W. W., Walters, T. J., Farrar, R. P., & Wilcox, R. E. (1987). Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolites in presenescent older rats. *Psychopharmacology*, 92(2), 236-240.
- Martín-Carrasco, M. (2010). Tetrabenazina en los trastornos del movimiento. *Psicogeriatría*, 2, 3-14.
- Mathes, W. F., Nehrenberg, D. L., Gordon, R., Hua, K., Garland, T., & Pomp, D. (2010). Dopaminergic dysregulation in mice selectively bred for excessive exercise or obesity. *Behavioural brain research*, 210(2), 155-163.
- Maurice-Tison, S., Verdoux, H., Gay, B., Perez, P., Salamon, R., & Bourgeois, M. L. (1998). How to improve recognition and diagnosis of depressive syndromes using international diagnostic criteria. *British Journal of General Practice*, 48(430), 1245-1246.
- Nodel, M., Yakhno, N., Medvedeva, A., & Kulikov, M. (2014). Apathy in Parkinson disease. *Frontiers in Biology*, 9(4), 324-331.
- Nunes, E. J., Randall, P. A., Hart, E. E., Freeland, C., Yohn, S. E., Baqi, Y., ... & Salamone, J. D. (2013). Effort-related motivational effects of the VMAT-2 inhibitor tetrabenazine: implications for animal models of the motivational symptoms of depression. *The Journal of Neuroscience*, 33(49), 19120-19130.
- Pae, C. U., Lim, H. K., Han, C., Patkar, A. A., Steffens, D. C., Masand, P. S., & Lee, C. (2007). Fatigue as a core symptom in major depressive disorder: overview and the role of bupropion. *Expert Review of Neurotherapeutics* 7(10), 1251-1263.
- Papakostas, G. I., Nutt, D. J., Hallett, L. A., Tucker, V. L., Krishen, A., & Fava, M. (2006). Resolution of sleepiness and fatigue in major depressive disorder: a comparison of bupropion and the selective serotonin reuptake inhibitors. *Biological psychiatry*, 60(12), 1350-1355.

- Paul, R. H., Brickman, A. M., Navia, B., Hinkin, C., Malloy, P. F., Jefferson, A. L., ... & Flanigan, T. P. (2014). Apathy is associated with volume of the nucleus accumbens in patients infected with HIV. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *17*(2), 167-171.
- Petzinger, G. M., Walsh, J. P., Akopian, G., Hogg, E., Abernathy, A., Arevalo, P., ... & Jakowec, M. W. (2007). Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *The Journal of neuroscience*, *27*(20), 5291-5300.
- Ploughman, M. (2008). Exercise is brain food: the effects of physical activity on cognitive function. *Developmental Neurorehabilitation*, *11*(3), 236-240.
- Podurgiel, S. J., Nunes, E. J., Yohn, S. E., Barber, J., Thompson, A., Milligan, M., ... & Salamone, J. D. (2013). The vesicular monoamine transporter (VMAT-2) inhibitor tetrabenazine induces tremulous jaw movements in rodents: implications for pharmacological models of parkinsonian tremor. *Neuroscience*, *250*, 507-519.
- Prakash, R. S., Snook, E. M., Erickson, K. I., Colcombe, S. J., Voss, M. W., Motl, R. W., & Kramer, A. F. (2007). Cardiorespiratory fitness: a predictor of cortical plasticity in multiple sclerosis. *Neuroimage*, *34*(3), 1238-1244.
- Ravindran, A. V., Kennedy, S. H., O'Donovan, M. C., Fallu, A., Camacho, F., & Binder, C. E. (2008). Osmotic-release oral system methylphenidate augmentation of antidepressant monotherapy in major depressive disorder: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of clinical psychiatry*, *69*(1), 87-94.
- Rhodes, J. S., & Garland Jr, T. (2003). Differential sensitivity to acute administration of Ritalin, apomorphine, SCH 23390, but not raclopride in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology*, *167*(3), 242-250.
- Roberts, M. D., Gilpin, L., Parker, K. E., Childs, T. E., Will, M. J., & Booth, F. W. (2011). Dopamine D1 receptor modulation in nucleus accumbens lowers voluntary wheel running in rats bred to run high distances. *Physiology & behavior*, *105*(3), 661-668.
- Roberts, M. D., Toedebusch, R. G., Wells, K. D., Company, J. M., Brown, J. D., Cruthirds, C. L., ... & Booth, F. W. (2014). Nucleus accumbens neuronal maturation differences in young rats bred for low versus high voluntary running behaviour. *The Journal of physiology*, *592*(10), 2119-2135.
- Salamone, J. D. (1992). Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: involvement in instrumental behavior processes. *Psychopharmacology*, *107*(2-3), 160-174.
- Salamone, J. D., & Correa, M. (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behavioural brain research*, *137*(1), 3-25.
- Salamone, J. D., Correa, M., Farrar, A., & Mingote, S. M. (2007). Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology*, *191*(3), 461-482.
- Salamone, J. D., Correa, M., Mingote, S. M., Weber, S. M., & 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. *Current Psychiatry Reviews*, 2(2), 267-280.

- Salamone, J. D., Correa, M., Nunes, E. J., Randall, P. A., & Pardo, M. (2012). The Behavioral Pharmacology of Effort-Related Choice Behavior: Dopamine, Adenosine and Beyond. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 97(1), 125-146.
- Salamone, J. D., Cousins, M. S., & 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. *Behavioural brain research*, 65(2), 221-229.
- Salamone, J. D., Cousins, M. S., & Snyder, B. J. (1997). Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(3), 341-359.
- Salamone, J. D., Steinpreis, R. E., McCullough, L. D., Smith, P., Grebel, D., & Mahan, K. (1991). Haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion suppress lever pressing for food but increase free food consumption in a novel food choice procedure. *Psychopharmacology*, 104(4), 515-521.
- Schmidt, K., Nolte-Zenker, B., Patzer, J., Bauer, M., Schmidt, L. G., & Heinz, A. (2001). Psychopathological correlates of reduced dopamine receptor sensitivity in depression, schizophrenia, and opiate and alcohol dependence. *Pharmacopsychiatry* 34(2), 66-72.
- Schumacher, H. E., Oehler, J., & Jaehkel, M. (1994). Individual motor activity—relationships to dopaminergic responses. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48(4), 839-844.
- Sibley, B. A., & Etnier, J. L. (2003). The relationship between physical activity and cognition in children: a meta-analysis. *Pediatric Exercise Science*, 15(3), 243-256.
- Soskin, D. P., Holt, D. J., Sacco, G. R., & Fava, M. (2013). Incentive salience: novel treatment strategies for major depression. *CNS Spectr*, 1, 1-8.
- Stahl, S. M. (2002). The psychopharmacology of energy and fatigue. *The Journal of clinical psychiatry*, 63(1), 7-8.
- Tajiri, N., Yasuhara, T., Shingo, T., Kondo, A., Yuan, W., Kadota, T., ... & Date, I. (2010). Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain research*, 1310, 200-207.
- Tajiri, N., Yasuhara, T., Shingo, T., Kondo, A., Yuan, W., Kadota, T., ... & Date, I. (2010). Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain research*, 1310, 200-207.
- Tillerson, J. L., Caudle, W. M., Reveron, M. E., & Miller, G. W. (2003). Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 119(3), 899-911.
- Tomer, R., Goldstein, R. Z., Wang, G. J., Wong, C., & Volkow, N. D. (2008). Incentive motivation is associated with striatal dopamine asymmetry. *Biological psychology*, 77(1), 98-101.
- Trifilieff, P., Feng, B., Urizar, E., Winiger, V., Ward, R. D., Taylor, K. M., ... & Javitch, J. A. (2013). Increasing dopamine D2 receptor expression in the adult nucleus accumbens enhances motivation. *Molecular psychiatry*, 18(9), 1025-1033.

- Trivedi, M. H., Greer, T. L., Church, T. S., Carmody, T. J., Grannemann, B. D., Galper, D. I., ... & Blair, S. N. (2011). Exercise as an augmentation treatment for nonremitted major depressive disorder: a randomized, parallel dose comparison. *The Journal of clinical psychiatry*, *72*, 677-84.
- Tylee, A., & Gandhi, P. (2005). The importance of somatic symptoms in depression in primary care. *Primary care companion to the Journal of clinical psychiatry*, *7*(4), 167.
- Van Praag, H. (2008). Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular medicine*, *10*(2), 128-140.
- Van Praag, H. (2009). Exercise and the brain: something to chew on. *Trends in neurosciences*, *32*(5), 283-290.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fowler, J. S., Tomasi, D., & Telang, F. (2011). Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(37), 15037-15042.(a)
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Newcorn, J. H., Kollins, S. H., Wigal, T. L., Telang, F., ... & Swanson, J. M. (2011). Motivation deficit in ADHD is associated with dysfunction of the dopamine reward pathway. *Molecular psychiatry*, *16*(11), 1147-1154.(b)
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Thanos, P. K., & Fowler, J. S. (2009). Imaging of brain dopamine pathways: implications for understanding obesity. *Journal of addiction medicine*, *3*(1), 8.
- Wiles, N. J., Haase, A. M., Gallacher, J., Lawlor, D. A., & Lewis, G. (2007). Physical activity and common mental disorder: results from the Caerphilly study. *American Journal of Epidemiology*, *165*(8), 946-954.
- Wu, S. Y., Wang, T. F., Yu, L., Jen, C. J., Chuang, J. I., Wu, F. S., ... & Kuo, Y. M. (2011). Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway. *Brain, behavior, and immunity*, *25*(1), 135-146.
- Yaffe, K., Barnes, D., Nevitt, M., Lui, L. Y., & Covinsky, K. (2001). A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk. *Archives of internal medicine*, *161*(14), 1703-1708.
- Yohn, S. E., Nunes, E. J., Randall, P. A., Baqi, Y., Müller, C. E., Correa, M., & Salamone, J. D. (2012). Development of rodent models of the motivational symptoms of depression: The catecholamine depleting agent tetrabenazine affects effort-related decision making in the T-maze barrier choice task. Program No. 923.12. In 2012 Neuroscience Meeting Planner, New Orleans, LA: Society for Neuroscience. Online.
- Yoon, M. C., Shin, M. S., Kim, T. S., Kim, B. K., Ko, I. G., Sung, Y. H., ... & Kim, C. J. (2007). Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. *Neuroscience letters*, *423*(1), 12-17.

Apéndices estadísticos

TABLA I. ANOVA Tiempo Comiendo (A), Tiempo Corriendo (B) y Tiempo Oliendo (C).

A. Tiempo Comiendo

Univariate Tests of Significance for T. Comiendo (línea base día 5 entre todas las Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	16827,01	1	16827,01	34,51204	0,000001
Condición	2479,48	3	826,49	1,69513	0,185352
Error	17552,49	36	487,57		

B. Tiempo Corriendo

Univariate Tests of Significance for T. Corriendo (línea base día 5 entre todas las Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	11820757	1	11820757	549,6221	0,000000
Condición	397978	3	132659	6,1682	0,001709
Error	774254	36	21507		

C. Tiempo Oliendo

Univariate Tests of Significance for T. Oliendo (línea base día 5 entre todas las Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	84,5281	1	84,52806	17,38118	0,000184
Condición	24,9000	3	8,30000	1,70670	0,182945
Error	175,0750	36	4,86319		

TABLA II. Fisher LSD Test para la variable T. Corriendo.

LSD test; variable T. Corriendo (línea base día 5 entre todas las variables.sta) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 21507,, df = 36,000					
Cell No.	Condición	{1}	{2}	{3}	{4}
1	1 Sin RW	579,50	0,093015	0,330821	0,008577
2	2 RW Voluntaria	0,093015	695,00	0,015166	0,000183
3	3 BLOQUEADA	0,330821	0,015166	517,60	0,094318
4	4 FORZADA	0,008577	0,000183	0,094318	404,90

TABLA III. ANOVA Tiempo en Compartimento Comida (A), Tiempo en Compartimento RW (B) y Tiempo en Compartimento Olor (C).

A. Tiempo en Compartimento Comida

Univariate Tests of Significance for T.comp comida (linea base dia 5 entrene todas Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	111125,1	1	111125,1	58,08220	0,000000
Condicion	6485,3	3	2161,8	1,12990	0,349931
Error	68876,6	36	1913,2		

B. Tiempo en Compartimento RW

Univariate Tests of Significance for T. comp RW (linea base dia 5 entrene todas la Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	15993571	1	15993571	1064,275	0,000000
Condicion	174876	3	58292	3,879	0,016798
Error	540996	36	15028		

C. Tiempo en Compartimento Olor

Univariate Tests of Significance for T comp olor (linea base dia 5 entrene todas las Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition)					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	72079,01	1	72079,01	30,01970	0,000003
Condicion	9541,46	3	3180,49	1,32462	0,281483
Error	86438,04	36	2401,06		

TABLA IV. Fischer LSD Test para la variable Tiempo en Compartimento RW.

LSD test; variable T. comp RW (linea base dia 5 entrene todas las variables.st; Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 15028,, df = 36,000					
Cell No.	Condicion	{1}	{2}	{3}	{4}
1	1 Sin RW	668,25	735,38	599,70	552,20
2	2 RW Voluntaria	0,238106		0,199839	0,033478
3	3 BLOQUEADA	0,199839	0,025338		0,003278
4	4 FORZADA	0,033478	0,003278	0,391993	

TABLA V. ANOVA Frecuencia a Compartimento Comida (A), Frecuencia a Compartimento RW (B) y Frecuencia a Compartimento Olor (C).

A. Frecuencia a Compartimento Comida

Univariate Tests of Significance for F. comp comida (linea base dia 5 entrene todas las variables.st)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2836,574	1	2836,574	153,6706	0,000000
Condicion	79,083	3	26,361	1,4281	0,250553
Error	664,517	36	18,459		

B. Frecuencia a Compartimento RW

Univariate Tests of Significance for F. comp RW (linea base dia 5 entrene todas las variables.st)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5183,919	1	5183,919	76,17679	0,000000
Condicion	143,258	3	47,753	0,70172	0,557219
Error	2449,842	36	68,051		

C. Frecuencia a Compartimento Olor

Univariate Tests of Significance for F. comp olor (linea base dia 5 entrene todas las variables.st)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1910,868	1	1910,868	135,1719	0,000000
Condicion	164,683	3	54,894	3,8832	0,016724
Error	508,917	36	14,137		

TABLA VI. Fisher LSD Test para la variable Frecuencia a Compartimento Olor.

LSD test; variable F. comp olor (linea base dia 5 entrene todas las variables.st)					
Probabilities for Post Hoc Tests					
Error: Between MS = 14,137, df = 36,000					
Cell No.	Condicion	{1}	{2}	{3}	{4}
		6,5833	4,2500	6,9000	10,200
1	1 Sin RW		0,182398	0,845167	0,030896
2	2 RW Voluntaria	0,182398		0,146018	0,001980
3	3 BLOQUEADA	0,845167	0,146018		0,057460
4	4 FORZADA	0,030896	0,001980	0,057460	

TABLA VII. Kruskal-Wallis Test para la variable Latencia a RW.

Depend.: Latencia	Kruskal-Wallis ANOVA by Ranks; Latencia (Spreadsheet57 Independent (grouping) variable: Condición Kruskal-Wallis test: H (3, N= 38) =1,369875 p =,7126		
	Code	Valid N	Sum of Ranks
RW Voluntaria	101	8	160,0000
Sin RW	102	10	160,5000
RW Forzada	103	10	213,0000
RW Bloqueada	104	10	207,5000