

## Interacción entre receptores $D_2$ y $A_{2A}$

### Toma de decisiones basada en el esfuerzo mediante un Programa de Razón Progresiva en ratas

PILAR BAYARRI  
bayarri@uji.es

LAURA LÓPEZ-CRUZ  
lcruz@uji.es

NOEMÍ SAN MIGUEL  
nsanmigu@uji.es

LIDÓN MONFERRER  
lmonferr@uji.es

MERCÈ CORREA  
correa@uji.es

#### Resumen

Uno de los síntomas motivacionales característicos de la depresión y que supone un mayor problema para la realización de tareas cotidianas, es la anergia. Este síntoma supone una disminución del vigor y el esfuerzo que el sujeto está dispuesto a realizar para conseguir un objetivo. Las bases neurales de la anergia pueden estudiarse en el laboratorio mediante modelos animales, induciéndose a través de antagonistas dopaminérgicos. En el presente estudio, analizamos los efectos de la manipulación farmacológica del sistema dopaminérgico mediante el antagonismo de los receptores  $D_2$  (eticlopride). Como tratamiento que revierta estos síntomas administraremos MSX3, un antagonista de los receptores de adenosina  $A_{2A}$ , los cuales están colocalizados con los receptores  $D_2$  y tienen efectos opuestos a éstos. Para evaluar los efectos conductuales de estas manipulaciones utilizamos un paradigma operante en el que el animal debe realizar cada vez más esfuerzo (apretando un mayor número de veces una palanca, Programa de Razón Progresiva, PROG) para conseguir una comida más apetecible, o tiene la opción de comer libremente otro tipo de comida menos sabrosa pero de libre acceso (CHOW). Los resultados demuestran que fármacos que interfieren con la transmisión de DA reducen el nivel de esfuerzo que el animal está dispuesto a realizar cuando tiene opciones menos costosas. Los antagonistas  $A_{2A}$  revierten estos efectos y tienen potencial como fármacos para el tratamiento de la anergia en la depresión y en otras patologías como el Parkinson o el síndrome de fatiga crónica.

**Palabras clave:** anergia, dopamina, eticlopride, PROG/chow.

## Abstract

People with depression not only display alterations in mood or affect, but also can show profound motivational impairments such as anergia. Mesolimbic dopamine (DA) is involved in behavioral activation and effort-related processes. Rats with impaired DA transmission reallocate their instrumental behavior away from food-reinforced tasks with high response requirements, and instead select less effortful food-seeking behaviors. DA receptors are colocalized with adenosine receptors but have opposite effects in the intracellular cascade. Thus, adenosine receptors can be a target for therapeutical approaches. In the present study, we used a progressive ratio (PROG)/chow feeding concurrent choice task. With this task, rats can lever press on a PROG schedule reinforced by a preferred high-carbohydrate food pellet, or alternatively approach and consume the less preferred but concurrently available laboratory chow. The DA  $D_2$  antagonist eticlopride reduced highest ratio achieved but did not reduce chow intake. In contrast, the  $A_{2A}$  antagonist MSX3 coadministered with eticlopride reversed the effects of the interference with DA transmission.

**Keywords:** anergia, dopamine, eticlopride, MSX3, PROG/chow.

## Introducción

La depresión es un trastorno del estado de ánimo caracterizado por la aparición de sentimientos negativos y conductas desadaptativas que impide un desarrollo normal en todos los ámbitos de la vida diaria. Las personas con depresión y trastornos relacionados no sólo muestran alteraciones en el estado de ánimo o el afecto, sino que también pueden mostrar profundas deficiencias en la motivación que se manifiestan como retraso psicomotor, anergia, fatiga, etc. La anergia es uno de los síntomas motivacionales característicos de la depresión que supone un mayor problema para la realización de tareas cotidianas. Este síntoma supone una disminución del esfuerzo que el sujeto está dispuesto a realizar para conseguir un objetivo.

La anergia puede estudiarse mediante varios modelos animales, induciéndose a través de la alteración del sistema dopaminérgico (Salamone and Correa, 2012). Basados en estos resultados utilizando modelos experimentales en animales, estudios realizados en humanos también han demostrado que las personas con depresión mayor muestran anergia manifestada como una reducción en la selección de alternativas de alto esfuerzo (Treadway *et al.*, 2012b).

La motivación es un proceso complejo implicado en múltiples funciones comportamentales y circuitos neuronales. Se distinguen dos componentes esenciales en la motivación: el activacional y el direccional. Los organismos se orientan hacia o evitan ciertos estímulos a los que llamamos reforzadores. Un reforzador positivo puede ser descrito como una meta o, en términos económicos, un bien de consumo. Los reforzadores son estímulos que, de alguna manera, son autoadministrados, conseguidos o preservados y a los que el sujeto se aproxima. Los reforzadores fortalecen la conducta induciendo altos niveles de activación conductual para alcanzarlos (Salamone and Correa, 2012).

La dopamina (DA), en particular en las proyecciones mesolímbicas que llegan al núcleo accumbens, juega un papel importante en la regulación de los aspectos activacionales de la motivación (energía, vigor, persistencia), aunque no en los aspectos direccionales. Los organismos con frecuencia tienen que tomar decisiones relacionadas con el esfuerzo que deben

invertir para conseguir un reforzador y las cualidades del mismo, basándose en un análisis de costes/beneficios (Salamone and Correa, 2012). La DA en el núcleo accumbens activa y mantiene la conducta, permitiendo la producción de trabajo y la persistencia en la búsqueda del reforzador. Esto posibilita superar los costes de respuesta requeridos para acceder a los estímulos significativos.

Además, existe una interacción funcional entre los receptores de dopamina DA  $D_2$  y adenosina  $A_{2A}$  (Fuxe *et al.*, 2003). Ambos receptores se encuentran localizados en las mismas neuronas del núcleo accumbens y su activación tiene efectos opuestos en la misma cascada bioquímica intracelular (Ferré, 1997). Varios estudios han demostrado que los antagonistas de adenosina  $A_{2A}$  pueden revertir los efectos de los antagonistas de DA  $D_2$  en las tareas conductuales de elección relacionadas con el esfuerzo (Pardo *et al.*, 2012).

En muchos de estos estudios se han utilizado tareas en las cuales, los animales deben elegir entre apretar la palanca para conseguir una comida más palatable (bolitas dulces) o pueden aproximarse y consumir directamente una comida menos apetecible (comida estándar de laboratorio, CHOW) que se encuentra disponible en todo momento en la caja operante (Nunes *et al.*, 2013). Típicamente en estos paradigmas las ratas entrenadas en una tarea de razón fija 1 (RF1) (una presión de palanca para conseguir una bolita de comida) o de RF5 (cinco presiones de palanca para conseguir una bolita de comida) obtienen la mayoría de su comida diaria en la tarea operante donde consiguen la dulce, pero consumen muy poca cantidad de comida libre. La administración sistémica de dosis moderadas o bajas de antagonistas de la DA producen un profundo efecto en esta tarea de elección. Así aunque la presión de la palanca decrece por la interferencia con la DA del núcleo accumbens, las ratas con el antagonista DA muestran una respuesta compensatoria y seleccionan una nueva vía hacia una fuente de comida alternativa (la que está más fácilmente disponible). Estos resultados demuestran que la interferencia con la transmisión dopaminérgica no reduce simplemente el apetito. Las ratas tratadas con dosis bajas de antagonistas de DA permanecen orientados hacia la adquisición y el consumo de comida, indicando que aspectos fundamentales del reforzamiento con comida y la motivación primaria por la comida permanecen intactos (Salamone and Correa, 2012).

Más recientemente, para evaluar los efectos conductuales de estas manipulaciones DA utilizamos un paradigma operante en el que el animal debe realizar cada vez más esfuerzo (apretando un mayor número de veces una palanca, Programa de Razón Progresiva, PROG) para conseguir la comida más apetecible, o tiene la opción de comer libremente el otro tipo de comida menos sabrosa pero de libre acceso (CHOW) (Randall *et al.* 2012).

El objetivo del presente estudio es evaluar los efectos de las manipulaciones farmacológicas sobre el sistema dopaminérgico-adenosinérgico y, al mismo tiempo, mostrar la utilidad de la tarea PROG/CHOW como procedimiento para estudiar la conducta motivada de elección relacionada con el esfuerzo.

Evaluamos los efectos de la manipulación farmacológica del sistema dopaminérgico mediante el antagonismo de los receptores de DA  $D_2$  (eticlopride). Esta sustancia se emplea ampliamente como antipsicótico en la clínica humana y como efectos secundarios se ha descrito que produce anergia, fatiga y entecimiento psicomotor.

Asimismo, dado que los receptores dopaminérgicos en el núcleo accumbens están colocalizados con receptores de adenosina y que su estimulación tiene un efecto opuesto a la estimulación de los receptores de adenosina, también estudiamos el efecto del antagonismo de los receptores  $A_{2A}$ , colocalizados con los receptores  $D_2$ , mediante la coadministración de MSX3 para revertir los efectos del eticlopride.

## Método

### *a) Sujetos*

Los sujetos experimentales fueron ratas macho adultas de la estirpe Sprague-Dawley (Harlan, Indianapolis, IN, EE.UU.) alojadas en una colonia a 23°C con ciclos de 12 horas de luz / oscuridad. Las ratas pesan 300-350 gramos al inicio de cada estudio, y se privan de comida al inicio del entrenamiento en base al 85 % de su peso corporal.

Las ratas reciben alimento suplementario para mantener el peso a lo largo del estudio, con agua disponible ad libitum en sus jaulas. Los protocolos empleados fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado de Animales de la Universidad de Connecticut, y siguiendo las directrices del NIH (National Institute of Health).

### *b) Drogas*

El Eticlopride se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se disuelve en cloruro de sodio al 0,9 %, que también sirve como la solución vehículo.

MSX-3 es proporcionado por el laboratorio de Christa Müller (Universidad de Bonn, Bonn, Alemania) y se disuelve en cloruro de sodio al 0,9 % ajustándose el pH con hidróxido de sodio a un pH final de 7,4.

Todos los fármacos se administran mediante inyección intraperitoneal (IP) y las dosis fueron seleccionadas en base a estudios previos realizados en el mismo laboratorio.

### *c) Procedimiento conductual*

Para evaluar los efectos conductuales de las manipulaciones farmacológicas, se utilizó la tarea PROG/CHOW, un paradigma operante donde el animal debe realizar cada vez más esfuerzo (apretando un mayor número de veces una palanca, Programa de Razón Progresiva, PROG) para conseguir una comida más apetecible, o tiene la opción de comer libremente otro tipo de comida menos sabrosa pero de libre acceso (CHOW). Es decir, que se expone a los animales a una situación experimental de toma de decisiones donde deben elegir entre realizar un trabajo para conseguir un reforzador, cuyo coste se va incrementando gradualmente, o no llevar a cabo esfuerzo alguno y obtener un reforzador menos valorado.

Las sesiones de entrenamiento conductual se realizaron en cajas de condicionamiento operante (28 x 23 x 23 cm<sup>3</sup>; Med Associates). Las ratas se entrenaron inicialmente para apretar la palanca en un programa de reforzamiento continuo RF1' (45 mg pastillas, Bioserve, Frenchtown, NJ, EE.UU.) durante 1 semana y a continuación se inició el entrenamiento en la tarea PROG (sesiones de 30 min, 5 días/ semana) durante 8 semanas más. En las sesiones PROG, la ratio comienza con RF1 y se incrementa en una respuesta adicional cada vez que se obtuvieron 15 refuerzos (RF1x15, RF2x15, RF3x15...).

Cuando los animales llegaron a una línea base estable de respuesta, se introdujo la comida libre (CHOW) como opción alternativa, disponible en el suelo de la caja durante las sesiones. Las ratas fueron entrenadas hasta que alcanzaron niveles basales estables de presión de la palanca e ingesta de comida, después de lo cual comenzaron los tests farmacológicos.

#### d) Diseño experimental

Para evaluar el impacto de la alteración del sistema dopaminérgico se realizaron dos tipos de experimentos. En el primero, se estudió el efecto de diferentes dosis de eticlopride. Cada día de test, las ratas ( $n = 16$ ) recibieron inyecciones de eticlopride a dosis de 0,02, 0,04, 0,08 mg/kg o una inyección de vehículo (VEH, dosis control), 30 minutos antes de la prueba.

A partir de los datos obtenidos en este experimento, se seleccionó la dosis de eticlopride efectiva para el segundo experimento, dónde se estudió el efecto de diferentes dosis de MSX3 sobre el impacto de la dosis efectiva de eticlopride. En éste, los animales recibieron inyecciones de ambos fármacos 30 min. antes del test, siendo las dosis coadministradas: vehículo de eticlopride + vehículo de MSX3, eticlopride 0,08 mg/kg + vehículo de MSX3, eticlopride 0,08 mg/kg + MSX3 1,0 mg/kg y eticlopride 0,08 mg/kg + MSX3 2,0 mg/kg.

El estudio responde a un diseño de medidas repetidas, ya que cada animal recibió todas las dosis del fármaco, incluida la dosis vehículo a modo de control, en orden aleatorio (un tratamiento por semana). Para determinar el efecto de los fármacos, nos centraremos en las variables respuesta Ratio (nivel de esfuerzo realizado por el animal) y Chow (cantidad de comida libre ingerida) en función de las dosis empleadas del fármaco y del sujeto (ID).

## Resultados

Dado que los datos no siguen una distribución normal y la muestra de sujetos es reducida, evaluamos los efectos de las manipulaciones farmacológicas mediante la prueba no paramétrica de Friedman para  $k$  muestras relacionadas. De igual modo, hemos realizado análisis de supervivencia para observar la evolución de los sujetos a lo largo de la tarea y poder comparar las curvas de supervivencia para cada dosis de un fármaco.

Experimento 1: Efecto de diferentes dosis de eticlopride.

La significación obtenida en la variable ratio ( $\chi^2 = 29,2742$ ,  $df = 3$ ,  $p\text{-value} = 1,961e-06$ ) muestra diferencias significativas en la mediana de por lo menos una de las dosis administradas. Comparaciones múltiples mediante el test de Wilcoxon y la corrección de Holm, muestran que la distribución de respuesta de los animales cuando se administraron las dos dosis mayores (eticlopride 0,04 y 0,08 mg/kg) es estadísticamente diferente a la dosis de vehículo (control) con  $p < 0,01$  y  $0,001$  respectivamente. En cambio, no obtenemos resultados significativos para la variable comida libre ingerida ( $\chi^2 = 7,6242$ ,  $df = 3$ ,  $p\text{-value} = 0,05445$ ). (Fig. 1).

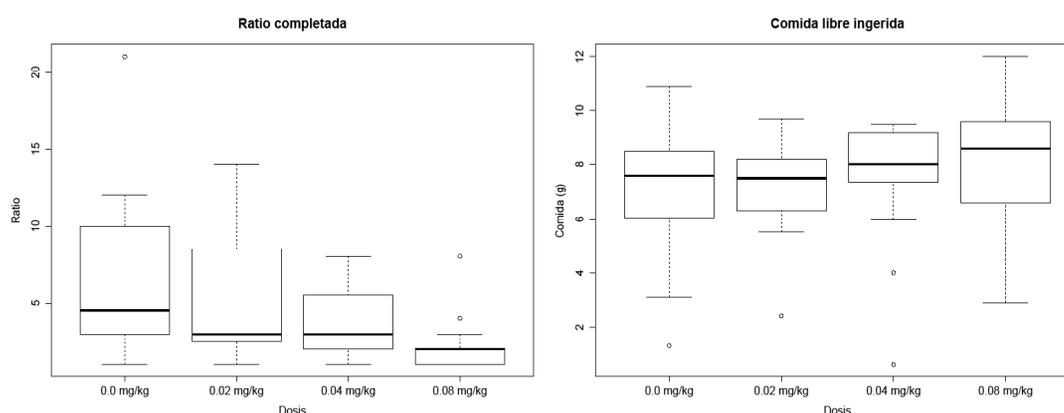


Figura 1. Distribución de la ratio completada y comida libre ingerida (chow) en función de las dosis administradas de Eticlopride. En los boxplots se representa la mediana, cuartiles primero y tercero, valores máximo y mínimo y outliers. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  diferencias estadísticamente significativas con respecto a la dosis VEH (0,0 mg/kg)

En el análisis de supervivencia, estudiamos como influye cada dosis administrada en la respuesta de los sujetos basándonos en el nivel de ratio completada. Este análisis nos permite describir la evolución del grupo de sujetos experimentales mediante la representación gráfica de las proporciones de supervivencia para diferentes intervalos de la ratio, obteniendo una curva para cada dosis administrada. Realizaremos las curvas de supervivencia con el estimador de Kaplan Meier, a través de la función `survfit()` de la librería `survival` (Therneau, 2012).

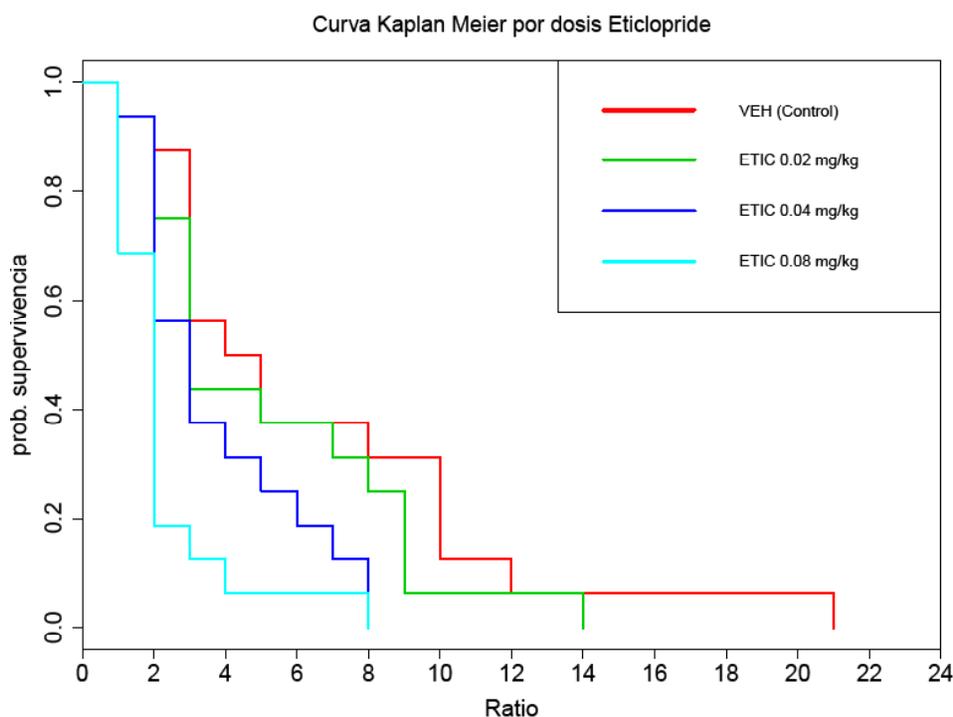


Figura 2. Curva de supervivencia con respecto a la ratio completada para cada dosis de Eticlopride. Cada línea representa la probabilidad acumulada de supervivencia para los intervalos de ratio y, para cada una de las dosis administradas del fármaco

El test `survdiff` ( $\chi^2 = 19,8$ , 3g.l.,  $p = 0.000186$ ) nos informa de que al menos una de las curvas de supervivencia es diferente al resto y, al realizar las comparaciones entre curvas, tanto el test de log Rank como el test de Peto muestran que existen diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de la dosis de Eticlopride 0,08 mg/kg con respecto a la dosis control (VEH) con un  $p < 0,001$  corregido por el método de Holm. (Fig. 2).

Como vemos la probabilidad de supervivencia va disminuyendo para las medianas de cada dosis, lo que refleja que, además de disminuir la mediana al aumentar la dosis de eticlopride, aunque la mitad de la muestra llegue hasta ese punto mediano, no lo supera.

Experimento 2: Efecto de diferentes dosis de MSX3 sobre el impacto de una dosis efectiva de eticlopride.

La significación obtenida en la variable ratio ( $\chi^2 = 31,1087$ ,  $df = 3$ ,  $p\text{-value} = 8,064e-07$ ) muestra diferencias significativas en la mediana de por lo menos una de las dosis administradas. El resultado de las comparaciones múltiples y la corrección de Holm, muestra que solo la mediana de las respuestas correspondiente a la coadministración de la dosis eticlopride 0.08 mg/kg + vehículo de MSX3 es estadísticamente diferente a la de la dosis vehículo (control) con un p-valor menor de 0,001.

Por el contrario, no obtenemos resultados significativos para la variable comida libre ingerida ( $\chi^2 = 2,1$ ,  $df = 3$ ,  $p\text{-value} = 0,5519$ ) donde no encontramos evidencia estadística para afirmar que las distribuciones de probabilidad en esta variable difieran en ninguna dosis. (Fig. 3).

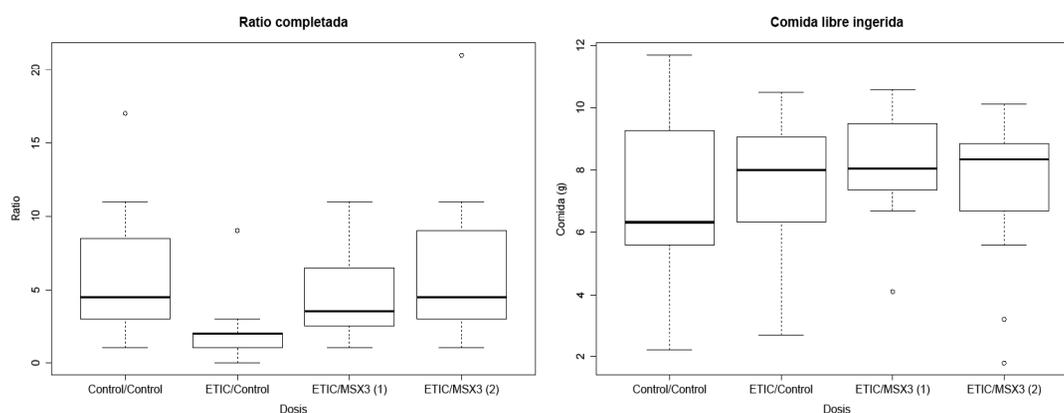


Figura 3. Distribución de la ratio completada y comida libre ingerida (chow) en función de las dosis administradas de msx3 (0, 1,0 y 2,0 mg/kg) junto con la dosis efectiva de Eticlopride (0,08 mg/kg). En los boxplots se representa la mediana, cuartiles primero y tercero, valores máximo y mínimo y outliers. \*\*\*  $p < 0,001$  diferencias estadísticamente significativas con respecto a la dosis VEH (control/control)

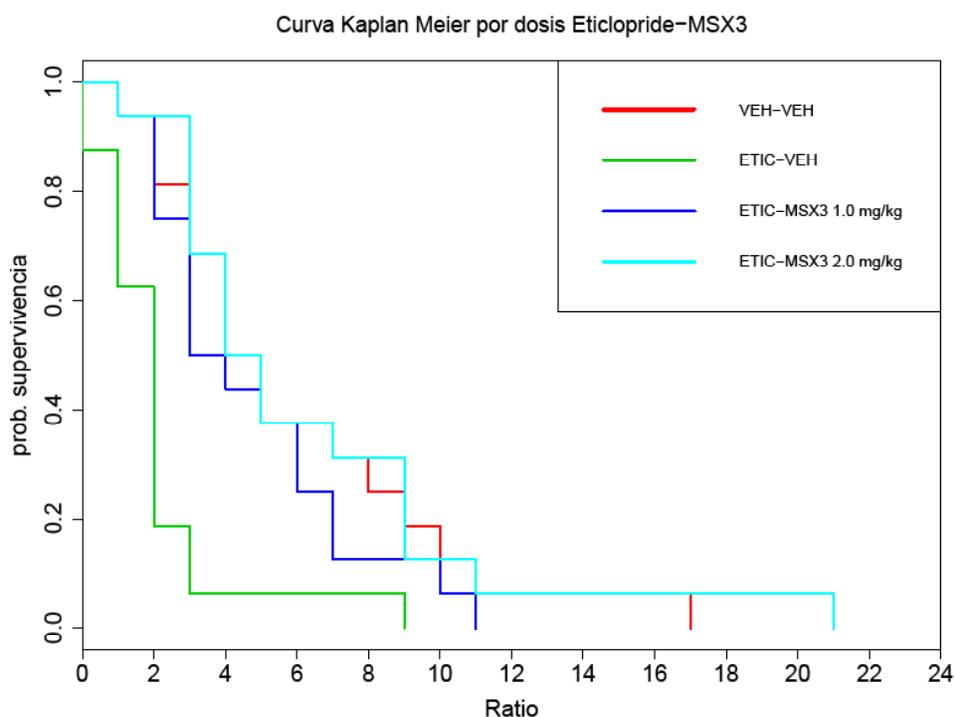


Figura 4. Curva de supervivencia con respecto a la ratio completada para cada dosis coadministradas de msx3 (0, 1,0 y 2,0 mg/kg) junto con la dosis de 0,08 mg/kg Eticlopride. Cada línea representa la probabilidad acumulada de supervivencia para los intervalos de ratio y, para cada una de las dosis coadministradas de los fármacos

Según muestra la significación del test survdiff ( $\chi^2 = 22,2$  on 3 degrees of freedom,  $p = 5,83e-05$ ), al menos una de las curvas de supervivencia es diferente al resto. Las comparaciones entre curvas mediante el test de log Rank ( $p = 0,0025$ ) y el test de Peto ( $p = 0,0011$ ) muestran diferencias significativas, una vez ajustado el p-valor por el método de Holm, únicamente entre las curvas de supervivencia de la dosis coadministrada de Eticlopride 0.08 mg/kg junto con el vehículo de MSX3 con respecto a la dosis control (VEH-VEH). Como vemos, los resultados siguen la misma línea que los obtenidos mediante el test de Friedman. (Fig. 4).

## Discusión y conclusiones

En condiciones normales, las ratas entrenadas en un programa progresivo alcanzan altos niveles de ejecución, es decir, llegan a apretar la palanca un gran número de veces para conseguir comida dulce (pellets) e ingieren menos comida libre menos palatable (chow). Alcanzan pues, una ratio alta de respuesta operante; prefieren trabajar para conseguir un reforzador que conseguir sin ningún esfuerzo un alimento disponible menos apetecible.

Por tanto, los resultados obtenidos nos indican que el eticlopride, un fármaco que antagoniza la función de los receptores de dopamina  $D_2$ , reduce el nivel de esfuerzo que el animal está dispuesto a realizar por conseguir un reforzador (disminuye la ratio de respuesta) cuando puede elegir opciones que requieran un esfuerzo menor (elegir la comida libre).

Los efectos del antagonismo dopaminérgico  $D_2$  tras la administración de eticlopride, se revirtieron mediante la coadministración de MSX3, un antagonista de los receptores de adenosina  $A_{2A}$ . La ejecución de los animales pasó a ser de esta manera, similar a las condiciones normales; los animales pasaron a responder a la palanca y a estar dispuestos a trabajar para conseguir el reforzador.

Estos estudios evidencian la potencialidad de este fármaco como tratamiento de la anergia en enfermedades como la depresión, el Parkinson o el síndrome de fatiga crónica. Al mismo tiempo, nos proporcionan información relevante acerca de la utilidad del Programa de Razón Progresiva con alternativa libre (PROG/ CHOW) como un modelo animal para el estudio de los síntomas motivacionales relacionados con el esfuerzo que se encuentran alterados en muchos trastornos psicológicos.

## Referencias bibliográficas

- Ferré, S. (1997). Adenosine–dopamine interactions in the ventral striatum. Implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 133: 107–120.
- Fuxe, K., Agnati, L. F., Jacobsen, K., Hillion, J., Canals, M., Torvinen, M. et al. (2003). Receptor heteromerization in adenosine  $A_{2A}$  receptor signaling: relevance for striatal function and Parkinson's disease. *Neurology* 61: S19–S23.
- Nunes, E. J., Randall, P. A., Podurciel, S., Correa, M. y Salamone, J. D. (2013). Nucleus accumbens neurotransmission and effort-related choice behavior in food motivation: Effects of drugs acting on dopamine, adenosine, and muscarinic acetylcholine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* in press.
- Pardo, M., Lopez-Cruz, L., Valverde, O., Ledent, C., Baqi, Y., Müller, C. E., Salamone, J. D. y Correa, M. (2012). Adenosine  $A_{2A}$  receptor antagonism and genetic deletion attenuate the effects of dopamine  $D_2$  antagonism on effort-based decision making in mice. *Neuropharmacol* 62: 2068-2077.

- Randall, P. A., Pardo, M., Nunes, E. J., López Cruz, L., Vemuri, V. K., Makriyannis, A., Baqi, Y., Müller, C. E., Correa, M. y Salamone, J. D. (2012). Dopaminergic modulation of effort-related choice behavior as assessed by a progressive ratio chow feeding choice task: pharmacological studies and the role of individual differences. *PLoS One* 7(10): e47934.
- Salamone, J. D. y Correa, M. (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*. 2012 Nov 8;76(3):470-85. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.021. Review.
- Therneau, T. (2012). A Package for Survival Analysis in S. R package version 2.36-14.
- Treadway, M. T., Bossaller, N. A., Shelton, R. C. y Zald, D. H. (2012b). Effort-based decision making in major depressive disorder: a translational model of motivational anhedonia. *J Abnorm Psychol* 121:553-558.