

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Anatomía y Embriología Humana



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DULOXETINA Y PREGABALINA
EN UN MODELO DE FIBROMIALGIA
INDUCIDA POR RESERPINA EN RATA”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

EVA MARÍA GONZÁLEZ SOLER

Dirigida por

Arantxa Blasco Serra

Profesora Ayudante de Universidad

Alfonso Amador Valverde Navarro

Profesor Titular de Universidad

Octubre 2017

VALENCIA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DULOXETINA Y PREGABALINA
EN UN MODELO DE FIBROMIALGIA
INDUCIDA POR RESERPINA EN RATA”**

Trabajo de investigación que presenta

EVA MARÍA GONZÁLEZ SOLER

Para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Valencia

Dirigido por los doctores

Arantxa Blasco Serra

Profesora Ayudante de Universidad

Alfonso Amador Valverde Navarro

Profesor Titular de Universidad

Realizado en el:

Departamento de Anatomía y Embriología Humana

Universidad de Valencia

Octubre 2017

VALENCIA

VNIVERSITAT
E VALÈNCIA [Q 人]

Facultat de Medicina i Odontologia

Departament d'Anatomia i Embriologia Humana



Arantxa Blasco Serra, Profesora Ayudante de Universidad, y Alfonso Amador Valverde Navarro, Profesor Titular de Universidad, ambos del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Valencia

HACEN CONSTAR:

Que Arantxa Blasco Serra ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral "EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DULOXETINA Y PREGABALINA EN UN MODELO DE FIBROMIALGIA INDUCIDA POR RESERPINA EN RATA"

Y para que así conste y surta efectos oportunos, firmo la presente en Valencia a 4 de Octubre de 2017.

Arantxa Blasco Serra

Alfonso A. Valverde Navarro

“La mayoría de las personas no entienden la fibromialgia. En realidad, no lo pueden entender; te ven, te miran, y en apariencia estás bien. Así que no lo entienden. El dolor de la fibromialgia es como una tensión o dolor muscular profundo. Para mí, ha sido un tedioso y profundo dolor y malestar continuado en todo mi cuerpo. Nunca sé cómo va a ser mi día. Me tengo que despertar por la mañana y ver qué me duele y cómo puedo medicarlo y ver si voy a poder funcionar todo el día. Durante el transcurso del día, siento que tengo una fecha de caducidad. Es como si tuviera pesas colgando de las rodillas, de la espalda, del cuello, de las caderas... y siento que empiezo a caer...aunque todavía pueda sentirme bien mentalmente, mi cuerpo me encierra en mí misma y tengo que acostarme.

La medicación está afectando a mis actividades de la vida diaria. Normalmente la tomo por la noche para que pueda funcionar por la mañana, pero ya no puedo improvisar ni hacer nada como antes. Necesito un “momento de gracia” para levantarme, ver lo que me duele...ver si necesito tomar medicamentos adicionales. Es como si estuviese caminando por una espesa niebla.

Al principio, lo más difícil fue obtener un diagnóstico. Tenía que ser A, B, C, D o E, y no lo era. Desde que mi médico me diagnosticó fibromialgia, la parte frustrante ha sido encontrar un tratamiento que me ayudase a volver a algo lo más parecido a una vida normal que se pueda.

Lo que yo me pregunto es, ¿hay un plan mejor para mí?”

*“Ms. P”, paciente del Dr. Clauw, en la conferencia que tuvo lugar en el
Beth Israel Deaconess Medical Center, en Boston, Massachusetts,
El 4 de octubre de 2012.*

AGRADECIMIENTOS

Hace unos años empecé un camino que jamás pensé que llegaría a recorrer. Todo empezó cuando me matriculé en el Máster de Neurociencias básicas y aplicadas de la Universitat de València. En una de las clases, un profesor nos habló del mundo del dolor: tan incomprendido, pero a la vez, tan presente en la sociedad, tan interesante a nivel clínico y experimental. Nos descubrió ese campo de investigación con tanto ímpetu y cocimiento que, desde ese momento, tuve claro que me quería dedicar a ello. Hoy tengo el orgullo de poder decir que ese profesor es mi director, mi tutor, mi mentor. Durante este tiempo, he aprendido y trabajado bajo un alto nivel de exigencia, y gracias a ello puedo presentar este trabajo de tesis del que estoy ampliamente orgullosa y satisfecha. Muchas gracias, Dr. Alfonso Valverde, por haberme abierto las puertas de este camino y haber despertado en mí las ganas de querer superarme a mí misma cada día.

Por supuesto, este camino no lo he recorrido sola. Junto a mí, apoyándome a cada momento dentro y fuera del laboratorio, solucionando problemas (pues tras 4 años, ha pasado de todo), y manteniendo el orden y la cordura, siempre ha estado mi amiga, mi mentora, de la que hoy puedo decir que es mi directora, la Dra. Arantxa Blasco Serra. Gracias por haber sido un muro inquebrantable todos estos años, por haber aplicado esa filosofía de “dormir está sobrevalorado” para que todo saliese adelante.

Este trabajo de tesis ha podido ser posible gracias al laboratorio GESADA (Grupo de estudio del sustrato anatómico del dolor y la analgesia), perteneciente al Departamento de Anatomía y Embriología humana de la Facultad de Medicina y Odontología. Este departamento me recibió con los brazos abiertos, y cada uno de sus integrantes me hizo aprender anatomía, embriología y disección a unos niveles inimaginables. Para mí, la anatomía ha sido siempre una pasión, así que es un honor pertenecer a este departamento. Muchas gracias a todos, cada día me enseñáis algo nuevo, algo maravilloso, y me hacéis mejorar como profesional.

A mis antiguos compañeros del laboratorio GESADA, que tomaron caminos diferentes: A Alida Taberner Cortés, por no rendirse ante nada; A Fernando “Ferni” Martínez Expósito, por ser una fuente de conocimientos humana y por haber compartido conmigo horas de trabajo y amistad; A Francesc Escrihuela Vidal, por haber sido una inspiración y un ejemplo de trabajo duro y perseverancia, de esfuerzo, de inteligencia. Aunque sus elecciones los hayan alejado del laboratorio, en cierto modo siempre han estado conmigo.

Al Laboratorio de Circuitos Neuronales y a sus integrantes: A la Dra. Joana Martínez Ricós y a la Dra. Ana Cervera Ferri, que siempre tienen sabios consejos para brindarme. Al Dr. Vicent Teruel Martí, pues sin él me hubiese perdido en un mar de “estadística y papeleo”, es un orgullo haber podido trabajar a vuestro lado. A los Dres. Sergio Martínez Bellver y Ceci Pardo Bellver: Fuentes de sabiduría en todos los sentidos, gracias por haber sido una sonrisa en los momentos más amargos.

A la Dra. Ana Lloret Alcáñiz y a todo su equipo, perteneciente al Departamento de Fisiología. No sólo he tenido la oportunidad de realizar una pequeña estancia en un departamento tan interesante, sino que lo he hecho al lado de profesionales cercanos y metódicos: Gracias por haberme acogido durante un breve período de tiempo.

Al Dr. Juan Antonio Micó Segura y a todo su equipo (Carmen, Meritxell, Laura, Lidia, Juan Antonio, Irene...), por habernos acogido en uno de los laboratorios dedicados a la investigación en dolor más potentes de toda Europa, por habernos enseñado nuevas técnicas, por habernos transmitido su profesionalidad, sus trucos, su maravillosa Cádiz...para mí, fue una estancia inolvidable en muchos aspectos. Espero que nos volamos a ver, y con grandes noticias.

A mis compañeros de Máster que han logrado sobrevivir al doctorado, en especial a Adrián Alacreu Crespo, que ha sido un pilar fundamental de mi salud mental durante estos años.

A mi familia, en especial a mi madre, Mercedes Soler Valiente; a mi padre, Antonio González Giménez, y a mi hermano, Antonio David González Soler: Aunque esta tesis tuviese un millón de páginas, no serían suficientes para agradeceros no sólo lo que habéis hecho por mí en este período de doctorado, sino en toda mi vida. Me habéis enseñado a trabajar duro, a ser fuerte, a no rendirme, a luchar y a seguir siempre hacia delante, pase lo que pase. Os quiero, gracias por estar ahí siempre, incondicionalmente.

Por último, a mi mejor amigo, mi compañero en la vida, mi pareja, mi apoyo, mi "luz en la oscuridad", David Sixto Navarro. Tampoco hay papel suficiente en el mundo para agradecértelo todo, ¡quién iba a decirlo cuando nos conocimos!. Con los años, te has convertido en una parte de mí, como si tú fueses Jyggalag y yo fuese Sheogorath; tú eres el orden y yo el caos, y aun así siempre hemos permanecido juntos en los buenos tiempos, en los malos tiempos, contra viento y marea, huyendo de convencionalismos y luchando juntos por nuestros objetivos y sueños. Este era una de los míos y me vienen mil sentimientos a la cabeza cuando pienso en qué me evoca que hayas estado a mi lado todo este tiempo, así que lo único que puedo escribir es, te quiero.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Síndrome de fibromialgia: definición e historia	6
1.2 Epidemiología e impacto socio-económico del síndrome de fibromialgia	4
1.3 Evolución de los criterios diagnósticos	8
1.3.1. Criterios diagnósticos en España	13
1.4 Sintomatología del síndrome de fibromialgia	14
1.4.1 Síntoma principal: Alteraciones en el procesamiento del dolor	14
1.4.2 Principal sintomatología comórbida: Síntomas depresivos	47
1.5 Etiopatogenia del síndrome de fibromialgia: principales hipótesis	52
1.6 Tratamientos actuales para el síndrome de fibromialgia	55
1.6.1 Tratamientos no farmacológicos	58
1.6.2 Tratamientos farmacológicos	62
1.7 Investigación básica en el síndrome de fibromialgia	69
1.7.1 Modelos animales de FMS	69
1.7.2 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina	70
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVO	75
2.1. Planteamiento del problema	77
2.2 Hipótesis de trabajo	79
2.3 Objetivos	80
2.3.1 Objetivo General	80
2.3.2 Objetivos específicos	80
3. MATERIAL Y MÉTODOS	83
3.1 Animales de experimentación	85
3.1.1 Condiciones ambientales y de estabulación	85
3.1.2 Consideraciones éticas	85
3.1.3 Control del estado físico y criterios de punto final	86
3.1.4 Casuística	88
3.2 Habituaación y handling	91
3.2.1. Habituaación a las maniobras y aparatos en el estudio del dolor	92
3.2.2. Habituaación a las maniobras y aparatos en el estudio de los síntomas depresivos	94
3.2.3. Habituaación para el estudio de inmunofluorescencia	94
3.3. Administración de reserpina	94
3.3.1 Preparación de la reserpina	94
3.4 Administración de fármacos	95

3.5 Procedimientos experimentales	96
3.5.1. Estudio de dolor	96
3.5.2 Estudio de síntomas depresivos	99
3.5.3 Estudio de inmunofluorescencia	105
3.6 Análisis estadístico	109
3.6.1. Análisis estadístico del estudio de dolor	109
3.6.2 Análisis estadístico del estudio de depresión	110
3.6.3 Análisis estadístico del estudio de inmunofluorescencia	113
4 RESULTADOS	117
4.1 Resultados de las medidas de los umbrales del dolor	119
4.1.1 Electrovonfrey Test	119
4.1.2 Randall y Selitto Test.....	139
4.2. Resultados de las medidas de síntomas depresivos	159
4.2.1 Forced swimming test.....	159
4.2.2. Novelty-Suppressed Feeding Test.....	168
4.3 Resultados del estudio inmunohistoquímico.....	182
4.3.1 Resultados de Locus Coeruleus.....	182
4.3.2 Resultados de A5.....	204
4.3.3 Resultados de A7.....	220
4.3.4 Estudio de la evolución de la activación de las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal tras aplicación de dolor inflamatorio (Test de la Formalina) en ratas sometidas al modelo de FMS inducido por reserpina en rata	238
5. DISCUSIÓN	245
5.1 Discusión del estudio de los umbrales del dolor	249
5.2 DiscusiónDiscusión del estudio de la sintomatología depresiva.....	253
5.2.1 Discusión del estudio Forced Swimming Test.....	254
5.2.2 Discusión del estudio Novelty-Suppressed feeding test.....	258
5.3 Discusión del estudio inmunohistoquímico	261
5.4 Consideraciones Finales	267
6. CONCLUSIONES	274
7. BIBLIOGRAFÍA	280
8. ANEXOS	327

01

INTRODUCCIÓN

1.1 Síndrome de fibromialgia: Definición e historia

El síndrome de fibromialgia (FMS) es una enfermedad que se caracteriza principalmente por dolor muscular crónico generalizado o multifocal, de origen desconocido, y la co-existencia de otras manifestaciones clínicas, como las alteraciones del estado de ánimo, los trastornos del sueño, la fatiga, la rigidez matutina, las disfunciones cognitivas, la ansiedad, los dolores de cabeza recurrentes, los mareos, el síndrome de colon irritable y/o el dolor urogenital (Bellato et al., 2012; Wolfe et al., 2013; Russell, 2013; Chinn et al., 2016).

El término FMS fue usado primera vez por Hensch en 1976 (Hensch, 1976). Desde el siglo XIX se han venido empleando diferentes nombres ante aquellos casos de dolor crónico generalizado de naturaleza musculoesquelética sin causa identificada; y entre ellos han destacado las denominaciones: Puntos Sensibles, Dolor Muscular, Myitis, Fibrositis, Fibromiositis Nodular, Reumatismo Psicógeno... (Hensch y Mitler, 1986; Inacini y Yunus, 2004).

Aunque existen posibles referencias al FMS en la medicina antigua, sobre todo en las obras de Hipócrates, se pueden aislar dos ideas diferentes sobre el comienzo del estudio del FMS. En primer lugar, el concepto del "Reumatismo Muscular", introducido en el siglo XIX en Alemania. En 1842, Robert Friedrich Frosiep describe los "nódulos musculares" o "muskelschwiele", describiéndolos como "grandes placas de consistencia en músculos de enfermos reumáticos". Este concepto inició el estudio del FMS y favoreció el desarrollo de técnicas de tratamiento como el masaje en las bandas musculares tensas por J. Mezger. Posteriormente, en 1903, A. Cornellius postuló que las características que influían sobre los puntos dolorosos/sensibles de los pacientes no estaban determinadas por el curso de los nervios y que además las influencias externas, incluyendo cambios ambientales, emocionales o físicos, podrían alterar las estructuras neuronales ya hiperreactivas asociadas con estas condiciones. En segundo lugar, el concepto de "fibrositis-fibromialgia", desarrollado a principios del siglo XX en Inglaterra, siendo W. Telling el primer autor que acuñó el término "*Fibromiositis Nodular*" en 1911. Los estudios enfocados a este síndrome en Estados Unidos empezaron a partir de 1927, los cuales distinguieron el síndrome miofascial del FMS,

acuñados con el término “miofibrositis” o “neurofibrositis” (Chaitow, 2003; Marson y Pasero, 2008).

Las personas con dolor crónico, trastornos del sueño y fatiga crónica han sido descritas en la literatura desde tiempos bíblicos. Diferentes autores consideran que personajes notables como Florence Nightingale o Charles Darwin, los cuales mostraron esta sintomatología, podrían haber sido diagnosticados en la actualidad con FMS (Smythe, 1989; Martínez-Lavín et al., 2000). De hecho, en la autobiografía de Charles Darwin pueden leerse numerosos párrafos como:

“...Mi principal disfrute y empleo único a lo largo de la vida ha sido el trabajo científico; y la emoción de tal trabajo me hace olvidar por el tiempo, o al menos conduce lejos, mi malestar diario. Por lo tanto, no tengo nada que registrar del resto de mi vida, excepto la publicación de varios libros.”

En 1990, el *American College of Rheumatology* (ACR) definió de forma consensuada criterios específicos para la fibromialgia, distinguiéndola de las enfermedades reumáticas inflamatorias y la artritis, y caracterizando el término FMS. Estos criterios se basaron en la existencia de dolor crónico generalizado y determinados “puntos dolorosos”. Con ello, el ACR pretendía agrupar e identificar un número importante de personas con necesidad de atención y tratamiento que presentaban síntomas similares y probablemente un proceso fisiopatológico común (Wolfe et al., 1990).

Posteriormente, el término FMS fue reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1992, tras la llamada “Declaración de Copenhague”, y tipificado en su manual de Clasificación Internacional de Enfermedades. En la CIE-9, el FMS se clasificó con el código 729.1 que engloba todas las mialgias y miositis no especificadas, y en la CIE-10 se clasificó dentro del apartado M79 “*Other soft tissue disorders, not elsewhere classified*”, con el código M79.7 Fibromyalgia, incluyendo a su vez Fibromyositis, Fibrositis y Myofibrositis. Asimismo, el FMS también fue reconocido en 1994 por la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) con el código X33.X8a (para revisión ver el documento Fibromialgia elaborado por el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad en 2011).

La clasificación diagnóstica de pacientes bajo el término FMS, si bien ha estado en constante discusión, ha facilitado la realización de ensayos clínicos y estudios fisiopatológicos que han permitido avanzar y conocer mejor el problema. No obstante,

la falta de pruebas o exámenes específicos, la ausencia de signos o síntomas patognomónicos del FMS, unido todo ello al hecho de que parte de los síntomas de este síndrome son compartidos con otros procesos de dolor crónico, han llevado a la controversia entre algunos profesionales sobre la aceptación del FMS como una enfermedad con una fisiopatología diferenciada, llegándose a publicar artículos tales como *“Fibromyalgia: ¿a virtual disease?”* (Ehrlich, 2003), *“Fibromyalgia – real or imagined?”* (Morris, 2004), *“Pain is real; fibromyalgia isn’t”* (Ehrlich, 2003), *“Fibromyalgia: to diagnose or not. Is that still the question?”* (Goldenberg, 2004), *“Fibromyalgia: the answer is blowin’ in the wind”* (White, 2004).

Algunos estudios posteriores cuestionaron la especificidad diagnóstica de los puntos dolorosos en el FMS, y varios estudios han señalado que estos puntos dolorosos pueden variar con el grado de estrés psicológico (Nampiaparampil y Shmerling; 2004; Harden et al., 2007).

En respuesta a todas estas cuestiones, el ACR volvió a publicar unos nuevos criterios diagnósticos preliminares de FMS (Wolfe et al., 2010), que fueron validados poco después (Wolfe et al., 2011), en los que se abandona el recuento de los puntos dolorosos y se sustituye por unos cuestionarios que hacían innecesaria la exploración clínica.

La controversia ha acompañado y todavía acompaña al FMS, pues aunque el dolor es el hallazgo típico, éste se caracteriza por un descenso generalizado de los umbrales de dolor sin anormalidad tisular o daño periférico que justifique tal sintomatología, y la ubicación e intensidad del dolor cambia con el tiempo y el curso de la enfermedad (Meeus y Nijs, 2006); además, los síntomas comórbidos no se habían tomado como tal hasta su inclusión en los nuevos criterios, y esto ha hecho que diferentes autores, como ya se ha mostrado anteriormente, hayan negado la existencia de este síndrome. La realidad incuestionable es que existe un grupo de personas con un problema de salud de evolución generalmente crónica que, aunque puede presentarse con diferentes niveles de afectación, resulta en la mayoría de los casos altamente invalidante, lo que requiere enfocar la actuación sanitaria de tal forma que reciban una atención integral adecuada a sus necesidades basada, siempre que sea posible en las evidencias científicas disponibles, y en aquellos aspectos donde éstas sean insuficientes, en el consenso de los expertos.

1.2 Epidemiología e impacto socioeconómico del síndrome de fibromialgia

Según estudios recientes, la prevalencia del FMS en la población general oscila entre el 2% y el 4%, dependiendo de los criterios aplicados para su diagnóstico; en países como Estados Unidos esta prevalencia alcanza el 6,4% (Smith et al., 2010; Vincent et al., 2013; Wolfe et al., 2013). Su prevalencia en Europa se sitúa sobre el 2,3-2,4% (Queiroz, 2013; Clauw, 2014; Kim et al., 2015).

Se calcula que en España existen unas 800.000 personas de la población adulta que padecen este síndrome (Cordero et al., 2010). Su prevalencia en nuestro país es del 2-6% en la consulta de medicina general, mientras que en la consulta de reumatología oscila entre el 3,7% y el 20%, según distintos autores (Carmona et al., 2001; Branco et al., 2010; Jones et al., 2015).

Aunque el FMS ha sido descrito durante mucho tiempo mayor en mujeres, con un ratio aproximado de 13,9 mujeres por cada hombre según los criterios del ACR de 1990 (Lindell et al., 2000; Harris y Clauw, 2008; Branco et al., 2010), el desarrollo de criterios diagnósticos nuevos y más específicos ha demostrado que esta mayor prevalencia en mujeres no es tan alta como se pensaba clásicamente, determinándose en la actualidad una prevalencia del 2,4% en mujeres y el 1,8 % en hombres (Wolfe et al., 2013; Jones et al., 2015).

Estos nuevos datos demuestran la importancia que la correcta definición y especificidad de los criterios diagnósticos tienen sobre los conocimientos de la patología y el por qué deben estar siempre en continua revisión atendiendo a las necesidades poblacionales y adaptándose a las realidades médicas.

Algunos autores han investigado las diferencias en la prevalencia de FMS entre áreas rurales o urbanas, basándose en el impacto que los factores socioeconómicos y culturales pueden tener sobre este síndrome. Estas muestras poblacionales fueron tomadas en zonas rurales y urbanas de diferentes países, como España, Turquía, India, México y Bangladesh. En general, la prevalencia encontrada por los autores es muy variada, tanto en el área urbana (entre el 0,69% y el 11,4%), como en las zonas rurales (entre 0,06% y 5,2%). A pesar de la elevada variabilidad, parece existir una tendencia de mayor prevalencia en las áreas rurales respecto a las zonas urbanas, especialmente

en estudios que evaluaron ambas regiones (Fitzcharles et al., 2014; Marques et al., 2016).

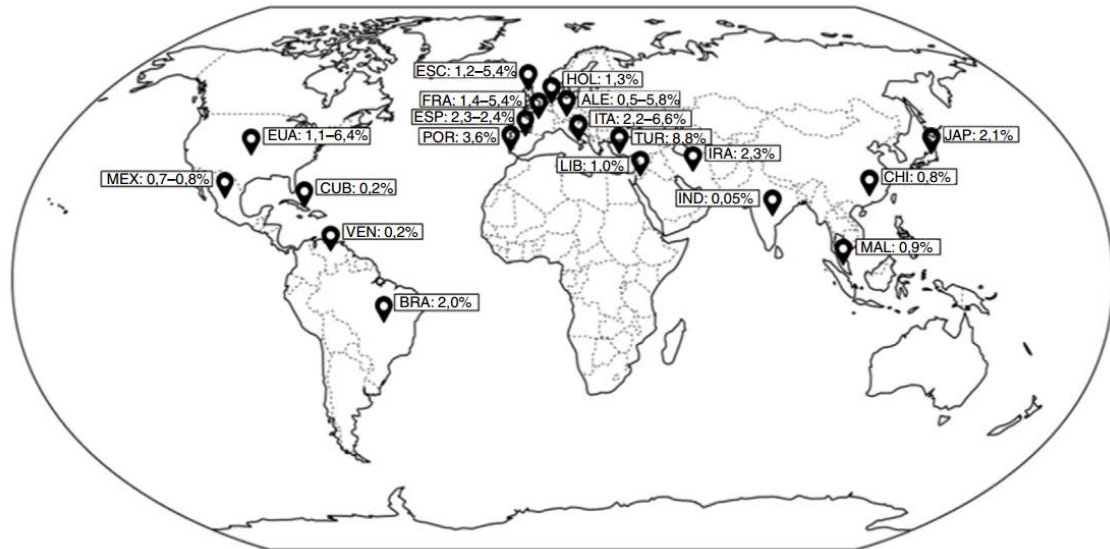


Figura 1.2.1: Distribución global de la prevalencia del FMS en el año 2014-2015. Tomado de Marques et al., 2016.

Las personas con FMS, debido al dolor generalizado, la fatiga y otros síntomas que padecen, encuentran dificultades para realizar las actividades de la vida diaria (AVD). En muchos casos se encuentran deprimidas o irritables, lo que afecta a sus relaciones sociales y familiares, y puede desencadenar un empobrecimiento de sus actividades de ocio y de su apoyo social, lo que en gran medida generará una emotividad negativa hacia su enfermedad que repercutirá en el agravamiento o retroalimentación de su sintomatología (Beam et al., 2009; Furlong et al., 2010; Wu et al., 2012; Russell, 2013; Liedberg et al., 2015).

A nivel socio-económico, las repercusiones son todavía mayores puesto que, aunque en los últimos años se han hecho importantes avances en el manejo de los pacientes con FMS, su tratamiento es mayoritariamente insatisfactorio, lo que repercute no solo en su calidad de vida y su economía, sino también en la de sus familias y, en general, en nuestra sociedad (Burke et al., 2012; Martín et al., 2014). El estudio EPISER (Estudio Epidemiológico de Enfermedades Reumáticas en España) publicado en España en 2000 sitúa la tasa de incapacidad laboral en FMS en un 11,5%; el 78,5% de los pacientes con FMS con trabajo remunerado, en algún momento han estado de baja laboral por algún

motivo relacionado con el FMS; el 6,7% de los pacientes con FMS vistos en consultas de reumatología son pensionistas por esta causa; además, la coexistencia de un trastorno crónico en el FMS es muy alta respecto a la población general, conllevando mayor número de visitas médicas, gastos sanitarios, medicamentos e intervenciones quirúrgicas; por otro lado, los pacientes con FMS suelen ser tratados con diversos fármacos lo que también aumenta el gasto sanitario (Annemans et al., 2008; Rivera et al., 2009).

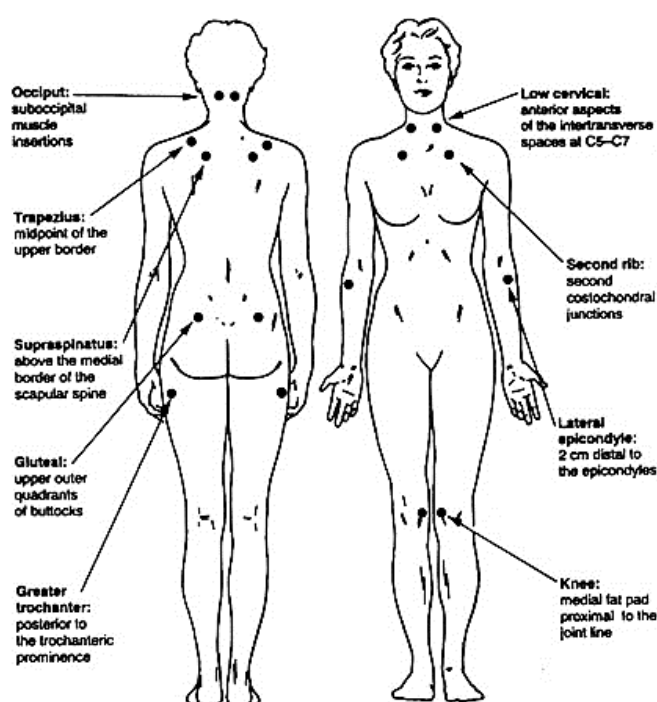
Estos datos son similares a los otros países de nuestro entorno. Análisis retrospectivos realizados en EEUU utilizaron los datos existentes de 1999 a 2005 y se estimó el coste medio directo anual de la atención médica para los pacientes con FMS (12 meses después del diagnóstico) en 11,049 dólares por paciente; el estudio de Wolfe et al. (1997) recoge en sus datos una media de diez visitas médicas al año por cada paciente con FMS, con un consumo de 2,7 fármacos relacionados con FMS en cada periodo de 6 meses. Estos autores calcularon que el coste económico en 1996, era de 2.274 dólares por paciente y año. Sin embargo, estas estimaciones están basadas en datos demasiado antiguos y, en consecuencia, llegan a subestimar la carga económica del FMS en el entorno sanitario actual. Estudios actuales realizados en muestras poblacionales de Canadá sugieren un coste directo anual de 3804 dólares por paciente. En Europa, los costes directos anuales oscilan entre los 500 y los 2500 dólares por paciente (Wolfe et al., 1997; Wu et al., 2012; Russell, 2013; Knight et al., 2013; Lacasse et al., 2016; Skaer y Kwong, 2016).

1.3 Evolución de los criterios diagnósticos

La falta de unos criterios diagnósticos claros, estandarizados y unánimemente aceptados ha sido uno de los principales factores que ha condicionado la aceptación del FMS como una entidad nosológica propia (Wolfe et al., 2010).

El primer intento formal y relativamente exitoso se realizó en 1990: el ACR, basándose en un estudio multicéntrico realizado en EEUU y Canadá, propuso para su diagnóstico únicamente la presencia de dolor difuso de más de 3 meses de evolución (en el lado derecho e izquierdo del cuerpo, por encima y por debajo de la cintura y en el esqueleto axial) y sensibilidad al dolor aumentada a la palpación digital en al menos 11

de 18 localizaciones anatómicas propuestas, denominadas puntos sensibles o “tender points”(Wolfe et al., 1990). La presión digital debía ejercerse con una fuerza aproximada de 4 kg, que en la práctica equivaldría al momento en que cambia de coloración subungueal del dedo del explorador (Collado et al., 2002). En esta primera estandarización de criterios diagnósticos ya se mencionaron como variables complementarias la presencia de trastornos del sueño, fatiga y depresión, los cuales se encontraron en un 75-85% de los pacientes incluidos en el estudio; de todos modos, no se le dio una importancia especial a la sintomatología comórbida.



Fibromyalgia Tender Points

General locations of the 18 tender points that make up the criteria for identifying fibromyalgia.

Figura 1.3.1: “Las tres gracias” y “Mapa de puntos sensibles”, ambos descritos en los criterios diagnósticos de la ACR en 1990. Tomado de Wolfe et al., 1990.

En 2010, ante la evidente dificultad en la práctica de realizar la exploración clínica necesaria para la correcta aplicación de los criterios diagnósticos propuestos en 1990, el ACR rediseñó sus criterios diagnósticos con el fin de hacer frente a determinadas realidades, las cuales ya habían estado presentes en anteriores estudios, pero a las que no se les había prestado la atención necesaria (Wolfe et al., 2010).

En primer lugar, en atención primaria, donde se daba la mayoría de diagnósticos de FMS, el recuento de los puntos sensibles se realizaba con poca frecuencia o no se realizaba correctamente (Fitzcharles y Boulos, 2003), por lo que el diagnóstico de FMS en la práctica era, por lo general, basado en los síntomas. En segundo lugar, la importancia de los síntomas a los que no se les había dado importancia en los criterios de clasificación de 1990 del ACR (fatiga, alteraciones cognitivas, alteraciones del sueño y del estado de ánimo) ha ido creciendo hasta convertirse en características clave en el FMS. Finalmente, algunos expertos mantienen que el FMS no puede ser definido por criterios dicotómicos, es decir, por presencia o ausencia de determinados síntomas, por tratarse de un espectro de alteraciones que pueden aparecer en mayor o menor medida (Wolfe et al., 2010).

La publicación de los criterios diagnósticos preliminares del FMS por el ACR en 2010 eliminó el examen de los “tender points”, haciendo así posible el estudio del FMS en investigación clínica. Estos nuevos criterios del ACR incluyeron:

- Un índice de dolor generalizado (Widespread Pain Index, WPI) que incluye 19 localizaciones que el paciente debe indicar si le han dolido durante la última semana (la puntuación de este índice oscila entre 0 y 19).
- Una escala de severidad de síntomas (Symptom Severity Score, SS), en la cual el paciente debe indicar de 0 a 3 el nivel de severidad en el que ha padecido cada uno de los tres síntomas que proponen en la última semana: fatiga, sueño no reparador y síntomas cognitivos. Asimismo, como puntuación en esta escala se suma la presencia en los últimos seis meses de dolor de cabeza, dolor o calambres en el bajo abdomen o depresión (0= ausencia; 1= presencia). La puntuación en esta escala puede variar entre 0 y 12 puntos.

Estos criterios diagnósticos de FMS se satisfacen si se cumplen estas tres condiciones (Wolfe et al., 2011):

- 1) Si el WPI ≥ 7 y la SS ≥ 5 (Tipo A) o el WPI es 3-6 y la SS ≥ 9 (Tipo B)
- 2) Los síntomas han estado presentes en una intensidad similar durante al menos 3 meses

3) El paciente no tiene un trastorno que pueda explicar el dolor

APPENDIX. Fibromyalgia criteria modified from American College of Rheumatology diagnostic criteria.			
Criteria			
A patient satisfies modified ACR 2010 fibromyalgia diagnostic criteria if the following 3 conditions are met: (1) Widespread Pain Index ≥ 7 and Symptom Severity Score ≥ 5 or Widespread Pain Index between 3–6 and Symptom Severity Score ≥ 9 . (2) Symptoms have been present at a similar level for at least 3 months. (3) The patient does not have a disorder that would otherwise sufficiently explain the pain.			
Ascertainment			
1). Widespread Pain Index (WPI): Note the number of areas in which the patient has had pain over the last week. In how many areas has the patient had pain? Score will be between 0 and 19.			
Shoulder girdle, Lt.	Hip (buttock, trochanter), Lt.	Jaw, Lt.	Upper Back
Shoulder girdle, Rt.	Hip (buttock, trochanter), Rt.	Jaw, Rt.	Lower Back
Upper Arm, Lt.	Upper Leg, Lt.	Chest	Neck
Upper Arm, Rt.	Upper Leg, Rt.	Abdomen	
Lower Arm, Lt.	Lower Leg, Lt.		
Lower Arm, Rt.	Lower Leg, Rt.		
2). Symptom Severity Score: Fatigue; Waking unrefreshed; Cognitive symptoms.			
For the each of these 3 symptoms, indicate the level of severity over the past week using the following scale: 0 = No problem; 1 = Slight or mild problems; generally mild or intermittent; 2 = Moderate; considerable problems; often present and/or at a moderate level; 3 = Severe: pervasive, continuous, life-disturbing problems.			
The Symptom Severity Score is the sum of the severity of the 3 symptoms (fatigue, waking unrefreshed, and cognitive symptoms) plus the sum of the number of the following symptoms occurring during the previous 6 months: headaches, pain or cramps in lower abdomen, and depression (0–3). The final score is between 0 and 12.			

Figura 1.3.2: Tabla resumen de los criterios diagnósticos modificados de FMS establecidos por el ACR en 2011. Tomado de Wolfe et al., 2011.

Con estos nuevos criterios diagnósticos clasificaron correctamente el 88,1% de los casos del estudio, y asimismo pudieron prescindir de los exámenes físicos de los puntos sensibles, los cuales, como ya se ha mencionado anteriormente, eran obviados en la atención primaria. La escala SS permitió, a partir de ese momento, evaluar la gravedad de los síntomas del FMS tanto en pacientes ya diagnosticados como en aquellos aún sin diagnosticar (Wolfe et al., 2010).

Poco después de la publicación de estos nuevos criterios, con el objetivo de desarrollar un cuestionario sencillo y práctico para la realización de estudios epidemiológicos y clínicos, se propuso la “*polysymptomatic distress scale*” (PSD), una escala que combina el índice de dolor generalizado y la escala de severidad de síntomas y en la que, por

tanto, la puntuación puede variar de 0 a 31, y una persona que cumpla los criterios para FMS medidos con el WPI y la SS, siempre dará una puntuación mínima de 12 en el PSD (Wolfe et al., 2011). El uso de esta escala permite trazar el FMS como una escala dimensional o un continuo, y facilita una mayor exploración de las características y distribución de la sintomatología asociada, además de haber demostrado ser simple, útil y eficaz (Wolfe et al., 2013; Häuser et al., 2014; Wolfe et al., 2015; Wolfe et al., 2016).

Widespread Pain Index
(1 point per check box; score range: 0-19 points)

① Please indicate if you have had pain or tenderness during the past 7 days in the areas shown below. Check the boxes in the diagram for each area in which you have had pain or tenderness.

Symptom Severity
(score range: 0-12 points)

② For each symptom listed below, use the following scale to indicate the severity of the symptom during the past 7 days.

- **No problem**
- **Slight or mild problem:** generally mild or intermittent
- **Moderate problem:** considerable problems; often present and/or at a moderate level
- **Severe problem:** continuous, life-disturbing problems

	No problem	Slight or mild problem	Moderate problem	Severe problem
Points	0	1	2	3
A. Fatigue	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
B. Trouble thinking or remembering	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
C. Waking up tired (unrefreshed)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

③ During the past 6 months have you had any of the following symptoms?

	0	1
A. Pain or cramps in lower abdomen	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Yes
B. Depression	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Yes
C. Headache	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Yes

Additional criteria (no score)

④ Have the symptoms in questions 2 and 3 and widespread pain been present at a similar level for at least 3 months?

No Yes

⑤ Do you have a disorder that would otherwise explain the pain?

No Yes

Figura 1.3.3: Ejemplo de encuesta de auto-informe del paciente, el llamado “PSD”, basada en los criterios diagnósticos del ACR para la fibromialgia de 2011. Tomado de Clauw, 2014.

Aún con todo esto, el diagnóstico diferencial del FMS sigue siendo relativamente complicado. Síntomas como el dolor musculoesquelético o la fatiga pueden también ser característicos de otras patologías, lo que puede conducir a un diagnóstico erróneo. Además, la sintomatología comórbida no es exclusiva del FMS (Buskila, 2009; Fitzcharles et al., 2013). Por todo ello, un diagnóstico erróneo puede llevar al profesional de la salud a confundir FMS con diversos trastornos inflamatorios y autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome

de Sjögren, polimialgia reumática y espondiloartritis; con endocrinopatías, incluyendo hipotiroidismo e hiperparatiroidismo, o bien con ciertos trastornos neurológicos, incluyendo neuropatías periféricas, síndromes de atrapamiento de nervios, esclerosis múltiple o miastenia gravis (Arnold et al., 2011; Vitali y Del Papa, 2015).

Como la fibromialgia no presenta ninguna de las anomalías de laboratorio específicas encontradas en los otros trastornos, los resultados normales pueden ayudar a descartar diagnósticos incorrectos. Por lo tanto, el diagnóstico debe llevarse a cabo con una historia detallada, un exhaustivo examen físico y, siempre que sea posible, con estudios de imagen. Es en este punto donde hay que preguntarse si habría algún marcador o una serie de marcadores bioquímicos específicos que apoyasen al examen físico y mejorasen y facilitasen el diagnóstico diferencial de la enfermedad (Chinn et al., 2016).

1.3.1. Criterios diagnósticos en España

También en España se han hecho esfuerzos en los últimos años por adaptar los criterios diagnósticos del FMS a las realidades de la práctica clínica en atención primaria. Los estudios en esta línea se han centrado en el análisis de los nuevos criterios de la ACR de 2011 y del test FiRST (fibromyalgia rapid screening tool), debido a su fácil aplicación en atención primaria. El FiRST es un test creado por el Grupo de Estudio de Dolor Reumático de Francia, que se emplea como una herramienta de autodetección y *autoinforme* breve para detectar FMS en pacientes con dolor musculoesquelético crónico difuso.

De este modo, los criterios diagnósticos propuestos en España consisten en la adaptación de estas dos herramientas previamente descritas (FiRST y Criterios ACR 2011) a las que se les han realizado ligeras modificaciones (con permiso de los autores). Una vez creada la propuesta para la población española, se puso a prueba estudiando su especificidad, sensibilidad y validez. Los resultados muestran que tanto la versión española del *FiRST* como de los criterios diagnósticos de la ACR son herramientas útiles para la detección de pacientes con FMS en centros de salud de atención primaria (Casanueva et al., 2016; Casanueva et al., 2016).

1.4 Sintomatología del síndrome de fibromialgia

Como se ha definido anteriormente, el FMS se caracteriza por su sintomatología dolorosa generalizada de predominio musculoesquelético, que convive con la manifestación de síntomas comórbidos no específicos como trastornos del sueño, trastornos del estado de ánimo y deterioro neurocognitivo (Giacomelli et al., 2013). El interés por el estudio de estos síntomas comórbidos ha ido cobrando importancia durante la última década debido al impacto que tienen sobre la calidad de vida de los pacientes, las repercusiones socioeconómicas que acarrea su tratamiento y la interrelación que presentan con la sintomatología de dolor (Consoli et al., 2012; Wolfe et al., 2010).

1.4.1 Síntoma principal: Alteraciones en el procesamiento del dolor

1.4.1.1 Bases anatómicas y fisiológicas del procesamiento del dolor

Una de las primeras preguntas que se ha planteado sobre el dolor durante la historia de la medicina y de las ciencias de la salud es saber si el dolor, al igual que la visión, el tacto o la audición, es una sensación específica que posee receptores y vías periféricas y centrales propias, o, más bien, se trata de una cualidad, ligada a la intensidad de la estimulación, y que se ajusta a las características de diversas sensaciones específicas (Osorio y Frutos, 1995).

Para hacerse consciente, el dolor (como el resto de sensibilidades) utiliza unas vías nerviosas aferentes que requieren de unos receptores específicos que capten los estímulos dolorosos, de unas fibras nerviosas que trasladen la señal generada hasta el sistema nervioso central, y finalmente, de unas vías ascendentes que conduzcan esta información por el sistema nervioso central hasta la corteza cerebral, donde la sensación dolorosa se hará consciente (Valverde et al., 2015).

La taxonomía del dolor es muy amplia: en función de la duración podemos clasificar el dolor en agudo o crónico. El dolor agudo, es la consecuencia inmediata de la activación de los sistemas nociceptores por una noxa. Aparece por estimulación química, mecánica o térmica de nociceptores específicos; tiene una función de protección

biológica. Los síntomas psicológicos son escasos. El dolor crónico, por otra parte, no posee una función de protección, es persistente y puede perpetuarse por tiempo prolongado después de una lesión, e incluso en ausencia de la misma. Suele ser refractario al tratamiento y se asocia a importantes síntomas psicológicos. Asimismo, hay autores que clasifican, en función de la localización del dolor, entre dolor somático y dolor visceral; en compensación, también hay autores que hacen distinciones fisiológicas según su rapidez de viaje en el sistema nervioso, diferenciando entre dolor rápido (el cual se siente a los 0.1s de haberse producido el daño tisular) y dolor lento (Puebla, 2005; Pérez-Cajaraville y Gil-Aldea, 2006; Zegarra-Pièrola, 2007; Vanderah, 2007).

En función de los mecanismos fisiopatológicos, el dolor se diferencia en nociceptivo o neuropático, en los cuales profundizaremos algo más:

Por una parte, el dolor nociceptivo es consecuencia de una lesión somática o visceral, la cual activa nociceptores en tejidos periféricos; de este modo, el dolor inflamatorio (dolor asociado a una inflamación activa) se clasifica en la categoría de dolor nociceptivo, aunque es reconocido que el sistema nociceptivo puede estar alterado en el dolor inflamatorio crónico.

Por otra parte, el dolor neuropático es el resultado de una lesión y alteración de la transmisión de la información nociceptiva a nivel del sistema nervioso central o periférico. El dolor neuropático implica la existencia de patología del sistema somatosensorial, ya sea en el sistema nervioso periférico (SNP) (dolor neuropático periférico) o en el sistema nervioso central (SNC) (dolor neuropático central). En este caso, y otra vez debido a la falta de una herramienta diagnóstica específica para este tipo de dolor, se propuso un sistema de clasificación de dolor neuropático en "definido", "probable" y "posible". El grado "posible" sólo puede considerarse como una hipótesis de trabajo. Los grados "probable" y "definido" requieren pruebas confirmatorias de un examen neurológico (Loeser and Treede, 2008).

1.4.1.2 Vías ascendentes del dolor: De los receptores cutáneos a la corteza cerebral

En 1906, Sherrington definió los receptores encargados de recoger la información de naturaleza dolorosa, los nociceptores, como aquellos receptores sensoriales capaces

de informar sobre la existencia de un daño o sobre la amenaza de que éste se fuera a producir (Ringkamp et al., 2013; Westlund y Willis, 2015). Los nociceptores son terminaciones nerviosas libres que no parecen tener una estructura de receptor específica como ocurre en otros tipos de receptores somatosensoriales (Almeida et al., 2004; Ringkamp et al., 2013; Warren et al, 2014b; Valverde et al., 2015). Estas terminaciones nerviosas libres son las ramas terminales de las fibras nerviosas sensoriales que se encuentran libremente en el tejido inervado y constituyen el tipo más abundante de terminación sensorial, que ocurre ampliamente en el integumento (en este caso, la piel) y también dentro de los músculos, articulaciones, vísceras y otras estructuras (Crossman y Neary, 2014).

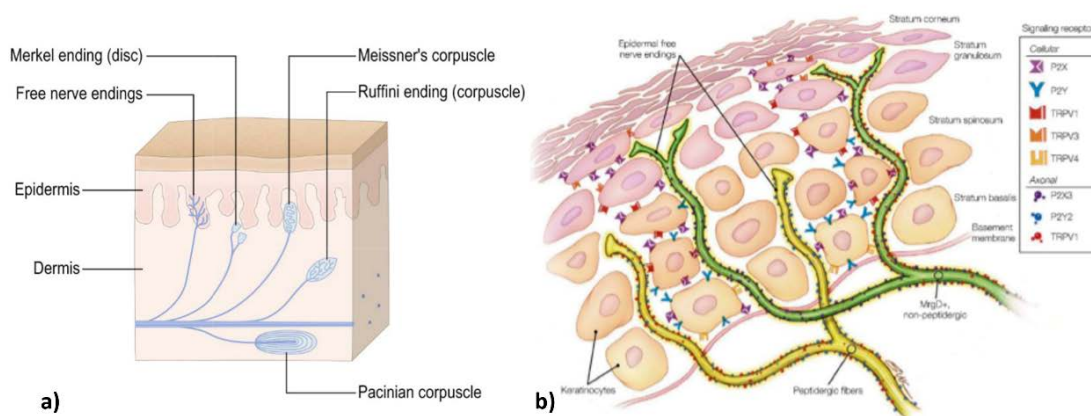


Figura 1.4.1.2.1: a) Receptores nerviosos sensibles en la piel; tomado de Crossman y Neary, 2014. b) Terminaciones nerviosas libres. Tomado de Ringkamp et al., 2013.

Los receptores del dolor no se adaptan y por lo tanto se diferencian de otros receptores de sensaciones, pero tienen la propiedad única de la hiperalgesia. Los factores que causan dolor son las temperaturas extremas, la acidosis láctica resultante de la isquemia del tejido, la contusión del tejido, la infección bacteriana y los espasmos musculares debidos a la estimulación de receptores mecánicos directa e indirectamente por la compresión de los vasos sanguíneos (isquemia).

Según el tipo de dolor que active a las terminaciones nerviosas libres podemos distinguir tres clases de nociceptores: los nociceptores mecánicos, los cuales responden ante estímulos táctiles intensos, como un pinchazo o un aplastamiento, generalmente acompañados de mayor o menor lesión tisular; los nociceptores térmicos, los cuales son excitados por temperaturas extremas, (tanto altas, por encima

de 45°C, como bajas, por debajo de 5°C); y los nociceptores polimodales, que responden a diferentes estímulos mecánicos, térmicos y al contacto con estímulos químicos nocivos.

Por otra parte, los nociceptores pueden ser subclasificados según cuatro criterios: (1) Rapidez de acción: Aferentes de fibra C no mielinizados (el llamado “dolor lento”) versus aferentes de fibra A mielinizada (“dolor agudo”), (2) Las modalidades de estimulación que evocan una respuesta, (3) Las características de respuesta, y (4) Marcadores químicos distintivos (por ejemplo, receptores expresados en la membrana) (Ringkamp et al., 2013).

Teniendo en cuenta la clasificación fisiológica del dolor en rápido y lento, podemos distinguir distintas características. El dolor agudo se siente comúnmente en los tejidos superficiales, rara vez en los tejidos más profundos; lo producen estímulos de dolor mecánicos o térmicos, y lo conducen fibras A δ a velocidades entre 6 y 30 m/s. El dolor agudo hace que la persona sea consciente de la influencia perjudicial y reaccione inmediatamente para retirarse del estímulo. Por lo que respecta al dolor lento, es activado por nociceptores polimodales y se siente tanto en la piel como en los tejidos profundos. La vía del dolor lento es transportada por fibras de tipo C a velocidades entre 0,5 y 2 m/s. Químicos como la bradiquinina, la serotonina, la histamina, la acetilcolina son los responsables de la generación del dolor lento. Las prostaglandinas y la sustancia P aumentan la sensibilidad de las terminaciones nerviosas sin excitarlas directamente (Basbaum y Jessell, 2013; Gardner y Johnson, 2013; Londhey, 2015; Valverde et al., 2015).

Table 22-2 Receptor Types Active in Somatic Sensation

Receptor type	Fiber group ¹	Fiber name	Modality
Cutaneous and subcutaneous mechanoreceptors			
Meissner corpuscle	A α , β	RA1	Touch Stroking, flutter
Merkel disk receptor	A α , β	SA1	Pressure, texture
Pacinian corpuscle ²	A α , β	RA2	Vibration
Ruffini ending	A α , β	SA2	Skin stretch
Hair-tylotrich, hair-guard	A α , β	G1, G2	Stroking, fluttering
Hair-down	A δ	D	Light stroking
Field	A α , β	F	Skin stretch
C mechanoreceptor	C		Stroking, erotic touch
Thermal receptors			
Cool receptors	A δ	III	Temperature Skin cooling (<25°C [77°F])
Warm receptors	C	IV	Skin warming (>35°C [95°F])
Heat nociceptors	A δ	III	Hot temperature (>45°C [113°F])
Cold nociceptors	C	IV	Cold temperature (<5°C [41°F])
Nociceptors			
Mechanical	A δ	III	Pain Sharp, pricking pain
Thermal-mechanical (heat)	A δ	III	Burning pain
Thermal-mechanical (cold)	C	IV	Freezing pain
Polymodal	C	IV	Slow, burning pain
Muscle and skeletal mechanoreceptors			
Muscle spindle primary	A α	Ia	Limb proprioception Muscle length and speed
Muscle spindle secondary	A β	II	Muscle stretch
Golgi tendon organ	A α	Ib	Muscle contraction
Joint capsule receptors	A β	II	Joint angle
Stretch-sensitive free endings	A δ	III	Excess stretch or force

Figura 1.4.1.2.2: Tipos de receptores somatosensoriales. Tomado de Ringkamp et al., 2013.

Otro tipo de clasificación de los nociceptores es según su localización. Los nociceptores están ampliamente distribuidos por la piel (nociceptores cutáneos), encargados de recoger el dolor somático superficial; por los músculos y articulaciones (nociceptores profundos), donde recogen el dolor somático profundo; y en diferentes vísceras y órganos internos (nociceptores viscerales) responsables de la captación del dolor visceral (Warren et al, 2014).

Una vez los nociceptores han sido activados, la señal dolorosa generada viaja hacia el sistema nervioso central por las fibras nerviosas nociceptivas que, como ya hemos comentado, pueden ser de dos tipos (Gardner y Johnson, 2013; Valverde et al., 2015):

- Fibras A δ (A-delta), escasamente mielinizadas, fibras aferentes del grupo III, de entre 1-6 μ m de diámetro y una velocidad de conducción de 4-36 m/s.
- Fibras C, amielínicas, fibras aferentes del grupo IV, con un diámetro que varía entre las 0,2-1,5 μ m y una velocidad de conducción de 0,4-2,0 m/s.

<i>Fibras nociceptivas</i>	<i>Tipo</i>	<i>Velocidad</i>	<i>Diámetro</i>
Fibras A- δ	Mielínicas	4-30 m.sg ⁻¹	1-5 μ m
Fibras C	Amielínicas	0,4-2 m.sg ⁻¹	0,3-1,5 μ m

Figura 1.4.1.2.3: Breve clasificación de las fibras nociceptivas. Tomado de Romera et al., 2000.

Un tercer tipo de fibras nerviosas, las fibras Ab (A-beta), mielinizadas, fibras aferentes del grupo II, de entre 6-12 μ m de diámetro y una velocidad de conducción de 36-72 m/s, no conducen estímulos nociceptivos, pero son fundamentales en los mecanismos de supresión segmental (Almeida et al., 2004; Gardner y Johnson, 2013).

La ubicación, la intensidad y el patrón temporal de los estímulos nocivos se traducen en una señal reconocible a través de estas fibras nerviosas nociceptivas. Éstas son los axones o prolongaciones periféricas de las neuronas nociceptivas primarias. La información nociceptiva procedente de cualquier zona del cuerpo (excepto de la cabeza) viaja por estas prolongaciones periféricas hasta el soma neuronal de las neuronas nociceptivas primarias, localizado en el ganglio espinal de la raíz dorsal correspondiente. De este ganglio parte la prolongación central de la neurona nociceptiva primaria que, tras terminar de recorrer el resto de la raíz posterior, llega al sistema nervioso central a nivel del asta dorsal de la médula espinal.

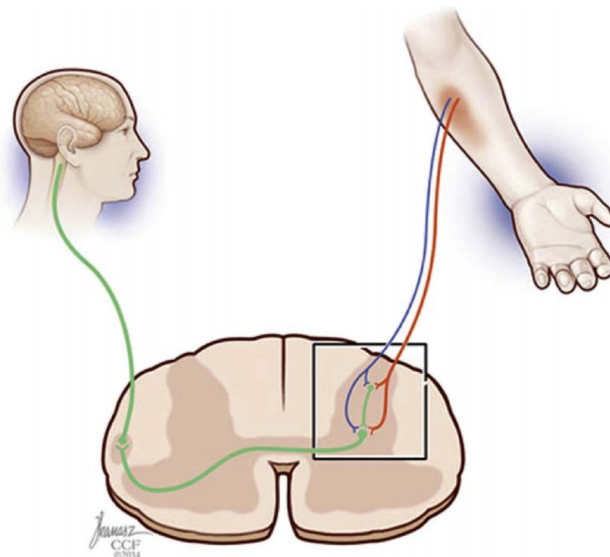


Figura 1.4.1.2.4: Simplificación de la llegada de fibras nociceptivas periféricas al SNC. Tomado de Bourne et al., 2014.

No obstante, cabe señalar que algunas de estas prolongaciones centrales nociceptivas cambian de dirección en la raíz posterior y entran finalmente en la médula espinal por raíces ventrales. Estas fibras son conocidas como fibras recurrentes, y serían las responsables de la persistencia del dolor tras rizotomía posterior (Almeida et al., 2004; Bourne et al., 2014; Naftel, 2014). La información nerviosa nociceptiva craneal es recogida por las fibras del par craneal V, el nervio Trigémino; las fibras que recogen la sensibilidad térmica y dolorosa terminan en el núcleo espinal, llegando a su terminación descendiendo por el tracto espinal del trigémino, un fascículo de fibras que se encuentra inmediatamente superficial al núcleo espinal (Crossman y Neary, 2014).

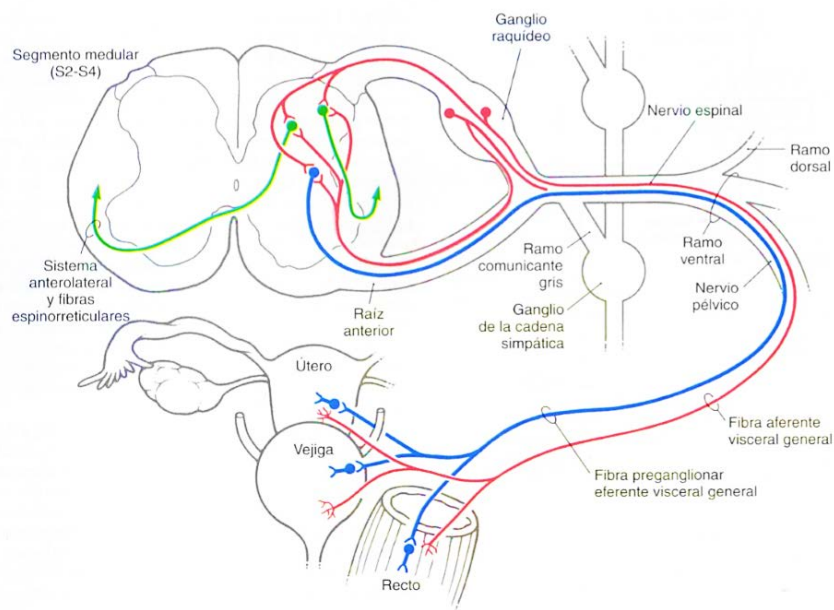


Figura 1.4.1.2.5: Fibra recurrente de origen visceral (representada en rojo en la raíz anterior). Tomado de Naftel, 2014.

Una vez alcanzan el asta dorsal de la médula, las fibras que conducen la información nociceptiva se dividen en una rama ascendente y otra descendente, formando el fascículo o tracto de Lissauer. Tanto las ramas ascendentes como las descendentes, tras recorrer varios segmentos medulares en ambos sentidos, penetran de nuevo en el interior del asta dorsal medular. La información dolorosa conducida por las fibras A δ (A-delta) hace sinapsis en

neuronas de la lámina I y parte externa de la lámina II (Ile) y lámina V, mientras que las fibras C van a contactar con células de las láminas I y II (Ile) (Basbaum y Jessell, 2013).

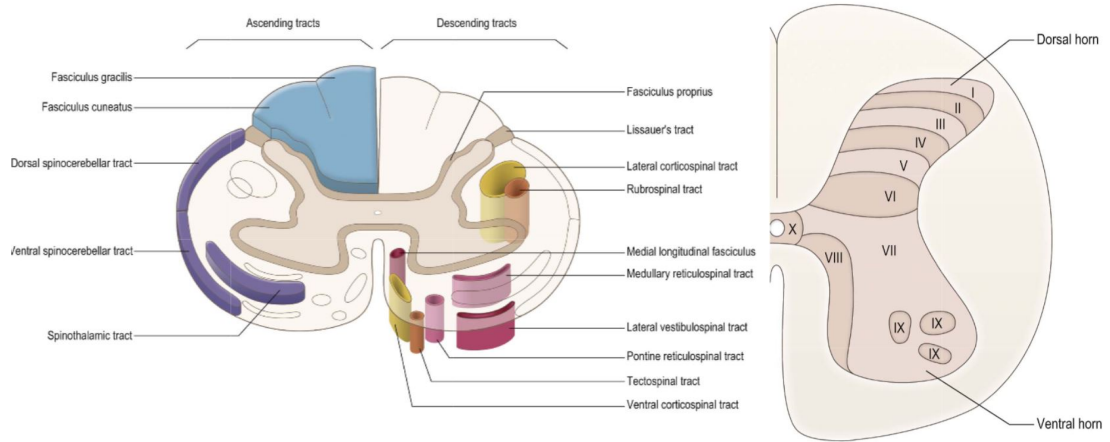


Figura 1.4.1.2.6: Tractos de la sustancia blanca de la médula espinal y división en láminas de la sustancia gris. Tomado de Crossman y Neary, 2014.

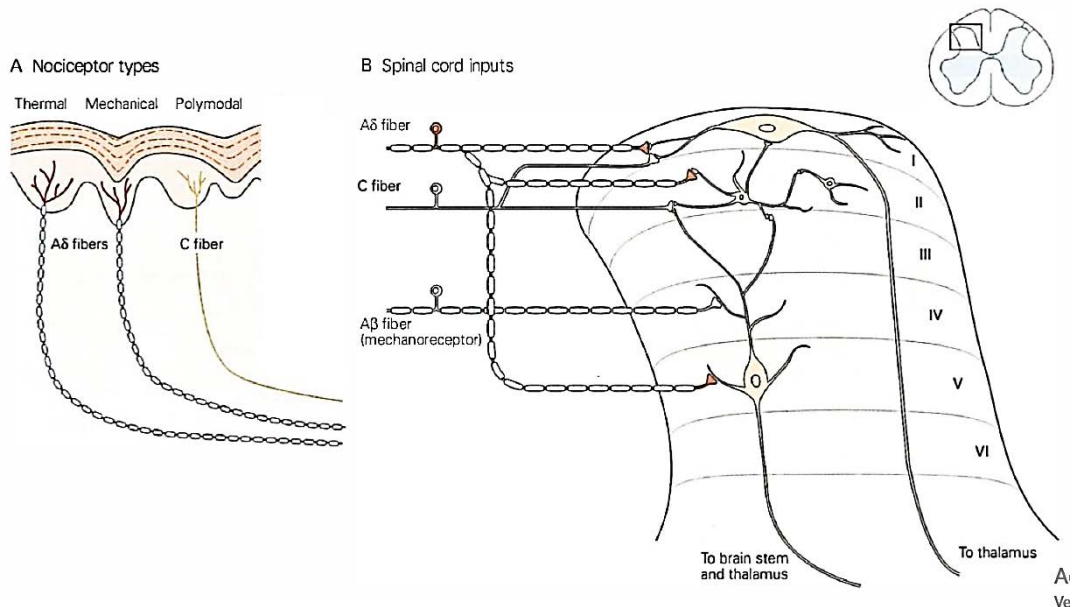


Figura 1.4.1.2.7: Terminación de las fibras nociceptivas sobre el asta posterior de la médula espinal. Tomado de Basbaum y Jessell, 2013

Las neuronas de la lámina I, también llamada zona marginal, son en general grandes y proyectan a otras láminas de la médula espinal, a la formación reticular del tronco del encéfalo y al tálamo. La lámina II, también llamada sustancia gelatinosa de Rolando, puede ser dividida en dos zonas: una más interna, la lámina Ili, que recibe información

no dolorosa; y otra más externa, la lámina IIe, que recibe información de naturaleza nociceptiva. Contiene interneuronas excitadoras e inhibitoras que proyectan a otras láminas de la médula espinal. La lámina V contiene grandes neuronas denominadas de amplio margen dinámico o WDR debido a que responden a una gran variedad de estímulos (mecánicos, térmicos, químicos...). Algunas de ellas reciben también estímulos nociceptivos de origen visceral. Junto con las de la lámina I, las neuronas de la lámina V constituyen el grupo celular más importante en la transmisión ascendente de la información nociceptiva hacia el cerebro (Warren et al., 2014b).

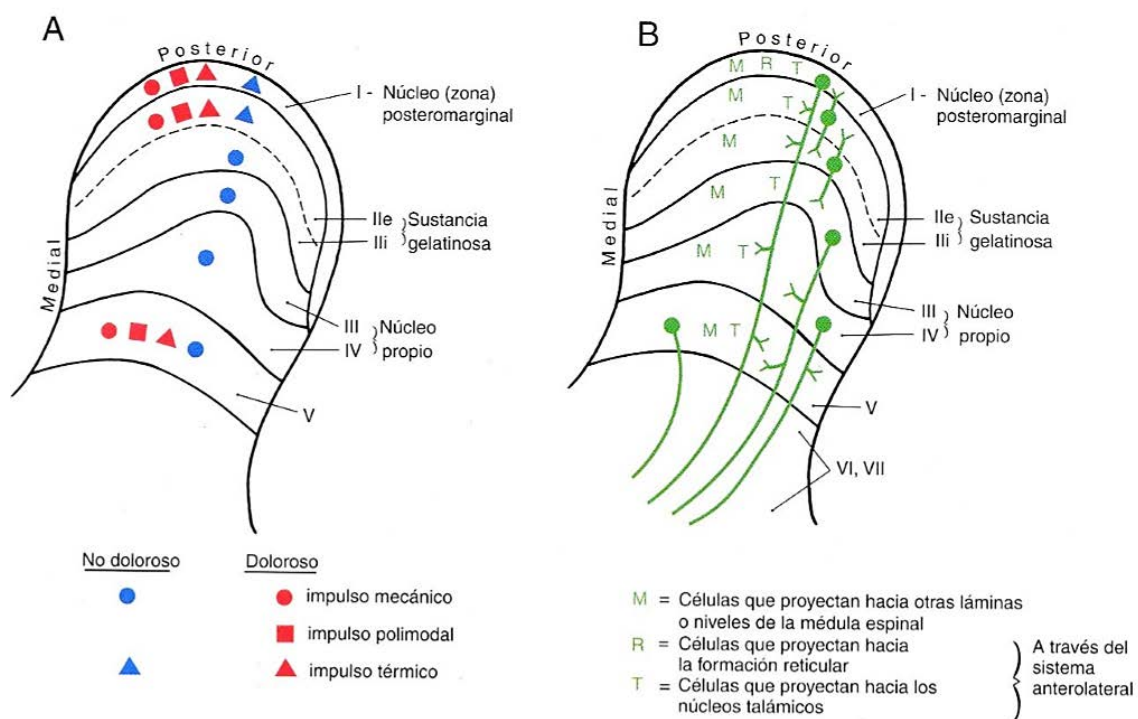


Figura 1.4.1.2.8: Láminas del asta posterior de la médula espinal, con sus principales entradas (A) y salidas (B). Tomado de Warren et al., 2014a.

La señal dolorosa generada en el asta posterior de la médula alcanzará centros superiores supraespinales a través de diferentes haces o fascículos ascendentes principales. Los más importantes son los que actualmente conforman el denominado sistema anterolateral (SAL), que incluye los clásicos haces espinotalámicos, espinoreticular, espinomesencefálico y espinohipotálamico, sin embargo, encontramos vías ajenas al SAL que intervienen en la transmisión nociceptiva

ascendente, como el haz espinocervical y la vía postsináptica de la columna dorsal (Warren et al., 2014b).

El haz espinotalámico constituye la principal vía nociceptiva ascendente desde la médula espinal. En sus fibras se incluyen los axones de las neuronas nociceptivas específicas y de amplio espectro dinámico (WDR). Las fibras de estas neuronas cruzan por la comisura gris anterior de la médula, en una decusación que tiene lugar a través de varios segmentos medulares, y alcanzan el cordón anterolateral de la hemimédula opuesta, acordándose en ángulo recto para hacerse ascendentes. Desde este momento, estas fibras recorren, como parte del SAL, la médula espinal, el bulbo, la protuberancia y el pedúnculo cerebral, hasta llegar de forma directa al tálamo, donde hacen relevo en la neurona tálamo-cortical nociceptiva, en el núcleo ventral posterolateral del tálamo. Algunos autores lo denominan la vía neoespinotalámica. A partir de esta sinapsis, las neuronas de tercer orden se proyectarán hacia el giro postcentral (Almeida et al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Dostrovsky y Craig, 2013; Warren et al, 2014b; Westlund y Willis, 2015; Valverde et al., 2015).

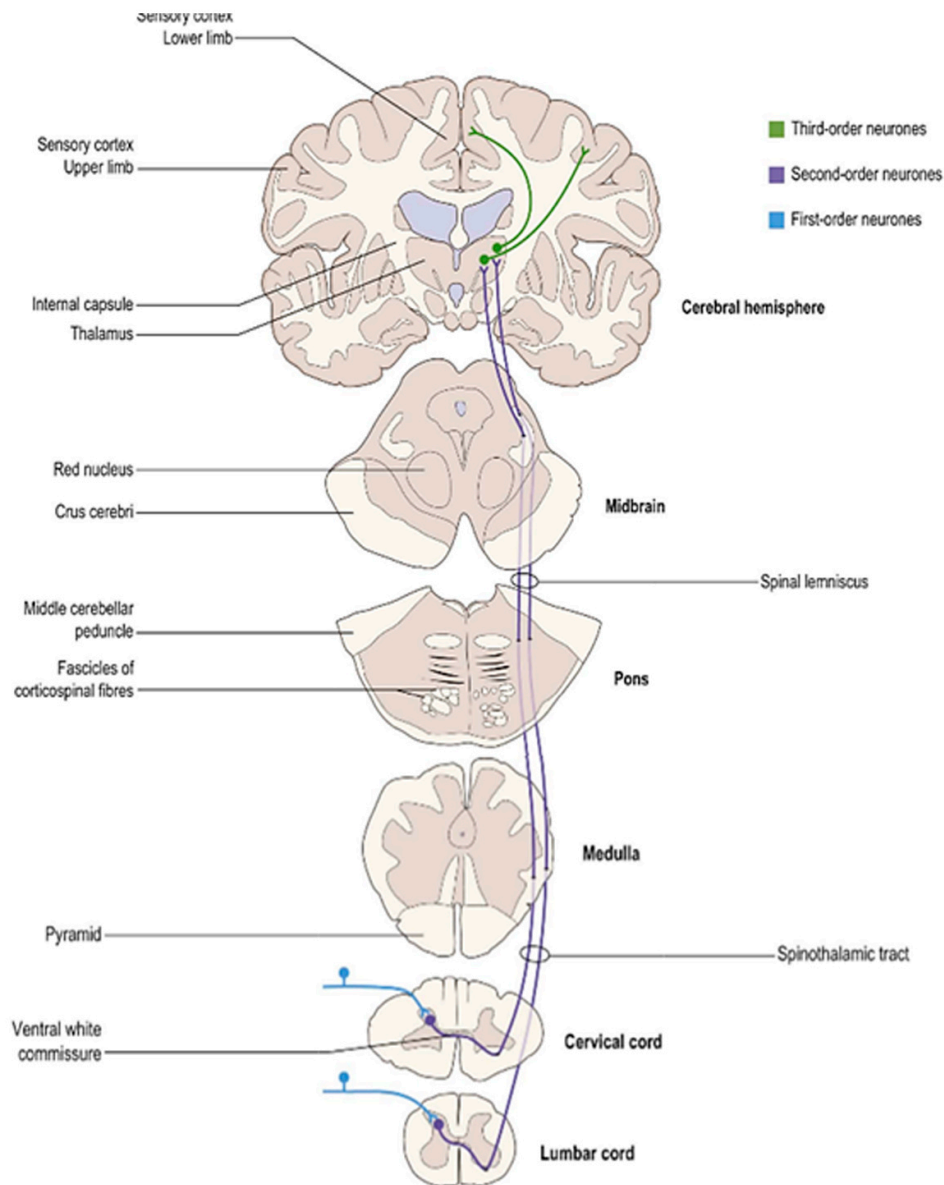


Figura 1.4.1.2.9: Tracto espinotalámico. Tomado de Crossman y Neary, 2014.

Por otra parte, las fibras algésicas del haz espinoreticular se dirigen principalmente hacia la formación reticular bulbo-pontina. Desde este punto, la información nociceptiva puede o bien continuar hacia el tálamo por fibras reticulotalámicas, completando la vía indirecta al tálamo o vía paleoespinotalámica, o bien puede descender de nuevo a la médula espinal desde núcleos como el locus coeruleus o el núcleo del rafe magno, contribuyendo en el control descendente del dolor (Almeida et

al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Dostrovsky y Craig, 2013; Warren et al, 2014b; Westlund y Willis, 2015; Valverde et al., 2015).

El haz espinomesencefálico transporta las señales nociceptivas desde la médula espinal hasta núcleos importantes en la modulación endógena del dolor como la sustancia gris periacueductal (PAG), o en la integración afectivo-emocional del dolor como el núcleo parabraquial (fibras espinoparabraquiales), gracias a sus proyecciones sobre la amígdala del sistema límbico (Almeida et al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Dostrovsky y Craig, 2013; Warren et al, 2014b; Westlund y Willis, 2015; Valverde et al., 2015).

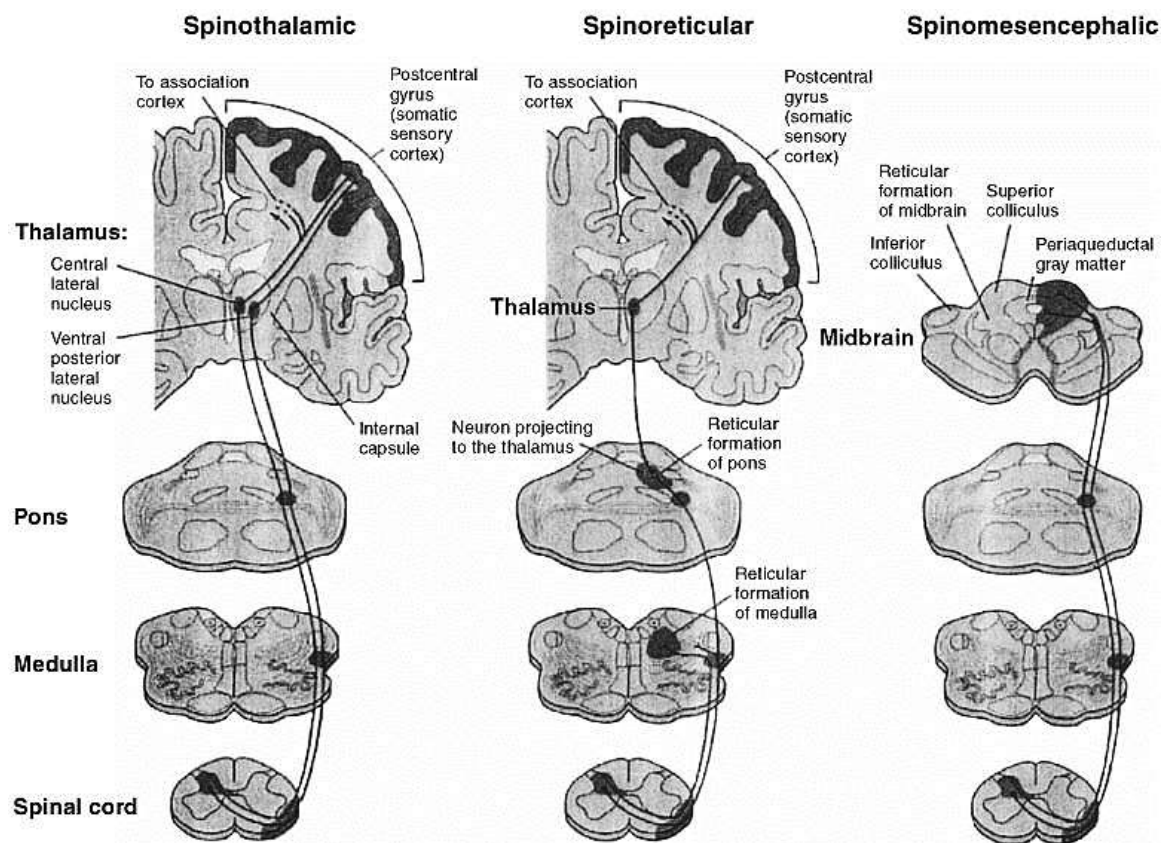


Figura 1.4.1.2.9: Haces espinotalámico, espinoreticular y espinomesencefálico comparados; principales vías ascendentes nociceptivas. Tomado de Lemke et al., 2004.

Haremos una mención especial al recordar que, dentro del SAL, la mayoría de autores diferencian unas fibras espinohipotálamicas, que bien de forma directa o a través de fibras colaterales procedentes de los haces espinoreticular y espinomesencefálico, llevan información nociceptiva al hipotálamo, contribuyendo de forma importante en

la elaboración de respuestas endocrinas y vegetativas ante estímulos nociceptivos (Almeida et al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Dostrovsky y Craig, 2013; Warren et al, 2014b; Westlund y Willis, 2015; Valverde et al., 2015). Se forma, de este modo, el sustrato anatómico que permite las reacciones autonómicas reflejas del estímulo doloroso. Durante las últimas décadas se ha estado estudiando el papel de estas conexiones (como las del núcleo supraquiasmático, que controla parcialmente el patrón sueño/vigilia) en comportamientos tales como la dificultad para dormir en condiciones de dolor, particularmente en el dolor crónico (Kittelberg y Bolsook, 1999). De forma externa al SAL, destacaremos la vía postsináptica de la columna dorsal, fundamental en la conducción del dolor visceral. Estas fibras acompañan principalmente a las fibras vegetativas simpáticas y parasimpáticas, y los somas de las neuronas sensitivas primarias que lo transmiten se localizan en los ganglios raquídeos. Sus terminaciones centrales presentan un amplio territorio de finalización, la cual es parcialmente bilateral, en las láminas superficiales y profundas del asta dorsal de la médula espinal (láminas I y V) y alrededor del canal central medular (lámina X). Con todo esto, se produce una convergencia cutánea y visceral en las láminas I y V (las cuales son el principal origen del tracto espinotalámico). Hay autores que sostienen la hipótesis de que es esta convergencia la que podría darle una explicación al dolor referido.

Desde la lámina X, la información dolorosa visceral asciende por la columna dorsal hasta alcanzar los núcleos grácil y cuneiforme, conduciéndose posteriormente al tálamo, la amígdala, el hipotálamo, la PAG, etc... (Westlund y Willis, 2015).

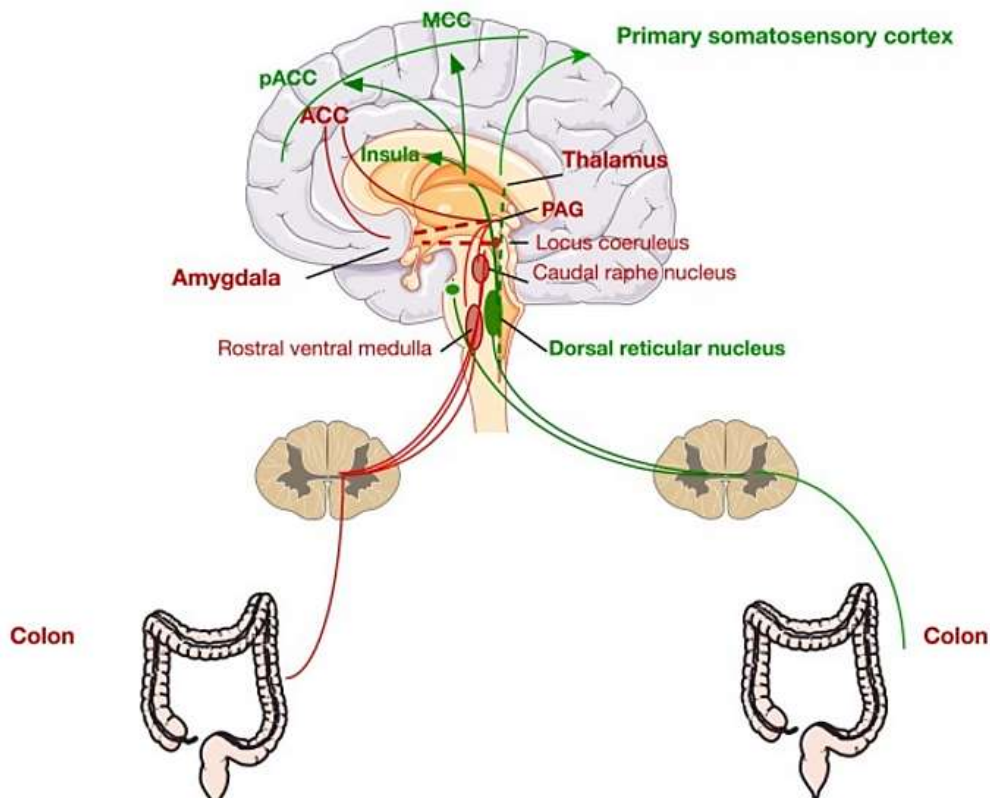


Figura 1.4.1.2.11: Vías ascendentes y descendentes que median en la sensación del dolor visceral. Se muestra en verde la vía ascendente del dolor visceral y en rojo la vía descendente de modulación de la sensación del dolor visceral. Tomado de Moloney et al., 2015.

Por último, un haz espinocervicotálamico también ha sido descrito, y aunque sobre su origen y destino en el ser humano no existe un consenso general, su estudio en otros mamíferos, incluidos los primates, ha aportado suficientes datos para no cuestionar su participación en la conducción ascendente del impulso nervioso nociceptivo (Almeida et al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Valverde et al., 2015).

A raíz del estudio de todas las vías ascendentes del dolor, se hace evidente la importancia del relevo talámico. El tálamo es el componente más grande del diencefalo, situado entre el tronco encefálico y los hemisferios cerebrales. La gran mayoría de los núcleos talámicos tienen múltiples conexiones recíprocas con la corteza cerebral.

El tálamo se divide en tres principales masas nucleares, la masa Anterior, la masa Medial y la masa Lateral. Cada uno de estos complejos celulares se subdivide en un número de núcleos nombrados individualmente.

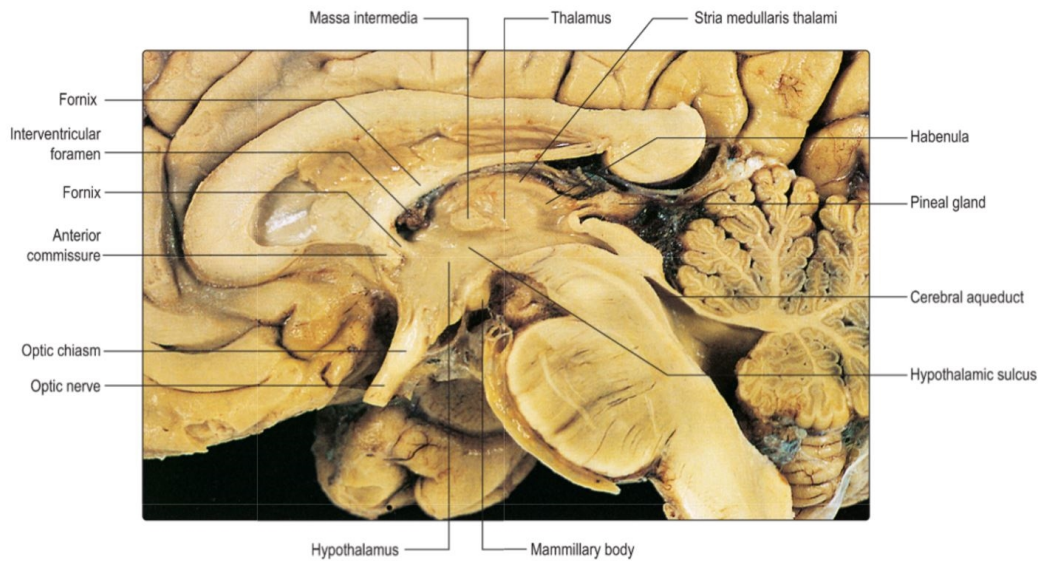


Figura 1.4.1.2.12: Sección sagital del cerebro que muestra las relaciones del diencefalo. Tomado de Crossman y Neary, 2014.

El núcleo que en este caso nos interesa es el Núcleo Ventral Posterolateral (VPL), que pertenece a la masa lateral. Es una extensa porción lateral que recibe información del tronco y de los miembros a través de los tractos espinotalámicos y del lemnisco medial; además, envía eferencias a la corteza somatosensorial primaria (Crossman and Neary, 2014).

El VPL es considerado históricamente el principal núcleo en el relevo talámico de la información somatosensorial, incluida la nociceptiva (Almeida et al., 2004; Westlund y Willis, 2015), procedente de todo el cuerpo, excepto la cabeza, que envía la información al núcleo talámico ventral posteromedial (VPM) (Warren et al, 2014b). El VPL, como hemos mencionado anteriormente, recibe la mayoría de sus aferencias nociceptivas de fibras del SAL aunque también recibe fibras de la vía postsináptica de la columna dorsal y del tracto espinocervicotálamico (Almeida et al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Warren et al, 2014b).

Recientemente se ha descrito en la parte más ventral, posterior y medial del VPL una pequeña zona la cual sería el principal destino de las fibras espinotalámicas procedentes de la lámina I de la médula espinal (Dostrovsky y Craig, 2013): la denominada parte posterior del núcleo ventromedial (VMpo). De hecho, cada vez más autores lo consideran un núcleo independiente del VLP, incluso incorporándolo al grupo posterior de núcleos del tálamo (Almeida et al., 2004).

Los núcleos talámicos intralaminares son, junto con el VPL, la otra clásica región talámica de relevo de la información dolorosa (Almeida et al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Dostrovsky y Craig, 2013; Warren et al, 2014b; Westlund y Willis, 2015; Valverde et al., 2015). De entre ellos destacan el centromediano (CM), el central lateral (CL) y el parafascicular (Pf). El núcleo CM es el núcleo intralaminar más grande en seres humanos. Los núcleos intralaminares reciben aferentes ascendentes de la formación reticular del tronco cerebral y también de los sistemas espinotalámico y trigeminotalámico. A su vez, reciben información espinotalámica indirecta a través de la vía paleoespinotalámica o espinorreticulotalámica; por otra parte, proyectan fibras a regiones extensas de la corteza cerebral y al núcleo caudado y putamen de los ganglios basales. Los núcleos intralaminares forman parte del mecanismo de activación de la corteza cerebral. Las lesiones de los núcleos intralaminares reducen la percepción del dolor y el nivel de conciencia (Basbaum y Jessell, 2013; Warren et al, 2014b; Crossman y Neary, 2014).

La región ventral y caudal del núcleo dorsomedial del tálamo (MDvc) es incluida por algunos autores, junto a los núcleos intralaminares, en el grupo medial o interno de núcleos del tálamo que reciben información nociceptiva (Almeida et al., 2004; Dostrovsky y Craig, 2013). Existen amplias conexiones recíprocas entre el núcleo MD del tálamo y la corteza prefrontal, su función se ha descrito clásicamente por ocuparse principalmente del control del estado de ánimo y de las emociones (Crossman y Neary, 2014).

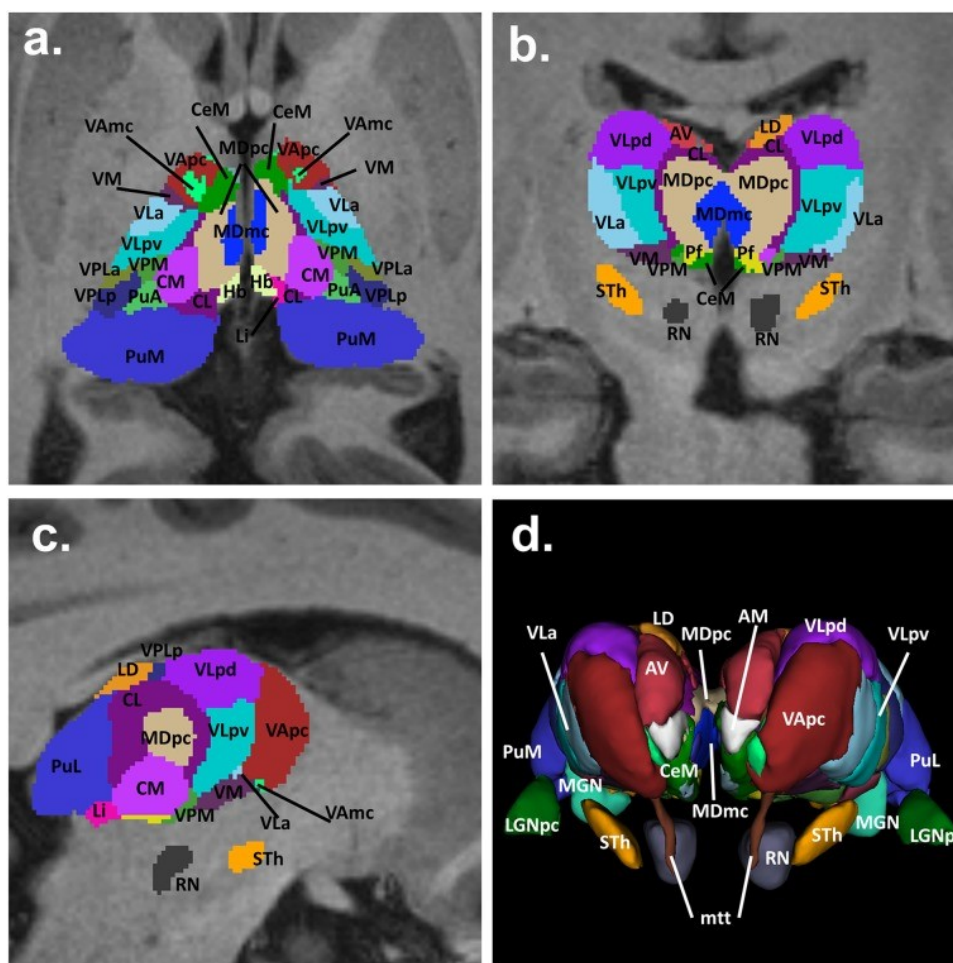


Figura 1.4.1.2.13: Segmentación del tálamo y núcleos. Tomado de Iacono et al., 2015.

En este mismo orden, pasaremos al último paso en la ascensión de la información nociceptiva. Las señales dolorosas procedentes del tálamo (fibras talamocorticales) alcanzan la corteza cerebral pasando por el brazo posterior de la cápsula interna.

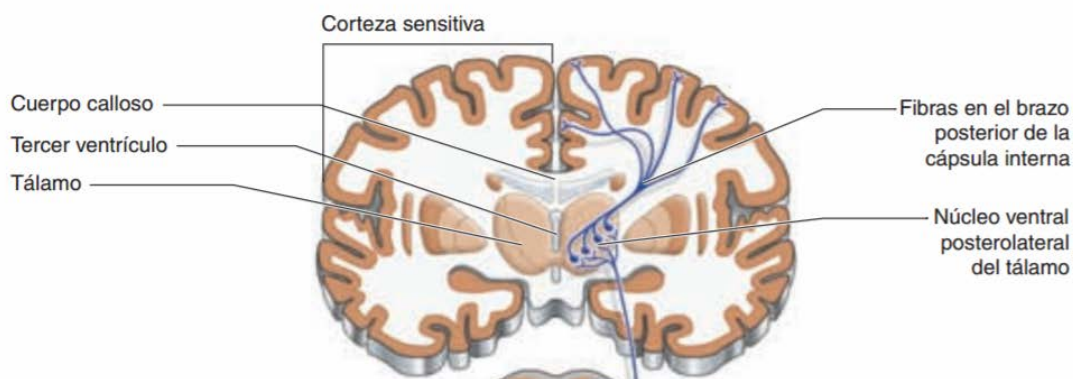


Figura 1.4.1.2.14: Relevé talámico en VPL y fibras talamocorticales ascendiendo por el brazo posterior de la cápsula interna. Tomado de Pró, 2012.

Las principales regiones corticales donde termina la información nociceptiva son (Almeida et al., 2004; Apkarian et al., 2013):

1) La corteza somatosensorial primaria o SI (áreas 3, 1 y 2 de Brodmann): Ocupa la circunvolución parietal ascendente o postcentral, recibiendo la mayoría de las proyecciones procedentes del núcleo ventral posterolateral del tálamo y presentando una organización somatotópica que conforma el homúnculo sensitivo.

2) La corteza somatosensorial secundaria o SII: Ocupa el labio superior de la cisura lateral o de Silvio, formando parte del opérculo frontoparietal. Recibe la mayor parte de las señales del área SI, aunque también recibe fibras directamente del tálamo. Por fuera se encuentra la corteza somatosensorial primaria y por dentro la corteza insular.

3) La corteza insular: Se sitúa en la zona más profunda de la cisura lateral y su porción más posterior está relacionada con los aspectos emocionales de la percepción del dolor. También recibe fibras directas del tálamo.

4) La corteza cingular anterior (área 24 de Brodmann): Se localiza en la cara medial de los hemisferios cerebrales, justo por encima de la parte anterior del cuerpo caloso. Recibe aferencias directas de los núcleos talámicos intralaminares y de la región ventral y caudal del núcleo dorsomedial del tálamo (MDvc). Participa en el

componente afectivo del dolor, en la selección de la respuesta motora adecuada y en los mecanismos de aprendizaje asociados con la predicción y la evitación del dolor.

1.4.1.3 Vías descendentes del dolor: Sistema de Control Endógeno de la Transmisión Nociceptiva

Es un hecho que, en el campo de la transmisión nociceptiva, existen unos circuitos centrales capaces de regular la percepción del dolor; esto ha sido uno de los descubrimientos más notables en la historia de la investigación del dolor.

Estos descubrimientos evidenciaron que el dolor no es simplemente el resultado directo de la actividad de las fibras aferentes nociceptivas, es decir, que el dolor no se percibe a través de una vía unidireccional, sino que está regulado por la actividad de otras estructuras no implicadas directamente en la transmisión de la información dolorosa. Las vías de modulación del dolor implican varias regiones del SNC, ya sea directa o indirectamente, las cuales ejercen influencia sobre la percepción del dolor al inhibir o facilitar la transmisión de impulsos nociceptivos a nivel del asta dorsal de la médula espinal.

Aunque desde principios del siglo XX ha habido autores que han postulado la existencia de influencias moduladoras del dolor, los primeros autores que articularon claramente un sistema específico de control del dolor fueron Melzack y Wall (1965), con su teoría de la puerta de control para el dolor (*Gate Control Theory*). Los autores postularon que este sistema debería estar bajo el control de un sistema descendente de fibras procedentes del tronco del encéfalo que sería sensible a factores ambientales (Melzack y Wall, 1965; Heinricher y Fields, 2013; Kwon et al., 2014).

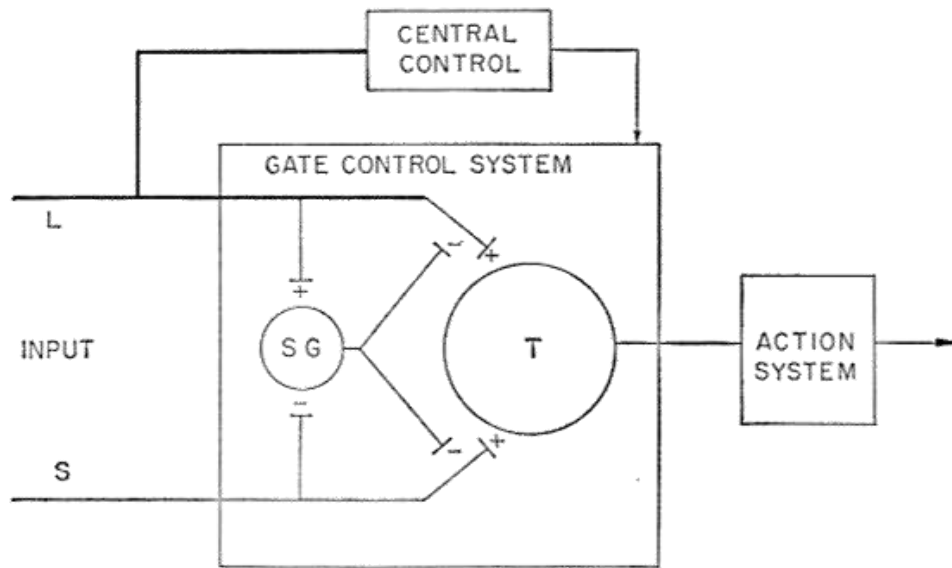


Figura 1.4.1.3.1: Esquema original publicado por Melzack y Wall en la revista Science en 1965 para ilustrar su teoría de la puerta de control del dolor. Tomado de Melzack y Wall, 1965.

Melzack y Wall desarrollaron la Teoría de la Compuerta del Dolor a raíz de una teoría del filósofo René Descartes en el siglo XVII; de hecho, el impacto de la teoría de Descartes marcó la historia de la experimentación de la anatomía y fisiología del dolor, pues estas investigaciones se centraron en la búsqueda de fibras y vías de dolor específicas y un centro clave de dolor en el cerebro (Melzack, 1996).



Figura 1.4.1.3.2: Imagen extraída del "Tratado del Hombre", publicada por René Descartes en 1664. Así esquematizaba su teoría de la sensación nociceptiva. Tomado de "Traité de l'homme", de René Descartes, 1664; y de su aparición en Melzack y Wall, 1965.

Sin embargo, las pruebas de la existencia de este sistema de analgesia endógeno no fueron presentadas hasta 1969, cuando Reynolds descubrió que la estimulación eléctrica de la sustancia gris periacueductal (PAG) de la rata producía una analgesia profunda (denominada SPA o analgesia producida por estimulación) sin afectar la respuesta al resto de estímulos medioambientales ni la actividad motora.

A partir de este punto, la investigación del dolor avanzó a grandes pasos, y por ello estudios posteriores a Reynolds permitieron a Basbaum y Fields (1984) establecer el primer circuito endógeno de control del dolor, en el que la sustancia gris periacueductal del mesencéfalo (PAG) era la estructura principal. La PAG enviaría proyecciones a núcleos serotoninérgicos de la porción rostral y ventromedial del bulbo raquídeo (RVM), como el núcleo del rafe magno. Finalmente, éstos y otros núcleos monoaminérgicos, como el locus coeruleus (LC), noradrenérgico, proyectarían sobre el asta posterior de la médula espinal, inhibiendo las neuronas de proyección nociceptiva.

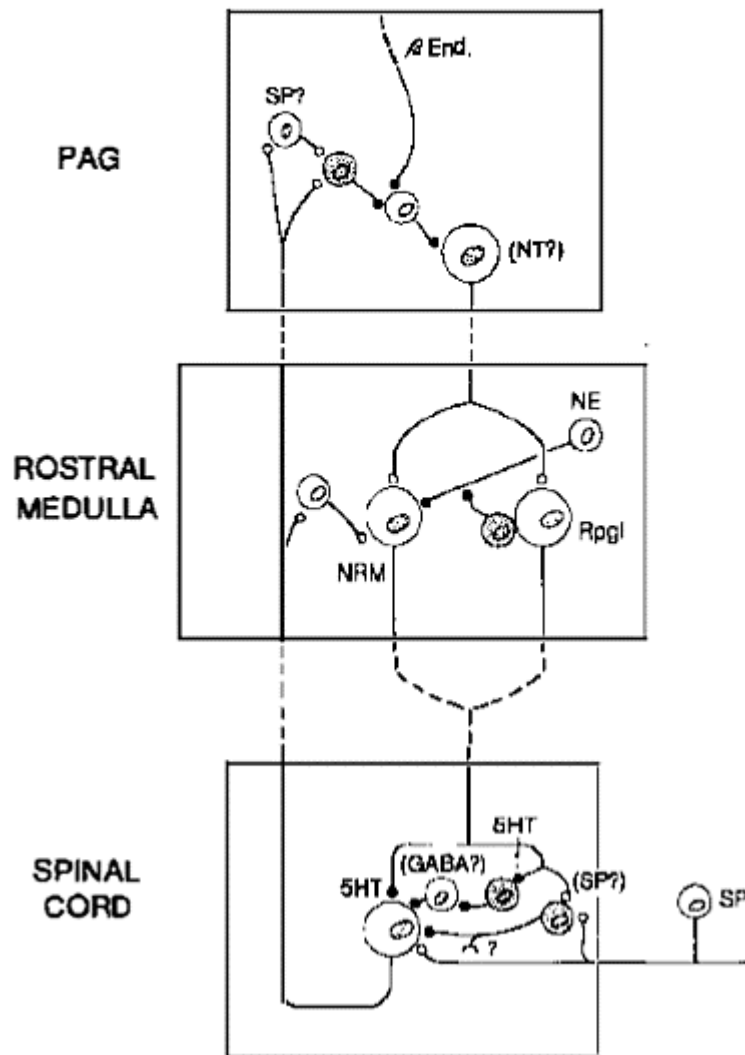


Figura 1.4.1.3.3: Esquema original publicado por Basbaum y Fields en 1984 para ilustrar su propuesta de circuito endógeno de control del dolor. Tomado de Basbaum y Fields, 1984.

Un gran número de estudios realizados a posteriori han confirmado el papel determinante de la PAG en el circuito endógeno de control del dolor; estos estudios realizados en animales de experimentación demuestran que, durante la estimulación de la PAG, los animales permanecen alerta y activos, sin cambios en la respuesta a la mayoría de estímulos ambientales, excepto al dolor, puesto que las respuestas esperadas ante los estímulos nociceptivos desaparecen. El descubrimiento del papel en la modulación del dolor de la PAG ha sido un avance decisivo para el entendimiento de los mecanismos cerebrales de procesamiento del dolor (Heinricher y Fields, 2013).

Del mismo modo, se ha demostrado que la estimulación del bulbo rostral ventromedial (Rostral ventromedial medulla, RVM, en inglés) también produce analgesia, por ello se considera que RVM, junto con PAG, están implicados en el control del dolor endógeno a través de la vía descendente inhibidora del dolor PAG-RVM-DH; asimismo, también hay evidencias de que RVM está involucrado en la facilitación descendente de la transmisión nociceptiva (Kwon et al., 2014).

Mientras que las proyecciones eferentes más numerosas de la PAG son sobre RVM, las principales eferencias de RVM se dirigen hacia la médula espinal. Teniendo en cuenta que las proyecciones directas de la PAG a la médula espinal son mínimas, la influencia de la PAG sobre la médula espinal requiere de al menos un relevo en RVM. Asimismo, PAG recibe inputs del córtex frontal y de la corteza insular, amígdala e hipotálamo (Mantyh, 1982; Westlund y Willis, 2015).

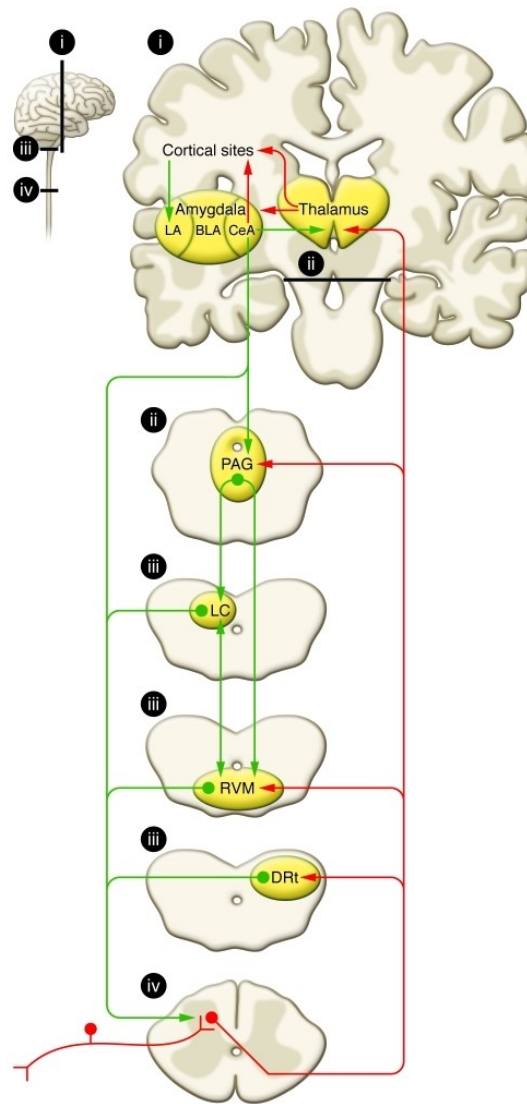


Figura 1.4.1.3.4: Representación simplificada de las vías ascendentes del dolor (rojo) y del sistema PAG-RVM-DH (verde). Tomado de Ossipov et al., 2010.

Este sistema PAG-RVM-DH de la médula espinal es sensible a los opiáceos tanto endógenos como exógenos: esto quiere decir que la aplicación directa de opiáceos tanto en PAG como en RVM o en el asta posterior de la médula espinal produce analgesia. Pero, dada la acción inhibitoria a nivel neuronal de los opiáceos, los resultados parecen incongruentes con los que indican que la estimulación del circuito descendente PAG-RVM es la que produce la analgesia. Esta aparente contradicción propició que incluso Basbaum y Fields (1984) en su circuito de control endógeno del dolor introdujeran la hipótesis de la analgesia por desinhibición gabaérgica: los

opioides activarían el circuito descendente PAG-RVM indirectamente, suprimiendo el efecto inhibitorio de las interneuronas gabaérgicas locales, y de esta forma desinhibiendo el impulso antinociceptivo de las neuronas que proyectan hasta la médula espinal (Lau y Vaughan, 2014).

Recientemente, esta hipótesis ha sido adaptada para incluir junto a los opioides también a los cannabinoides (Escobar et al., 2012; Lau y Vaughan, 2014).

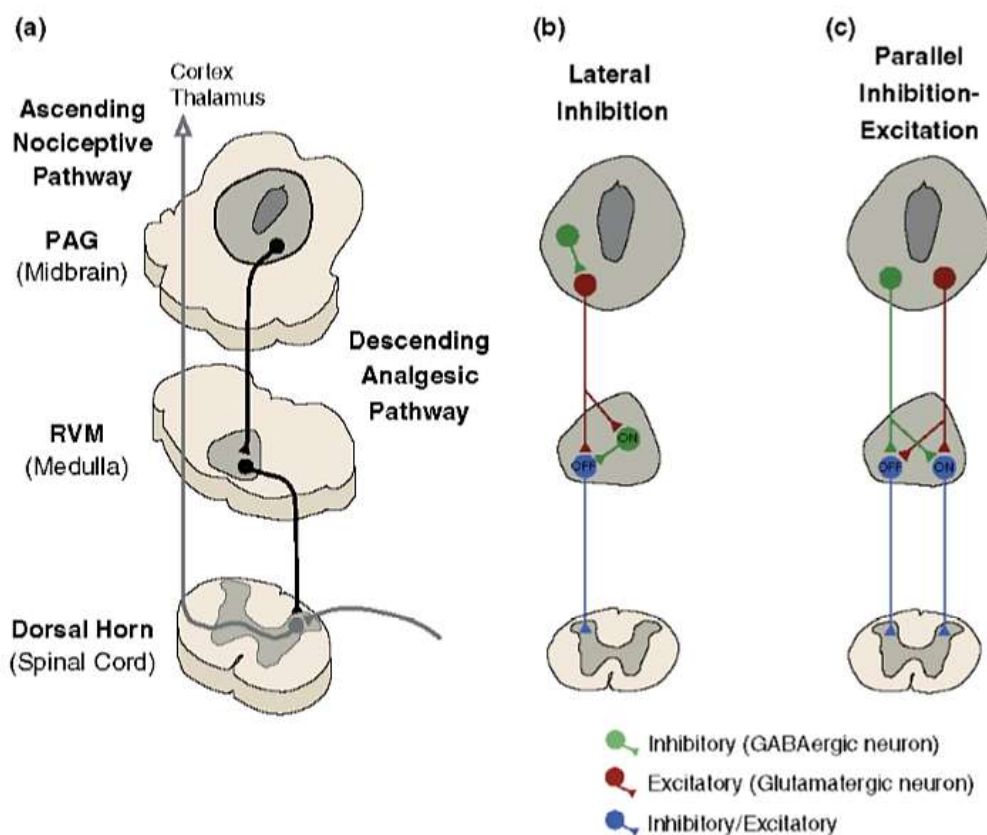


Figura 1.4.1.3.5: Esquema que ilustra la hipótesis de la analgesia por desinhibición gabaérgica. Tomado de Lau y Vaughan, 2014.

Hoy en día, cuando se habla de las vías descendentes del dolor, siempre se dice que esta modulación del dolor está mediada en gran medida a través de las vías descendentes monoaminérgicas, cuyos principales neurotransmisores serían la noradrenalina (norepinefrina), la dopamina y la serotonina. Como prueba de ello, cabe destacar que el 20% del total de neuronas de la RVM son serotoninérgicas. Su estimulación eléctrica, que recordemos produce analgesia, provoca una importante

liberación de serotonina en la médula espinal. Asimismo, la aplicación directa de serotonina en la médula espinal inhibe la transmisión nociceptiva. Todo ello apunta a que la serotonina, al igual que los opioides, juega un papel importante en el circuito endógeno de control del dolor. El principal núcleo serotoninérgico de la RVM es el núcleo del rafe magno (Heinricher y Fields, 2013).

Recientemente, se ha demostrado la participación en el circuito de control del dolor de otros núcleos serotoninérgicos como el núcleo del rafe dorsal (DR). Éste, sin embargo, apenas proyecta sobre la médula espinal por lo que su influencia sobre la nocicepción es indirecta, mediada por otras regiones del tronco del encéfalo hacia las cuales sí proyecta el DR, y que a su vez envían abundantes proyecciones a la médula espinal, como son el propio núcleo del rafe magno y el locus coeruleus (LC); por otra parte, también cabe destacar que un 10% de las proyecciones del DR están destinadas a la amígdala (Ma et al., 1991; Westlund y Willis, 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, la noradrenalina también ha demostrado jugar un papel importante en el control del dolor (Pertovaara, 2006; 2013), como ya apuntaron Basbaum y Fields en su propuesta original (Basbaum y Fields, 1984).

El 80% de la noradrenalina que se libera en la médula espinal procede del locus coeruleus (LC), que corresponde al área A6. El LC es el núcleo noradrenérgico más importante del tronco del encéfalo, y desde hace ya más de una década se le atribuye un papel fundamental en el control descendente del dolor (Pertovaara, 2006). Son abundantes los trabajos que destacan que la estimulación directa del LC produce un efecto antinociceptivo a nivel medular, mediado por receptores adrenérgicos alfa-2; de hecho, numerosos estudios indican que el circuito PAG-RVM produce su efecto antinociceptivo, al menos en parte, por la activación del sistema noradrenérgico descendente (Pertovaara, 2013; Westlund y Willis, 2015).

Actualmente, el sistema noradrenérgico descendente se ha convertido en uno de los circuitos más relevantes en el control del dolor, suscitando el interés de una gran parte de los investigadores y convirtiéndose en una de las principales dianas potenciales para el tratamiento del dolor (Pertovaara, 2013; Schünke et al., 2015).

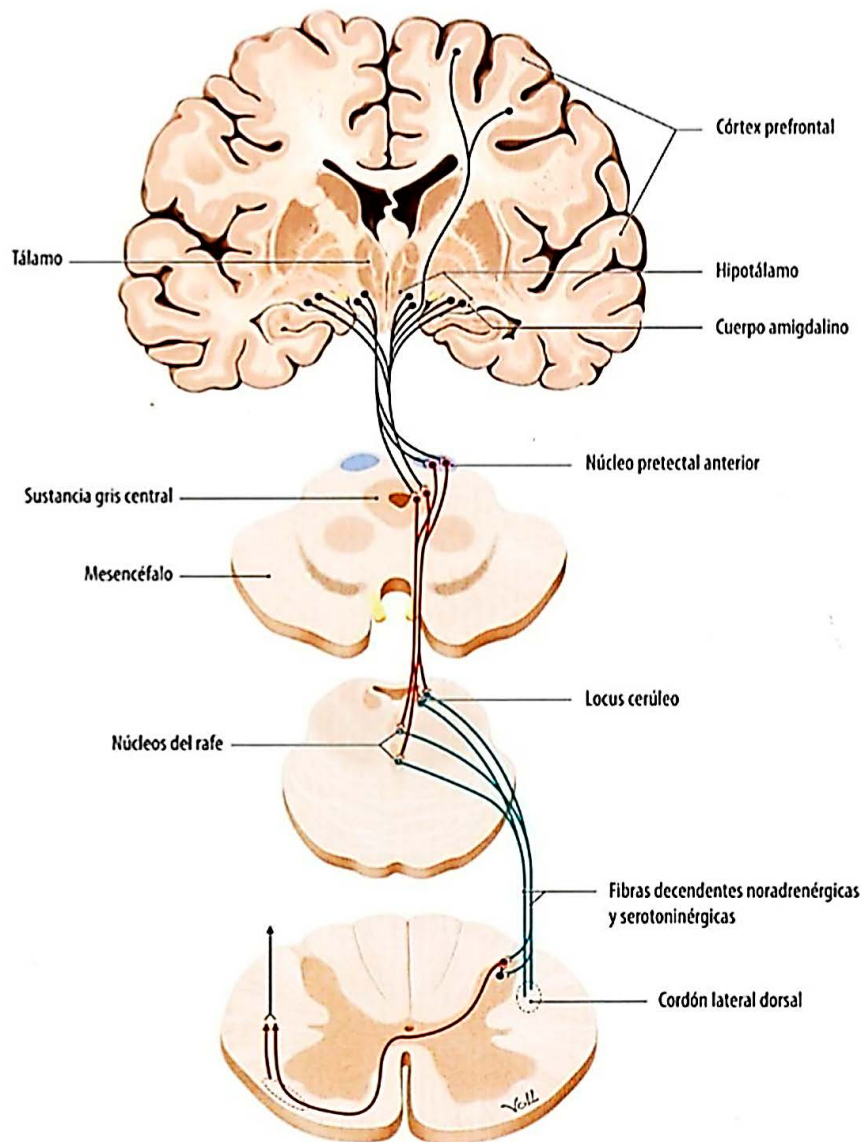


Figura 1.4.1.3.62: Esquema del circuito de control descendente del dolor, donde se puede observar como las principales aferencias a la médula espinal son monoaminérgicas (serotoninérgicas y noradrenérgicas). Tomado de Schünke et al., 2015.

1.4.1.4 Alteraciones del procesamiento del dolor en el síndrome de fibromialgia

El dolor crónico generalizado es la característica predominante del FMS; además, éste ejerce un impacto considerable en las AVD y en la calidad de vida de los pacientes, que a menudo informan de limitaciones funcionales similares a las reportadas por personas

con osteoartritis o artritis reumatoide (Hawley y Wolfe, 1991; Costa et al., 2017). Aun así, durante años las personas con dolor por FMS han sido cuestionadas, negada su condición de enfermos, e incluso criticadas. La principal razón de esta reacción de profesionales de la salud, familia y amigos ha sido que, en muchas ocasiones, se ha considerado que la única sintomatología de estos pacientes era el dolor crónico generalizado. El dolor es común en la población general, en casi cualquier edad, por lo que las personas que se quejan con frecuencia de dolor son consideradas indebidamente “sensibleras” o “adictas a los medicamentos o hipocondríacos”. Aparte de las razones sociológicas de estas descalificaciones, bien es verdad que la ciencia médica nunca ha dispuesto de un instrumento que pudiera documentar u objetivar la severidad del dolor experimentado. El dolor del FMS ha sido, es, y probablemente siempre será, un fenómeno subjetivo sujeto a diferentes experiencias sobre el propio dolor y el sufrimiento. A pesar de todo ello, el empeño de los investigadores por entender el FMS ha contribuido de forma singular a la comprensión científica del procesamiento del dolor en general (Russell, 2013).

El dolor del FMS es variable, su localización y su intensidad cambian a lo largo del tiempo y durante el transcurso de la enfermedad; además, no hay pruebas ni signos o síntomas específicos o patognomónicos del FMS. De hecho, como se ha mencionado anteriormente, el FMS ha llegado tanto a ser negado como incluso a ser calificado como “la medicalización de la miseria” por Hadler en un representativo editorial en *The Journal of Rheumatology* (2003), que puede servir de ejemplo de la controversia que ha acompañado a este síndrome doloroso a lo largo de los años.

En la actualidad, sin embargo, tras el nuevo aval en 2010 del *American College of Rheumatology* a la revisión y la actualización de los criterios diagnósticos de FMS (Wolfe et al., 2011; Wolfe et al., 2010), existen cada vez menos dudas de que el FMS es uno de los trastornos con dolor crónico generalizado más común. Evidencias procedentes tanto de estudios preclínicos como de estudios clínicos apuntan a que este dolor crónico generalizado del FMS es de origen neurogénico: El dolor parece el resultado de un desequilibrio neuroquímico a nivel, principalmente, del sistema nervioso central, que conduce a un procesamiento anormal del dolor, caracterizado por alodinia e hiperalgesia (Clauw et al., 2011; Petersel et al, 2011).

La hiperalgesia y cierto grado de alodinia son síntomas frecuentes de enfermedad y pueden ser útiles adaptaciones para una mejor protección de tejidos vulnerables. El término alodinia se introdujo originalmente para diferenciar esta sensación tanto de la hiperalgesia como de la hiperestesia, y se refiere a las condiciones que se observan en pacientes con lesiones del sistema nervioso donde el tacto, la presión ligera o el frío moderado / calor evocan dolor cuando se aplican a la piel aparentemente normal. Por otra parte, la hiperalgesia representa una exacerbación de la sensación de dolor ante un estímulo molesto/mínimamente doloroso (Sandkühler, 2009; Merskey y Bogduk, 2012).

El aumento de la sensibilidad al dolor puede, sin embargo, persistir mucho después de que la causa inicial del dolor haya desaparecido. En ese caso, el dolor ya no es un síntoma, sino que se convierte en una enfermedad en sí mismo. Los cambios en el procesamiento de las señales dolorosas por parte del sistema nervioso pueden contribuir, o incluso llegar a ser la única causa, de la aparición de hiperalgesia y de alodinia.

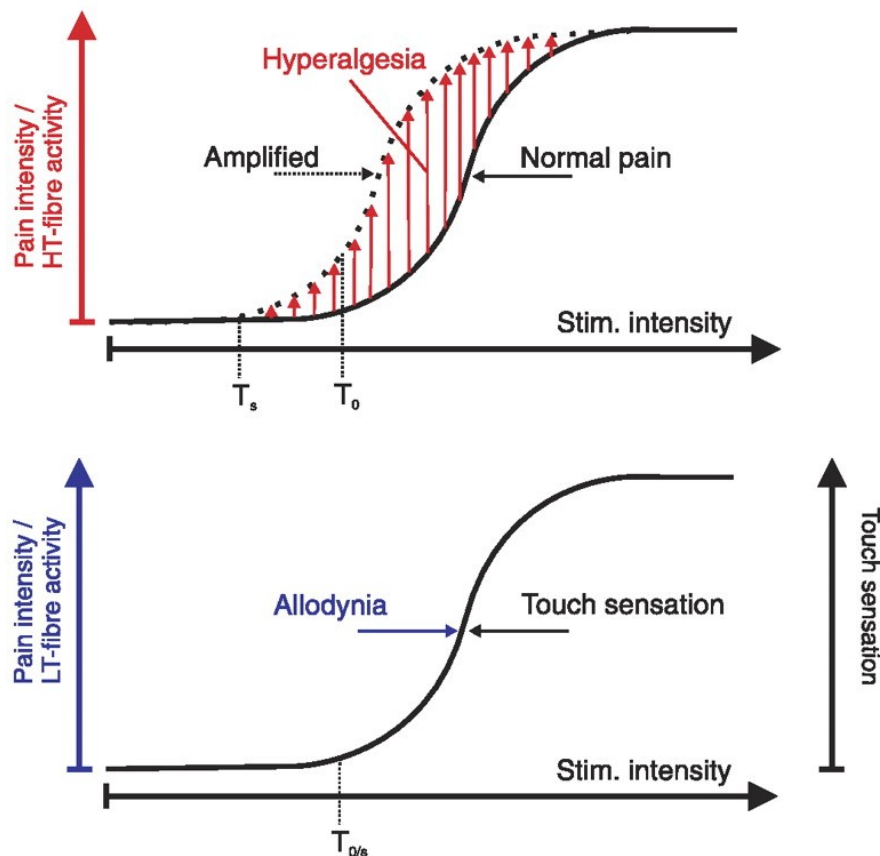


Figura 1.4.1.4.1: Representación gráfica de las definiciones actualizadas de alodinia e hiperalgesia introducidas en 2008 por el grupo de trabajo de la IASP. Tomado de Sandküler, 2009.

Durante los últimos años, gran parte del estudio del dolor en FMS se han centrado en el apoyo de la teoría que postula que el proceso que subyace tras el procesamiento anormal del dolor en este síndrome es la amplificación central de la percepción del dolor (Petersel et al., 2011).

La amplificación central del dolor (también llamada sensibilización central) supone una disfunción en el procesamiento central de dolor. El origen de este proceso de amplificación del dolor no se conoce completamente, pero sí es cierto que es multifactorial. Es probable que participen factores periféricos, pero las investigaciones actuales sugieren un componente central preeminente, en gran medida independiente de la entrada nociceptiva periférica (Clauw et al., 2011).

En el procesamiento normal del dolor, la percepción del dolor depende del correcto funcionamiento no sólo de la vía ascendente del dolor, sino también de la descendente. En los pacientes con FMS, ambas vías del dolor funcionan

anormalmente: se produce un incremento de la excitabilidad de las neuronas centrales que forman parte de la vía ascendente del dolor y una reducción de los mecanismos inhibitorios del dolor en las vías descendentes. Estudios sobre el umbral de dolor muestran que los pacientes con FMS perciben el dolor a umbrales más bajos que los controles sanos. En esta línea, recientes estudios de neuroimagen han contribuido en gran medida a la comprensión de los cambios funcionales y morfológicos de las estructuras cerebrales involucrados en los sistemas de dolor en FMS. Estos estudios se han impuesto en la investigación en humanos para observar posibles cambios morfológicos que den lugar a este fenómeno de amplificación central; de hecho, han demostrado que el flujo sanguíneo cerebral en los pacientes con FMS se incrementa en las áreas cerebrales asociadas al procesamiento del dolor ante menores presiones nociceptivas que en los controles sanos. Sin embargo, de entre todos ellos cabe destacar un estudio del 2002 del grupo de Gracely, el cual mediante resonancia magnética funcional (fMRI) demostró de forma sólida que, en respuesta a los estímulos dolorosos, los pacientes con FMS han aumentado la activación neuronal en las regiones cerebrales relacionadas con el dolor, incluyendo la corteza somatosensorial primaria y secundaria, la ínsula y la corteza cingulada anterior (Gracely et al., 2002; Clauw et al., 2011; Petersel et al., 2011 ; Chinn et al., 2016). Además de los estudios de neuroimagen, se han utilizado diversas herramientas electrofisiológicas como el reflejo de flexión nociceptivo y la estimulación magnética transcraneal para examinar el procesamiento central del dolor en pacientes con FMS. De esta última técnica, estudios recientes han reportado la existencia de una disminución de la inhibición intracortical en pacientes con FMS, lo que sugiere la presencia de deficiencias en los mecanismos inhibidores centrales, lo que apoya completamente esta teoría de amplificación central (Schwenkreis et al., 2011; Baek et al., 2016). Además, los pacientes de FMS muestran cambios en los niveles de neurotransmisores y receptores asociados con un aumento de la señalización ascendente (pro-nociceptiva) y una disminución de la señalización descendente (antinociceptiva) (Petersel et al., 2011).

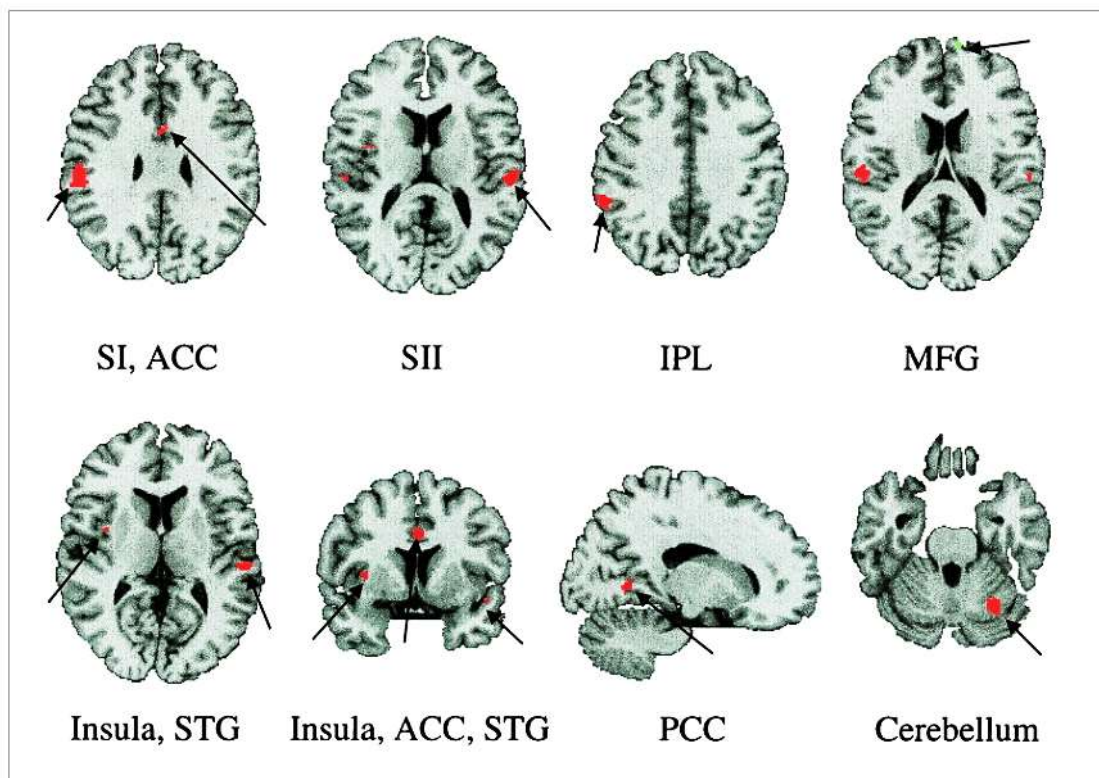


Figura 1.4.1.4.1: Resonancia Magnética funcional (fMRI) que compara las respuestas de estímulos nociceptivos de pacientes FMS y pacientes control. Las regiones en las que la respuesta en los pacientes de FMS es significativamente mayor que la respuesta en los pacientes control se muestra en rojo.

Tomado de Gracely et al., 2002.

En cuanto a las alteraciones en las vías ascendentes dentro de la teoría de la sensibilización central, el aumento de los niveles en el líquido cefalorraquídeo de neurotransmisores que generalmente actúan incrementando el impulso ascendente, indican una mayor señalización ascendente, la cual es pronociceptiva. Estos neurotransmisores pronociceptivos, entre los que se incluyen la sustancia P, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), se hallan en niveles más altos (que llegan a ser el doble o del triple) en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con FMS que en los controles sanos (Chinn et al., 2016; Clauw et al., 2011; Giovengo et al., 1999; Laske et al., 2007; Petersel et al., 2011). Asimismo, los niveles de glutamato y otros aminoácidos excitadores han demostrado ser elevados tanto en el LCR como en el cerebro de pacientes de FMS. El glutamato actúa sobre los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) produciendo un

aumento del dolor por el fenómeno de potenciación o “wind up”, un fenómeno por el que después de repetidas estimulaciones dolorosas se produce un aumento progresivo de la amplificación central del dolor, lo que provoca mayor hiperalgesia y alodinia (Clauw et al., 2011; Petersel et al., 2011; Yunus, 2007).

Por otra parte, en los pacientes con FMS, la actividad de las vías descendentes antinociceptivas se muestra reducida. Una de las vías inhibitorias descendentes se origina en el núcleo del rafe magno y otros núcleos adyacentes de la porción rostral y ventromedial del bulbo raquídeo (RVM), como hemos podido comprobar en apartados anteriores. Son núcleos serotoninérgicos que hacen sinapsis en la médula espinal para inhibir la transmisión dolorosa en el asta dorsal. Una segunda vía se origina en el locus coeruleus o área A6, situado en el tegmento posterior dorsolateral del tronco del encéfalo. Es el principal núcleo noradrenérgico. Sus neuronas también envían señales inhibitorias al asta posterior de la médula espinal. El análisis del líquido cefalorraquídeo de pacientes con FMS ha encontrado de forma consistente una disminución en los niveles de los metabolitos de la serotonina y la noradrenalina (Russell et al., 1992; Legangneux et al., 2001; Clauw et al., 2011; Chinn et al., 2016; Baek et al., 2016).

En conclusión, el anormal comportamiento de los circuitos encargados del procesamiento del dolor en los pacientes con FMS es debido a distintos factores, entre los que figuran algunas contribuciones dependientes de mecanismos periféricos, pero fundamentalmente a un mecanismo de amplificación central del dolor, en el que se produce una combinación de aumento de la facilitación del dolor y disminución de la inhibición del mismo. Así pues, tanto los estudios de fMRI, como los de estimulación magnética transcraneal y los estudios bioquímicos del líquido cefalorraquídeo en humanos apoyan la hipótesis de la amplificación del dolor central en FMS. Aunque la fisiopatología del FMS aún no está completamente dilucidada, ya son muchos los estudios que apoyan la teoría que considera a la sensibilización central la principal patogénesis del FMS.

1.4.2 Principal sintomatología comórbida: Síntomas depresivos

Como hemos podido observar anteriormente, el FMS es un síndrome caracterizado por la presencia de dolor generalizado e hipersensibilidad no motivada por alteraciones periféricas. Así pues, el FMS se presenta con una serie de síntomas comórbidos que repercuten severamente en la calidad de vida de las personas, convirtiéndola en una patología altamente incapacitante (Bellato et al., 2012; Wolfe et al., 2013; Russell, 2013).

De entre ellos, vamos a centrarnos en uno de los principales síntomas presentes y más preocupantes en el FMS, los síntomas depresivos, haciendo hincapié en sus bases anatómicas y fisiológicas, las cuales podrían explicar la elevada prevalencia en la que se presenta en el FMS y sus características e impacto sobre la calidad de vida de los pacientes.

Se han desarrollado a lo largo de las últimas décadas diferentes teorías explicativas sobre la depresión desde distintas corrientes psicológicas, entre las que destacan la teoría conductista de la disminución del refuerzo positivo o las teorías cognitivas de la indefensión aprendida. Los modelos conductuales sugieren que la depresión es fundamentalmente un fenómeno aprendido relacionado con las interacciones negativas y su entorno. Por otro lado, las teorías cognitivas consideran que la interpretación del sujeto sobre un suceso es más importante que el suceso en sí mismo. De esta forma, la percepción errónea de uno mismo, de los otros o de los sucesos puede dar lugar a un trastorno depresivo (Akiskal y McKinney, 1973; Nestler et al., 2002).

Los trastornos depresivos son una de las alteraciones mentales más comunes, y las estimaciones muestran que, para el año 2020, serán el segundo factor más importante en el deterioro de la salud global (Reddy, 2012). Los desórdenes depresivos han sido descritos desde el principio de la historia escrita de la humanidad. El primero en describirlos fue Hipócrates, alrededor del 400 a.C., mediante el término “melancolía” (que significa *bilis negra* en griego). Algunos autores, entre los que destacan Aristóteles y Galeno, también hicieron referencia a la melancolía. Este término comprende la teorización de los estados humorales, e incluye descripciones detalladas de los sujetos de estudio. Aunque la medicina humoral tan sólo conserva interés

histórico, sus descripciones de los signos y síntomas de personas con “melancolía” han tenido una importancia considerable en el desarrollo de la investigación de los trastornos depresivos en psicología, psicobiología y neurociencia; de hecho, la definición actual de depresión comparte con la definición de melancolía cinco similitudes fundamentales: tristeza, desaliento, temor, ansiedad y aprehensión (Radden, 2003). No fue hasta la mitad del siglo XIX que el cerebro se convirtió en el foco de los esfuerzos para comprender la fisiopatología de este trastorno (Akiskal y McKinney, 1973; Nestler et al., 2002).

1.4.2.1 Bases anatómicas y fisiológicas de los síntomas depresivos

Tradicionalmente se ha pensado que los estados de ánimo como la depresión estaban asociados únicamente al sistema límbico; no obstante, hoy existe abundante evidencia de que también participan estructuras no límbicas. Las bases anatómicas y fisiológicas de la depresión son objeto de activa investigación de la que se puede concluir que las áreas más probablemente involucradas son las estructuras límbicas (córtex cingulado, hipocampo, cuerpos mamilares y tálamo anterior), los circuitos de recompensa (núcleo accumbens, sublenticular, amígdala, tegmento ventral, ínsula, tálamo, giro parahipocámpico y corteza prefrontal), el hipotálamo y la corteza temporal anterior (Hanff et al., 2010; Kalia, 2005; Nestler et al., 2002).

La dinámica afectiva humana es un proceso muy complejo que implica la acción de varios agentes electroquímicos cerebrales, pero también factores psicosociales. Los trastornos afectivos son fenómenos conscientes impulsados por la acción de la neuromodulación (Wang and Pereira Jr., 2016).

La neuromodulación se concibe como un proceso regulador que actúa sobre el equilibrio de la excitación y la inhibición en todo el SNC. Este equilibrio se genera principalmente por la combinación de liberación y acción de Glutamato (Glu) y de ácido γ -aminobutírico (GABA). Los principales neuromoduladores son la Acetilcolina (ACH) y las monoaminas, de las que ya hemos hablado con anterioridad y de las que hablaremos más adelante en profundidad: Dopamina (DA), Serotonina: 5-hidroxitriptamina (5-HT) y Norepinefrina o Noradrenalina (NE/NA) (Wang and Pereira Jr., 2016).

Durante la segunda mitad del siglo XX se realizaron numerosos avances en el estudio de las bases neurobiológicas y químicas de la depresión. Por un lado, se encontró que los fármacos que causan depleción de monoaminas cerebrales (por ejemplo, la reserpina antihipertensiva) producían depresión en pacientes sin antecedentes psiquiátricos. Por otro lado, se observó que los agentes que alteran el metabolismo de las monoaminas, como los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO) y los fármacos tricíclicos, aliviaban los síntomas depresivos. Estos hechos llevaron a principios de los años sesenta del siglo pasado a sugerir de la hipótesis monoaminérgica de la depresión (Akiskal y McKinney, 1973; Elhwuegi, 2004; Kalia, 2005; Nestler et al., 2002).

La hipótesis monoaminérgica de la depresión ha aumentado los conocimientos tanto de la fisiopatología de la depresión como de la acción de los tratamientos farmacológicos antidepresivos en las últimas décadas, lo cual ha conducido a la producción de varias generaciones de agentes antidepresivos (Massart et al., 2012). La hipótesis monoaminérgica de la depresión defiende que su origen neurobiológico está relacionado con una disminución de las monoaminas en el sistema nervioso central. Esta hipótesis de la depresión ha sido cuestionada por algunos autores como excesivamente simplista en la descripción de su patología, puesto que en la patogénesis de los trastornos de la conducta también se han descrito disfunciones del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA), así como alteraciones neurodegenerativas e inflamatorias. Sin embargo, la evidencia creciente muestra una fuerte relación entre la desregulación de las vías neurales de aminas biogénicas y el desarrollo de trastornos del estado de ánimo, no exclusivamente por la falta de neurotransmisores, sino debido a disfunciones complejas derivadas de estas carencias (Akiskal y McKinney, 1973; Elhwuegi, 2004; Fuchs y Flugge, 2004; Hamon y Blier, 2013; Hanff et al., 2010; Nestler et al., 2002).

Las vías de los sistemas monoaminérgicos se proyectan desde el tronco encefálico hacia diferentes áreas cerebrales y médula espinal, e incluyen neuronas dopaminérgicas, localizadas en el Área Ventral Tegmental (VTA) y la pars compacta de la Sustancia Negra (SNc), neuronas noradrenérgicas procedentes del locus coeruleus (LC), y neuronas serotoninérgicas, procedentes de los núcleos medio (MRN) y dorsal del rafe (DR). Como hemos mencionado anteriormente, puede observarse que estos

núcleos también tienen un papel muy importante en las vías descendentes de regulación del dolor (Hale and Lowry, 2011; Di Giovanni et al., 2016).

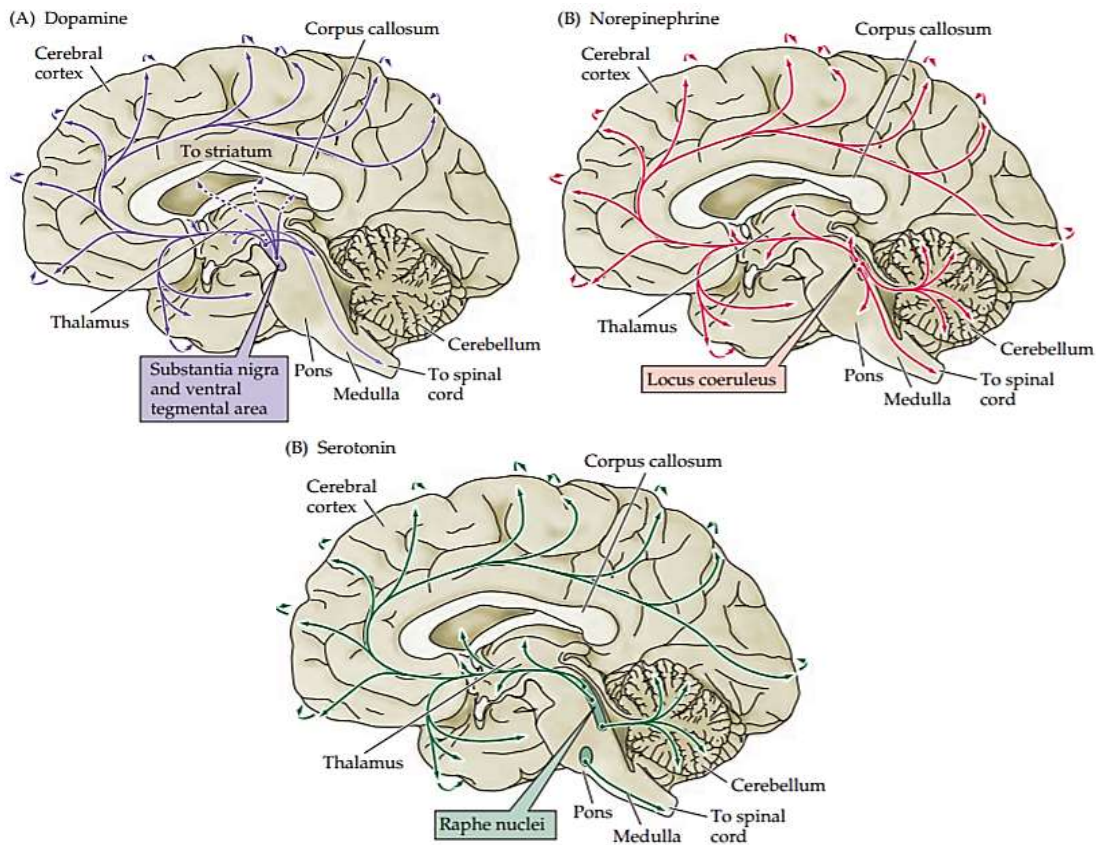


Figura 1.4.2.1: Distribución en el cerebro humano de las neuronas monoaminérgicas DA, NE y 5-HT y sus proyecciones. Tomado de Haines, 2013.

Como se puede apreciar en la figura 1.4.2.1, las neuronas serotoninérgicas procedentes principalmente de los núcleos del rafe dorsal y del rafe magno proyectan a los núcleos caudado, putamen, globo pálido, amígdala, cerebro anterior y neocorteza límbica. El locus coeruleus, principal productor de noradrenalina, proyecta sus axones al tegmento lateral del tronco cerebral, el hipocampo, amígdala, corteza entorrinal, el tálamo y corteza cerebral. El área tegmental ventral (VTA) proyecta sus eferencias dopaminérgicas principalmente al núcleo accumbens y a la corteza prefrontal, estructuras implicadas en el sistema de refuerzo (Akiskal y McKinney, 1973; Elhwuegi,

2004; Fuchs y Flugge, 2004; Hamon y Blier, 2013; Hanff et al., 2010; Nestler et al., 2002).

1.4.2.2 Alteraciones depresivas en pacientes con síndrome de fibromialgia

La depresión es la comorbilidad psiquiátrica más frecuente en pacientes con FMS, con tasas de prevalencia que van desde 20% a 80%. De los pacientes con FMS que no han sido diagnosticados formalmente de depresión mayor, un 40% presenta síntomas depresivos, es decir, cumplen con algunos síntomas característicos de la enfermedad, pero no cumplen por completo los criterios para su diagnóstico (Aguglia et al., 2011; Buskila y Cohen, 2007; Fietta et al., 2007; Russell, 2013).

Estudios realizados durante los últimos 20 años han demostrado que la depresión en FMS representa un impacto severo en la calidad de vida de los pacientes, los cuales obtienen una puntuación muy baja en el *Test de calidad de vida relacionada con la salud* (Health-related quality of life Test, HRQoL), con medias muy bajas en cada una de sus encuestas (más específicamente, en el *medical outcome study 36-short-form health survey*, o MOS-SF-36). Esta disminución de las medias, así como el radio de comorbilidad con un desorden psiquiátrico, son significativos en comparación con pacientes con enfermedades crónicas tan severas como enfermedad obstructiva pulmonar crónica (EPOC), artritis reumatoide o incluso síndrome de Sjörge. Los estudios que han realizado encuestas HRQoL exponen que los trastornos depresivos en fibromialgia están relacionados con un aumento de los trastornos funcionales, sentimiento de baja energía, menos interés en actividades de ocio, menor motivación y problemas en las relaciones interpersonales (Sherbourne et al., 1994; Kurtze et al., 1999; Pagano et al., 2004; Consoli et al., 2012).

El síndrome de depresión mayor (MDD), según el *DSM-V (Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5ª edición)*, comparte con el FMS alguna sintomatología, como la presencia de fatiga o alteraciones del sueño. Esto dificulta el diagnóstico de depresión en los pacientes con FMS, lo que hace necesario un buen diagnóstico diferencial (Veltri et al., 2012); por otra parte, estas similitudes nos incitan a pensar que estas dos patologías comparten ciertas vías neurales en su etiopatogenia (Aguglia et al., 2011; Alciati et al., 2012; Bernik et al., 2013; Goldenberg, 2010).

La interrelación entre el FMS y los estados de ánimo depresivos es retroalimentativa: En efecto, las personas con FMS, debido al dolor generalizado, la fatiga o los problemas de sueño, sufren un malestar generalizado y dificultades para realizar las actividades de la vida diaria, lo que afecta a su calidad de vida y a sus relaciones sociales, lo que repercute en su estado de ánimo (Jensen et al., 2010; Pae et al., 2008; Soriano-Maldonado et al., 2015; Torta et al., 2014). Por otro lado, las dificultades observadas en los tests HRQoL, como una mayor atención hacia sus síntomas de dolor, pensamientos negativos hacia la enfermedad y los estados de alerta y estrés mantenidos, etc., repercuten en una disminución de los umbrales de dolor (Consoli et al., 2012; de Souza et al., 2014; Gota et al., 2015).

Las alteraciones monoaminérgicas podrían explicar la elevada prevalencia en que el dolor y la depresión coexisten (Agüera-Ortiz et al., 2011; Arora et al., 2011; Ohayon, 2009). Anteriormente hemos expuesto los diversos estudios que han demostrado una disminución de monoaminas centrales (dopamina, serotonina y noradrenalina) en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con FMS (Legangneux et al., 2001; Russell et al., 1992). Esta disminución de monoaminas en los pacientes con FMS podría estar provocando, por una parte, la supresión de las vías descendentes inhibitorias del dolor y el aumento de las vías facilitadoras ascendentes (en otras palabras, el fenómeno de sensibilización y amplificación central), lo cual sería responsable del dolor muscular generalizado característicos de estos pacientes (Becker y Schweinhardt, 2012; DeSantana y Sluka, 2012; Meeus y Nijs, 2006; Petersel et al., 2011; Yunus, 2007), y, por otra parte, justificaría en estos pacientes la aparición de síntomas depresivos (Akiskal y McKinney, 1973; Elhwuegi, 2004; Hamon y Blier, 2013).

1.5 Etiopatogenia del síndrome de fibromialgia: Principales hipótesis

La etiopatogenia del FMS sigue siendo desconocida en la actualidad (Branco et al., 2009; Bellato et al., 2012; Chinn et al., 2016), lo que dificulta, entre otros, el establecimiento de tratamientos específicos satisfactorios. Uno de los principales problemas que se presenta en el estudio de la etiopatogenia del FMS es la interrelación que existe entre sus principales síntomas (la privación de sueño no REM en personas sanas provoca clínica dolorosa, el dolor crónico puede provocar sintomatología ansiosa y depresiva, y a su vez estos pacientes suelen presentar

somatizaciones sobre el aparato locomotor...). La interrelación de estos factores dificulta todavía más crear relaciones de causalidad entre ellos y establecer un origen (Villanueva y Valía, 2004).

Las investigaciones en FMS de los últimos 15 años han apostado por una serie de hipótesis respecto de su origen.

En primer lugar, y a pesar de la extensa bibliografía que apoya la hipótesis de que la patogénesis del FMS radica en el sistema nervioso central, hay una corriente clásica que describe posibles etiologías periféricas de esta patología. Entre ellas, destacan los estudios que sugieren el papel de la inflamación neurogénica en la etiología del FMS (Salemi et al., 2003), o las que sugieren una alteración del flujo sanguíneo en los músculos de los pacientes con FMS (Lindh et al., 1995; Elvin et al., 2006; McIver et al., 2006). Además, estudios recientes han expuesto que un hallazgo frecuente en los pacientes de FMS es la dificultad que tienen para relajar sus músculos, lo que puede ser motivo de fatiga y dolor muscular, pero no se han demostrado cambios electrofisiológicos que lo corroboren (Staud, 2011).

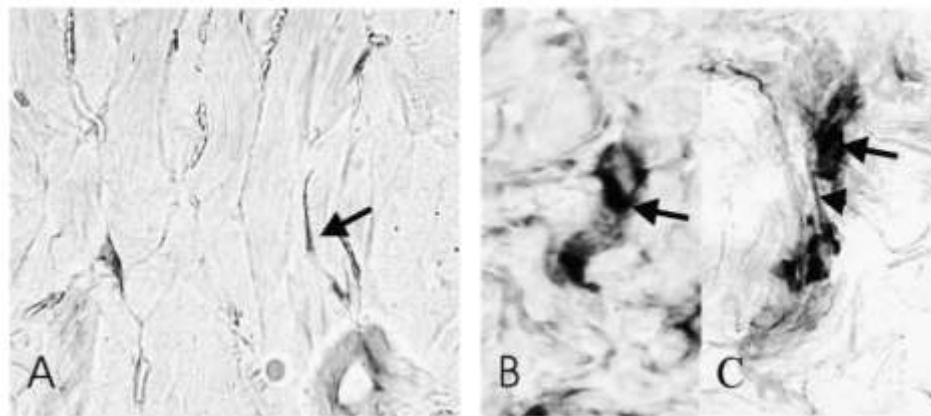


Figura 1.5.1: Secciones cutáneas de pacientes con FMS que muestran señales positivas de la proteína IL-1 β y IL-1 β en la región subcutánea en células similares a fibroblastos, lo que sugiere que la neuroinflamación tiene un papel en la etiología de la fibromialgia. Tomado de Salemi et al., 2003.

Por otra parte, algunos estudios sugieren como posible origen del FMS alteraciones a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal, planteando algunos investigadores que el desbalance a estos niveles podría justificar la teoría de “síndrome relacionado al estrés” (Lyon et al., 2011), así como alteraciones en neurotransmisores como el péptido de calcitonina, noradrenalina, endorfinas, dopamina, histamina y GABA, o

elevados niveles de hormona de crecimiento (Giovengo et al., 1999). Otras investigaciones apoyarían la hipótesis de que la elevada actividad de hormona corticotropa determinaría muchos síntomas del FMS y múltiples alteraciones en los ejes hormonales (Neeck, 2002).

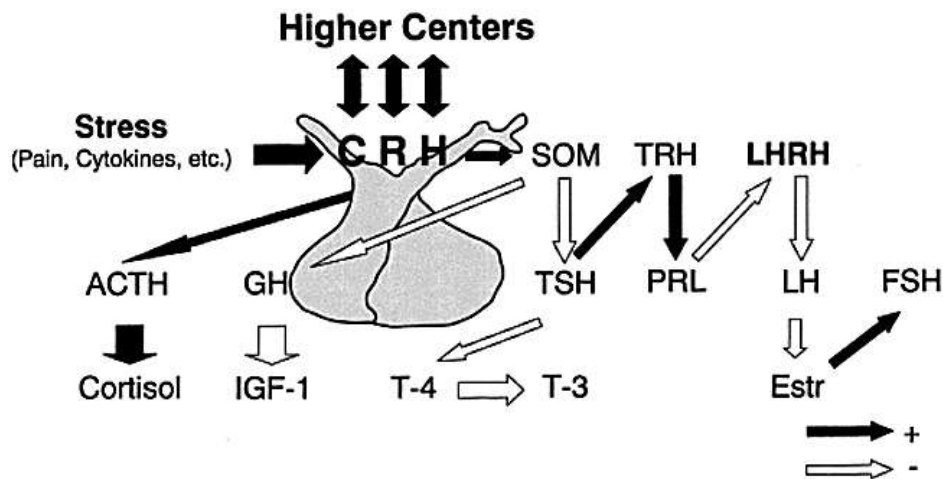


Figura 1.5.2: Modelo de las interacciones hipofisarias hipotalámicas impulsadas por CRH en pacientes con síndrome de fibromialgia hipotetizado por Meeck en 2002. Las abreviaturas son: Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH), Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH), Hormona Liberadora de Hormonas Luteinizantes (LHRH), Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH), Hormona del crecimiento (GH), somatostatina (SOM) hormona tiro-estimulante (TSH), estrógeno (Estr), Hormona luteinizante (LH), Hormona estimuladora de folículos (FSH), Factor de crecimiento insulin-like (IGF-1). Tomado de Neeck, 2002.

En último lugar, mencionaremos la hipótesis de la alteración monoaminérgica, la más apoyada por la evidencia. Una considerable cantidad de estudios coinciden en que la sintomatología de este síndrome parece indicar que existe una sensibilización del sistema nervioso central (Meeus y Nijs, 2006; Yunus, 2007). Tanto en estudios preclínicos como en estudios clínicos se ha encontrado una amplificación central del dolor de estos pacientes, mediante una supresión de las vías descendentes inhibitorias y un aumento de las vías facilitadoras descendentes (Petersel et al., 2011; Smith et al., 2011; Chinn et al., 2016). Además, el descubrimiento tanto de un incremento de la sustancia P y del glutamato (Arora et al., 2011; Legangneux et al., 2001; Lyon et al., 2011; Russell et al., 1992), como de una disminución de la mayor parte de metabolitos de la serotonina, la noradrenalina y la dopamina en el líquido cefalorraquídeo de

pacientes con FMS (Becker y Schweinhardt, 2012; Legangneux et al., 2001; Russell et al., 1992) podrían explicar este fenómeno de amplificación central. En esta misma línea, diversos estudios sobre polimorfismos genéticos en genes relacionados con la regulación de la serotonina, la dopamina y la noradrenalina destacan la importancia del papel que los sistemas monoaminérgicos juegan en la etiopatogénesis del FMS (Buskila, 2009; Buskila y Cohen, 2007; Buskila y Sarzi-Puttini, 2006; Lee et al., 2012; Xiao et al., 2012). Estos sistemas monoaminérgicos, como hemos señalado anteriormente, también están implicados en la regulación del estado de ánimo, entre otros, lo que podría explicar la elevada comorbilidad de síntomas psiquiátricos en este síndrome (Agüera-Ortiz et al., 2011; Arora et al., 2011; Ohayon, 2009).

Genetic markers in fibromyalgia	
System	Genetic marker
Serotonergic	5-HT _{2A} receptor polymorphism T/T phenotype SLC6A4 serotonin transporter
Dopaminergic	Dopamine D ₄ receptor exon III repeat polymorphism
Catecholaminergic	Catecholamine O-methyl transferase polymorphism
Future clinical implications of molecular genetic findings in fibromyalgia	
Subgrouping of fibromyalgia patients	
Pharmacologic treatment based on knowledge of patient's genotype	
<ul style="list-style-type: none"> • Subjects with the short 5-HTTLPR allele may be more suitable candidates for antidepressant medication • Subjects without the 7DRD4 allele may be candidates for dopaminergic medication 	

Figura 1.5.3: Polimorfismos genéticos encontrados en pacientes de FMS y su posible implicación clínica futura. Estos polimorfismos, aunque no son específicos de FMS, apoyan la teoría monoaminérgica del síndrome. Tomado de Buskila, 2009.

1.6 Tratamientos actuales para el síndrome de fibromialgia

La información sobre el diagnóstico, el pronóstico y las alternativas terapéuticas es especialmente relevante en cualquier enfermedad. El diagnóstico de FMS en pacientes con dolor crónico generalizado y su sintomatología comórbida suele terminar un

período muy largo de incertidumbre, desinformación y en algunos casos menosprecio. Según el informe sobre FMS elaborado por el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad en 2011, los pacientes bien informados estarán mejor preparados para afrontar su enfermedad, clínica y emocionalmente, y minimizar sus consecuencias. Aunque algunos profesionales han sugerido que el diagnóstico de FMS podría tener efectos negativos, una revisión sistemática de una extensa bibliografía indica que reduce la presión asistencial por parte de estos pacientes (para revisión ver el documento Fibromialgia elaborado por el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad en 2011).

Debido al desconocimiento de su etiopatogenia, el objetivo del tratamiento del FMS no es curativo sino paliativo y debe perseguir el máximo alivio sintomático teniendo en cuenta la severidad y las consecuencias que los distintos síntomas tienen en el paciente (Russell, 2013, Theoharides et al., 2015). En este sentido, el dolor musculoesquelético crónico generalizado (que posee componentes sensitivos, afectivos y cognitivos) y el resto de sintomatología comórbida, generan un amplio espectro de sintomatología a tratar, y toda terapia exitosa deberá abordar dichos aspectos. Actualmente se considera que el mejor tratamiento debe llevarse a cabo desde un abordaje multidisciplinar e individualizado, centrado en las necesidades de cada persona (O'Brien et al., 2010). Los tratamientos del FMS con mayor evidencia científica podrían dividirse en 2 grandes grupos: tratamientos no farmacológicos y tratamientos farmacológicos.

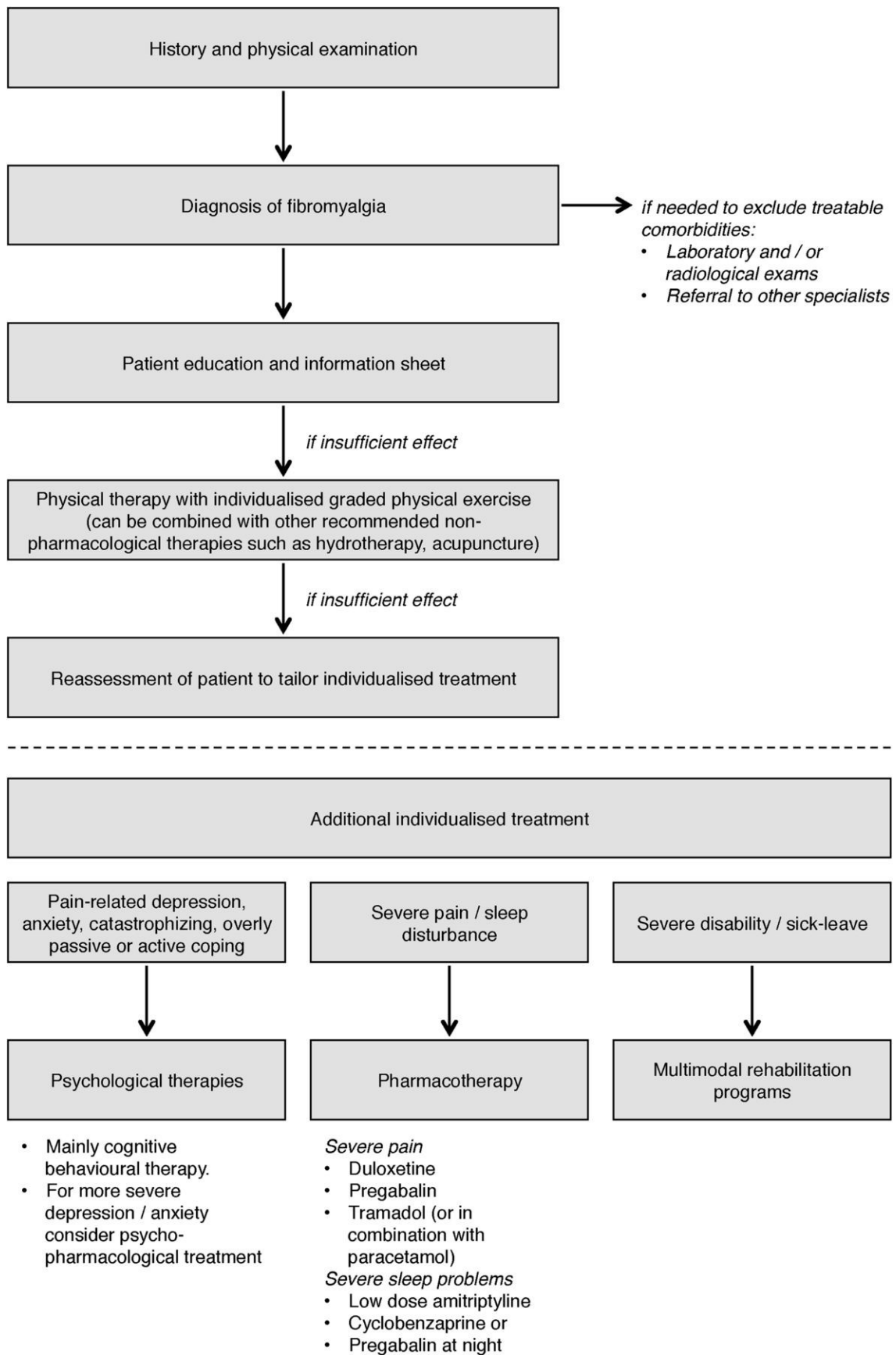


Figura 1.6.13: Recomendaciones del manejo del tratamiento del FMS de The European League Against Rheumatism (EULAR), revisados en Febrero del 2017. Tomado de Macfarlane et al., 2017.

1.6.1 Tratamientos no farmacológicos

Se han publicado numerosas revisiones que analizan la eficacia de los tratamientos no farmacológicos en el FMS (Sueiro-Blanco et al., 2008; Hasset and Grevitz, 2009; Castro-Sánchez et al., 2017; Noguchi et al., 2017). Muchos de estos estudios coinciden en que los programas de ejercicios son la intervención no farmacológica más y mejor estudiada, pero cada vez es más habitual encontrar estudios del resto de intervenciones no farmacológicas que se emplean en el tratamiento del FMS (agentes físicos, terapia manual, punción seca...), lo que ha aumentado la evidencia de la efectividad de los diversos tratamientos no farmacológicos en esta patología.

1.6.1.1 Programas de ejercicio físico

El ejercicio físico, ya sea ejercicio aeróbico, entrenamiento de resistencia, o entrenamiento de flexibilidad, se ha demostrado muy positivo proporcionando beneficios en pacientes con FMS (Sueiro-Blanco et al., 2008; Hasset and Grevitz, 2009; Chinn et al., 2016).

Esta mejora en la sintomatología podría estar mediada por las evidencias halladas en la investigación del deporte y la actividad física que demuestran que el ejercicio aeróbico regular de intensidad moderada aumenta los niveles de serotonina en el sistema nervioso central y produce liberación de endorfinas endógenas, además de tener influencia sobre el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA), disminuyendo los niveles plasmáticos de cortisol (Russell, 2013; Kumar, 2015). Recientes investigaciones han hallado que tan sólo 15 minutos al día de ejercicio aeróbico moderado (bicicleta estática) son suficientes para movilizar de forma aguda el Factor de crecimiento insulínico en suero-1 (*Serum insulin-like growth factor-1*, IGF-1). El IGF-1 regula la actividad metabólica y la proliferación celular en el músculo esquelético y en el sistema nervioso central y periférico durante el ejercicio, y hay estudios que exponen que aproximadamente un tercio de los pacientes de FMS sufren una deficiencia de este factor. Por ello, la movilización aguda a partir del ejercicio de este factor es un apoyo a la hora de planificar nuevas estrategias específicas moderadas dentro del ejercicio

físico para los pacientes con FMS (Cuatrecasas et al., 2010; Mannerkorpi et al., 2017; Bjersing et al., 2017).

Además de las implicaciones fisiológicas, el aumento en la actividad física diaria y la práctica de ejercicio físico mejora la calidad de vida de los pacientes con FMS, puesto que la sintomatología coexistente de dolor crónico generalizado, estados de ánimo depresivo y la fatiga crónica contribuyen en gran medida a estilos de vida sedentarios. De esta forma, la práctica regular de ejercicio evita el círculo vicioso entre el dolor, los trastornos psicológicos y la inactividad comunes en los pacientes con FMS (Sañudo et al., 2010; Russell, 2013; Chinn et al., 2016).

Sin embargo, para que este ejercicio sea eficaz, tiene que ser cuidadosamente prescrito y controlado. La intensidad del ejercicio debe ser moderada, de modo que pueda derivar en efectos positivos del entrenamiento, pero no tan elevada como para incrementar los síntomas; además, la adhesión a medio-largo plazo se plantea como uno de los grandes problemas, ya que, si el paciente con FMS deja de realizar los ejercicios o no incrementa su nivel de actividad física, los efectos conseguidos se pierden pronto. Por todo ello, conseguir que los pacientes con FMS inicien y mantengan un programa de ejercicio físico sigue siendo un reto (Sañudo et al., 2010; Russell, 2013).

1.6.1.2 Fisioterapia

En la actualidad abundan los estudios sobre el efecto de las terapias con agentes físicos (termoterapia, hidroterapia, electroterapia...), terapia manual y terapias un poco más invasivas como la punción seca en pacientes con FMS. Estas terapias, unidas a un tratamiento farmacológico adecuado, resultan beneficiosas, lo que aumenta la evidencia de que la clave de un tratamiento satisfactorio en FMS radica en la actuación de equipos multidisciplinares bien organizados (Romeyke et al., 2015; Calandre et al., 2017).

Por una parte, la termoterapia, de forma aislada, ha demostrado ser efectiva en términos de reducción del dolor tras un tratamiento diario de seis meses. Aun así, estudios que han empleado tratamientos mediante hipertermia señalan que ésta es mejorada si se combina con ejercicio físico, o bien con otros tratamientos

fisioterápicos o farmacológicos, haciendo hincapié de nuevo en la necesidad de grupos multidisciplinares que aborden esta patología (Romeyke et al., 2015). En la misma línea, la hidroterapia a largo plazo ha demostrado ser efectiva en reducir el dolor significativamente, con una frecuencia de tratamiento de aproximadamente 4 horas a la semana (Macfarlane et al., 2017).

En cuanto a los tratamientos basados en la electroterapia, la utilización de programas de electro-estimulación nerviosa transcutánea (TENS) y otras corrientes analgésicas, ya sean combinadas o no con otro tipo de terapias, reducen significativamente el dolor, pero no muestran signos de mejora de la fatiga crónica coexistente (Salazar et al., 2017).

Un estudio reciente evalúa el papel de la punción seca y del *cross taping* sobre puntos gatillo (*trigger points*) y sobre la musculatura paravertebral en pacientes con FMS. Los resultados muestran una disminución significativa tanto del número de puntos gatillo como de la intensidad de dolor percibida por el paciente. Está demostrado que esta reducción del dolor se debe a que las fibras A Δ se estimulan 72 horas después de la aplicación de la punción seca en el punto de activación, y la estimulación prolongada de estas fibras hace que la encefalina funcione en las interneuronas inhibitoras en el asta dorsal de la médula espinal. La punción seca también aumenta la circulación sanguínea local del tejido y genera un estiramiento local en las estructuras del citoesqueleto, lo que causa la relajación de los sarcómeros al reducir la cantidad de solapamiento entre actina y miosina en un músculo con puntos gatillo (Dommerholt, 2011; Castro-Sánchez et al., 2017).

Antes de la inclusión de los nuevos criterios diagnósticos en 2010, las investigaciones sobre la terapia manual en FMS eran confusas y sus resultados mostraban controversias entre autores. La terapia manual en general ha demostrado, desde la revisión de los criterios en 2010, ser efectiva reduciendo la intensidad del dolor en pacientes con FMS en tratamientos de al menos 4-5 semanas (Field et al., 2007). De forma más específica, aunque el masaje sueco y el masaje tradicional sólo han demostrado resultados significativos reduciendo el dolor, varios estudios han evidenciado que las terapias manuales miofasciales han reducido significativamente el dolor, la ansiedad y los trastornos depresivos (Chinn et al., 2016). En algunos casos, una terapia continuada de masaje técnico miofascial ha llegado a reducir

significativamente incluso los trastornos del sueño (Li et al., 2014). El Shiatsu, por otra parte, también ha demostrado tener efectos sobre dolor, depresión y trastornos del sueño, pero en menor medida que las terapias miofasciales (Li et al., 2014; Field, 2014; Chinn et al., 2016; Field, 2016).

Otros tratamientos comunes en fisioterapia, como la aplicación de ultrasonidos o la magnetoterapia (ya sea mediante campos estáticos o campos pulsátiles de baja frecuencia) han mostrado resultados a muy corto plazo en la reducción del dolor, pero la evidencia no es, por el momento, lo suficientemente fuerte (para revisión ver el documento Fibromialgia elaborado por el Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad en 2011).

1.6.1.3 Tratamientos psicológicos

Hablaremos, en primer lugar, de la terapia de cognitivo-conductual (TCC) y de los modelos psicoeducativos. Distintas estrategias, dentro de un marco cognitivo-conductual, han mostrado eficacia en el tratamiento del dolor por FMS, entre ellas, la reestructuración cognitiva, la redefinición de objetivos, el control de la autoexigencia, el fomento de la independencia emocional, la programación gradual de ejercicio, la redistribución de los esfuerzos físicos, la utilización de técnicas de relajación y de control de estrés, entre otros (Villanueva et al., 2004; Russell, 2013).

La TCC actúa intentando dotar a los pacientes con FMS de estrategias para que puedan ejercer control sobre sus vidas, manteniendo la mayor funcionalidad posible. Los programas cognitivo-conductuales incluyen una parte psicoeducativa y otra en entrenamiento en la adquisición y mejora de habilidades de afrontamiento del dolor y sus consecuencias. La parte psicoeducativa resulta sumamente importante, puesto que enseña al paciente a ajustar sus experiencias a su situación; es decir, se establecen relaciones funcionales entre los diferentes elementos del comportamiento de la persona con dolor y cómo esta persona puede ser motor y agente de cambio (Villanueva y Valía, 2004; Russell, 2013).

Por otra parte, cada vez se les da mayor peso a las terapias psicológicas alejadas del tradicionalismo cognitivo-conductual. El mindfulness o atención plena se conceptualiza como aquella habilidad que consiste en "centrar la atención de un modo intencional:

en un objeto, en el momento presente, y sin juzgar". El Doctor Jon Kabat-Zinn de la Universidad de Massachussets, desarrolló el mindfulness-Based Stress Reduction (MBSR) que constituye un protocolo terapéutico cuya eficacia en la reducción de estrés ha sido empíricamente validado en numerosos estudios (Ivanovski y Malhi, 2007; Praissman, 2008).

El entrenamiento en mindfulness ha demostrado ser beneficioso para pacientes con FMS. Varios autores han comprobado que tras la aplicación del entrenamiento se conseguía incrementar el bienestar psicológico de las pacientes (Rosenzweig et al., 2010), paliar la sintomatología depresiva (Sephton et al., 2007), reducir el dolor y mejorar el funcionamiento físico de las mismas (Astin et al., 2003). Otros estudios han evidenciado que el mindfulness conseguía reducir significativamente diversas variables tales como la disminución de la calidad de vida, el nivel de dolor percibido o las estrategias negativas de afrontamiento del dolor empleadas (Grossman et al., 2007). Estudios recientes muestran que una terapia continuada de mindfulness tiene efectos positivos tanto en la percepción del dolor, calidad del sueño, malestar psicológico, falta de apego y compromiso cívico de pacientes con FMS, efectos que se prolongan hasta los 6 meses de seguimiento, aunque muchos hacen hincapié en que, por supuesto, debe combinarse con el tratamiento farmacológico (Amutio et al., 2015; Menzies, 2016; Castelli y Tesio, 2016; Van Gordon et al., 2017).

1.6.2 Tratamientos farmacológicos

No hay, hasta la fecha, ningún fármaco aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios ni por la Agencia Europea de Medicamentos (AEM) con indicación específica para FMS. Aunque existen múltiples pautas de tratamiento farmacológico basadas en la evidencia para el FMS, presentadas por la *American Pain Society* y por la *European League Against Rheumatism* (EULAR), así como en las directrices nacionales establecidas en Canadá, España y Alemania (Chinn et al., 2016). Sólo unos pocos fármacos han demostrado eficacia de forma consistente en algunos de los síntomas del FMS (para revisión ver el documento Fibromialgia del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2011). Entre ellos encontramos cuatro grandes grupos: fármacos antiepilépticos (DEA), antidepresivos tricíclicos (TCA),

inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) e inhibidores de la recaptación de serotonina-noradrenalina (SNRI). Aun con todo esto, La *Food and Drugs Administration* (FDA) de Estados Unidos sólo ha aprobado hasta la fecha la duloxetina, la pregabalina y el milnacipram para el tratamiento del FMS; la sanidad de Canadá solo ha aprobado el uso de duloxetina y pregabalina, mientras que la AEM no ha aprobado de forma específica ningún medicamento para esta patología a día de hoy (Chinn et al., 2016).

Otros fármacos de uso común en diversas patologías han sido investigados en FMS, sin resultados significativos.

A continuación, se describen los resultados que los principales tipos de fármacos han tenido tanto en la práctica clínica como en la investigación básica en el tratamiento del FMS:

1.6.2.1 Analgésicos

Por supuesto, es inevitable pensar en un tratamiento analgésico para una patología de dolor crónico. Aun así, el tratamiento farmacológico con analgésicos en pacientes con FMS presenta eficacia muy limitada, y sólo resulta levemente efectiva en periodos en los que los pacientes tienen una sintomatología leve de dolor (Russell, 2013).

Como analgésico por excelencia, el paracetamol ha sido el fármaco más utilizado en FMS. Aunque hay estudios que han evidenciado que el 27% de los pacientes lo consideraba totalmente ineficaz (Wolfe et al., 2000), otros estudios algo más recientes exponen que sólo el 36% de pacientes consideraba que el paracetamol les había sido útil (Bennet et al., 2007); sin embargo, los expertos recomiendan no utilizarlo como terapia única (Sarzi-Puttini et al., 2016).

El uso de opioides ha mostrado ser efectivo para reducir el dolor generalizado en los pacientes con FMS, pero no ejerce efectos sobre el resto de síntomas presentes en este síndrome, excepto los derivados de su efecto psicotrópico; además, existe controversia en su uso por sus efectos adversos, como la afectación del sistema digestivo, la adicción generada y la alta tolerabilidad. En resumen, no es frecuente recurrir al uso de estos fármacos para tratar el FMS porque consideran que los

beneficios no superan los inconvenientes que generan (Ngian et al., 2011; Russell, 2013).

Por otra parte, el tramadol, un agonista opioide débil que además posee acciones serotoninérgicas y noradrenérgicas, resulta eficaz en pacientes con FMS con dolor ligero a moderado (Kaneko et al., 2014; Russell et al., 2000).

Las investigaciones más actuales apuestan por una sinergia paracetamol-tramadol, introduciendo el concepto de “*Analgesia Multimodal*”. No sólo se ha evidenciado una disminución del dolor sino que una parte considerable de los pacientes experimentan una reducción de la astenia y las parestesias. Una nueva revisión de los criterios del EULAR incluyen la analgesia multimodal paracetamol-tramadol como una de las posibilidades de tratamiento (Roskell et al., 2011; Ghini et al., 2016; Macfarlane et al., 2017).

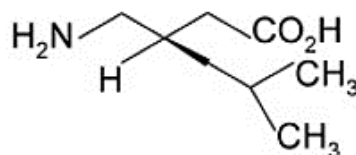
Hay que mencionar, además, a los cannabinoides dentro de los fármacos analgésicos. La nabilona, un cannabinoide sintético, sólo se ha estudiado en pequeños ensayos clínicos, los cuales han mostrado controversia en sus efectos. De hecho, a día de hoy aún no se puede hablar de resultados robustos para este tipo de fármacos en ningún tipo de sintomatología del FMS (Skrabek et al., 2008; Ware et al., 2010; Walitt et al., 2016).

Incluiremos también en este grupo a los antiinflamatorios. El tratamiento mediante antiinflamatorios, ya fuesen antiinflamatorios no esteroideos (AINES) o mediante glucocorticoides, ha demostrado eficacia en el tratamiento del FMS (Clark et al., 1985; Yunus et al., 1989). Varios estudios han señalado la posible utilidad de combinar ibuprofeno o naproxeno con amitriptilina, ciclobenzaprina o benzodiazepinas, pero no se han encontrado ventajas frente a otros tratamientos, y por ello, no han tenido un gran impacto en la investigación del FMS (Rao et al., 2003).

1.6.2.2 Antiepilépticos

Los fármacos antiepilépticos tales como la gabapentina (GBP) o la pregabalina (PGB) se han usado como co-analgésicos en diversas patologías que cursan con dolor crónico. La indicación inicial para ambos compuestos dentro de su uso como analgésicos era el dolor neuropático en diversas patologías, como neuralgia postherpética,

polineuropatía diabética y dolor neuropático central después de lesiones en la médula espinal. Sin embargo, el uso de estos fármacos se ha ampliado a otras condiciones de dolor tanto crónicas como agudas. El FMS es una de las afecciones crónicas en las que la PGB ha resultado ser efectiva; de hecho, en 2007, fue la primera terapia farmacológica aprobada por la FDA para el manejo del FMS, y se usa cada vez más para el tratamiento de esta patología (Boomershine, 2010; Bellato et al., 2012; Russell, 2013; Forte et al., 2015; Gerardi et al., 2016; Chinn et al., 2016). La PGB es un fármaco anticonvulsivante que actúa uniéndose a la subunidad alfa-2-delta de los canales de calcio voltaje-dependientes del SNC; por lo tanto, regula a la baja el flujo de iones de calcio en las neuronas, reduciendo posteriormente la liberación de una variedad de neurotransmisores excitadores e inhibidores. Esta inhibición de la función de los canales de calcio provoca una reducción de la transmisión excitadora a nivel de la médula espinal, que sería el mecanismo por el que la PGB consigue producir un efecto antihiperalgésico en pacientes con FMS (Bauer et al., 2009; Bauer et al., 2010).



Pregabalin

Figura 1.6.2.2.1 : Estructura molecular de la pregabalina (S(+)-3-isobutyl GABA). Tomado de McClelland et al., 2004.

La seguridad de la PGB en el tratamiento del FMS se refleja en los datos de diversos estudios. Aunque los efectos secundarios son frecuentes, la tasa de efectos adversos ha mostrado ser aproximadamente similar a la del placebo. Los efectos adversos durante el tratamiento se observaron en aproximadamente el 80-90% de los pacientes en los grupos de PGB y aproximadamente el 70-75% en los grupos de placebo y eran principalmente leves o moderados (Chinn et al., 2016; Gerardi et al., 2016).

Los estudios realizados a corto plazo con antiepilépticos han demostrado mejoras significativas del dolor y las alteraciones del sueño (Chinn et al., 2016). Los estudios a

largo plazo muestran, además, mejoras significativas de la fatiga crónica. Estos resultados son similares a otros medicamentos eficaces en FMS, como milnacipran o duloxetina. Aun con todo, no se ha estudiado el papel de la PGB en los trastornos del estado de ánimo en el FMS (Roskell et al., 2011; Chinn et al., 2016; Derry et al., 2016; Gerardi et al., 2016).

En cuanto al protocolo de tratamiento de FMS con PGB, se ha sugerido que la dosis inicial debe ser baja, y que se ha de aumentar progresivamente. Se ha demostrado que una dosis entre 300 y 600 mg/día es suficiente para observar las mejoras en la sintomatología anteriormente mencionada. La dosificación de PGB debe adaptarse individualmente a cada paciente en función del uso de otros medicamentos y su tolerancia previa a fármacos. Los pacientes con antecedentes de efectos adversos moderados causados por pequeñas dosis de otros medicamentos pueden tener reacciones similares a la PGB. Las dosis orales iniciales pueden ser de 75 mg cada noche a la hora de acostarse o de 75 mg dos veces al día, y aumentarse gradualmente a una dosis de 150 mg dos veces al día durante 1 a 2 semanas según se tolere y en base a la eficacia. Las dosis más altas son más probables de ser intolerables (Boomershine et al., 2010; Forte et al., 2015; Chinn et al., 2016; Derry et al., 2016).

Aún con todo, y debido a que no se cubre un gran espectro de sintomatología comórbida con un solo fármaco, cada vez más se está abandonando la idea de un tratamiento basado en sólo un fármaco (actualmente conocido como monoterapia) y se están abordando nuevas opciones, como una terapia combinada aprovechando la sinergia entre PBG y duloxetina (Gilron et al., 2016).

1.6.2.3 Antidepresivos

La eficacia de los antidepresivos (ya sean tricíclicos, SNRI o SSRI) en la reducción del dolor, la depresión y la fatiga, y la mejora de la calidad de vida en general ha dado lugar a su uso regular en el tratamiento de pacientes con FMS; además, diversos estudios que han analizado la eficacia de los antidepresivos en el FMS los clasifican como una de las alternativas terapéuticas más eficaces (Häuser et al., 2014; Forte et al., 2015; Lawson, 2016).

1.6.2.3.1 Antidepresivos tricíclicos (TCAs):

La amitriptilina es el fármaco más representativo de entre los TCAs, y es recomendado por todas las guías clínicas. La amitriptilina mejora el dolor y las alteraciones del sueño en el FMS, pero el efecto sobre la depresión apenas se ha estudiado. Aunque se ha mostrado más eficaz que otros antidepresivos como el milnacipran o la duloxetina, los estudios basados en tratamiento farmacológico con TCAs fueron realizados entre 1986 y 2000, generalmente con tamaños de muestra pequeños, mientras que los datos obtenidos con otros antidepresivos de nueva generación, u otros tratamientos farmacológicos, como PGB, son más robustos, realizados con tamaños de muestra mucho mayores en estudios diseñados para obtener la aprobación terapéutica, y más actuales. Esto es muy importante ya que los diseños de los estudios han mejorado considerablemente a lo largo de los años a medida que se ha incrementado la aplicación de una metodología científica rigurosa (Moret y Briley, 2006; Häuser et al., 2014; Chinn et al., 2016).

1.6.2.3.2 Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs):

De este grupo de antidepresivos, los más estudiados para el FMS han sido citalopram, escitalopram, fluoxetina, paroxetina y sertralina. Los resultados de los pocos ensayos que se han realizado con SSRIs no han sido tan prometedores como con los SNRIs o TCAs. El citalopram y el escitalopram no han mostrado resultados significativos en su efecto analgésico; por otra parte, y sorprendentemente, la paroxetina ha mostrado eficacia en reducir significativamente los trastornos del sueño y el estado de ánimo, pero no reduce el dolor musculoesquelético generalizado de forma significativa (Patkaar et al., 2007; Calandre et al., 2015). Sin embargo, la fluoxetina sí ha mostrado mejoras significativas en el dolor, la fatiga y los trastornos depresivos, pero sólo a una dosis mayor que la dosis estándar (hasta 80 mg) (Arnold et al., 2002).

A pesar de ello, diversos autores han concluido que, en general, no hay resultados robustos que sugieran que los SSRIs sean efectivos en el tratamiento del dolor, la fatiga o los trastornos del sueño. La nueva revisión realizada por el EULAR en 2017 clasifica a

los SSRI de baja efectividad en FMS por su falta de eficacia frente a la sintomatología comórbida (Chinn et al., 2016; Macfarlane et al., 2017).

1.6.2.3.3 Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (SNRI)

Una revisión de la literatura muestra que los inhibidores de la recaptación de serotonina que poseen un componente noradrenérgico parecen ser más eficaces en el alivio de los síntomas del FMS (Arnold, 2006; Lunn et al., 2014; Palmer et al., 2010). En particular, la duloxetina y el milnacipran son, a la vez, fármacos representativos dentro de esta clase y fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento del FMS.

La duloxetina es un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina con una robusta eficacia en el tratamiento de la depresión mayor (Pérez-Cajaraville y Gil-Aldea, 2006), que ha aportado perspectiva al tratamiento del dolor neuropático (Snedecor et al., 2013; Le Cudennec y Castagné, 2014). La duloxetina tiene poca o ninguna afinidad por receptores serotoninérgicos, noradrenérgicos, acetilcolinérgicos, dopaminérgicos, histaminérgicos, o incluso opioidérgicos, ni tampoco para los canales iónicos, incluidos los canales de sodio (Bymaster et al., 2001). Se ha mostrado eficaz en revertir la alodinia mecánica en modelos de dolor neuropático y de dolor persistente en ratas (Iyengar et al., 2004; Le Cudennec y Castagné, 2014). El tratamiento del FMS con duloxetina, a corto plazo (hasta 12 semanas) y a largo plazo (hasta 28 semanas), aunque no muestra efecto significativo a 20-30 mg/día, ha mostrado mejoría significativa en los niveles de dolor y en los síntomas depresivos a dosis de 60-120 mg/día. No ha mostrado efecto sobre los niveles de fatiga, y los resultados referentes a trastornos del sueño no son concluyentes. Es uno de los fármacos autorizados por el EULAR, la FDA y otros sistemas médicos en el tratamiento del FMS; aunque, por supuesto, en la actualidad se estipula que el tratamiento combinado con otros fármacos, como la PGB, sería más apropiado (Roskell et al., 2011; Chinn et al., 2016; Gilron et al., 2016; Macfarlane et al., 2017).

Por otra parte, en lo referente al milnacipran, hay resultados robustos que evidencian que tras un tratamiento a largo plazo los pacientes de FMS experimentan una reducción del dolor del 30%, pero los resultados sobre la fatiga son muy leves y no hay

resultados referentes a trastornos del sueño. Las dosis efectivas se encuentran entre 100-200 mg/día (Roskell et al., 2011; Chinn et al., 2016; Macfarlane 2017).

1.7 Investigación básica en el síndrome de fibromialgia

Con todo lo expuesto anteriormente se hace evidente la necesidad de avanzar en el conocimiento de este síndrome, tanto en lo referente a su etiopatogenia como en el desarrollo de un tratamiento que aborde el mayor número posible de síntomas comórbidos. La investigación básica necesaria para ello se ha estado viendo frenada porque todavía no existen modelos animales de FMS completamente validados (Sluka, 2009; Nagakura et al., 2009; DeSantana et al., 2013).

1.7.1 Modelos animales de FMS

Es evidente que el animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas. Son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan tanto al ser humano como a los propios animales. Asimismo, también son importantes sus aportes en la docencia biológica y en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles (Belzung y Lemoine, 2011; Cryan y Sweeney, 2011; Green et al., 2012; Mogil et al., 2010; Nestler y Hyman, 2010).

Bien es verdad que, además de las cuestiones de carácter ético y moral, el principal inconveniente de la experimentación en animales es su incapacidad para comunicar verbalmente sus experiencias subjetivas, y que los constructos humanos como sensaciones y sentimientos deben ser inferidos a través del registro y análisis de su conducta observable; sin embargo, las ventajas que plantea la utilización de modelos animales de una enfermedad superan a los inconvenientes, puesto que se pueden controlar la mayoría de variables ambientales, e incluso genéticas, que pueden interferir en sus experiencias perceptivas, lo que nos permite obtener una homogeneidad entre sujetos y aumenta la objetividad del estudio (Belzung y Lemoine,

2011; Cryan y Sweeney, 2011; Green et al., 2012; Mogil et al., 2010; Nestler y Hyman, 2010).

Un buen modelo animal de FMS debería reproducir no solo los síntomas de dolor generalizado, sino también los síntomas más frecuentemente asociados con este síndrome. Varios de los modelos animales propuestos hasta la fecha implican la inducción de dolor muscular significativo por inyección intramuscular de sustancias tales como carreginina (Kehl et al., 2000), ácido salino (Sluka et al., 2001), factor de necrosis tumoral (Schäfers et al., 2003) e incluso ácido clorhídrico (Furuta et al., 2012). Otros modelos animales de FMS también han intentado producir dolor muscular mediante técnicas alternativas a la inyección intramuscular de agentes irritantes, como la inducción de un estrés producido por natación forzada en ratas (Suarez-Roca et al., 2006), por la exposición a sonidos estresantes impredecibles (Green et al., 2011) o mediante estrés por frío intermitente (Nishiyori y Ueda, 2008). El problema es que todos estos modelos tratan de producir un síntoma que arrastre a la sintomatología comórbida, pero entre ellos no hay ninguno que busque un punto en común en el SNC y que haga aparecer toda la sintomatología a la vez.

1.7.2 Modelo de fibromialgia inducido por reserpina

El modelo más convincente de entre todos los existentes es el introducido por el grupo de Nagakura en 2009. Este grupo describió un modelo de FMS en rata mediante la inyección subcutánea de reserpina, un fármaco que disminuye severamente los niveles de las aminas biogénicas (noradrenalina, dopamina y serotonina) en el SNC al impedir su traslado vesicular en la sinapsis por el bloqueo permanente de los receptores V-MAT de las vesículas de liberación sináptica (Nagakura et al., 2009; Oe et al., 2010).

Las ratas sujetas a este modelo, tras la administración de 1 mg/kg de reserpina al día durante tres días seguidos, mostraron hiperalgesia mecánica muscular, alodinia táctil, síntomas depresivos y alteraciones del sueño (Nagakura et al., 2009; Oe et al., 2010; Blasco-Serra et al., 2015; Blasco-Serra et al., *under review*). El modelo recibió críticas fundadas, en parte, a la falta de estandarización de la metodología (entre otros), lo que lo hizo pasar desapercibido durante unos años (Munro, 2010); sin embargo, estudios posteriores que han apoyado este modelo animal han ayudado a que el

modelo de FMS inducido por reserpina contribuya a una mejor comprensión de la fisiopatología del FMS y se espera que contribuya a la evaluación de fármacos, especialmente aquellos que se centren en la modulación de los sistemas de aminas biogénicas (Blasco-Serra et al., 2015; Zhang et al., 2016; Wells et al., 2017).

Nuestro grupo de investigación ha evidenciado recientemente que las ratas a las que se les administra reserpina siguiendo el modelo descrito por Nagakura y sus colaboradores en 2009 presentan alteraciones en los patrones de sueño que coinciden parcialmente con las descritas en pacientes con FMS en términos de pérdida de arquitectura normal de sueño, intrusiones de onda rápida en sueño no-REM y aumento de la actividad motora durante el sueño, entre otros. Los hallazgos electrofisiológicos de este estudio también evidencian una disminución del número de *spindles* durante el sueño de ondas lentas de las ratas sometidas a este modelo, lo que también sugiere la presencia de alteraciones cognitivas y de consolidación de la memoria (las cuales también están presentes en pacientes de FMS) (Blasco-Serra et al., *under review*).

1.7.2.1 Reserpina: Mecanismo de acción

La reserpina (metil-11,17 α -dimetoxi-18 β -[(3,4,5-trimetobenzoilo) oxy]-3 β ,20 α -yohimban-16 β -carboxilato) es un alcaloide natural biológicamente activo derivado de varios miembros del género *Rauwolfia*, un arbusto trepador indígena del sur y el sureste de Asia. Es prácticamente insoluble en agua, aunque libremente soluble en cloroformo, éter, cloruro de metileno y ácido acético glacial. Es estable en condiciones normales de almacenamiento, pero está sujeto a oxidación e hidrólisis. (National Toxicology Program, 2011).

Clásicamente se ha utilizado para reducir la presión arterial y la frecuencia cardíaca, como tranquilizante y sedante, como agente radioprotector y experimentalmente como anticonceptivo en humanos (Nakayama y Nakamura, 1978; Chan y Tang, 1984). Los extractos de *Rauwolfia serpentina* se han utilizado como medicina en la India durante siglos para una variedad de condiciones, incluyendo mordeduras de serpiente, hipertensión, insomnio y locura. La reserpina también se ha utilizado como tranquilizante y sedante en piensos para animales (IARC, 1976).

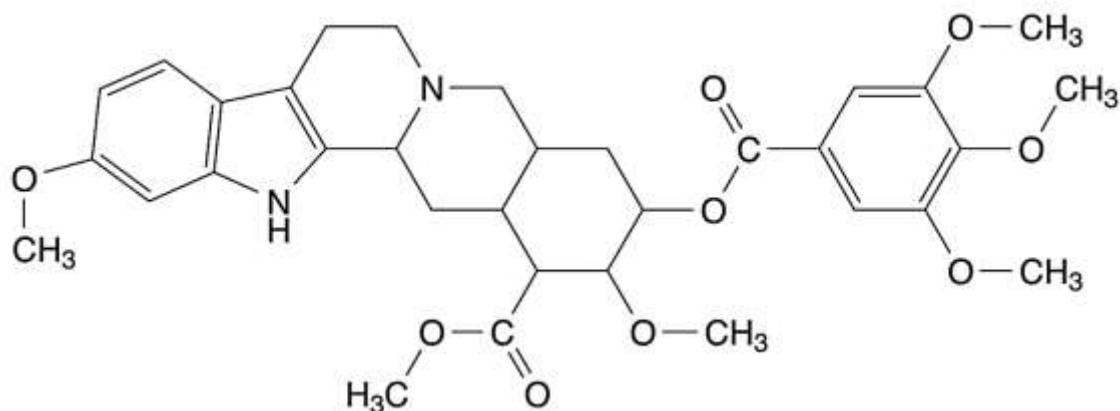


Figura 1.7.2.1.1: Estructura química de la reserpina. Tomado del National Toxicology Program, 2011.

La reserpina interfiere en el sistema monoaminérgico al inhibir irreversiblemente al transportador vesicular V-MAT2 de las vesículas de almacenamiento, transporte y liberación de monoaminas (Lee et al., 2015; Minor y Hanff, 2015). Todo esto genera la destrucción de dichas vesículas, de modo que los terminales no pueden concentrar o almacenar serotonina, noradrenalina o dopamina, produciéndose una acumulación de aminas en el citosol, las cuales se degradarán mediante enzimas tipo MAO (monoamina O₂ oxidoreductasa, EC 1.4.3.4) (Lee et al., 2015; Maldonado y Maeyama, 2015). El resultado final es una depleción de monoaminas en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso simpático (Antkiewicz-Michaluk et al. 2015; Lee et al., 2015).

Dada su acción sobre las aminas biógenas, la reserpina se utiliza en la actualidad para crear modelos animales de enfermedades caracterizadas por déficits de monoaminas (Parkinson, modelo farmacológico de depresión), así como para estudiar el efecto de fármacos destinados a modular sistemas de los que el sistema monoaminérgico es responsable (Kaneko et al., 2014; Leão et al., 2015; Minor y Hanff, 2015, Maldonado y Maeyama, 2015; Wang et al., 2014).

Debido al papel que las monoaminas juegan en la patofisiología de esta enfermedad y el papel que ejercen en el procesamiento supramedular del dolor y la analgesia (Elhwuegi, 2004; Yunus, 2007; Kindler et al., 2011; Petersel et al., 2011; Phillips y Clauw, 2011; Hamon y Blier, 2013 ; Parent et al., 2015), el uso de la reserpina en el

estudio del dolor está aportando información sobre las posibles alteraciones presentes en los cuadros de dolor crónico generalizado sin causa periférica, entre los que se encuentra el FMS, permitiendo el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de estas patologías (Kaneko et al., 2014; Nagakura et al., 2009; Ogino et al., 2013; Taguchi et al., 2015).

1.7.2.2 La importancia del modelo

Como ya hemos subrayado con anterioridad, durante la última década tanto la investigación neurobiológica básica como estudios clínicos han expuesto que las monoaminas (5-HT, DA y NA) desempeñan un papel crucial en el desarrollo del FMS (Legangneux et al., 2001; Petersel et al., 2011); en ello radica la importancia de que exista un modelo animal que se base en la depleción monoaminérgica para acercarse a la patofisiología del FMS, y esto se ha conseguido gracias al modelo de Nagakura (Nagakura et al., 2009; Oe et al., 2010).

El modelo de FMS inducido por reserpina en rata presenta validez aparente (similitud de síntomas entre el modelo y el trastorno en humanos: dolor muscular, alodinia, síntomas comórbidos como depresión y trastornos del sueño), validez de constructo (las ratas no muestran síntomas físicos aparentes y se observa una disminución a nivel central de las aminas biológicas) y validez predictiva (se ha observado una similitud en la respuesta al tratamiento) (Nagakura et al., 2009;).

Sin embargo, aún queda trabajo por hacer. Uno de los siguientes pasos en la aportación de validez al modelo es la prueba de los tratamientos farmacológicos actuales, de una forma metodológicamente correcta y estandarizada, para dar así paso a la investigación con nuevos fármacos y a las sinergias entre ellos (Murai et al., 2015; Favero et al., 2017; Shibrya et al., 2017).

02

PLANTEAMIENTO DEL
PROBLEMA,
HIPÓTESIS DE TRABAJO
Y OBJETIVOS

2.1. Planteamiento del problema

El Síndrome de fibromialgia (FMS) es una enfermedad compleja caracterizada por dolor musculoesquelético crónico generalizado asociado a sintomatología comórbida (fatiga intensa, trastornos del estado de ánimo, sueño no reparador y deterioro cognitivo, entre otros) sin ningún daño o anormalidad tisular real que explique la causa del dolor. El desarrollo de unos nuevos criterios diagnósticos más específicos para la clasificación del FMS y el reciente incremento en la investigación de este síndrome están ayudando a una mejor caracterización y diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, y aunque en los últimos años se han hecho importantes avances en el manejo de estos pacientes, no se consigue alcanzar, con los tratamientos existentes en la actualidad, un grado de satisfacción similar al de los tratamientos de otras patologías que igualmente repercuten de forma importante en la calidad de vida y, por consiguiente, en la economía y el sistema de bienestar de nuestra sociedad.

La falta de comprensión de la patogénesis del FMS dificulta la investigación del desarrollo de nuevos tratamientos satisfactorios. Mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos subyacentes en el origen y mantenimiento de los síntomas expresados en FMS es crítico para desarrollar estrategias terapéuticas más específicas y efectivas para tratar esta afección. Es difícil avanzar en el conocimiento del origen de una enfermedad si la comunidad científica no dispone de modelos animales en los que reproducir dicha enfermedad, aun con las salvedades propias de las diferencias entre especies. Los modelos animales de cualquier enfermedad intentan reproducir en los animales de experimentación el cuadro sintomatológico que la enfermedad en cuestión produce en los pacientes humanos, con el fin de obtener datos anatomofuncionales que en humanos no se podrían obtener por razones metodológicas y/o éticas

La mayor parte de la investigación sobre la patogénesis de la FMS se dirige hoy en día a la investigación del papel de los sistemas monoaminérgicos en los síntomas relacionados con el procesamiento del dolor, la regulación del sueño y el estado de ánimo que sufren estos pacientes. Siguiendo esta línea, el grupo de Nagakura et al. describieron en 2009 un modelo novedoso de FMS en rata basado en la depleción de monoaminas centrales tras la administración repetida de reserpina. Este modelo no

sólo muestra una disminución en los umbrales del dolor, sino que también reproduce sintomatología depresiva.

Sin embargo, este modelo recibió severas críticas por aspectos metodológicos que cuestionan, precisamente, la supuesta reproducción de los síntomas comórbidos; hoy en día, diferentes grupos de investigación han apotrado validez a este modelo aumentando la experimentación y evidenciando que, en efecto, reproduce no sólo dolor musculoesquelético generalizado, sino también reproduce diversos aspectos de la sintomatología comórbida, como síntomas depresivos y alteraciones del sueño.

El presente trabajo es una continuación de los esfuerzos de nuestro grupo de investigación en aportar validez al modelo de FMS inducido por reserpina. Aunque no existen en la literatura estudios similares al presentado en este trabajo, existen suficientes indicios para que podamos sostener la hipótesis de que el tratamiento con fármacos utilizados actualmente en humanos con FMS producirá en los animales sometidos al modelo de FMS inducida por reserpina una mejora de la sintomatología similar a la descrita en pacientes humanos. Los fármacos seleccionados, la pregabalina y la duloxetina, actualmente son la primera línea de terapia farmacológica en pacientes con FMS en las unidades del dolor del Hospital Clínico Universitario de Valencia y del Hospital General de Valencia, entre otros.

Por otra parte, nuestro equipo de investigación describió en estudios previos una alteración en los patrones de activación de Locus Coeruleus (LC) tras la administración de reserpina. Dada la relevancia que el sistema noradrenérgico tiene en la regulación tanto de las vías ascendentes y descendentes del procesamiento del dolor como en la regulación del estado de ánimo, y puesto que en el modelo de FMS inducido por reserpina encontramos alteraciones en ambos sistemas, en este trabajo de tesis hemos realizado un análisis de la modificación de los patrones de activación de los principales centros noradrenérgicos encefálicos (A5, A6 (LC) y A7) en diferentes momentos temporales tras la administración de reserpina. Asimismo, hemos analizado la activación del asta dorsal de la médula espinal y su relación con la activación de dichos centros noradrenérgicos tras la aplicación de un dolor inflamatorio en los animales tratados con reserpina. Por otro lado, se ha realizado una caracterización de las neuronas activadas para comprobar si son de naturaleza noradrenérgica. Existen suficientes indicios para que podamos sostener la hipótesis de que los cambios en los

patrones de activación observados en estos núcleos son debidos a alteraciones en las neuronas noradrenérgicas, causados por la acción de la reserpina. Esto, a su vez, aportaría pruebas a la hipótesis de que el FMS tiene una fuerte relación con el sistema monaminérgico, y de que el LC participa tanto en las alteraciones en la percepción del dolor como en el estado de ánimo en el FMS.

2.2 Hipótesis de trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo sostiene que el modelo de FMS inducido por reserpina en rata descrito por Nagakura et al. en 2009 es un modelo válido para reproducir en animales las mejoras de los síntomas predominantes de este síndrome debidas a los tratamientos farmacológicos prescritos en pacientes humanos.

Por tanto, si nuestra hipótesis resulta cierta, las ratas a las que administremos pregabalina o duloxetina tras la administración subcutánea de 1mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos, presentarán un aumento en los umbrales de dolor y una mejora de la sintomatología depresiva con respecto a las tratadas con placebo.

Por otra parte, a raíz de haber encontrado en anteriores estudios una modificación del patrón de activación en Locus Coeruleus tras la implantación del modelo sin administración de fármacos, postulamos la hipótesis de que las neuronas que modifican su patrón de activación son noradrenérgicas. Por tanto, si nuestra hipótesis fuese cierta, al caracterizar los núcleos Locus Coeruleus (A6), A5 y A7), las neuronas noradrenérgicas que están modificando los patrones de activación aparecerían marcadas con tirosin hidroxilasa. Por otro lado, la aplicación de formalina en ratas tratadas con reserpina alterará la activación del asta dorsal de la médula espinal, y modificará el patrón de activación de los centros noradrenérgicos, ya modificado por el efecto de la reserpina.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo General

El objetivo general de nuestro estudio es aportar validez robusta al modelo de FMS inducido por reserpina en rata propuesto por Nagakura et al. en 2009. Para ello utilizaremos los tratamientos farmacológicos que se usan en pacientes humanos, la pregabalina y la duloxetina, y comprobaremos su eficacia tanto sobre los umbrales de dolor como sobre el estado de ánimo.

El objetivo secundario es caracterizar las neuronas que están modificando los patrones de activación de Locus Coeruleus y áreas A7 y A5 en el modelo de FMS inducido por reserpina en rata sin tratamiento farmacológicos, y observar su evolución con el paso del tiempo desde la administración de reserpina y tras la aplicación de un dolor inflamatorio.

2.3.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos se pueden concretar de la siguiente manera:

1. Estudiar el efecto de la duloxetina y la pregabalina sobre los umbrales de dolor. Empleando los tests conductuales Electrovonfrey Test para alodinia táctil, y el Randall and Selitto Test para la hiperalgesia mecánica, comprobar si los tratamientos farmacológicos con duloxetina o con pregabalina, en dosis aguda o tras un tratamiento crónico de 14-15 días, mejoran las alteraciones encontradas en los umbrales del dolor tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina en rata y compararlo con el tratamiento con vehículo.
2. Estudiar el efecto de la duloxetina y la pregabalina sobre la sintomatología depresiva. Empleando el Forced Swimming Test y una adaptación del Novelty-Suppressed Feeding Test, comprobar el efecto de ambos fármacos, duloxetina y pregabalina, en el modelo de FMS inducido por reserpina en rata y comparar los efectos con un tratamiento placebo.

3. Caracterizar las neuronas que alteran los patrones de activación de Locus Coeruleus y áreas A5 y A7 tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina en rata en diferentes momentos temporales sin tratamiento farmacológico. Realizaremos esto mediante técnicas de inmunofluorescencia de colocalización del gen de expresión temprana c-fos y Tirosina-Hidroxilasa.

4. Estudiar si la aplicación de un dolor inflamatorio (test de formalina) tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina modifica los patrones de activación de los centros Locus Coeruleus, A5 y A7. Caracterizar la naturaleza de las neuronas que modifican su patrón de activación. Realizaremos esto mediante técnicas de inmunofluorescencia de colocalización del gen de expresión temprana c-fos y Tirosina-Hidroxilasa.

5. Estudiar el patrón de activación medular con dolor existente mediante técnicas de inmunofluorescencia para la detección del gen de expresión temprana c-fos en diferentes momentos del tiempo sin tratamiento farmacológico.

03

MATERIAL

Y

MÉTODOS

3.1 Animales de experimentación

3.1.1 Condiciones ambientales y de estabulación

Se utilizaron un total de 128 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Janvier Labs, Saint Berthevin, France), con un peso de 300 ± 50 gramos. Utilizamos esta cepa porque los estudios previos de este modelo han sido realizados en ella (Nagakura et al., 2009; Oe et al., 2010); machos para evitar fluctuaciones conductuales producidas por los ciclos hormonales (Aloisi y Bonifazi, 2006; Amandusson y Blomqvist, 2013; Cryan y Slattery, 2014). Los roedores fueron recepcionados y estabulados en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Universidad de Valencia. Se mantuvieron con ciclo controlado de 12 horas luz- 12 horas oscuridad, una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, una humedad relativa del $55\% \pm 10$, y con una impulsión de aire filtrado a través de filtros HEPPA con más de 15 renovaciones aire/hora. Las ratas estuvieron con acceso *ad libitum* a agua y comida (Dieta 2014 para mantenimiento de ratas, Envigo); los animales destinados a la prueba conductual Novelty Supressed-feeding test siguieron un protocolo de deprivación, detallado en el apartado 3.4.2.2.

3.1.2 Consideraciones éticas

Los animales fueron estabulados, sometidos al procedimiento experimental y sacrificados según el RD 53/2013 sobre “protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos”, siguiendo las normas para la buena práctica con animales de experimentación del Consejo Europeo (86/609/EEC) y siguiendo las recomendaciones de FELASA (Federación Europea de animales de laboratorio), del Comité de Ética de la Universitat de València y de la IASP (Zimmermann, 1983) para el estudio de dolor en animales conscientes. (Números de autorización de procedimientos aprobados por el comité ético de la Universitat de València (A1359998202530; A1379366948779; A1385127985666)).

3.1.3 Control del estado físico y criterios de punto final

El peso de los animales fue registrado todos los días desde el inicio hasta el final de todos los procedimientos para detectar variaciones anormales de peso que pudiesen ser indicativas de problemas en la salud del animal. Asimismo, con el mismo fin se controlaron mediante observación directa indicios cualitativos de estrés, tales como el exceso de secreción de porfirinas (cromodacriorrea) o la disminución de las conductas de autoaseo, y se registró cualquier otro tipo de dolor que pudiesen sentir, como el producido por la rotura de alguna uña. Las ratas que presentaron un cuadro de sufrimiento innecesario para el objetivo de este trabajo (criterio de punto final) fueron excluidas del experimento y sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico.

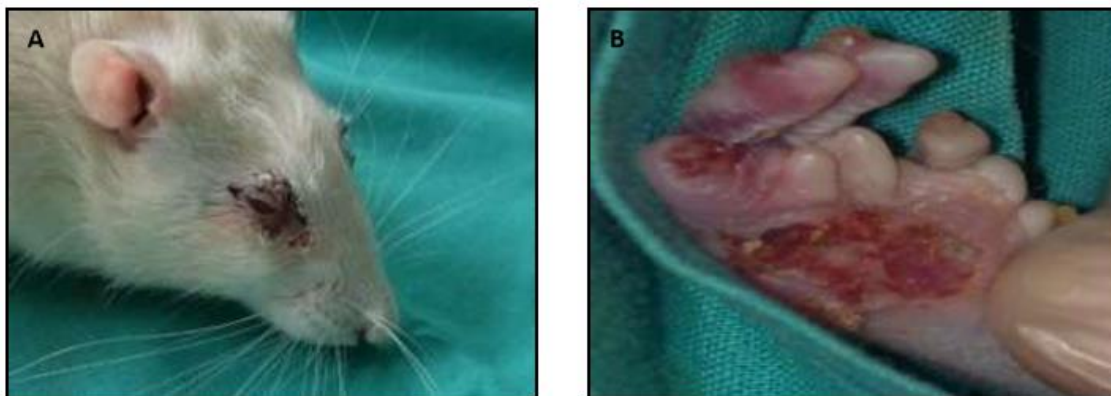


Figura 3.1.3.1: Signos de sufrimiento excesivo del animal que determinan criterios de punto final: (A) Secreción excesiva de porfirinas (cromodacriorrea), acumuladas por la disminución de la conducta de autoaseo; (B) Mutilación parcial de la pata trasera derecha tras la constricción del nervio ciático.

Para establecer el criterio de punto final de los animales, se empleó el protocolo de Morton y Griffiths (1985) (Tabla 3.1.3.1).

PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN

	Variables a considerar y puntuación	
Pérdida de peso (de 0 a 3)	Normal (no hay pérdida de peso o el animal crece normalmente)	0
	Pérdida de peso inferior al 10%	1
	Pérdida de peso entre el 10 y 20%. Posible alteración en el aspecto o cantidad de las heces.	2
	Pérdida de peso superior al 20%. El animal no consume agua ni alimento.	3
Aspecto (de 0 a 3)	Normal	0
	Pelo en mal estado	1
	Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones oculares o nasales	2
Comportamiento espontáneo (de 0 a 3)	Normal	0
	Pequeños cambios	1
	Inactividad	2
Comportamiento en respuesta a la manipulación (de 0 a 3)	Normal	0
	Cambios pequeños	1
	Cambios moderados	2
Constantes vitales (de 0 a 3)	Normal	0
	Pequeños cambios	1
	Cambios en la temperatura corporal de 1-2°C, incremento del 30% en frecuencia cardíaca o respiratoria	2
	Cambios en la temperatura corporal >2°C, incremento del 50% en frecuencia cardíaca o respiratoria	3

PUNTUACIÓN TOTAL.....de 0 a 20

Nota: cuando un animal obtiene una puntuación de 3 en más de un parámetro, todos los "3" pasan a "4".

Las medidas correctoras sugeridas en función de la puntuación obtenida para cada animal son las siguientes:

de 0-4	Normal
de 5-9	Supervisar cuidadosamente (¿analgésicos?)
de 10-14	Sufrimiento intenso. Analgésicos (¿eutanasia?)
de 15-20	Eutanasia (¿suprimir el procedimiento?)

Tabla 3.1.3.1: Protocolo de supervisión de Morton y Griffiths publicado en 1985

Además de los ítems descritos en el protocolo de Morton y Griffiths (1985), se controló el lugar de la inyección subcutánea de reserpina, ya que por la naturaleza de la reserpina y su presentación debía disolverse en una solución de agua destilada con ácido acético glacial al 0,5% para ser administrada, y ésta pequeña concentración de ácido acético podría ocasionar irritación. La valoración de este parámetro se hizo de la siguiente manera:

- 0- el lugar de la inyección no presenta alteraciones;
- 1- el lugar de la inyección presenta enrojecimiento y caída del cabello;
- 2- el lugar de la inyección presenta una pequeña úlcera (<5mm de diámetro);
- 3- el lugar de la inyección presenta más de una úlcera o una de más de 5mm de diámetro.

Las puntuaciones de este último parámetro se sumaron a las del protocolo de supervisión de Morton y Griffiths (máximo de 20 puntos) de forma que nuestro protocolo de supervisión completo podía alcanzar un máximo de 23 puntos, de los cuales una puntuación de 18 se consideró como criterio de punto final.

3.1.4 Casuística

El número de animales de cada grupo experimental fue reducido al mínimo imprescindible. Siguiendo las indicaciones del Prof. Montes Suay, Catedrático de Universidad del Dpto. de Estadística e Investigación Operativa de la Facultad de CC. Matemáticas de la Universitat de València, la determinación del número mínimo de ejemplares por grupo experimental se hizo siguiendo el método propuesto por Cohen (1988), de tal forma que se garantizaran unos resultados estadísticamente válidos.

3.1.4.1 Distribución de los animales en los distintos estudios conductuales

3.1.4.1.1 Animales para el estudio de los umbrales de dolor

Para el estudio de los umbrales de dolor mediante el Electrovonfrey Test se emplearon un total de 21 ratas macho. A todas ellas se les administró 1mg/kg al día de reserpina

durante tres días consecutivos para inducirles el modelo de FMS siguiendo el procedimiento descrito por Nagakura et al. 2009. De las 21 ratas, 4 fueron tratadas con placebo (Vehículo, VEH, el cual fue agua común); 11 fueron tratadas con duloxetina (DUL), y 6 fueron tratadas con pregabalina (PGB).

Para el estudio de los umbrales de dolor mediante el Randall and Selitto Test se emplearon un total de 21 ratas macho. A todas ellas se les administró 1mg/kg al día de reserpina durante tres días consecutivos para inducirles el modelo de FMS siguiendo el procedimiento descrito por Nagakura et al. 2009. De las 21 ratas, 4 fueron tratadas con placebo (Vehículo, VEH, el cual fue agua común); 11 fueron tratadas con duloxetina (DUL), y 6 fueron tratadas con pregabalina (PGB).

3.1.4.1.2. Animales para el estudio de los síntomas depresivos

Para el estudio de los síntomas depresivos mediante el Forced Swimming Test se emplearon un total de 24 ratas macho. A todas ellas se les administró 1mg/kg al día de reserpina durante tres días consecutivos para inducirles el modelo de FMS siguiendo el procedimiento descrito por Nagakura et al. 2009. Tras la administración de reserpina, los 24 animales fueron distribuidos en tres condiciones experimentales: 9 recibieron un tratamiento placebo (Vehículo, VEH, el cual fue agua común); 8 fueron tratados con duloxetina (DUL), y 7 fueron tratadas con pregabalina (PGB).

Para el estudio de los síntomas depresivos mediante el Novelty- Suppressed Feeding Test se emplearon un total de 22 ratas macho. A todas ellas se les administró 1mg/kg al día de reserpina durante tres días consecutivos para inducirles el modelo de FMS siguiendo el procedimiento descrito por Nagakura et al. 2009. Tras la administración de reserpina, los 24 animales fueron distribuidos en tres condiciones experimentales: 7 recibieron un tratamiento placebo (Vehículo, VEH, el cual fue agua común); 7 fueron tratados con duloxetina (DUL), y 8 fueron tratados con pregabalina (PGB).

3.1.4.1.3. Resumen de la casuística de los estudios conductuales

ESTUDIO CONDUCTUAL	RESERPINA-VEHÍCULO	RESERPINA-DULOXETNA	RESERPINA-PREGABALINA	TOTAL (FILA)
ELECTROVONFREY TEST	4	11	6	21
RANDALL & SELITTO TEST	4	11	6	21
FORCED SWIMMING TEST	9	8	7	24
NOVELTY-SUPPRESSED FEELING TEST	7	7	8	22

Tabla 3.1.4.1.3.1: Resumen de la casuística del estudio conductual.

3.1.4.2. Animales para el estudio de inmunofluorescencia

Para el estudio mediante inmunofluorescencia se emplearon 40 ratas. Todos los animales recibieron 1 mg/kg de reserpina al día durante 3 días consecutivos, siguiendo el procedimiento descrito por Nagakura et al. Posteriormente, los animales fueron clasificados en 6 condiciones experimentales de la siguiente forma:

- Condición 1 (6 ratas): Reserpina 6 horas (RES-FOS-6H). Este grupo de animales fue perfundido a las 6 horas de la tercera administración de reserpina.
- Condición 2 (6 ratas): Reserpina 5 días (RES-FOS-5D). Este grupo experimental fue perfundido a los 5 días de la tercera administración de reserpina.
- Condición 3 (7 ratas): Reserpina 15 días (RES-FOS-15D). Este grupo experimental fue perfundido a los 15 días de la tercera administración de reserpina.
- Condición 4 (6 ratas): Reserpina 6 horas + *Formalin test* (RES-FOS-FT-6H). A este grupo de animales se les realizó el test de la formalina 2 horas antes de ser perfundidos, es decir, a las 4 horas de la tercera administración de reserpina.
- Condición 5 (8 ratas): Reserpina 5 días + *Formalin test* (RES-FOS-FT-5D). A este grupo se les realizó el test de la formalina a los 5 días de la tercera administración de reserpina, y fueron perfundidos 2 horas después de la realización del test.

-Condición 6 (7 ratas): Reserpina 15 días + *Formalin test* (RES-FOS-FT-15D). A este grupo se les realizó el test de la formalina a los 15 días de la tercera administración de reserpina, y fueron perfundidos 2 horas después de la realización del test.

3.1.4.2.1. Resumen de la casuística del estudio de inmunofluorescencia

ESTUDIO DE INMUNOFLUORESCENCIA	
CONDICIÓN EXPERIMENTAL	Nº ANIMALES
RES-FOS-6H	6
RES-FOS-5D	6
RES-FOS-15D	7
RES-FOS-FT-6H	6
RES-FOS-FT-5D	8
RES-FOS-FT-15D	7
TOTAL	40

Tabla 3.1.4.2.1.1: Resumen de la casuística del estudio de inmunofluorescencia.

3.2 Habitación y Handling

En los cinco primeros días de todos los procedimientos realizados se sometió a los animales a un periodo de habituación al entorno, al investigador y a las maniobras que se le iban a realizar durante el procedimiento experimental, con el objetivo de disminuir el malestar de la rata durante el mismo, así como disminuir el error que pudiese introducir en nuestros resultados la respuesta de estrés (Schmitt y Hiemke, 1998; Butler y Finn, 2009; Yilmaz et al., 2010). Este periodo de habituación difiere en los distintos procedimientos, ya que en cada experimento se debe habituar a los aparatos y maniobras concretas para cada test. En cualquier caso, para todos los animales el inicio de la habituación fue el mismo. En primer lugar, se transportó al animal a la sala de experimentación, y durante los primeros 10 minutos se les dejó en su jaula sobre la mesa para que se acostumbrara al entorno y a la presencia del experimentador. Posteriormente se inició el *handling*, fase durante la cual el animal se acostumbró al

contacto y a la manipulación e inmovilización por parte del investigador.

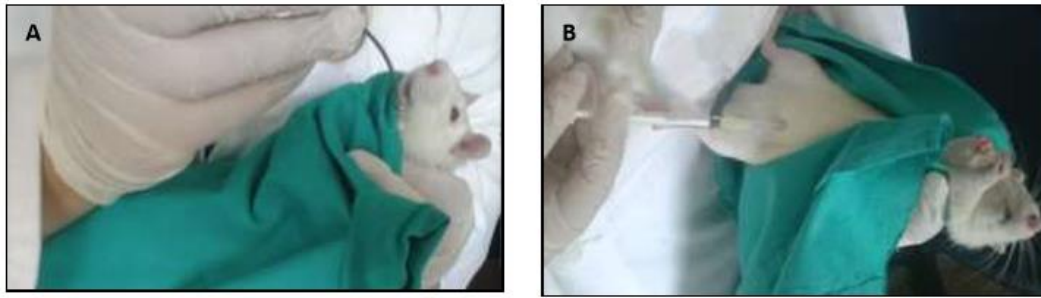


Figura 3.2.1: Habitación a las maniobras de inmovilización para la administración de fármacos, por vía oral (A) e intraperitoneal (B).

3.2.1. Habitación a las maniobras y aparatos en el estudio del dolor

Para los grupos destinados al estudio de medidas conductuales de dolor, se habituó al animal a los aparatos y manipulaciones específicas de su condición experimental. El proceso total de habituación por día para cada rata fue de unos 30 minutos.

3.2.1.1. *Habitación al Electrovonfrey Test*

A los animales del grupo que fueron sometidos al test Electrovonfrey se les alojó en un cilindro de metacrilato sobre una superficie rejada durante 10 minutos cada día tras la fase de *handling* (Figura 3.2.1.1.1).

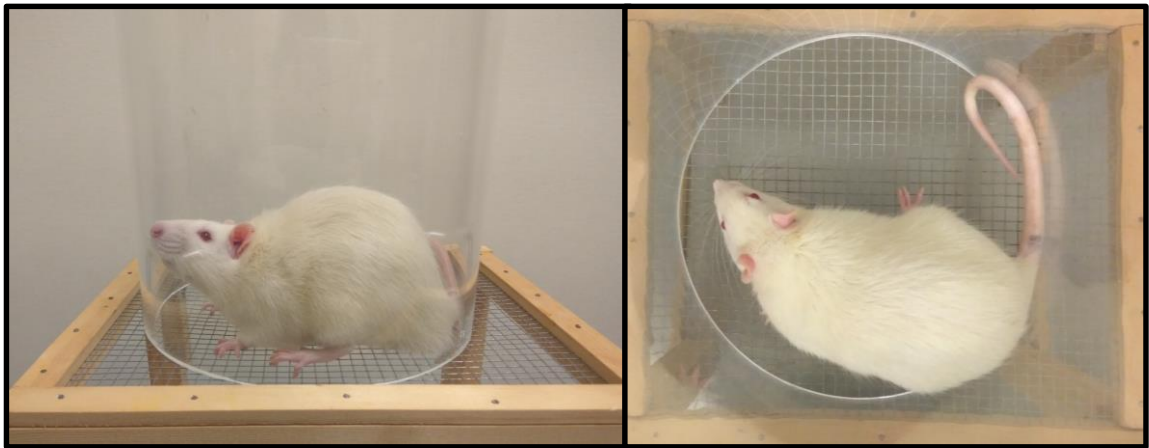


Figura 3.2.1.1.1: Habitación a los test de conducta. Habitación para el Electrovonfrey Test; la rata se encuentra sobre un suelo de rejilla elevado, dentro de un cilindro de metacrilato transparente de 20 cm de diámetro.

3.2.1.2. Habitación al Randall and Selitto Test

Los animales del grupo destinado al test Randall and Selitto fueron habituados a permanecer inmóviles sobre un soporte de tela elevado, sujetas por la parte ventral del cuerpo y con las patas suspendidas a través de agujeros en la tela durante 10 minutos al día tras el periodo de *handling*.

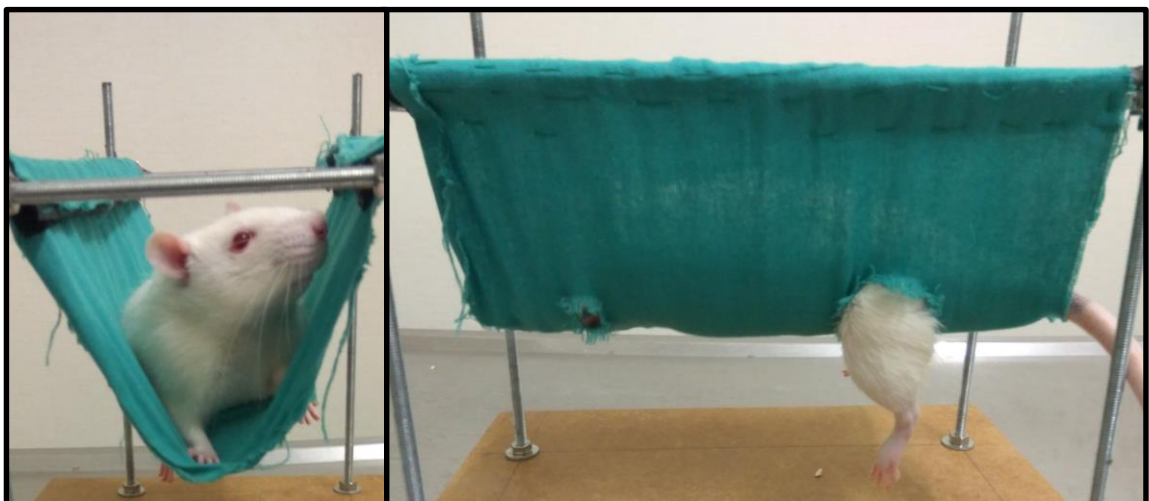


Figura 3.2.1.1: Habitación a los test de conducta. Habitación para el Randall and Selitto Test; la rata se encuentra inmóvil apoyada por la parte ventral del cuerpo sobre un soporte de tela elevado, con las patas suspendidas en el aire a través de agujeros en la tela.

3.2.2. Habitación a las maniobras y aparatos en el estudio de los síntomas depresivos

En los estudios de depresión la novedad al entorno de experimentación es clave, por ello, la habitación se realizó a la manipulación por parte del investigador y a la inmovilización requerida tanto para la administración de reserpina como para la administración de fármaco/vehículo, pero no se expuso al animal en ningún momento previo al test ni al campo abierto utilizado en el Novelty-Suppressed Feeding Test ni al cilindro con agua utilizado en el Forced Swimming Test. El proceso total de habitación por día para cada animal fue de 20 minutos.

3.2.3. Habitación para el estudio de inmunofluorescencia

Los animales empleados para el estudio de inmunofluorescencia fueron habituados al entorno de experimentación y a las manipulaciones e inmovilizaciones por parte del investigador para la inoculación de reserpina. El periodo total de habitación en este grupo de ratas fue de 20 minutos al día para cada animal.

3.3. Administración de reserpina

Después del proceso de habitación, se administró una inyección subcutánea de 1mg/kg de reserpina una vez al día durante tres días consecutivos (Nagakura et al., 2009) a cada uno de los grupos experimentales.

3.3.1 Preparación de la reserpina

La reserpina (Sigma-Aldrich, crystallized, $\geq 99.0\%$ (HPLC)) fue disuelta en ácido acético glacial y diluida en agua destilada hasta una concentración final de 0.5% de ácido acético. La reserpina fue preparada todos los días antes de la administración.

3.4 Administración de fármacos

En el estudio empleamos la duloxetina en forma comercial, en cápsulas de 60 mg (Cymbalta®, Eli Lilly and Company, California). Para la administración de la duloxetina, las cápsulas fueron disueltas en agua, y la mezcla administrada estaba a una concentración de 6mg/ml. La pregabalina también fue usada en su forma comercial, en cápsulas de 150 mg (Lyrica®, Pfizer, Madrid). Para su administración, las cápsulas de pregabalina fueron disueltas en agua, en una disolución de 7,5 mg/ml de pregabalina. Las disoluciones de los fármacos se prepararon cada día. La dosis de elección de cada fármaco fue estipulada por la literatura consultada, siendo establecida en 30 mg/kg diarios para cada fármaco (Kaygisiz et al., 2015; Shibrya et al., 2017), administrados en una única dosis.

La administración de duloxetina (DUL), pregabalina (PGB) o vehículo (agua, VEH) se realizó por vía oral mediante una cánula gastroesofágica curvada de acero con la punta redondeada, del calibre 16 y 75 mm de largo (Fine Science Tools).



Figura 3.4.1: Forma comercial empleada de la duloxetina (Cymbalta®) y de la pregabalina (Lyrica®).

3.5 Procedimientos experimentales

Todos los animales sin excepción pasaron por un proceso de habituación de 5 días seguido por un proceso de reserpización de 3 días (inyección subcutánea de 1mg/kg diaria, descrito por el grupo de Nagakura en 2009). Finalizado estos 8 días y una vez al animal se le ha implantado el modelo de FMS inducido por reserpina, se inician los procedimientos concretos para cada objetivo.

3.5.1. Estudio de dolor

En todos los sujetos del estudio conductual de umbrales de dolor se realizaron las siguientes medidas: Previamente a la administración de reserpina se establecieron los umbrales basales de dolor de cada rata (Línea Base). Estas medidas se realizan con el objetivo de establecer en qué grado la administración de reserpina altera los umbrales de dolor en cada rata específicamente. Este dato es el resultado de calcular la media de dos medidas realizadas en las mismas condiciones en dos días consecutivos, los dos últimos días del periodo de habituación. Cada medida constó de la media de tres mediciones, tomadas con un intervalo interestímulo de 30 segundos, para así reducir el error típico producido tanto por el humano como por el margen de error del instrumental.

Tras la administración de reserpina, los umbrales de dolor se midieron para ambos test los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 posteriores a la última administración de reserpina, que se corresponden con los días del 9 al 23 del estudio. La primera medida evaluó el efecto agudo del fármaco, al tomarse 2 horas después de la primera administración.

Al finalizar la última medida las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico. En estos sujetos no extrajimos ni cerebro ni médula porque la manipulación realizada durante los test alteraría la expresión de marcadores.

En la figura 3.5.1.1 se esquematiza la evolución cronológica de estos procedimientos.

ELECTROVONFREY TEST + RANDALL AND SELITTO TEST



Figura 3.5.1.1: Cronograma del estudio de los umbrales de dolor mediante Electrovonfrey test y Randall and Selitto.

3.5.1.1 Electrovonfrey Test

Empleamos el Electronic Von Frey Test (Electrovonfrey-EVF) para evaluar la alodinia táctil. Cada animal fue colocado sobre un suelo de rejilla elevado, dentro de un cilindro de metacrilato transparente de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura. Mediante el uso del instrumento electrónico de Von Frey (Electrovonfrey, model nº: 2290, IITC Inc. Woodland Hills, CA), el cual consiste en un transductor de fuerza que tiene acoplado una punta rígida de 0.8 mm de diámetro, ejercimos una presión creciente sobre la planta de

la pata trasera derecha de la rata hasta obtener una respuesta de retirada de la misma, teniendo en cuenta que tuviese las cuatro patas apoyadas sobre la rejilla en el momento de la medición (Figura 3.5.1.1.1).

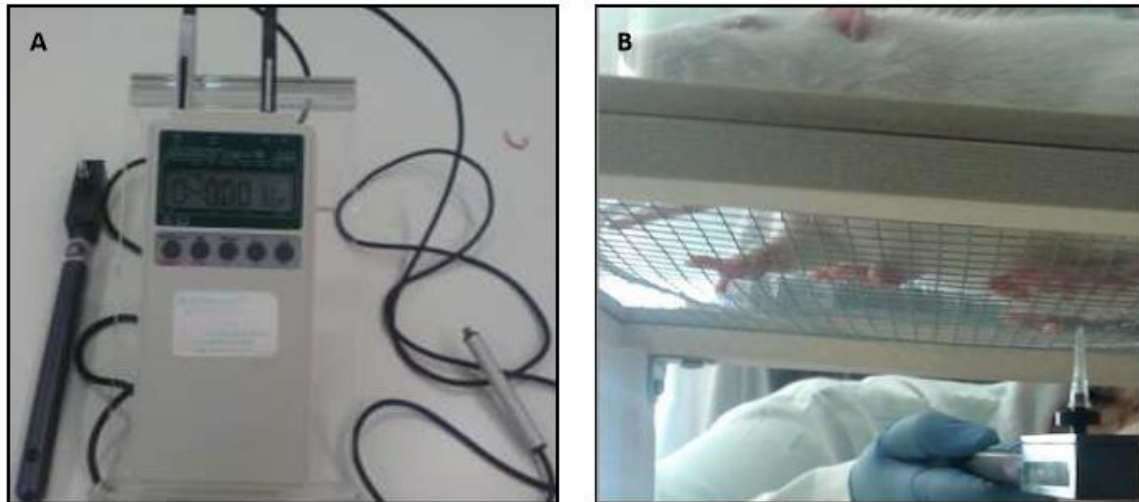


Figura 3.5.1.1.1: (A) Aparato Electronic Von Frey: consta de un transductor de fuerza, una unidad Almemo 2290-4 de registro de datos y un dispositivo de reinicio; (B) Rata sobre la rejilla elevada. La punta rígida unida al transductor de fuerza ejerce presión sobre la pata trasera derecha.

3.5.1.2. Randall and Selitto Test

Empleamos el Randall and Selitto Test adaptado para evaluar síntomas de hiperalgesia mecánica muscular. Para la realización de este test se inmovilizó ligeramente al animal empleando un soporte de tela elevado en el que el animal tenía la parte ventral de su cuerpo sobre la tela y las patas suspendidas en el aire, a través de unos agujeros de la tela destinados a tal fin. Una vez inmovilizado, se ejerció una presión creciente sobre el músculo gastrocnemio de la pata trasera derecha empleando el aparato adaptado de Randall and Selitto (IITC Inc. Woodland Hills, CA), hasta que el animal realizó la conducta de retirada de la pata (Figura 3.5.1.2.1).

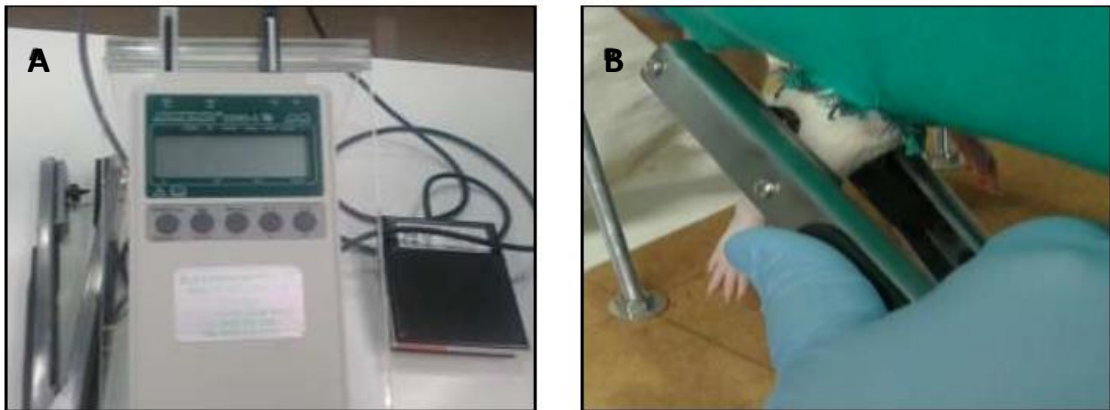


Figura 3.5.1.2.1: (A) Aparato Randall and Selitto adaptado: consta de un transductor de fuerza, una unidad Almemo 2290-4 de registro de datos y un dispositivo de reinicio; (B) Rata sobre el soporte de tela con las patas suspendidas. El transductor de fuerza unido a un aparato en forma de pinza ejerce presión sobre el músculo gastrocnemio la pata trasera derecha.

3.5.2 Estudio de síntomas depresivos

3.5.2.1. Forced Swimming Test

El Forced Swimming Test (FST) fue introducido por primera vez por Porsolt en 1979. Años después, en 1997, Lucki incorporó ciertas modificaciones adecuando el modelo a los antidepresivos de nueva generación. En el presente estudio, el FST se realizó siguiendo las modificaciones propuestas por Lucki, recogidas por Slattery y Cryan en 2012 en un artículo en el que se detallan las indicaciones e instrucciones necesarias para la correcta realización de esta prueba (Slattery y Cryan, 2012).

En los días 4 y 5 posteriores a la última administración de reserpina (días 12 y 13 del experimento), los animales fueron expuestos al FST en dos etapas; Pretest y Test, respectivamente. En el Pretest, las ratas fueron introducidas individualmente en un cilindro transparente de metacrilato de 40 cm de profundidad y 20 cm de diámetro, con 30 cm de agua a 24 ± 2 °C durante 15 minutos. Tras el pretest, se le administró a cada animal su correspondiente dosis de fármaco o vehículo. Veinticuatro horas después, se administró de nuevo una segunda dosis de fármaco o vehículo, y tras dos horas de espera necesarias para la absorción del fármaco tras una administración oral, se realizó

el Test, en el que las ratas fueron sometidas a las mismas condiciones durante 5 minutos. Al finalizar los procedimientos, los animales fueron sacados del agua, secados y devueltos a sus jaulas. El cilindro fue vaciado y vuelto a llenar con agua limpia a 24 ± 2 °C para cada rata. Ambos procedimientos fueron grabados en vídeo desde una visión superior y otra lateral (Figura 3.5.2.1.1).

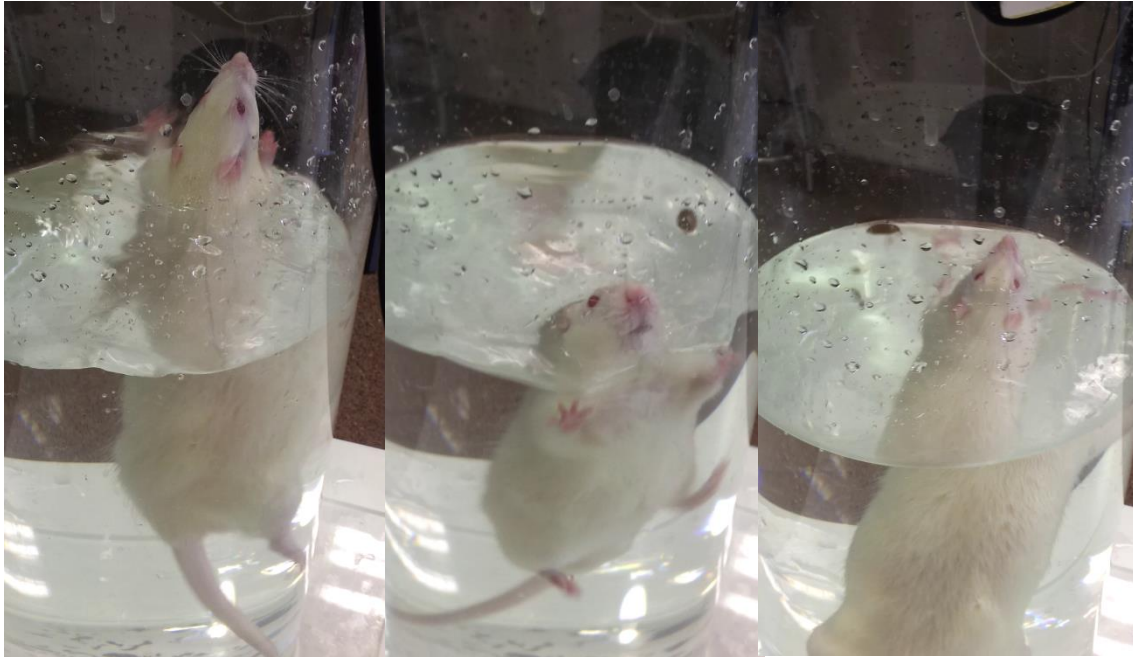


Figura 3.5.2.1.1: Visión lateral del Forced Swimming Test. De izquierda a derecha pueden verse representadas las conductas de inmovilidad, escalar y nadar.

Los vídeos de Pretest y Test fueron analizados siguiendo un método de muestreo de tiempo. La conducta de la rata fue registrada cada 5 segundos, clasificándola en una de estas tres conductas: Nadar (movimientos horizontales a través del cilindro con las patas); Escalar (movimientos verticales con las patas contra la pared del cilindro); o Inmovilidad (inmovilidad total o movimientos con las patas necesarios para mantener la nariz fuera del agua, únicamente). Los resultados fueron expresados en un Índice de Conductas, es decir, la cantidad de medidas asignadas a cada conducta, de un total de 60 (Test) o 180 (Pretest).

La medida de conductas fue realizada por dos investigadores diferentes, empleando la metodología de ciego para la condición experimental del animal (desconociendo si pertenecían al grupo experimental o control). Los investigadores fueron entrenados antes del análisis de los vídeos, y se calculó una fiabilidad entre jueces del 90%.

FORCED SWIMMING TEST

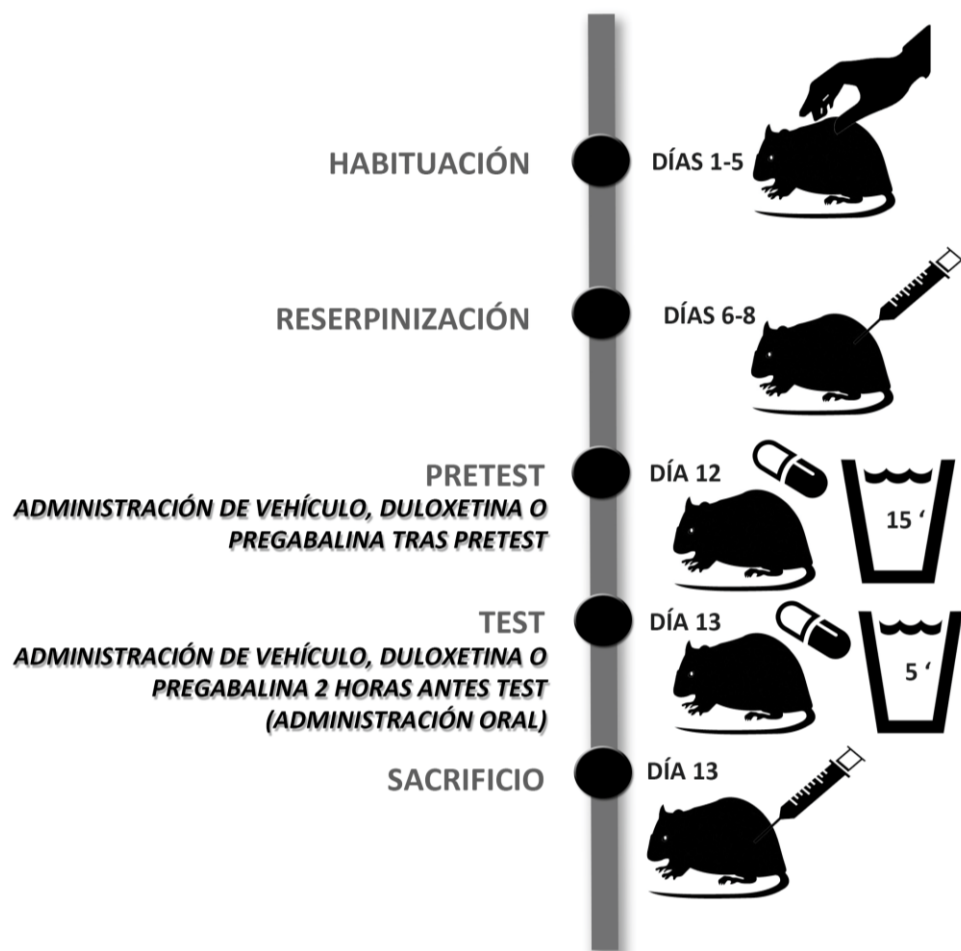


Figura 3.5.2.1.2: Cronograma del estudio de los síntomas depresivos a corto plazo mediante FST.

3.5.2.2 *Novelty-suppressed feeding test*

A los grupos de animales destinados al NSFT se les alimentó con pellets estándar que previamente habían sido sumergidos en una solución de agua con sacarosa al 50% durante unos segundos, con el objetivo de incrementar su palatabilidad y deseabilidad. La cantidad de comida ingerida por cada rata fue registrada diariamente desde el inicio del periodo de habituación, pesándola todas las mañanas antes de empezar los procedimientos (Blasco-Serra et al., 2015; Blasco et al., 2017).

Antes de la realización del test, los animales fueron sometidos a un periodo de restricción alimentaria, dividido en dos etapas. En la primera etapa (días 11 y 12 de administración de fármaco, correspondientes a los días 19 y 20 del experimento) la comida fue reducida al 80% de la media del consumo registrado durante los cinco días de habituación. En la segunda etapa (las 24 horas previas al test, día 21 de experimento) la comida fue reducida al 20% (Blasco-Serra et al., 2015; Blasco et al., 2017). Los animales tuvieron acceso libre al agua durante todo el procedimiento.

Los animales fueron introducidos en un campo abierto consistente en una caja de metacrilato negra (100cm x 100 cm x 40 cm) con el suelo cubierto de serrín, el cual se renovaba para cada animal. En el centro de la caja se colocó una placa Petri sobre una pequeña plataforma blanca, donde se introdujeron pellets enriquecidos con sacarosa al 50%. El centro de la caja estuvo altamente iluminado (1.000 lúmenes), mientras que la intensidad de luz en el perímetro del campo fue de 800 lúmenes. El resto de la sala permaneció a oscuras. Todo el procedimiento fue grabado en vídeo (Figura 3.5.2.2.1).

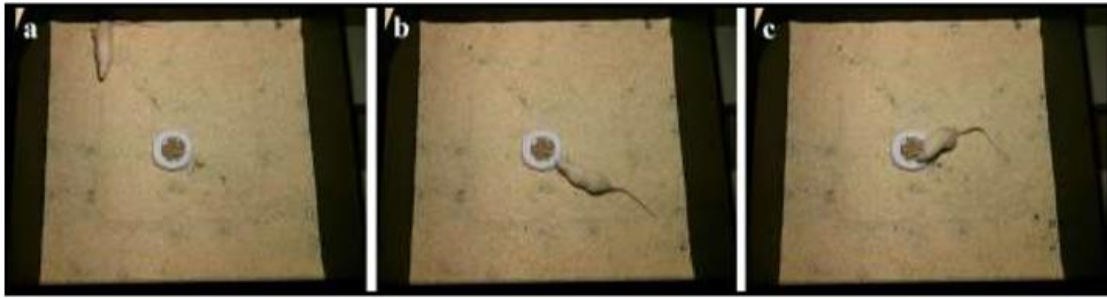


Figura 3.5.2.2.1: Novelty- Suppressed Feeding Test. La rata se colocó en una esquina del campo abierto (a) al inicio del test. La rata se acercó a la plataforma central (b) y olió y tocó la comida (c) durante el test. La prueba finalizó cuando comieron del centro por primera vez, o pasados 10 minutos si el animal no come.

Las ratas fueron colocadas en una esquina del campo abierto y se registraron los siguientes parámetros: (1) veces por minuto que el animal se acercó a la comida (tocó la plataforma blanca donde se encontraba la placa Petri con la comida); (2) veces por minuto que la rata olió y tocó, pero no comió, la comida; (3) tiempo transcurrido hasta que el animal comió de la comida del centro. Se estableció un tiempo máximo de 10 minutos por rata. Para controlar que las diferencias en el tiempo transcurrido hasta el consumo de comida en el test entre los grupos experimentales eran debidas a la presencia de síntomas depresivos y no a efectos directos de la reserpina sobre el apetito de las ratas, después del episodio de consumo de comida, o en su defeco transcurridos los 10 minutos, los animales fueron devueltos a sus jaulas y llevados a la sala de estabulación, donde inmediatamente se les proporcionó una ración controlada de comida y se registraron dos parámetros: (1) el tiempo que tardó el animal en empezar a comer en su jaula, y (2) la cantidad de comida que el animal comió durante 10 minutos posteriores al test (Blasco-Serra et al., 2015; Blasco et al., 2017).

NOVELTY-SUPPRESSED FEEDING TEST

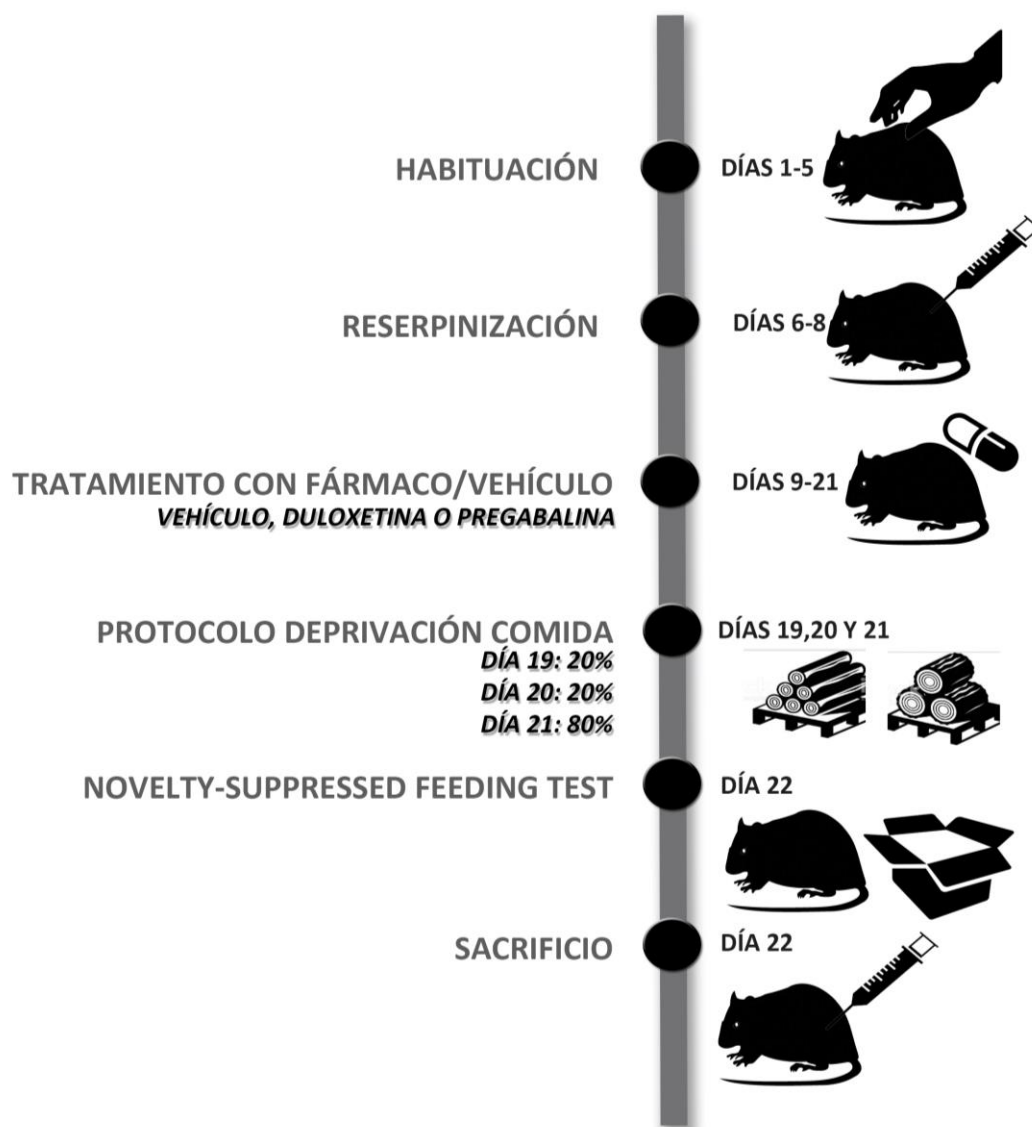


Figura 3.5.2.2.2: Cronograma del estudio de los síntomas depresivos a largo plazo mediante NSFT.

3.5.3 Estudio de inmunofluorescencia

3.5.3.1. Perfusión

El procedimiento de perfusión se inició con una sobredosis i.p. de pentobarbital sódico. Se comenzaron las maniobras propias del proceso de perfusión cuando el animal estuvo profundamente anestesiado (ausencia de reflejo corneal), y con el corazón todavía en activo. Las perfusiones se realizaron mediante acceso transcardíaco, con un primer lavado del árbol vascular con suero salino isotónico heparinizado (15000UI/l) seguido de una solución fijadora de paraformaldehído al 4%. Todo el proceso de anestesia y perfusión en ningún caso sobrepasó los 15 minutos de duración, para evitar la inducción iatrogénica de c-fos por efecto de la manipulación previa o de la propia anestesia (Herdegen et al., 1991; Takayama et al., 1994).

3.5.3.2. Tratamiento del tejido tras su extracción

Al finalizar la perfusión, el encéfalo y la porción lumbar de la médula espinal fueron extraídos y conservados a 4°C en la misma solución fijadora durante dos horas. Transcurrido ese tiempo, las muestras se pasaron a una solución crioprotectora a base de sacarosa al 30% en PBS (*Phosphate Buffered Saline*), en la cual permanecieron hasta que se hundieron (48-72 horas). Una vez crioprotegidas, las piezas se congelaron y seccionaron con un criostato en cortes coronales de 40µm de grosor distribuidos en 6 series equivalentes que se conservaron a -17°C hasta su utilización.

3.5.3.3 Colocalización por fluorescencia de c-fos y Tirosina Hidroxilasa (TH)

El estudio de la activación cerebral y su caracterización anatomo-funcional se realizó mediante una detección inmunohistoquímica fluorescente con doble marcaje. La inmunodetección se efectuó sobre el gen de expresión temprana c-fos, y sobre la enzima tirosina hidroxilasa, precursora del neurotransmisor noradrenalina, con el fin de determinar si las neuronas fos-positivas eran de naturaleza noradrenérgica.

El protocolo de inmunodetección fue realizado en *free-floating*. En primer lugar, se lavó el tejido (tres lavados de cinco minutos a temperatura ambiente) con una solución de TBS 0.05M (*tris buffer saline*) con Tritón X-100 al 0.1% para eliminar los restos de sacarosa procedentes de la crioprotección. Antes de la incubación de los anticuerpos primarios, el tejido se mantuvo una hora a temperatura ambiente en una solución de bloqueo de TBS 0.05M con Tritón X-100 al 0.1%, 2% de BSA (*bobine serum albumina*) y 10% de NGS (*normal goat serum*). Para la incubación de los anticuerpos primarios se empleó una solución de TBS 0.05M con Tritón X-100 al 0.1%, y 2% de NGS, a la que se le añadieron los anticuerpos primarios *guinea pig polyclonal anti-Fos* 1:500 (226 004, Synaptic Systems, Germany) y *mouse monoclonal anti-Tyrosine Hidroxylase* 1:5000 (T1299, Sigma-Aldrich, USA). El proceso de incubación duró al menos 48 horas y se mantuvo a 4°C. Tras la incubación de los anticuerpos primarios se realizaron tres lavados de cinco minutos a temperatura ambiente con una solución de TBS 0.05M y Tritón X-100 al 0.1%, y se procedió al revelado. Los anticuerpos secundarios empleados fueron *Alexa Fluor 568 goat anti-guinea pig* (A-11075, Thermo Fisher Scientific, USA) y *Alexa Fluor 488 goat anti-mouse* (A-11029, Thermo Fisher Scientific, USA). Este paso se realizó en TBS 0.05M y duró tres horas, mantenido a temperatura ambiente y en oscuridad. Al finalizar el protocolo de inmunodetección, el tejido fue lavado con TBS 0.05M, los cortes se montaron secuenciados en porta objetos de cristal con tratamiento de polilisina (Thermo Scientific, Braunschweig, Germany), y se cubrieron con *Vectashield Mounting medium for fluorescence with DAPI* (H-1200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Durante todo el proceso posterior al revelado el tejido estuvo protegido de la luz directa.

3.5.3.4 Análisis de Imagen

Con la ayuda de un atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos y Watson, 2013) se seleccionaron las fotografías de los centros noradrenérgicos Locus Coeruleus (LC), A5 y A7 y de las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal, empleando un microscopio Axioscope A1 de Carl Zeiss para epifluorescencia con combinación de luz transmitida. Las imágenes para el estudio fotográfico fueron capturadas mediante una

cámara Axiocam MRC refrigerada de alta resolución acoplada al microscopio. El conteo de células fos-positivas y th-positivas se realizó con el programa ImageJ, empleando un conteo por área. Para ello, se fusionaron con Photoshop CS5 las plantillas de los núcleos a estudiar extraídas del atlas de estereotaxia usado anteriormente y las fotografías de los cortes seleccionados. Tras una separación de canales de color, se calculó el porcentaje de área total del núcleo que ocupaban las células th-positivas y las células fos-positivas, y por último, se calculó el porcentaje de área de ambos marcadores que colocalizaba. Por otra parte, el conteo de las células fos-positivas existentes en las láminas I y II de la médula espinal fue por partículas y no por área.

Para nuestro estudio sólo se consideraron aquellas células claramente marcadas. Esto se consiguió ajustando previamente los parámetros del programa de análisis Image J. En caso de corrección manual del ImageJ, se mantuvo siempre el mismo criterio de exclusión o inclusión con todos los ejemplares del experimento.

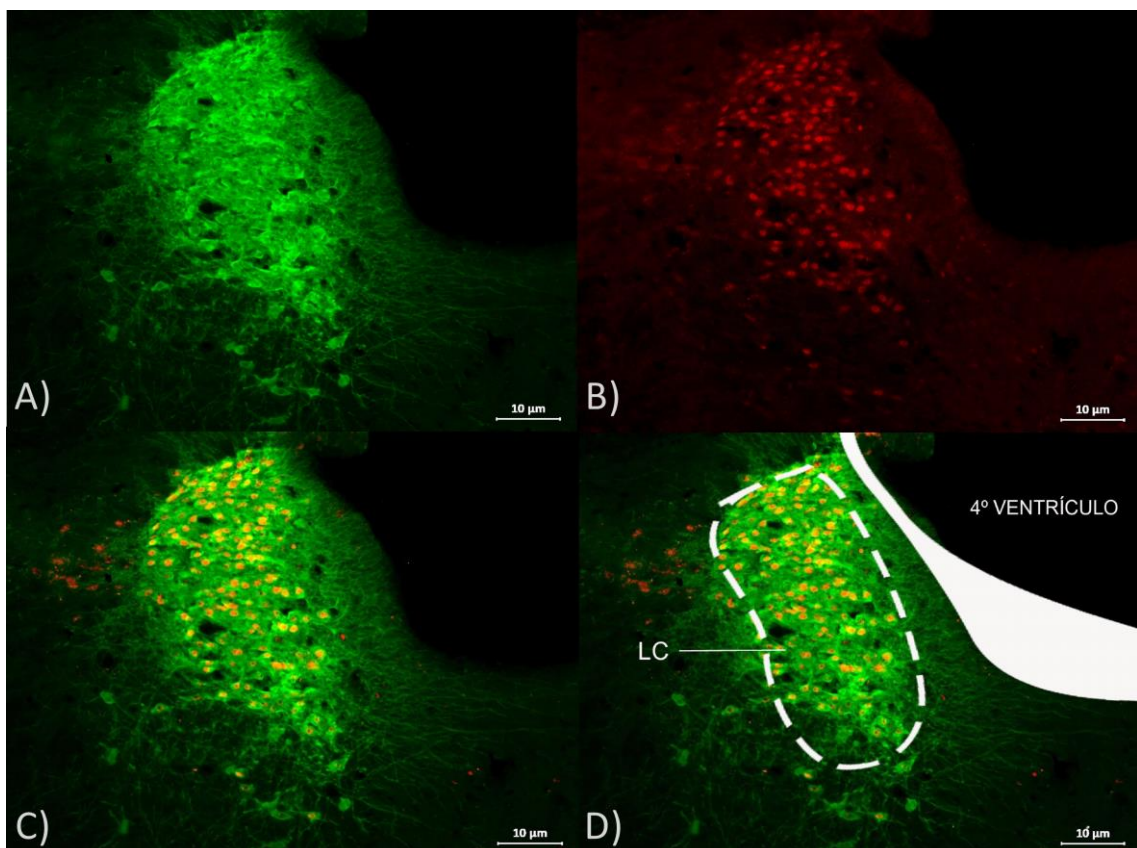


Figura 3.5.3.4.2: Imágenes del estudio de inmunofluorescencia de Locus Coeruleus. A) Imagen del marcaje de neuronas TH-positivas. B) Imagen del marcaje de núcleos activos (células fos-positivas). C) Canales TH- y Fos-positivos unidos D) Canales unidos con plantilla incrustada, tomada de Watson y Patxinos, 2013.

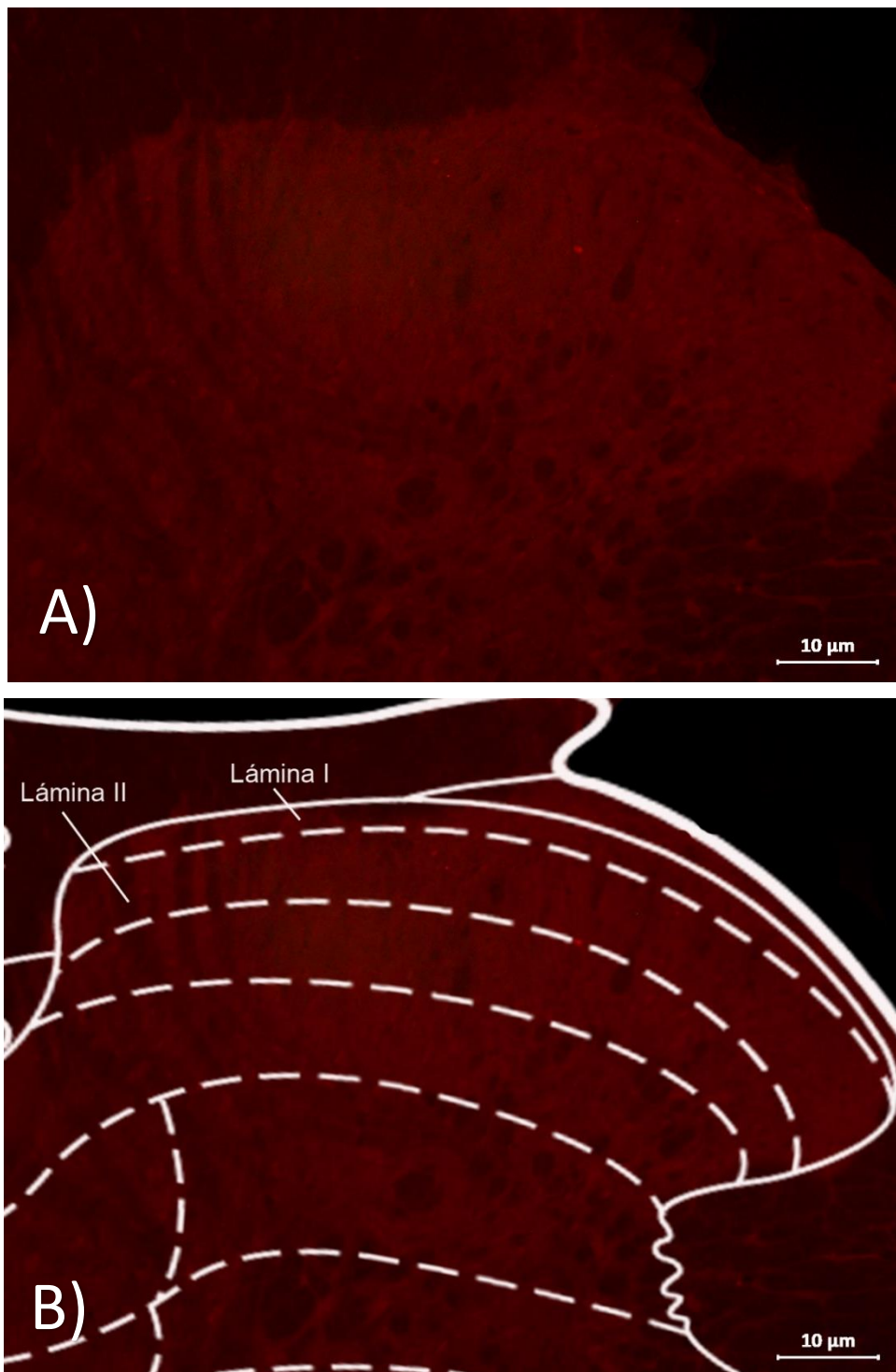


Figura 3.5.3.4.2: Imágenes del estudio de inmunofluorescencia con marcaje de Fos en el nivel L4/L5. A) Imagen sin plantilla. B) Imagen con plantilla, tomada de Watson y Patxinos, 2013.

3.6 Análisis estadístico

3.6.1. Análisis estadístico del estudio de dolor

Para el análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se utilizó SPSS v.22 (IBM). Se analizaron por separado las medidas obtenidas con el Electrovonfrey Test y las obtenidas con el Randall and Selitto Test.

Cada dato obtenido empleando estos test es el resultado de la media de tres medidas registradas con 30 segundos interestímulo. Para obtener las medidas basales de los umbrales de dolor de cada rata se realizaron dos mediciones de umbrales en dos días consecutivos previos a la administración de reserpina.

Todas las medidas registradas mediante el Electrovonfrey Test y el Randall and Selitto Test fueron normalizadas para cada sujeto respecto a su línea base (la media de las dos medidas de umbrales basales), para obtener las variaciones en el umbral perceptivo de cada rata en función de su nivel basal.

En ambos casos el análisis estadístico se inició con un estudio descriptivo de los datos, que incluía la media, el intervalo de confianza para la media al 95%, la varianza, la desviación típica, la asimetría y la curtosis.

Tras analizar los descriptivos, se analizó la normalidad de la muestra con el test Shapiro-Wilk, indicado para muestras menores de 30 casos, y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levène, para determinar el estadístico más apropiado para el estudio de comparaciones entre los grupos.

Las comparaciones de los umbrales de dolor entre los grupos tratados con reserpina-vehículo (RES-VEH) respecto a los grupos tratados con reserpina-duloxetina (RES-DUL) y reserpina-pregabalina (RES-PGB) se realizaron por separado para los días de tratamiento 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de administración de fármaco. Para la comparativa se empleó el análisis de varianza para un factor (ANOVA), para muestras independientes. Si el supuesto de normalidad no pudo cumplirse, se utilizó un test no paramétrico análogo al test ANOVA de un factor, el test Kruskal-Wallis para muestras independientes, con su correspondiente post-hoc de comparación por pares. Se consideró un nivel de significación de $p < 0,05$ para determinar la existencia de diferencias estadísticamente

significativas. A continuación, se realizó el correspondiente análisis post-hoc de Bonferroni para los datos que poseían homogeneidad de varianzas y de Games-Howell para los que no poseían homogeneidad de varianzas, de esta forma se determinó si existían diferencias significativas en la variación de respuesta entre las diferentes condiciones experimentales y se pudo analizar entre qué condiciones esas diferencias eran más significativas.

Cada comparación se acompañó de un gráfico de barras para observar las diferencias de los umbrales de dolor entre los grupos, y se incorporó al final de cada apartado un gráfico que incluía las comparaciones entre grupos de los cuatro días de medida. En cada gráfico se muestran barras de error señalando ± 2 en el error estándar de la media (SEM).

3.6.2 Análisis estadístico del estudio de depresión

3.6.2.1 Análisis estadístico del Forced Swimming Test

Para el análisis estadístico y la representación gráfica se utilizó SPSS v.22 (IBM).

Se analizaron los datos obtenidos en la fase de test. La conducta de la rata fue registrada cada 5 segundos, clasificándola en una de estas tres conductas: Nadar, Escalar o Inmovilidad. Los resultados fueron expresados en un Índice de Conductas, es decir, la cantidad de medidas asignadas a cada conducta, de un total de 60.

El análisis estadístico se inició con un estudio descriptivo de los datos, que incluía la media, el intervalo de confianza para la media al 95%, la desviación típica, la asimetría y la curtosis.

Tras analizar los descriptivos, se analizó la normalidad de la muestra con el test Shapiro-Wilk, indicado para muestras menores de 30 casos, y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene, para determinar el estadístico más apropiado para el estudio de comparaciones entre los grupos.

Se realizaron comparaciones entre RES-VEH, RES-DUL y RES-PGB en las conductas de nadar, escalar e inmovilidad por separado. Para la comparativa se empleó el análisis de varianza de un factor ANOVA para muestras independientes en el caso de que la

muestra presentase normalidad, aunque no se pudiese asumir homogeneidad de varianzas, ya que este test se considera robusto a pesar de la ausencia de homogeneidad. A continuación, se realizó el correspondiente análisis post-hoc de Bonferroni para los datos que poseían homogeneidad de varianzas y de Games-Howell para los que no poseían homogeneidad de varianzas, de esta forma se determinó si existían diferencias significativas en la variación de respuesta entre las diferentes condiciones experimentales y se pudo analizar entre qué condiciones esas diferencias eran más significativas.

Cada comparación se acompañó de un gráfico de barras para observar las diferencias de los umbrales de dolor entre los grupos, y se incorporó al final de cada apartado un gráfico que incluía las comparaciones entre grupos de las tres conductas. En cada gráfico se muestran barras de error señalando ± 2 en el error estándar de la media (SEM).

3.6.2.2 Análisis estadístico del Novelty-suppressed feeding test

Para el análisis estadístico y la representación gráfica se utilizó SPSS v.22 (IBM). Los parámetros analizados en el NSFT fueron los siguientes:

- Comida ingerida en el período de la habituación
- Comida ingerida el día previo a la primera deprivación
- Tiempo en el que come por primera vez en el NSFT (Latencia en comer)
- Veces por minuto que se acerca a la plataforma blanca del centro del test
- Veces por minuto que huele y toca la comida en el test
- Tiempo en el que come al ser devuelto a su jaula (Latencia en comer en jaula)
- Cantidad de comida ingerida en 10 minutos al ser devuelto a su jaula

El análisis estadístico se inició con un estudio descriptivo de los datos, que incluía la media, el intervalo de confianza para la media al 95%, la desviación típica, la asimetría y la curtosis.

Tras analizar los descriptivos, se analizó la normalidad de la muestra con el test Shapiro-Wilk, indicado para muestras menores de 30 casos, y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene, para determinar el estadístico más apropiado para el estudio de comparaciones entre los grupos.

Se realizaron comparaciones entre los grupos RES-VEH, RES-DUL y RES-PGB cada uno de los parámetros anteriormente mencionados. Para la comparativa se empleó el estadístico ANOVA de un factor para muestras independientes en el caso de que la muestra presentase normalidad, aunque no se pudiese asumir homogeneidad de varianzas, ya que este test se considera robusto a pesar de la ausencia de homogeneidad. A continuación, se realizó el correspondiente análisis post-hoc de Bonferroni para los datos que poseían homogeneidad de varianzas y de Games-Howell para los que no poseían homogeneidad de varianzas, de esta forma se determinó si existían diferencias significativas en la variación de respuesta entre las diferentes condiciones experimentales y se pudo analizar entre qué condiciones esas diferencias eran más significativas.

En los casos en los que la muestra no presentó normalidad, se realizó la prueba no paramétrica correspondiente, análoga al ANOVA de un factor: la prueba Kruskal-Wallis, con un análisis por pares post-hoc.

En el caso de la comparación de las ingestas de comida, se empleó un test T de Student para muestras independientes entre la media de ingesta de comida del período de habituación y la cantidad de comida ingerida el día previo a la primera privación, con el objetivo de no encontrar diferencias que pudiesen hacer caer al sistema de retirada progresiva de alimento y asegurar que ningún animal estuviese pasando por un período de anorexia causado o bien por la reserpina o bien por el tratamiento farmacológico.

Se consideró un nivel de significación de $p < 0,05$ para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Cada comparación se acompañó de un gráfico de barras para observar las diferencias de los umbrales de dolor entre los grupos, y se incorporó al final de cada apartado un gráfico que incluía las comparaciones entre grupos de todos los parámetros en conjunto. En cada gráfico se muestran barras de error señalando ± 2 en el error estándar de la media (SEM).

3.6.3 Análisis estadístico del estudio inmunohistoquímico

Para el análisis se utilizó SPSS v.22 (IBM). El análisis estadístico se inició con un estudio descriptivo de los datos, en el cual se han incluido el número total de casos, la media, el error típico de la media y la desviación típica.

Tras analizar los descriptivos, se analizó la normalidad de la muestra con el test Kolmogorov-Smirnov, indicado para muestras mayores de 30 casos, y con el test Shapiro-Wilk, indicado para muestras menores de 30 casos. La homogeneidad de varianzas se realizó mediante el test de Levene, para determinar el estadístico más apropiado para el estudio de comparaciones entre los grupos.

En referencia a la estadística inferencial, en primer lugar se compararon los datos obtenidos del conteo del porcentaje de área de los núcleos pertenecientes a células TH-positivas y células fospositivas y su colocalización de los grupos experimentales a los que no se le había aplicado una condición de dolor inflamatorio mediante el test de la formalina, para observar los cambios en los patrones de activación en diferentes momentos del tiempo; y de los grupos experimentales a los que sí se le había aplicado una condición de dolor inflamatorio mediante el test de la formalina para observar los cambios en los patrones de activación en diferentes momentos del tiempo ante la existencia de un dolor inflamatorio agudo. En otras palabras, se compararon entre sí los grupos a los que se les sometió al modelo de FMS inducido por reserpina tras 6 horas de la última administración de reserpina, 5 días y 15 días; y del mismo modo se compararon entre sí los grupos a los que se les sometió al modelo de FMS inducido por reserpina (y a los que se les aplicó dolor inflamatorio agudo mediante el test de la formalina tras 6 horas de la última administración de reserpina, 5 días y 15 días. Para ello, se efectuó un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, con análisis post-hoc de Bonferroni para los datos que poseían homogeneidad de varianzas y de Games-Howell para los que no poseían homogeneidad de varianzas, de esta forma se determinó si existían diferencias significativas. Para los datos que no cumplían el supuesto de normalidad se empleó un test no paramétrico análogo al análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, llamado análisis de Kruskal-Wallis.

En segundo lugar, se ha comparado cada momento (6 horas tras la última administración de reserpina, 5 días y 15 días) de las dos condiciones experimentales (sin aplicación del test de la formalina y con aplicación del test de la formalina) para comprobar si había diferencias estadísticamente significativas entre ellas, es decir, para ver si la implantación de este modelo también plantea una alteración en los núcleos noradrenérgicos supramedulares ante la existencia de dolor inflamatorio agudo en el modelo de FMS. Para ello, se empleó un test T de Student de muestras independientes. Para los datos que no cumplían los supuestos de normalidad se empleó un es no paramétrico análogo al test T de Student de muestras independientes, el test U de Mann-Whitney para muestras independientes.

En último lugar, se ha analizado el número de células fospositivas existentes en la médula tras una aplicación de dolor inflamatorio agudo (test de la formalina) en diferentes momentos (tras 6 horas de la última administración de reserpina, 5 días y 15 días) para comprobar si por el paso del tiempo desde que se implantó el modelo se encuentra más o menos dolor en la médula. Para ello, se empleó un test T de Student de muestras independientes. Para los datos que no cumplían los supuestos de normalidad se empleó un es no paramétrico análogo al test T de Student de muestras independientes, el test U de Mann-Whitney para muestras independientes. En este apartado también se ha analizado si existen diferencias estadísticamente significativas entre las astas medulares posteriores ipsilateral y contralateral al Test de la Formalina, independientemente de su condición experimental mediante un test ANOVA de medidas repetidas con un factor intersujeto.

Se consideró un nivel de significación de $p < 0,05$ para determinar la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Cada comparación se acompañó de un gráfico de barras para observar las diferencias entre las diferentes condiciones experimentales. En cada gráfico se muestran barras de error señalando ± 2 en el error estándar de la media (SEM).

04

RESULTADOS

4.1 Resultados de las medidas de los umbrales del dolor

4.1.1 Electrovnofrey Test

En la Tabla 4.1.1.1 se muestran los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos en el estudio de los umbrales de dolor mediante Electrovnofrey test. Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo I.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
EVF día 1	21	,8487	,18253	,055	,501	-,634	,972
EVF día 3	21	,7278	,17406	-,819	,501	,439	,972
EVF día 5	21	,7444	,16028	-,389	,501	,837	,972
EVF día 7	21	,8105	,15798	-,505	,501	-,506	,972
EVF día 9	21	,7989	,12440	-,405	,501	-,804	,972
EVF día 11	21	,7844	,12962	-1,089	,501	1,963	,972
EVF día 13	21	,8429	,17579	-,536	,501	-,204	,972
EVF día 15	21	,7752	,13406	-,880	,501	1,061	,972
N válido	21						

Tabla 4.1.1.1. Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de los umbrales de dolor referentes a la alodinia táctil, obtenidas los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de tratamiento con fármaco o vehículo con el Electrovnofrey Test. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad *Shapiro-Wilk* para muestras inferiores a 30 casos indica normalidad en todos los casos, exceptuando en el grupo RES-PGB el día 11 de tratamiento (EVF día 11) ($W=0,657$; $p<0,05$), probablemente debido a un pequeño aumento de variabilidad que se exagera al manejar muestras pequeñas (Tabla 4.1.1.2). Por ello, en el análisis inferencial de esta variable utilizaremos un test no paramétrico adecuado para este caso.

Pruebas de normalidad

Condición experimental		Shapiro-Wilk		
EVF día 1	RES-DUL	,901	11	,188
	RES-VEH	,873	4	,309
	RES-PGB	,916	6	,478
EVF día 3	RES-DUL	,931	11	,420
	RES-VEH	,980	4	,902
	RES-PGB	,937	6	,638
EVF día 5	RES-DUL	,940	11	,515
	RES-VEH	,918	4	,525
	RES-PGB	,829	6	,106
EVF día 7	RES-DUL	,937	11	,487
	RES-VEH	,838	4	,189
	RES-PGB	,900	6	,372
EVF día 9	RES-DUL	,941	11	,536
	RES-VEH	,998	4	,993
	RES-PGB	,897	6	,355
EVF día 11	RES-DUL	,944	11	,571
	RES-VEH	,926	4	,572
	RES-PGB	,657	6	,002
EVF día 13	RES-DUL	,945	11	,575
	RES-VEH	,977	4	,881
	RES-PGB	,968	6	,880
EVF día 15	RES-DUL	,927	11	,383
	RES-VEH	,991	4	,965
	RES-PGB	,965	6	,861

Tabla 4.1.1.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en el registro de umbrales de dolor mediante EVF test los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de tratamiento con fármaco o vehículo. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Se observa que únicamente en la variable EVF día 11, el grupo RES-PGB no cumple el supuesto de normalidad. Significación $p<0,05$.

Utilizamos el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas. El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas en general. Encontramos una excepción en el primer día de tratamiento (EVF día 1) ($F=3,871$; $p<0,05$). Esto no afectará a la estadística inferencial puesto que el análisis ANOVA se considera robusto para la homogeneidad de varianzas, pero sí al análisis post-hoc, en el cual utilizaremos la corrección de Games-Howell, indicada cuando no pueden asumirse varianzas homogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
EVF día 1	Se basa en la media	3,871	2	18	,040
EVF día 3	Se basa en la media	1,814	2	18	,192
EVF día 5	Se basa en la media	2,935	2	18	,079
EVF día 7	Se basa en la media	,502	2	18	,614
EVF día 9	Se basa en la media	,140	2	18	,870
EVF día 11	Se basa en la media	,334	2	18	,721
EVF día 13	Se basa en la media	2,713	2	18	,093
EVF día 15	Se basa en la media	,677	2	18	,521

Tabla 4.1.1.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en el registro de umbrales de dolor mediante EVF test los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de tratamiento con fármaco o vehículo. El estadístico empleado es Levene. Se puede observar que la variable EVF día 1 no cumple el supuesto de homogeneidad de la varianza. Significación $p<0,05$.

En cuanto al estudio inferencial, se realiza un análisis de varianzas ANOVA de un factor para muestras independientes para la comparación de los grupos RES-VEH, RES-DUL y RES-PGB en cada uno de los días de registro por separado. Para comprobar los grupos entre los cuales hay diferencias se ha empleado la prueba post-hoc de Bonferroni cuando se asumía homogeneidad de varianzas, y la corrección de Games-Howell cuando no se podía asumir homogeneidad de varianzas. En el caso de la variable EVF día 11, la cual registra los umbrales de dolor el decimoprimer día de tratamiento, al no poder asumirse el supuesto de normalidad, hemos empleado un test no paramétrico análogo a ANOVA de un factor, el conocido test Kruskal-Wallis para muestras independientes, con su correspondiente post-hoc de comparación por pares.

4.1.1.1 Primer día de tratamiento (EVF día 1)

Este registro se realiza tras dos horas de la primera dosis de fármaco o vehículo, así que podemos considerarlo como la medida del efecto de una dosis aguda de fármaco tras la implantación del modelo de dolor. El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=8,093$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.1.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Games-Howell (por el fallo en homogeneidad de varianzas en esta variable). Como podemos observar en la tabla 4.1.1.1.2, la diferencia estadísticamente significativa la presenta el grupo RES-DUL frente al grupo RES-VEH ($p<0,05$). El grupo RES-PGB no muestra diferencias estadísticamente significativas con ninguno de los grupos. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.1.1.1.

ANOVA

EVF día 1

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,316	2	,158	8,093	,003
Dentro de grupos	,351	18	,019		
Total	,666	20			

Tabla 4.1.1.1.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor mediante EVF test del día 1 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=8,093$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Games-Howell

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
RES-DUL	RES-VEH	,32423*	,07851	,009	,0981	,5503
	RES-PGB	,12724	,05794	,106	-,0240	,2785
RES-VEH	RES-DUL	-,32423*	,07851	,009	-,5503	-,0981
	RES-PGB	-,19699	,06587	,078	-,4242	,0302
RES-PGB	RES-DUL	-,12724	,05794	,106	-,2785	,0240
	RES-VEH	,19699	,06587	,078	-,0302	,4242

Tabla 4.1.1.1.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Games-Howell. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura 4.1.1.1.1 muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina respecto a las tratadas con vehículo en el primer día de administración de fármaco/vehículo e inmediatamente después del último día del período de reserpinización ($F=8,093$; $p<0,05$). Sin embargo, vemos que las ratas tratadas con Pregabalina, aunque muestran una tendencia a aumentar los umbrales del dolor, esta diferencia no es significativa respecto a las ratas tratadas con vehículo ($p>0,05$).

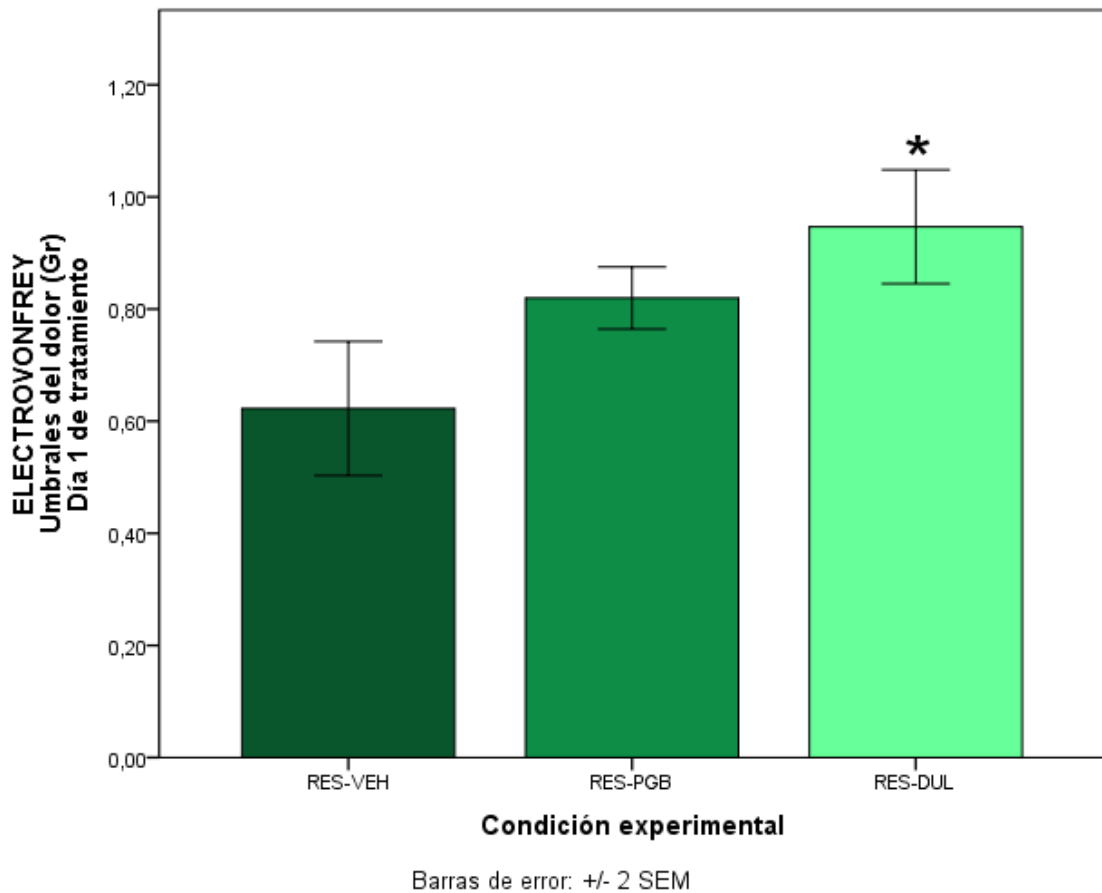


Figura 4.1.1.1.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el primer día de tratamiento, es decir, tras dos horas de la primera administración del fármaco. * Significación $p<0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2. Aunque el grupo RES-PGB no muestra diferencias significativas con RES-VEH, se aprecia una tendencia a aumentar los umbrales del dolor, y prueba de ello es que tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas con el grupo RES-DUL.

4.1.1.2 Tercer día de tratamiento (EVF día 3)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=22,575$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.2.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni. Como podemos observar en la tabla 4.1.1.2.2, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.1.2.1.

ANOVA

EVF día 3

	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,433	2	,217	22,575	,000
Dentro de grupos	,173	18	,010		
Total	,606	20			

Tabla 4.1.1.2.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 3 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=22,575$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Bonferroni RES-DUL	RES-VEH	,34378*	,05720	,000	,1928	,4947
	RES-PGB	-,05045	,04972	,971	-,1817	,0808
RES-VEH	RES-DUL	-,34378*	,05720	,000	-,4947	-,1928
	RES-PGB	-,39423*	,06323	,000	-,5611	-,2274
RES-PGB	RES-DUL	,05045	,04972	,971	-,0808	,1817
	RES-VEH	,39423*	,06323	,000	,2274	,5611

Tabla 4.1.1.2.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura 4.1.1.2.1 muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina y en las tratadas con Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el tercer día de administración de fármaco/vehículo ($F=22,575$; $p<0,05$).

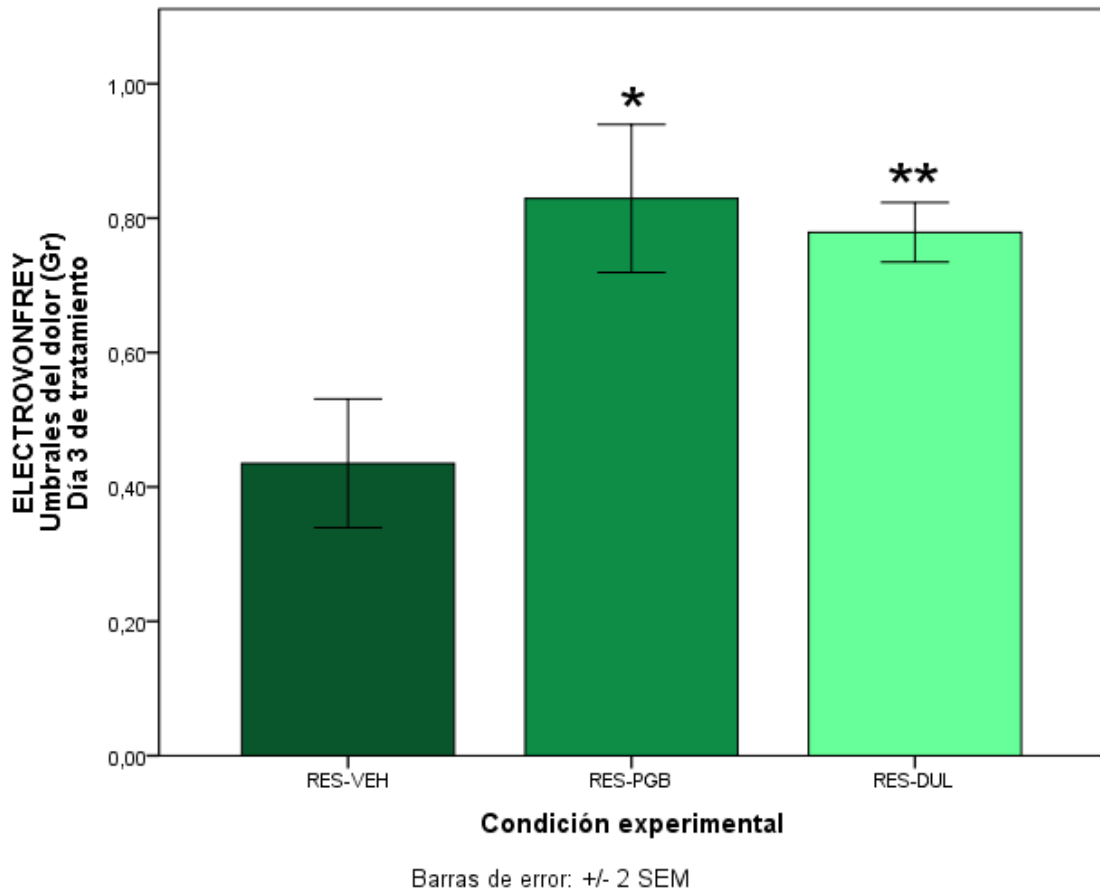


Figura 4.1.1.2.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el tercer día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.1.3 Quinto día de tratamiento (EVF día 5)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=11,926$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.3.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni. Como podemos observar en la tabla 4.1.1.3.2, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.1.3.1.

ANOVA

EVF día 5

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,293	2	,146	11,926	,001
Dentro de grupos	,221	18	,012		
Total	,514	20			

Tabla 4.1.1.3.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 5 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=11,926$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: EVF día 5

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Bonferroni RES-DUL	RES-VEH	,31578 [*]	,06469	,000	,1450	,4865
	RES-PGB	,07569	,05623	,585	-,0727	,2241
RES-VEH	RES-DUL	-,31578 [*]	,06469	,000	-,4865	-,1450
	RES-PGB	-,24009 [*]	,07152	,011	-,4288	-,0513
RES-PGB	RES-DUL	-,07569	,05623	,585	-,2241	,0727
	RES-VEH	,24009 [*]	,07152	,011	,0513	,4288

Tabla 4.1.1.3.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura 4.1.1.3.1 muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina y en las tratadas con Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el quinto día de administración de fármaco/vehículo ($F=11,926$; $p<0,05$).

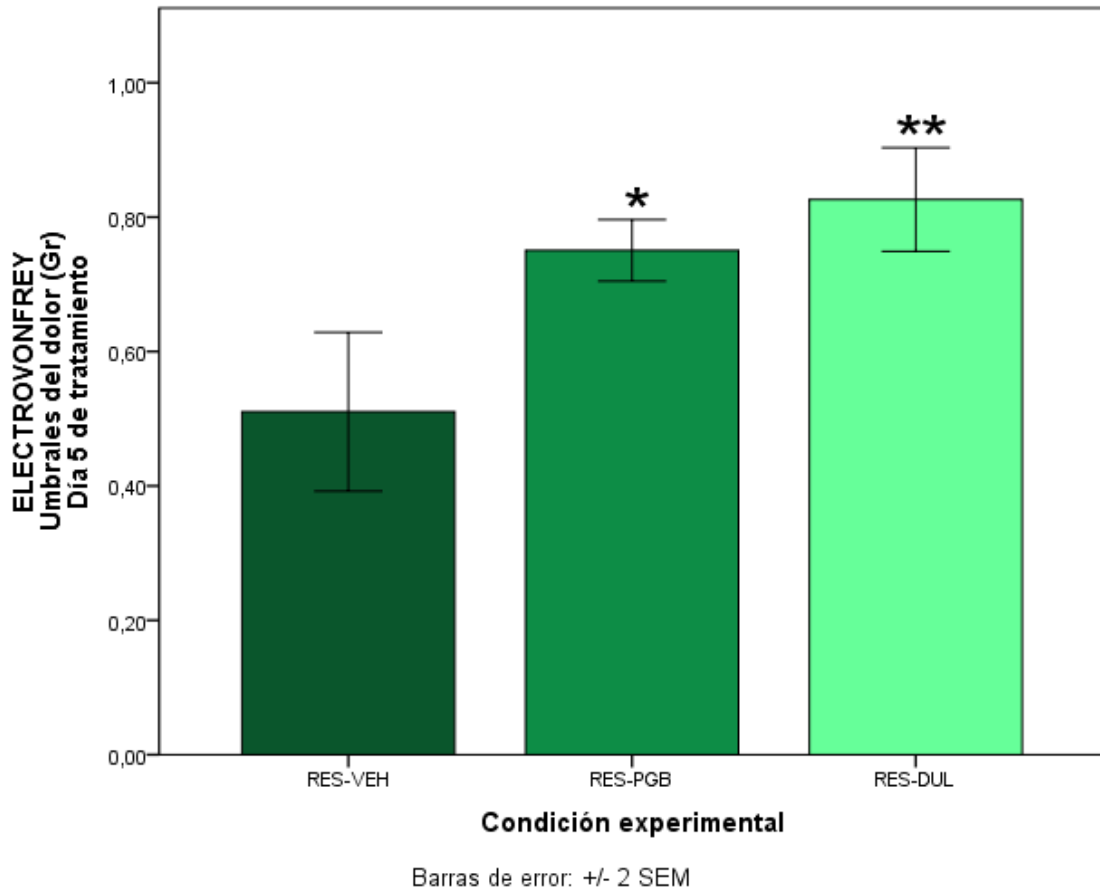


Figura 4.1.1.3.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el quinto día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.1.4 Séptimo día de tratamiento (EVF Día 7)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=7,249$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.4.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni. Como podemos observar en la tabla 4.1.1.4.2, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.1.4.1.

ANOVA

EVF día 7

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,223	2	,111	7,249	,005
Dentro de grupos	,276	18	,015		
Total	,499	20			

Tabla 4.1.1.4.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 7 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=7,249$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Bonferroni RES-DUL	RES-VEH	,25465*	,07236	,007	,0637	,4456
	RES-PGB	-,01911	,06290	1,000	-,1851	,1469
RES-VEH	RES-DUL	-,25465*	,07236	,007	-,4456	-,0637
	RES-PGB	-,27377*	,08000	,009	-,4849	-,0626
RES-PGB	RES-DUL	,01911	,06290	1,000	-,1469	,1851
	RES-VEH	,27377*	,08000	,009	,0626	,4849

Tabla 4.1.1.4.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura 4.1.1.4.1 muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina y en las tratadas con Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el séptimo día de administración de fármaco/vehículo ($F=7,249$; $p<0,05$).

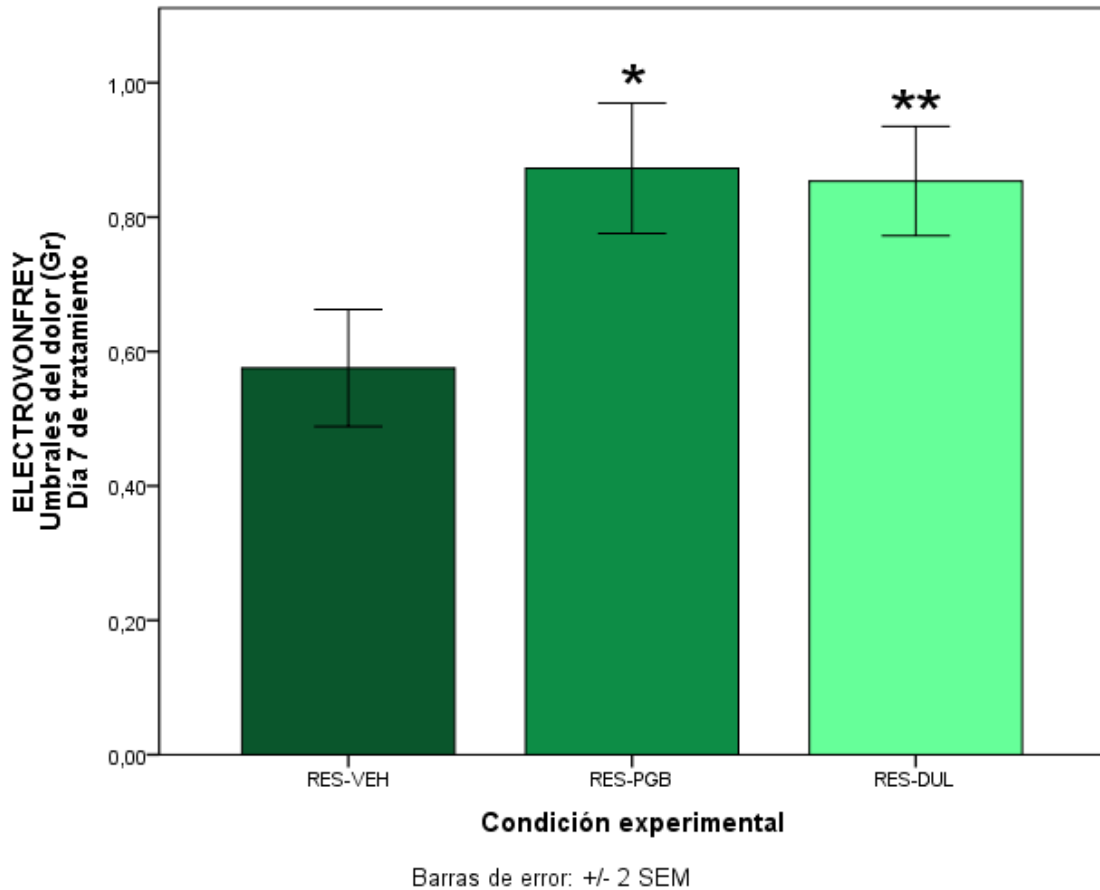


Figura 4.1.1.4.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el séptimo día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.1.5 Noveno día de tratamiento (EVF día 9)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=6,827$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.5.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni. Como podemos observar en la tabla 4.1.1.5.2, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.1.5.1.

ANOVA

EVF día 9

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,134	2	,067	6,827	,006
Dentro de grupos	,176	18	,010		
Total	,310	20			

Tabla 4.1.1.5.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 9 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=6,827$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Bonferroni RES-DUL	RES-VEH	,17793*	,05774	,019	,0256	,3303
	RES-PGB	-,04993	,05019	,999	-,1824	,0825
RES-VEH	RES-DUL	-,17793*	,05774	,019	-,3303	-,0256
	RES-PGB	-,22786*	,06383	,007	-,3963	-,0594
RES-PGB	RES-DUL	,04993	,05019	,999	-,0825	,1824
	RES-VEH	,22786*	,06383	,007	,0594	,3963

Tabla 4.1.1.5.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura 4.1.1.5.1 muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina y en las tratadas con Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el noveno día de administración de fármaco/vehículo ($F=6,827$; $p<0,05$).

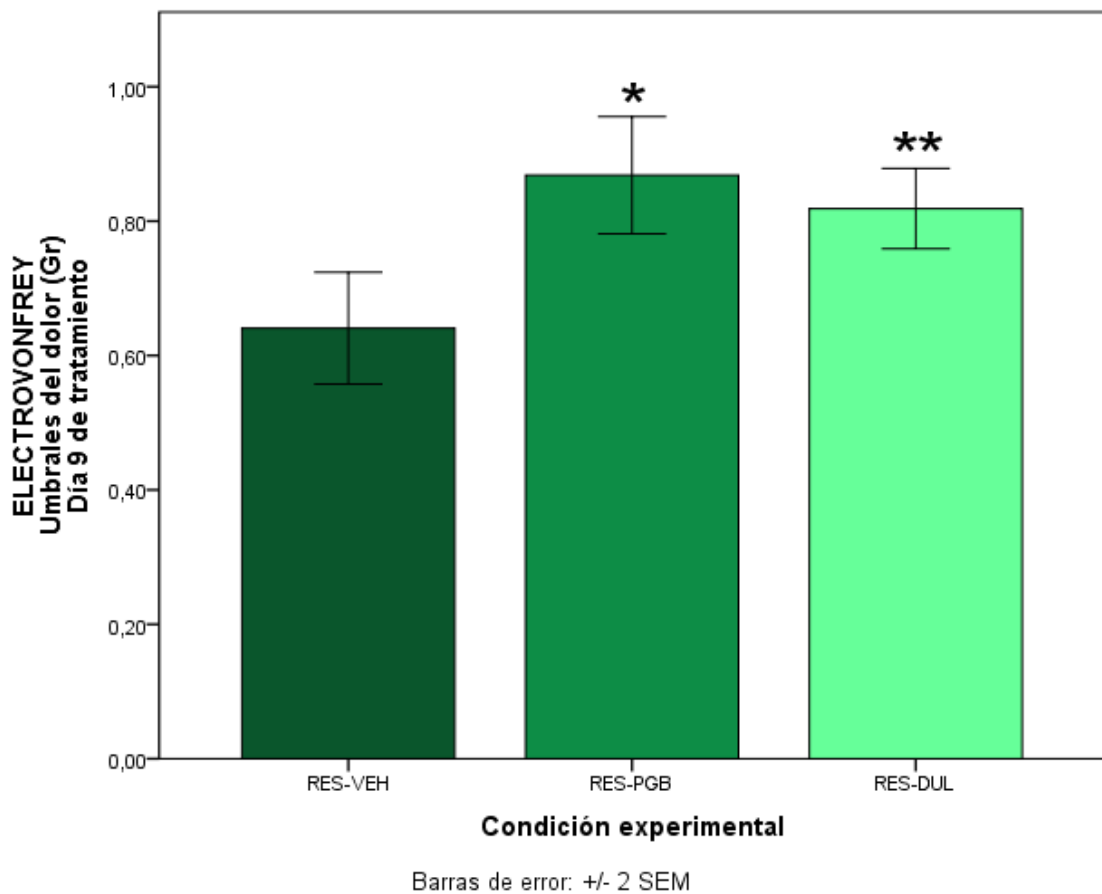


Figura 4.1.1.5.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el noveno día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.1.6 Decimoprimer día de tratamiento (EVF día 11)

En este caso, al perder la normalidad de la muestra hemos optado por el test no paramétrico análogo al ANOVA de un factor, el test Kruskal-Wallis para muestras independientes, con su correspondiente post-hoc por pares. El test evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$) (Tabla 4.1.1.6.1). El análisis post-hoc de comparación por pares (tabla 4.1.1.6.2), muestra que, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.1.6.1.

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de EVF day 11 Norm es la misma entre las categorías de Condición experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,009	Rechace la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,

Tabla 4.1.1.6.1: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 11 de tratamiento con fármaco o vehículo. $p < 0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de prueba	Estándar Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajust.
RES-VEH-RES-PGB	-10,333	3,986	-2,593	,010	,029
RES-VEH-RES-DUL	10,591	3,605	2,938	,003	,010
RES-PGB-RES-DUL	,258	3,134	,082	,934	1,000

Tabla 4.1.1.6.2: Comparaciones por pares post-hoc al Kruskal-Wallis para el test Electrovonfrey en el decimoprimer día de tratamiento. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p < 0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p < 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.1.6.1) muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina y en las tratadas con Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el decimoprimer día de administración de fármaco/vehículo ($p < 0,05$).

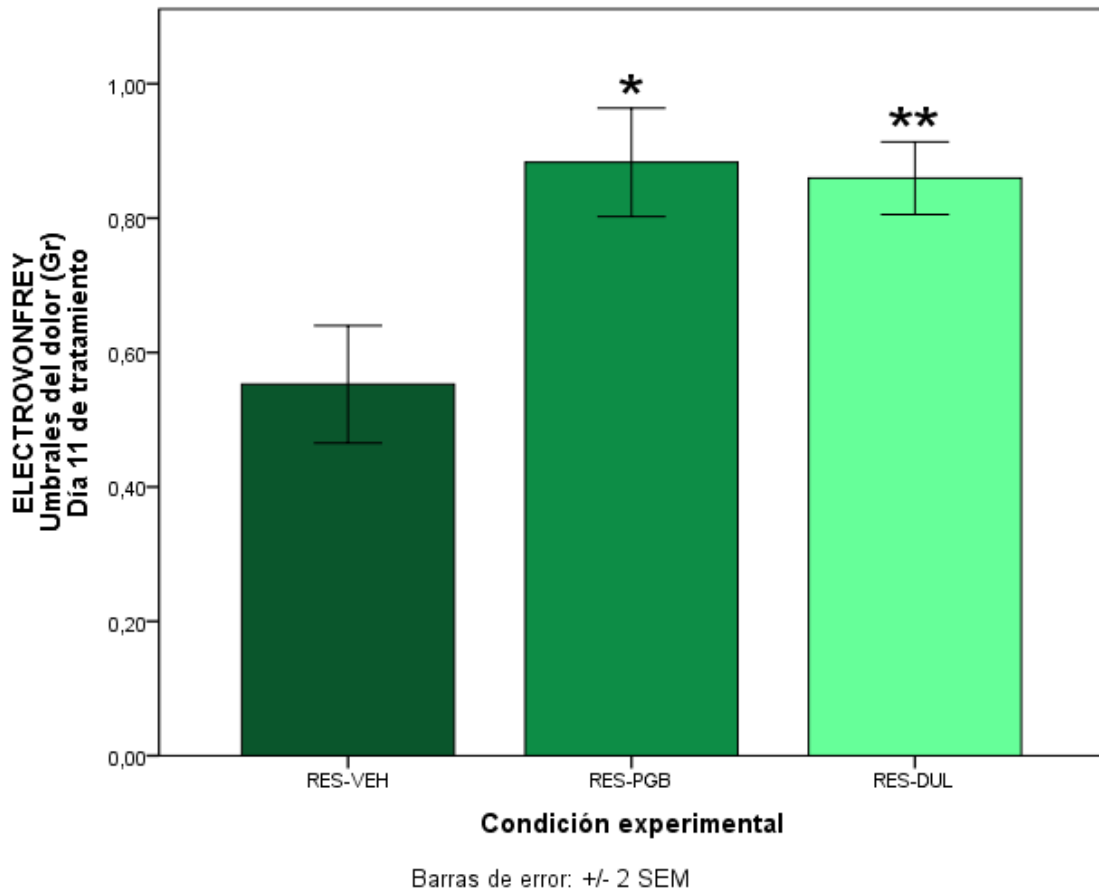


Figura 4.1.1.6.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el decimoprimer día de tratamiento. * Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.1.7 Decimotercer día de tratamiento (EVF día 13)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=21,343$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.7.1). El análisis post-hoc de Bonferroni (tabla 4.1.1.7.2), muestra que, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.1.7.1.

ANOVA

EVF día 13

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,402	2	,201	21,343	,000
Dentro de grupos	,170	18	,009		
Total	,572	20			

Tabla 4.1.1.7.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 13 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=21,343$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: EVF día 13

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Bonferroni RES-DUL	RES-VEH	,36273*	,05667	,000	,2132	,5123
	RES-PGB	,03536	,04926	1,000	-,0946	,1654
RES-VEH	RES-DUL	-,36273*	,05667	,000	-,5123	-,2132
	RES-PGB	-,32738*	,06265	,000	-,4927	-,1620
RES-PGB	RES-DUL	-,03536	,04926	1,000	-,1654	,0946
	RES-VEH	,32738*	,06265	,000	,1620	,4927

Tabla 4.1.1.7.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (Figura 4.1.1.7.1) muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina y en las tratadas con Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el decimotercer día de administración de fármaco/vehículo ($F=21,343$; $p<0,05$).

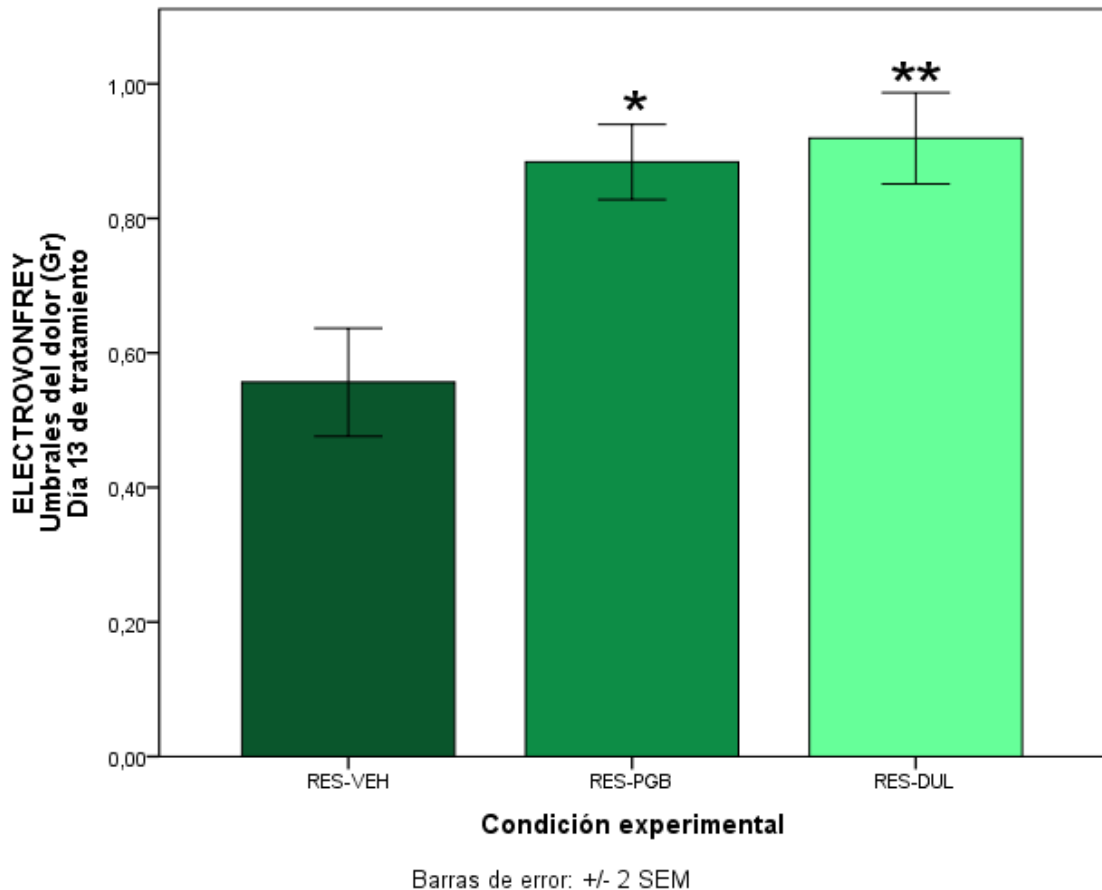


Figura 4.1.1.7.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el decimotercer día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.1.8 Decimoquinto día de tratamiento (EVF día 15)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=9,524$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.8.1). El análisis post-hoc de Bonferroni (tabla 4.1.1.8.2), muestra que, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.1.8.1.

ANOVA

EVF día 15

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,185	2	,092	9,524	,002
Dentro de grupos	,175	18	,010		
Total	,359	20			

Tabla 4.1.1.8.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 15 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=9,524$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: EVF día 15

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Bonferroni RES-DUL	RES-VEH	,22421*	,05751	,003	,0724	,3760
	RES-PGB	-,03354	,04999	1,000	-,1655	,0984
RES-VEH	RES-DUL	-,22421*	,05751	,003	-,3760	-,0724
	RES-PGB	-,25776*	,06358	,002	-,4256	-,0900
RES-PGB	RES-DUL	,03354	,04999	1,000	-,0984	,1655
	RES-VEH	,25776*	,06358	,002	,0900	,4256

Tabla 4.1.1.8.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.1.8.1) muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina y en las tratadas con Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el decimoquinto día de administración de fármaco/vehículo ($F=9,524$; $p<0,05$).

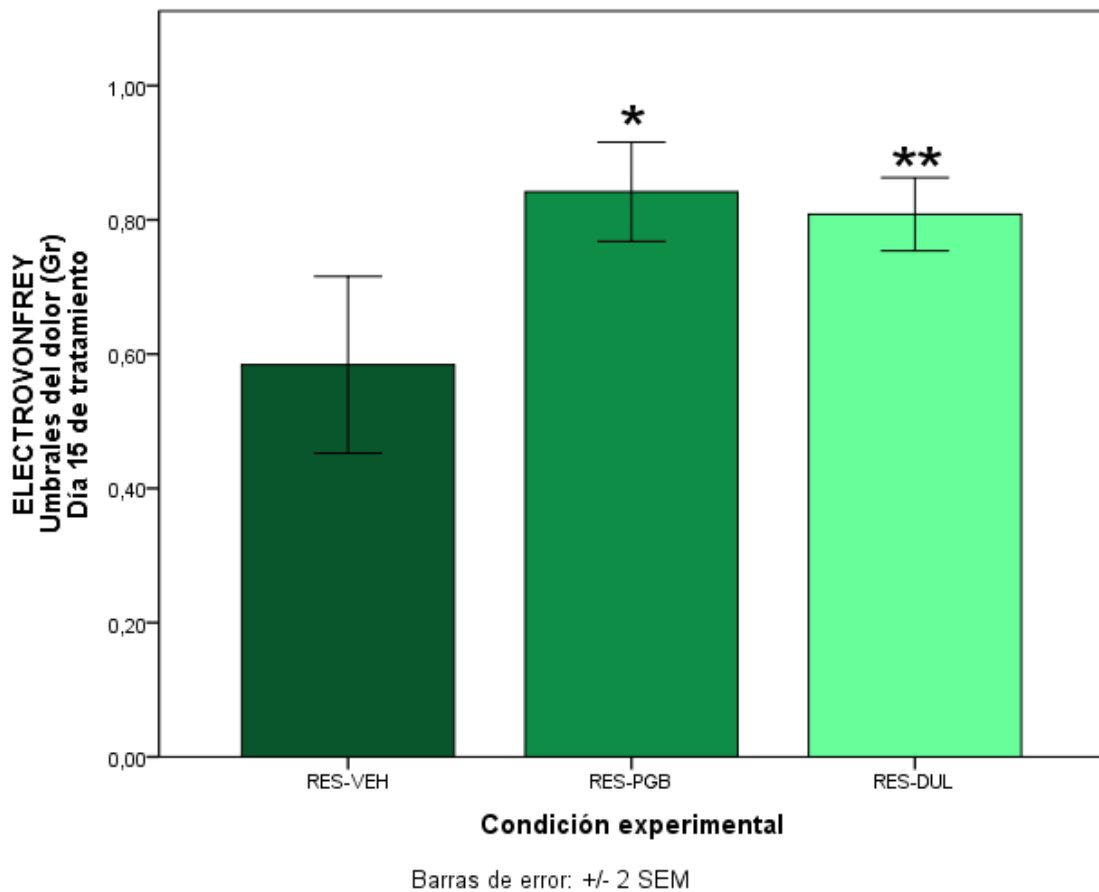


Figura 4.1.1.8.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el decimotercer día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.1.9 Variación global de los umbrales de dolor en alodinia táctil

La Figura 4.1.1.9.1 muestra las variaciones de los umbrales de dolor halladas entre los grupos tratados con fármaco respecto del grupo tratado con vehículo a lo largo de los días de registro medidas con el Electrovonfrey test.

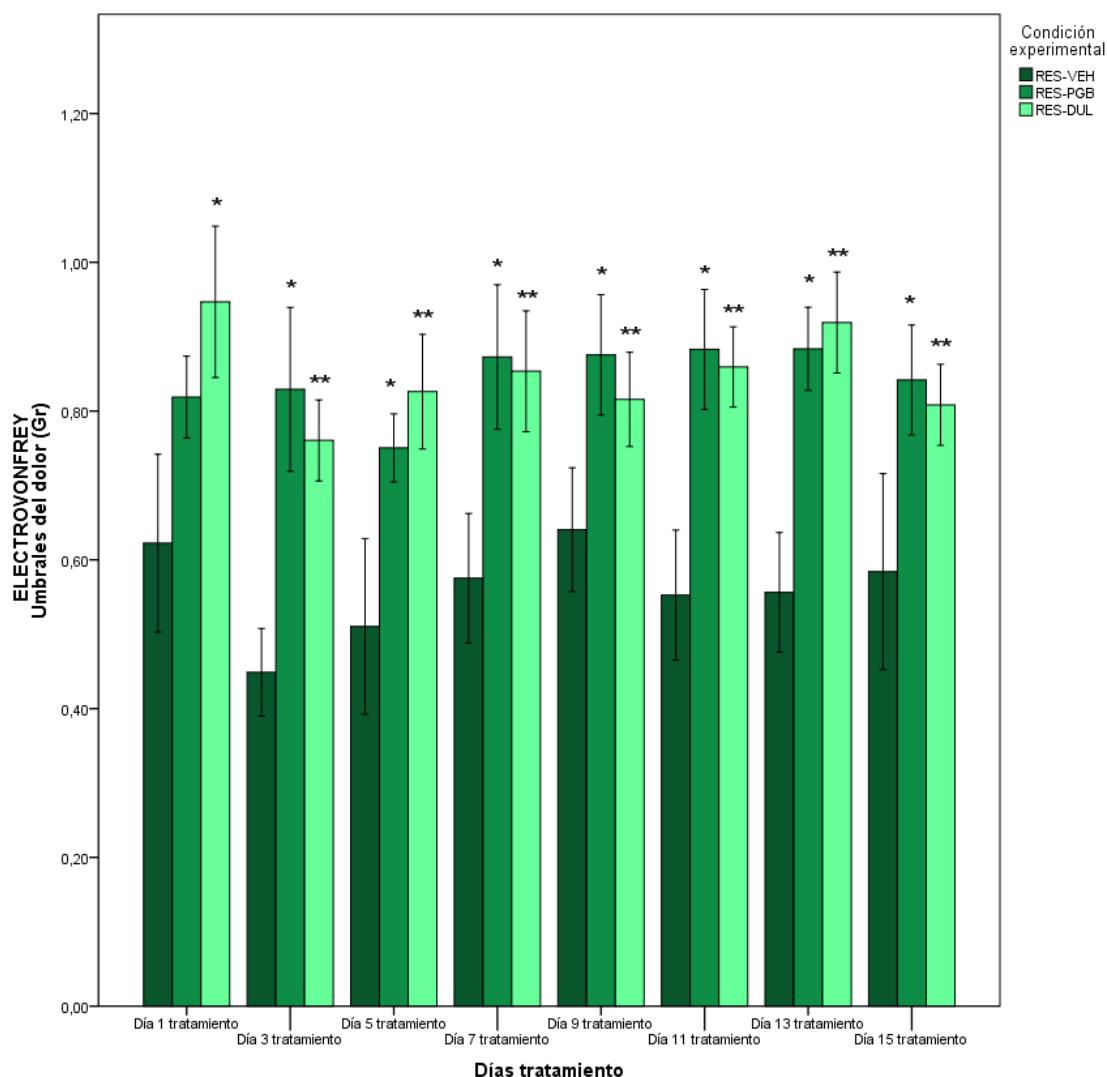


Figura 4.1.1.9.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo global de los umbrales de dolor referentes a la alodinia táctil en las ratas tratadas con Duloxetina o Pregabalina respecto a las ratas tratadas con vehículo en los días 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de tratamiento. Sin embargo, en el primer día de tratamiento, la "dosis aguda de fármaco", sólo el tratamiento con Duloxetina muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a las tratadas con vehículo. *Significación $p < 0,05$ respecto de RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto de RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

4.1.2 Randall y Selitto Test

En la Tabla 4.1.2.1 se muestran los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos en el estudio mediante Randall y Selitto test. Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo II.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
Condición experimental	21	1,76	,889	,517	,501	-1,583	,972
RyS día 1	21	,7164	,19802	,145	,501	,060	,972
RyS día 3	21	,8918	,29679	-,581	,501	-,765	,972
RyS día 5	21	,7633	,20636	,177	,501	-,934	,972
RyS día 7	21	,9458	,28175	-,336	,501	-,768	,972
RyS día 9	21	,9699	,25636	-,112	,501	-,037	,972
RyS día 11	21	,9404	,25029	,538	,501	,453	,972
RyS día 13	21	,9152	,27425	,301	,501	-,615	,972
RyS día 15	21	1,0256	,31018	-,257	,501	-,273	,972
N válido (por lista)	21						

Tabla 4.1.2.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de los umbrales de dolor referentes a la hiperalgesia mecánica, obtenidas los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de tratamiento con fármaco o vehículo mediante el Randall y Selitto test. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk para muestras inferiores a 30 casos muestra normalidad en todos los casos (Tabla 4.1.2.2)

Condición experimental		Shapiro-Wilk		
RyS día 1	RES-DUL	,978	11	,954
	RES-VEH	,962	4	,792
	RES-PGB	,921	6	,511
RyS día 3	RES-DUL	,898	11	,173
	RES-VEH	,952	4	,726
	RES-PGB	,987	6	,981
RyS día 5	RES-DUL	,935	11	,467
	RES-VEH	,797	4	,097
	RES-PGB	,933	6	,601
RyS día 7	RES-DUL	,957	11	,739
	RES-VEH	,990	4	,959
	RES-PGB	,961	6	,825
RyS día 9	RES-DUL	,964	11	,820
	RES-VEH	,977	4	,886
	RES-PGB	,993	6	,995
RyS día 11	RES-DUL	,919	11	,309
	RES-VEH	,851	4	,228
	RES-PGB	,924	6	,534
RyS día 13	RES-DUL	,947	11	,604
	RES-VEH	,980	4	,901
	RES-PGB	,894	6	,341
RyS día 15	RES-DUL	,920	11	,322
	RES-VEH	,789	4	,084
	RES-PGB	,913	6	,457

Tabla 4.1.2.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en el registro de umbrales de dolor los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de tratamiento con fármaco o vehículo. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p < 0,05$.

Utilizamos el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas. El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas en general. Encontramos una excepción en el séptimo día de tratamiento (RyS día 7) ($F=5,347$; $p<0,05$). Esto no afectará a la estadística inferencial puesto que el análisis ANOVA se considera robusto para la homogeneidad de varianzas, pero sí al análisis post-hoc, en el cual utilizaremos la corrección de Games-Howell, indicado cuando no pueden asumirse varianzas homogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
RyS día 1	Se basa en la media	2,724	2	18	,093
RyS día 3	Se basa en la media	1,777	2	18	,198
RyS día 5	Se basa en la media	3,323	2	18	,059
RyS día 7	Se basa en la media	5,347	2	18	,015
RyS día 9	Se basa en la media	1,639	2	18	,222
RyS día 11	Se basa en la media	1,142	2	18	,341
RyS día 13	Se basa en la media	3,583	2	18	,050
RyS día 15	Se basa en la media	1,441	2	18	,263

Tabla 4.1.2.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en el registro de umbrales de dolor los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de tratamiento con fármaco o vehículo. El estadístico empleado es Levene. Se puede observar que la variable RyS día 7 no cumple el supuesto de homogeneidad de la varianza. Significación $p<0,05$.

4.1.2.1 Primer día de tratamiento (RyS día 1)

Este registro se realiza tras dos horas de la primera dosis de fármaco o vehículo, así que podemos considerarlo como la medida del efecto de una dosis aguda de fármaco tras la implantación del modelo de dolor. El test ANOVA evidencia que, en esta primera fase, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=1,540$; $p>0,05$) (Tabla 4.1.2.1.1). Como podemos observar en las comparaciones múltiples post-hoc de Bonferroni (Tabla 4.1.2.1.2), ningún grupo presenta diferencias estadísticamente significativas respecto a ningún otro. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.2.1.1.

ANOVA

RyS día 1

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,115	2	,057	1,540	,241
Dentro de grupos	,670	18	,037		
Total	,784	20			

Tabla 4.1.2.1.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 1 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F= 1,540$; $p>0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RyS día 1

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Bonferroni RES-DUL	RES-VEH	,13995	,11262	,690	-,1573	,4372
	RES-PGB	-,07816	,09789	1,000	-,3365	,1802
RES-VEH	RES-DUL	-,13995	,11262	,690	-,4372	,1573
	RES-PGB	-,21811	,12451	,290	-,5467	,1105
RES-PGB	RES-DUL	,07816	,09789	1,000	-,1802	,3365
	RES-VEH	,21811	,12451	,290	-,1105	,5467

Tabla 4.1.2.1.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.2.1.1) no muestra diferencias significativas entre los umbrales de dolor de los diferentes grupos. Sin embargo, se aprecia una tendencia de los umbrales del dolor a aumentar en las ratas tratadas con Duloxetina o Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el primer día de administración de fármaco/vehículo ($F=1,540$; $p>0,05$).

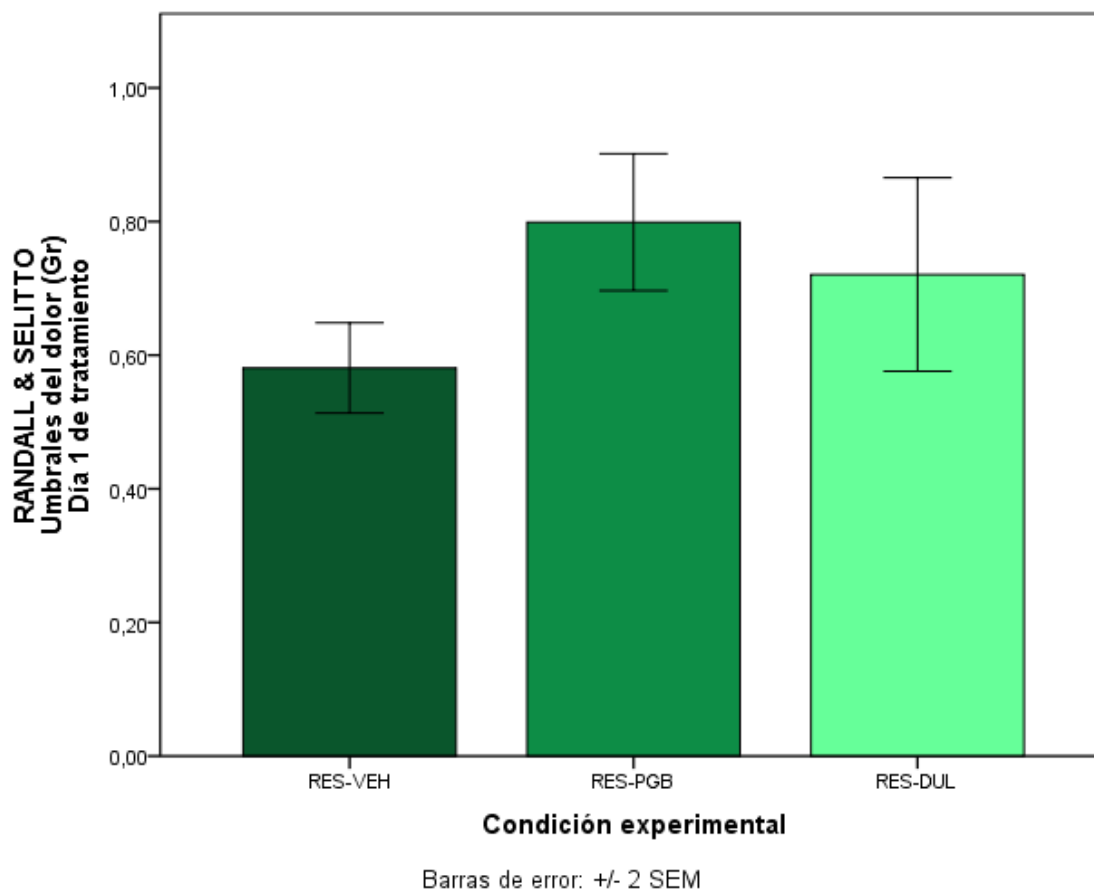


Figura 4.1.2.1.1: El gráfico muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos el primer día de tratamiento con fármaco o vehículo en hiperalgesia mecánica; sin embargo, se aprecia una tendencia de los grupos tratados con fármaco al aumento de los umbrales del dolor. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.2.2 Tercer día de tratamiento (RyS día 3)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=17,618$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.2.2.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni. Como podemos observar en la tabla 4.1.2.2.2, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.2.2.1.

ANOVA

RyS día 3

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,166	2	,583	17,618	,000
Dentro de grupos	,596	18	,033		
Total	1,762	20			

Tabla 4.1.2.2.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 3 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F= 17,618$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RyS día 3

(I) Condición Experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Bonferroni	RES-DUL	RES-VEH	,62986*	,10621	,000	,3495	,9102
		RES-PGB	,19136	,09232	,159	-,0523	,4350
	RES-VEH	RES-DUL	-,62986*	,10621	,000	-,9102	-,3495
		RES-PGB	-,43850*	,11742	,005	-,7484	-,1286
	RES-PGB	RES-DUL	-,19136	,09232	,159	-,4350	,0523
		RES-VEH	,43850*	,11742	,005	,1286	,7484

Tabla 4.1.2.2.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.2.2.1) muestra diferencias significativas entre los umbrales de dolor de los diferentes grupos. Se observa un aumento en los umbrales de las ratas tratadas con Duloxetina o Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en el tercer día de administración de fármaco/vehículo ($F=17,618$; $p<0,05$).

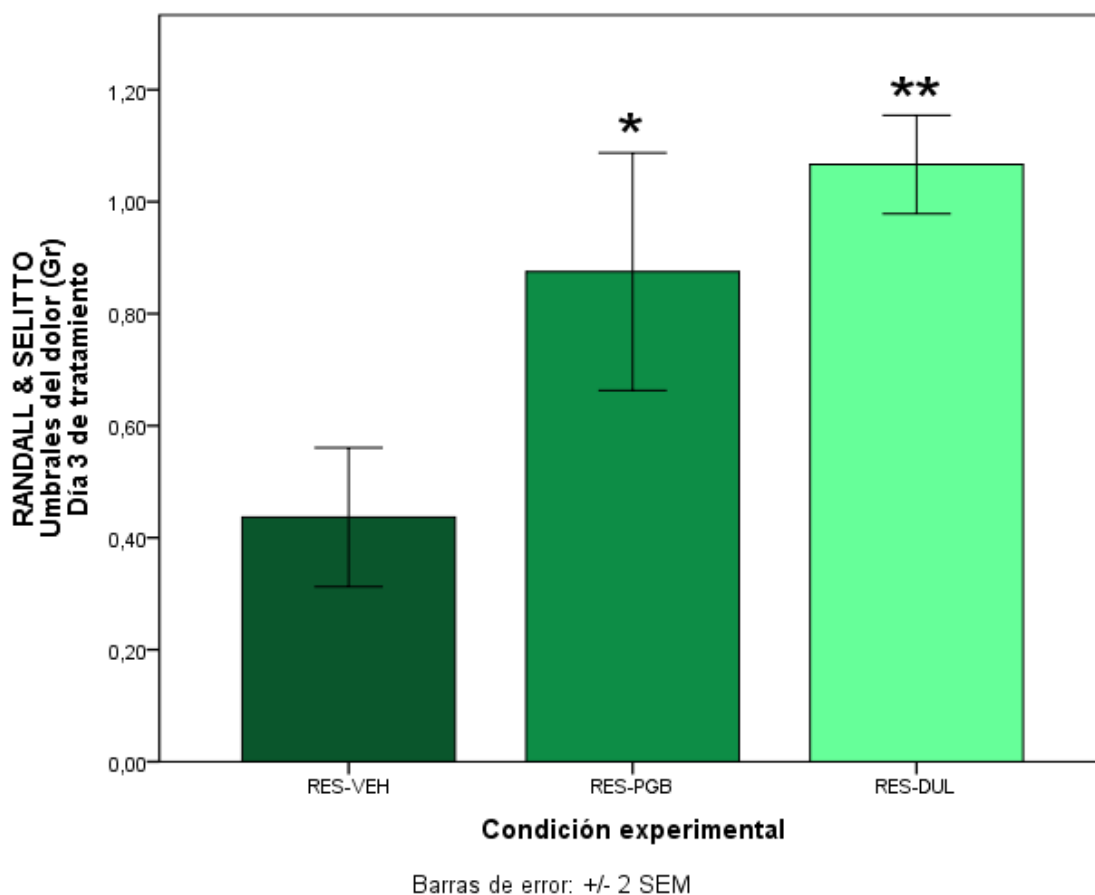


Figura 4.1.2.2.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el tercer día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.2.3 Quinto día de tratamiento (RyS día 5)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=5,815$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.2.3.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni. Como podemos observar en la tabla 4.1.2.3.2, tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.2.3.1.

ANOVA

RyS día 5

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,331	2	,166	5,815	,011
Dentro de grupos	,513	18	,028		
Total	,844	20			

Tabla 4.1.2.3.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 5 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F= 5,815$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RyS día 5

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Bonferroni	RES-DUL	RES-VEH	,28733 [*]	,09856	,028	,0272	,5475
		RES-PGB	-,06767	,08567	1,000	-,2938	,1584
	RES-VEH	RES-DUL	-,28733 [*]	,09856	,028	-,5475	-,0272
		RES-PGB	-,35500 [*]	,10897	,013	-,6426	-,0674
	RES-PGB	RES-DUL	,06767	,08567	1,000	-,1584	,2938
		RES-VEH	,35500 [*]	,10897	,013	,0674	,6426

Tabla 4.1.2.3.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.2.3.1) muestra diferencias significativas entre los umbrales de dolor de los grupos que han recibido tratamiento con Duloxetina o Pregabalina respecto al grupo tratado con vehículo en el quinto día de administración de fármaco/vehículo ($F=5,815$; $p<0,05$).

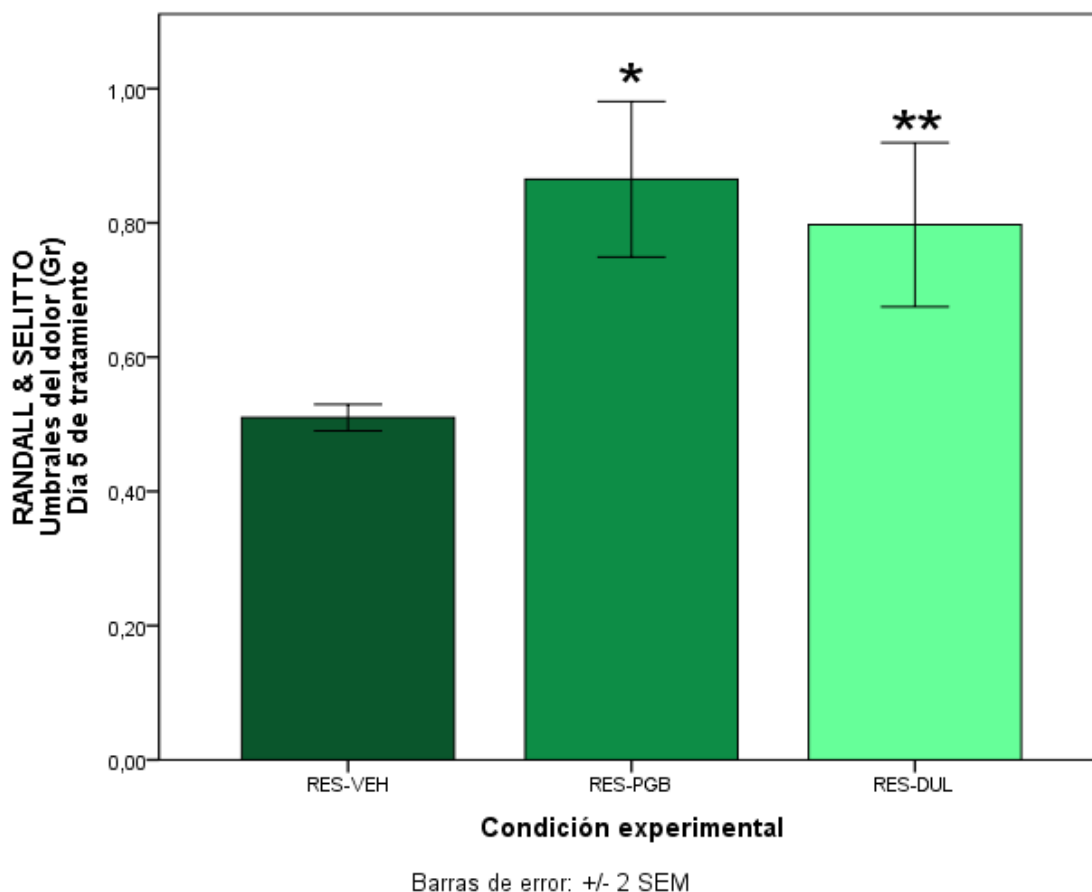


Figura 4.1.2.3.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el quinto día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.2.4 Séptimo día de tratamiento (RyS día 7)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=27,920$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.2.4.1). En este caso, para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Games-Howell puesto que teníamos un fallo en la homogeneidad de varianzas. Como podemos observar en la tabla 4.1.2.4.2, todos los grupos muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p<0,05$). Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.2.4.1.

ANOVA

RyS día 7

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,201	2	,600	27,920	,000
Dentro de grupos	,387	18	,022		
Total	1,588	20			

Tabla 4.1.2.4.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 7 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F= 27,920$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RyS día 7

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Games-Howell	RES-DUL	RES-VEH	,63453*	,05335	,000	,4904	,7787
		RES-PGB	,23686*	,07501	,019	,0388	,4349
	RES-VEH	RES-DUL	-,63453*	,05335	,000	-,7787	-,4904
		RES-PGB	-,39768*	,05531	,001	-,5723	-,2231
	RES-PGB	RES-DUL	-,23686*	,07501	,019	-,4349	-,0388
		RES-VEH	,39768*	,05531	,001	,2231	,5723

Tabla 4.1.2.4.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Games-Howell. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.2.4.1) muestra diferencias significativas entre los umbrales de dolor de los diferentes grupos en el séptimo día de administración de fármaco/vehículo ($F=27,920$; $p<0,05$). Como se puede apreciar, el grupo que ha recibido tratamiento con Duloxetina es el grupo que más alto umbral de dolor muestra.

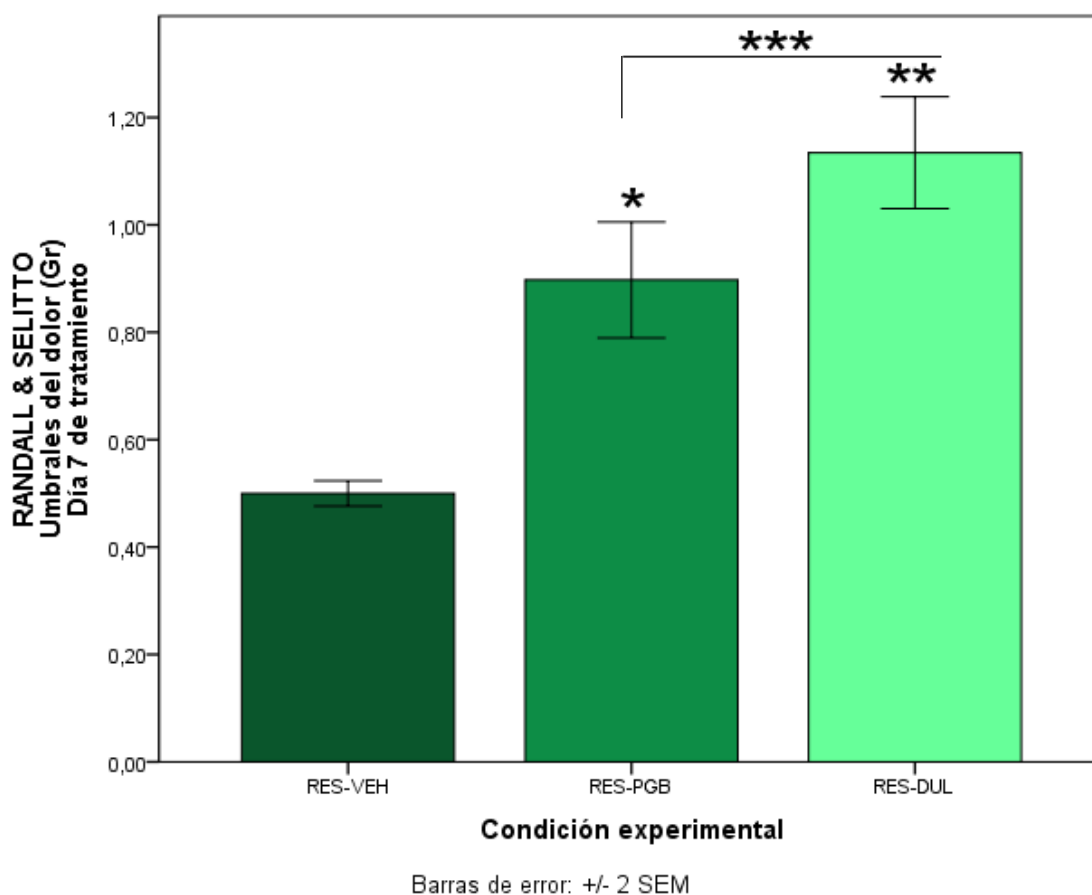


Figura 4.1.2.4.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el séptimo día de tratamiento; asimismo, se muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos RES-DUL y RES-VEH. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. *** Significación $p<0,05$ de RES-DUL con respecto a RES-PGB. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.2.5 Noveno día de tratamiento (RyS día 9)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=14,485$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.2.5.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni, y como podemos observar en la tabla 4.1.2.5.2, los grupos que han sido tratados o bien con Duloxetina o bien con Pregabalina muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con vehículo ($p<0,05$), pero no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,05$). Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.2.5.1.

ANOVA

RyS día 9

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,897	2	,448	14,485	,000
Dentro de grupos	,557	18	,031		
Total	1,454	20			

Tabla 4.1.2.5.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 9 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F= 14,485$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

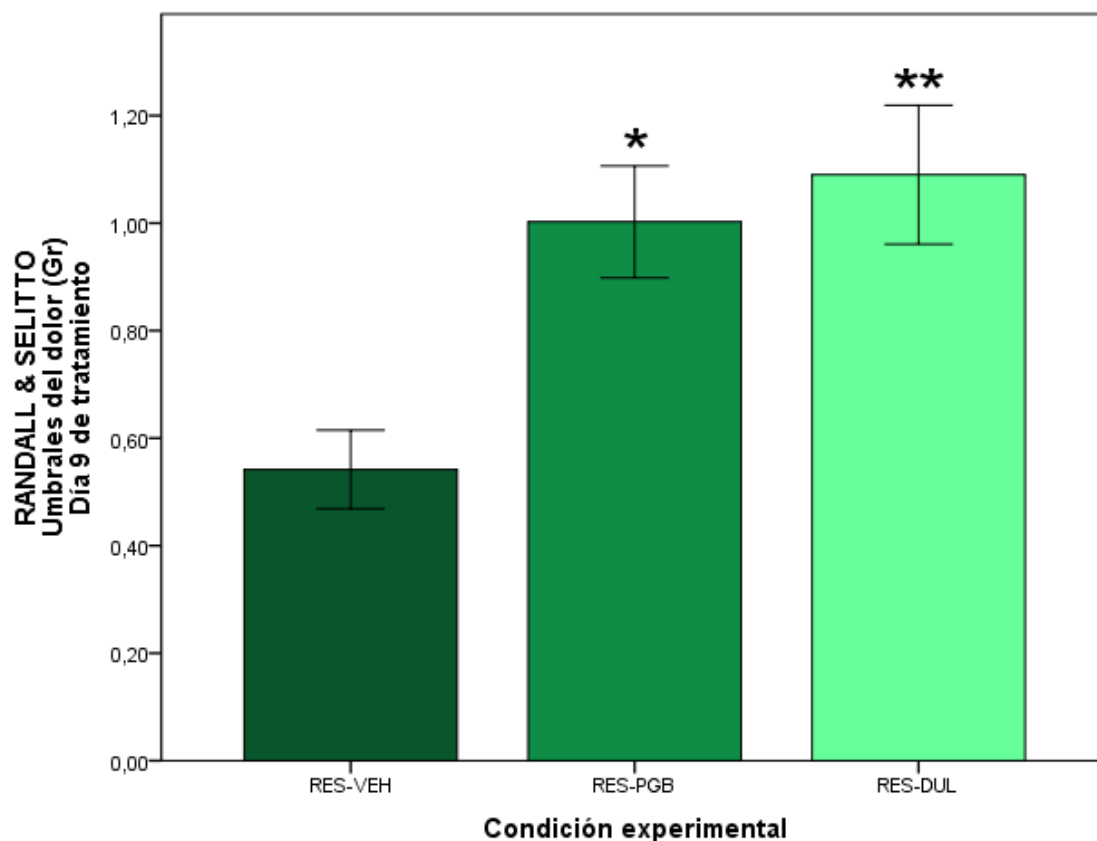
Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RyS día 9

(I)	(J)		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Bonferroni	RES-DUL	RES-VEH	,54835*	,10272	,000	,2772	,8195
		RES-PGB	,08768	,08929	1,000	-,1480	,3233
	RES-VEH	RES-DUL	-,54835*	,10272	,000	-,8195	-,2772
		RES-PGB	-,46067*	,11357	,002	-,7604	-,1610
	RES-PGB	RES-DUL	-,08768	,08929	1,000	-,3233	,1480
		RES-VEH	,46067*	,11357	,002	,1610	,7604

Tabla 4.1.2.5.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.2.5.1) muestra diferencias significativas entre los umbrales de dolor de los grupos que han recibido tratamiento con Duloxetina y los que han sido tratados con Pregabalina respecto al grupo tratado con vehículo en el noveno día de administración de fármaco/vehículo ($F=14,485$; $p<0,05$).



Barras de error: ± 2 SEM

Figura 4.1.2.5.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el noveno día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

4.1.2.6 Decimoprimer día de tratamiento (RyS día 11)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=5,959$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.2.6.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni, y como podemos observar en la tabla 4.1.2.6.2, los grupos que han sido tratados o bien con Duloxetina o bien con Pregabalina muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con vehículo ($p<0,05$), pero no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,05$). Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.2.6.1.

ANOVA

RyS día 11

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,499	2	,250	5,959	,010
Dentro de grupos	,754	18	,042		
Total	1,253	20			

Tabla 4.1.2.6.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 11 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=5,959$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RyS día 11

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Bonferroni	RES-DUL	RES-VEH	,39994*	,11948	,011	,0846	,7153
		RES-PGB	,02310	,10386	1,000	-,2510	,2972
	RES-VEH	RES-DUL	-,39994*	,11948	,011	-,7153	-,0846
		RES-PGB	-,37684*	,13209	,032	-,7255	-,0282
	RES-PGB	RES-DUL	-,02310	,10386	1,000	-,2972	,2510
		RES-VEH	,37684*	,13209	,032	,0282	,7255

Tabla 4.1.2.6.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.2.6.1) muestra diferencias significativas entre los umbrales de dolor de los grupos que han recibido tratamiento con Duloxetina y los que han recibido tratamiento con Pregabalina respecto al grupo tratado con vehículo en el decimoprimer día de administración de fármaco/vehículo ($F=5,959$; $p<0,05$).

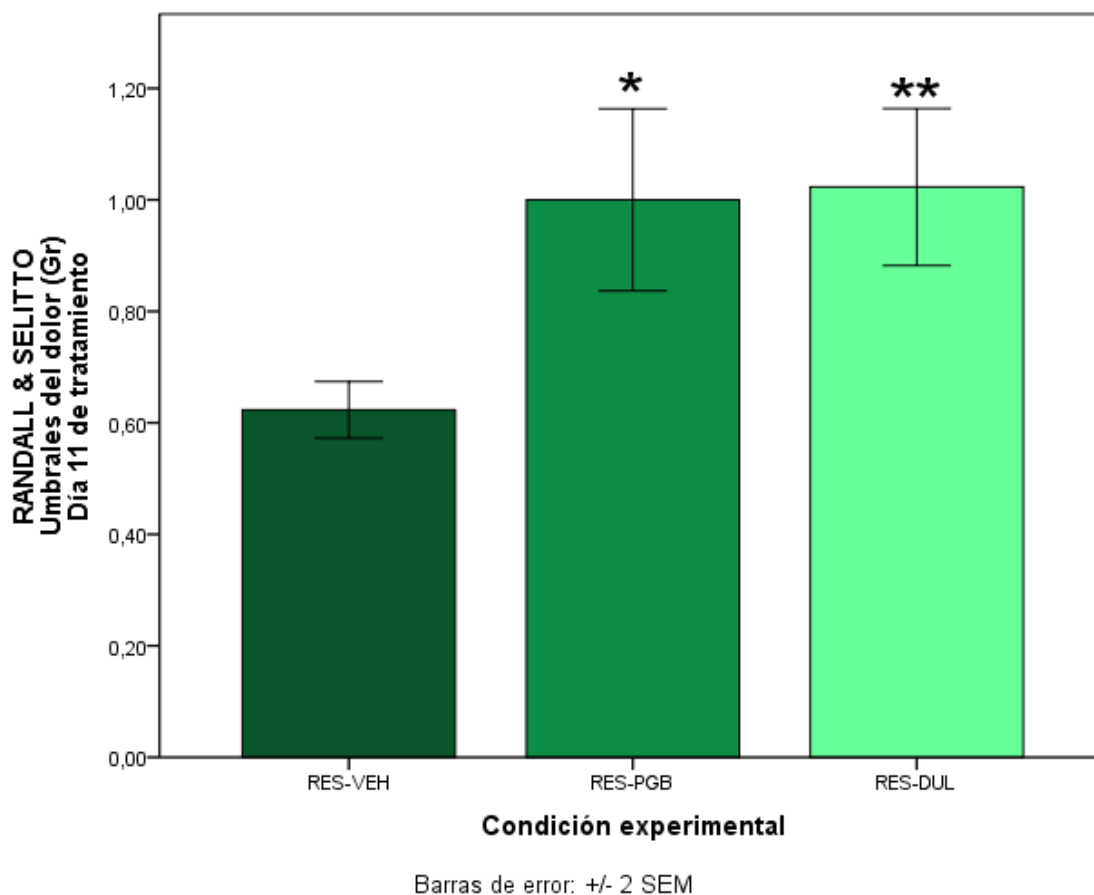


Figura 4.1.2.6.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el decimoprimer día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.2.7 Decimotercer día de tratamiento (RyS día 13)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=5,705$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.2.7.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni, y como podemos observar en la tabla 4.1.2.7.2, los grupos que han sido tratados o bien con Duloxetina o bien con Pregabalina muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo tratado con vehículo ($p<0,05$), pero no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,05$). Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.2.7.1.

ANOVA

RyS día 13

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,584	2	,292	5,705	,012
Dentro de grupos	,921	18	,051		
Total	1,504	20			

Tabla 4.1.2.7.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 13 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=5,705$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

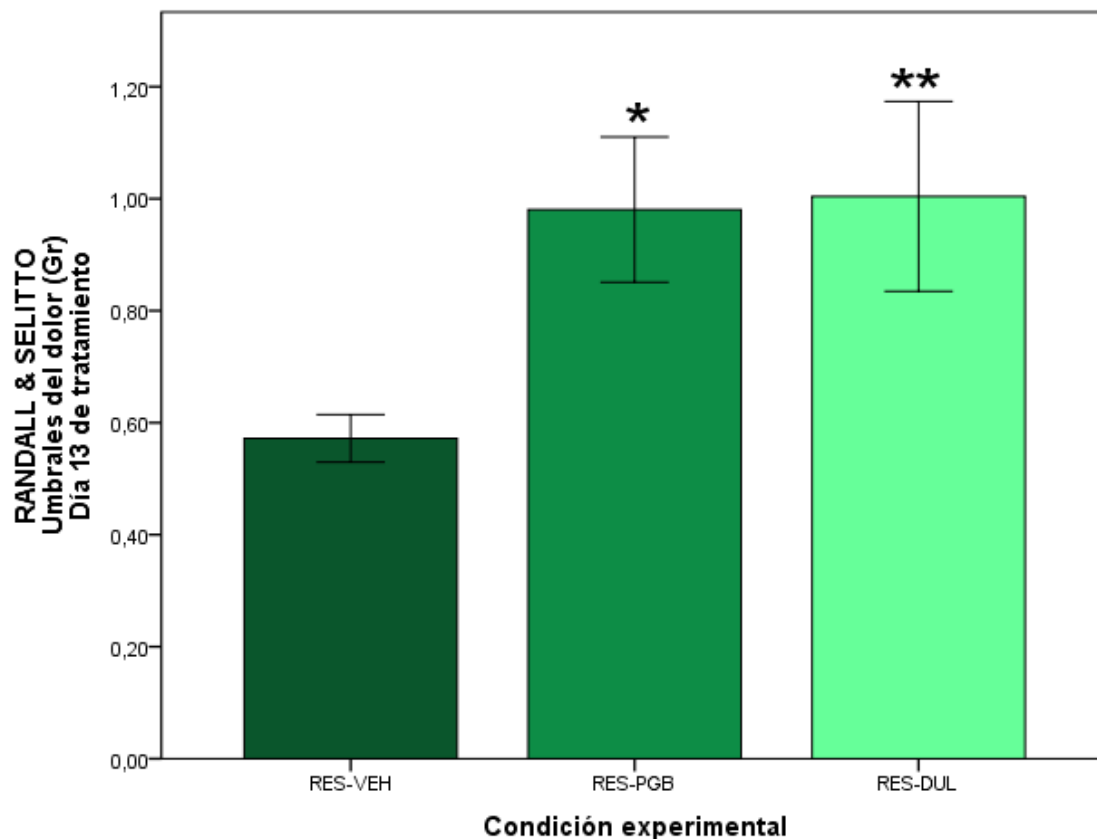
Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RyS día 13

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Bonferroni	RES-DUL	RES-VEH	,43201*	,13205	,013	,0835	,7805
		RES-PGB	,02341	,11478	1,000	-,2795	,3263
	RES-VEH	RES-DUL	-,43201*	,13205	,013	-,7805	-,0835
		RES-PGB	-,40860*	,14599	,036	-,7939	-,0233
	RES-PGB	RES-DUL	-,02341	,11478	1,000	-,3263	,2795
		RES-VEH	,40860*	,14599	,036	,0233	,7939

Tabla 4.1.2.7.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.2.7.1) muestra diferencias significativas entre los umbrales de dolor de los grupos que han recibido tratamiento con Duloxetina y los tratados con Pregabalina respecto al grupo tratado con vehículo en el decimotercer día de administración de fármaco/vehículo ($F=5,705$; $p<0,05$).



Barras de error: ± 2 SEM

Figura 4.1.2.7.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el decimotercer día de tratamiento. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

4.1.2.8 Decimoquinto día de tratamiento (RyS día 15)

El test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=36,777$; $p<0,05$) (Tabla 4.1.2.8.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Bonferroni, y como podemos observar en la tabla 4.1.2.8.2, todos los grupos muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p<0,05$). Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.1.2.8.1.

ANOVA

RyS día 15

	Suma de cuadrados	de gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,546	2	,773	36,777	,000
Dentro de grupos	,378	18	,021		
Total	1,924	20			

Tabla 4.1.2.8.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 15 de tratamiento con fármaco o vehículo. $F=36,777$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: RyS día 15

(I)	(J)	Condición experimental	Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
							Límite inferior	Límite superior
Bonferroni	RES-DUL		RES-VEH	,70976*	,08465	,000	,4864	,9332
			RES-PGB	,31548*	,07358	,001	,1213	,5097
	RES-VEH		RES-DUL	-,70976*	,08465	,000	-,9332	-,4864
			RES-PGB	-,39428*	,09358	,002	-,6413	-,1473
RES-PGB		RES-DUL	-,31548*	,07358	,001	-,5097	-,1213	
		RES-VEH	,39428*	,09358	,002	,1473	,6413	

Tabla 4.1.2.8.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (figura 4.1.2.8.1) muestra diferencias significativas entre los umbrales de dolor de los diferentes grupos en el decimoquinto día de administración de fármaco/vehículo ($F=36,777$; $p<0,05$). Como se puede apreciar, el grupo que ha recibido tratamiento con Duloxetina es el grupo que más alto umbral de dolor muestra.

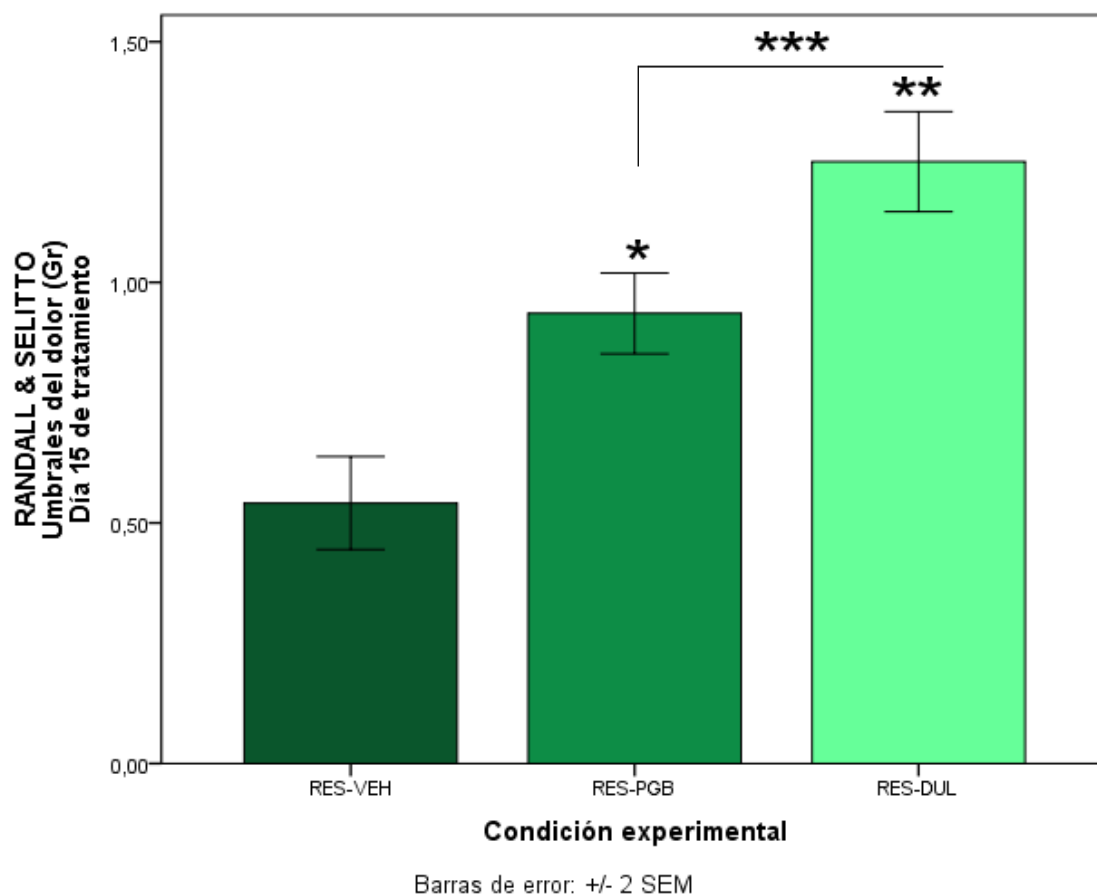


Figura 4.1.2.8.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el decimoquinto día de tratamiento; asimismo, se muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos RES-DUL y RES-VEH. * Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p<0,05$ respecto a RES-VEH. *** Significación $p<0,05$ de RES-DUL con respecto a RES-PGB. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.1.2.9 Variación global de los umbrales de dolor en hiperalgesia mecánica

La Figura 4.1.2.9.1 muestra las variaciones halladas en los umbrales de dolor referidos a la hiperalgesia mecánica entre los grupos tratados con fármaco respecto de los tratados con vehículo a lo largo de los días de registro.

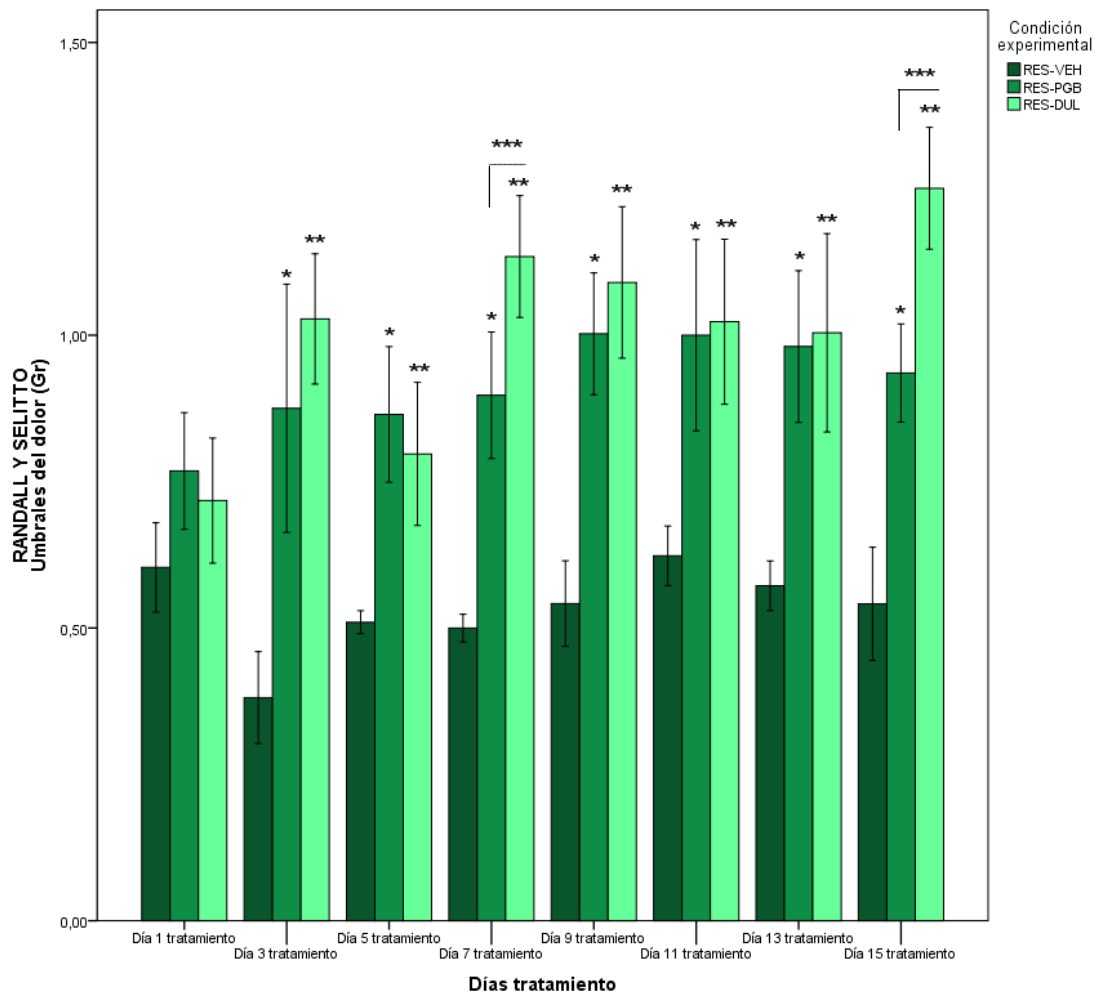


Figura 4.1.2.9.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo global de los umbrales de dolor referentes a la hiperalgesia mecánica en las ratas tratadas con Duloxetina o Pregabalina respecto a las ratas tratadas con vehículo en los días 3, 5, 9, 11 y 13 de tratamiento. Sin embargo, en el primer día de tratamiento, la "dosis aguda de fármaco", no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas con respecto a las tratadas con vehículo. Por otra parte, la Duloxetina muestra un pico de aumento de los umbrales del dolor en los días 7 y 15, mostrando diferencias estadísticamente significativas tanto con RES-VEH como con RES-PGB. *Significación $p < 0,05$ respecto de RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto de RES-VEH. *** Significación $p < 0,05$ entre RES-PGB y RES-DUL. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.2. Resultados de las medidas de síntomas depresivos

4.2.1 Forced swimming test

4.2.1.1 Fase de Pretest

El test conductual *Forced Swimming Test* (FST) tiene dos fases, la fase de Pretest y la fase de Test. El Pretest es un paso que ha de ser necesariamente realizado, pero generalmente no tiene que ser analizado; sólo si los animales han sido sometidos a manipulaciones previas que podrían alterar su comportamiento en la prueba de natación inicial (Slattery and Cryan, 2012). En este caso no la hemos realizado porque todos los animales han estado expuestos a la misma condición de reserpización, y en estudios anteriores de nuestro laboratorio se ha demostrado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los animales tratados con reserpina y los tratados con vehículo en la fase de Pretest (data not shown).

4.2.1.2 Fase de Test

En la Tabla 4.2.1.2.1 se muestran los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos en el estudio mediante FST de síntomas depresivos en la fase de Test. Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo III.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
Nadar	24	13,04	7,463	,033	,472	-1,354	,918
Escalar	24	2,13	2,401	1,731	,472	2,739	,918
Inmovilidad	24	44,88	8,002	-,019	,472	-1,273	,918
N válido (por lista)	24						

Tabla 4.2.1.2.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de conductas observadas en FST. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk para muestras inferiores a 30 casos muestra normalidad en todos los casos ($p > 0,05$), como se puede observar en la tabla 4.2.1.2.2.

Prueba de normalidad

Condición experimental		Shapiro-Wilk		
Nadar	RES-VEH	,951	9	,696
	RES-PGB	,978	7	,949
	RES-DUL	,943	8	,636
Escarlar	RES-VEH	,903	9	,273
	RES-PGB	,840	7	,099
	RES-DUL	,950	8	,716
Inmovilidad	RES-VEH	,920	9	,396
	RES-PGB	,874	7	,203
	RES-DUL	,982	8	,972

Tabla 4.2.1.2.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en el registro de conductas en FST. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Todos los casos cumplen el supuesto de normalidad. Significación $p < 0,05$.

Utilizamos el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.2.1.2.3). El conjunto de datos no presenta homogeneidad de varianzas en ningún caso ($p < 0,05$). Esto no afectará a la estadística inferencial puesto que el análisis ANOVA se considera robusto para la homogeneidad de varianzas; sin embargo, sí afecta al análisis post-hoc, en el que emplearemos la corrección de Games-Howell, indicada cuando no pueden asumirse varianzas homogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
Nadar	Se basa en la media	7,562	2	21	,003
Escarlar	Se basa en la media	5,645	2	21	,011
Inmovilidad	Se basa en la media	4,264	2	21	,028

Tabla 4.2.1.2.3: Pruebas de homogeneidad de las varianzas de los datos obtenidos en el registro de conductas en FST. El estadístico empleado es Levene. Ningún caso cumple el supuesto de homogeneidad. Significación $p < 0,05$.

En cuanto al análisis inferencial, se realiza un análisis de varianzas ANOVA de un factor para muestras independientes para la comparación de los grupos RES-VEH, RES-DUL y RES-PGB en las tres conductas estudiadas (nadar, escalar, inmovilidad). Para las pruebas post-hoc, empleamos la corrección de Games-Howell, como ya hemos explicado previamente.

En primer lugar, respecto a la conducta de NADAR, el test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=36,788$; $p<0,05$) (Tabla 4.2.1.2.4). El análisis post-hoc de Games-Howell indica, como podemos observar en la tabla 4.2.1.2.5, que tanto el grupo RES-DUL como el grupo RES-PGB muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo RES-VEH, pero no entre sí. Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.2.1.2.1.

ANOVA

Nadar

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	996,528	2	498,264	36,788	,000
Dentro de grupos	284,431	21	13,544		
Total	1280,958	23			

Tabla 4.2.1.2.4: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de la conducta de NADAR en el FST. $F=36,788$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Nadar

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Games-Howell	RES-VEH	RES-PGB	-12,222 [*]	,997	,000	-14,90	-9,54
		RES-DUL	-14,097 [*]	2,118	,000	-20,13	-8,06
	RES-PGB	RES-VEH	12,222 [*]	,997	,000	9,54	14,90
		RES-DUL	-1,875	2,197	,681	-7,99	4,24
RES-DUL	RES-VEH	14,097 [*]	2,118	,000	8,06	20,13	
	RES-PGB	1,875	2,197	,681	-4,24	7,99	

Tabla 4.2.1.2.5: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Games-Howell. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La Figura 4.2.1.2.1 muestra un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la conducta de nadar tanto en las ratas tratadas con Duloxetina como en las tratadas con Pregabalina respecto a las tratadas con vehículo en la fase de test del FST.

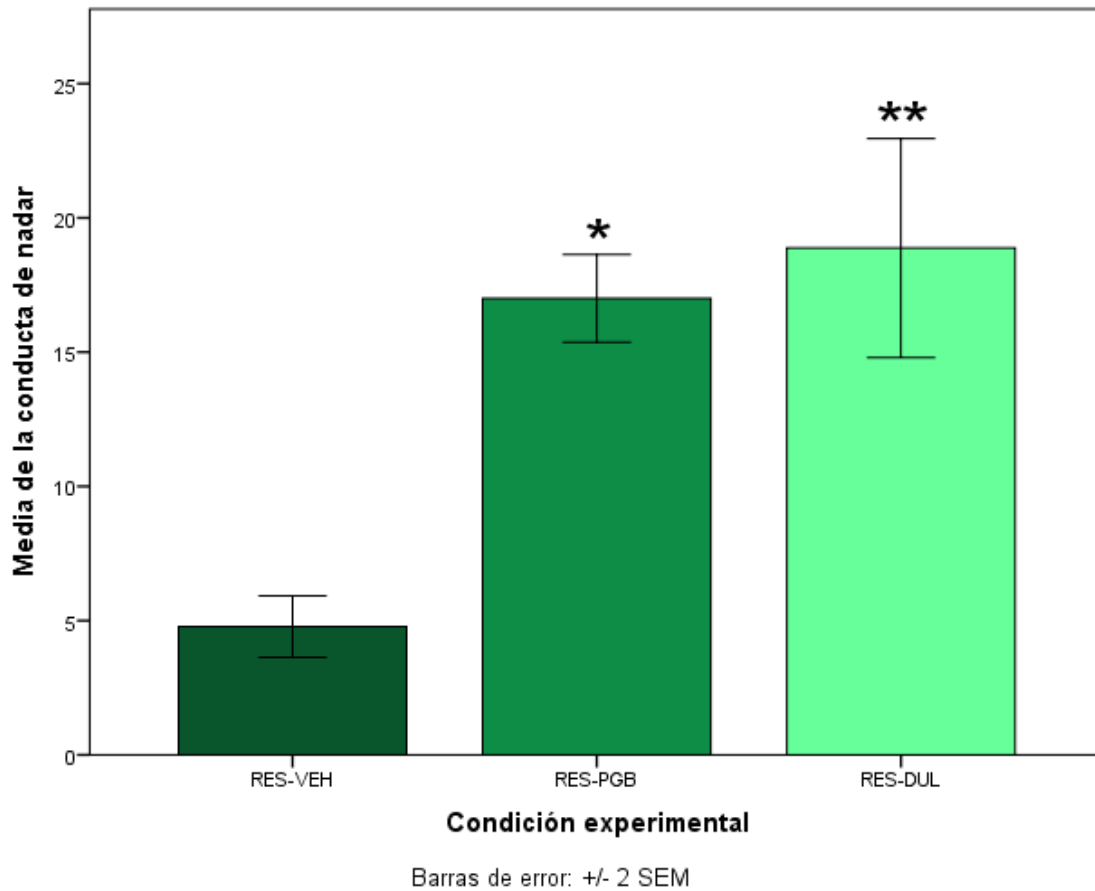


Figura 4.2.1.2.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de la conducta de nadar en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) en el FST. * Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

En el caso de los datos obtenidos en la conducta de ESCALAR en la fase de test (Tabla 4.2.1.2.6), se encuentran diferencias estadísticamente significativas con el test inferencial ANOVA de un factor ($F=12,839$; $p<0,05$). El posterior análisis post-hoc de Games Howell (Tabla 4.2.1.2.7) muestra que esas diferencias existen entre el grupo tratado con Duloxetina y los otros grupos, tanto el grupo tratado con Pregabalina como el grupo tratado con vehículo ($p<0,05$).

ANOVA

Escalar

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	59,046	2	29,523	12,839	,000
Dentro de grupos	48,288	21	2,299		
Total	107,333	23			

Tabla 4.2.1.2.6: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de la conducta de ESCALAR en el FST. $F= 12,839$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Escalar

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Games Howell	RES-VEH	RES-PGB	,365	,416	,663	-,72	1,45
		RES-DUL	-3,153*	,884	,015	-5,61	-,69
	RES-PGB	RES-VEH	-,365	,416	,663	-1,45	,72
		RES-DUL	-3,518*	,863	,008	-5,96	-1,08
	RES-DUL	RES-VEH	3,153*	,884	,015	,69	5,61
		RES-PGB	3,518*	,863	,008	1,08	5,96

Tabla 4.2.1.2.7: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Games-Howell. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-PGB ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

El gráfico representado a continuación muestra un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en la conducta de escalar en el grupo tratado con Duloxetina respecto al grupo tratado con Pregabalina y al grupo tratado con vehículo en la fase de test del FST. No se observan diferencias entre el grupo tratado con Pregabalina y el grupo tratado con vehículo (Figura 4.2.1.2.2).

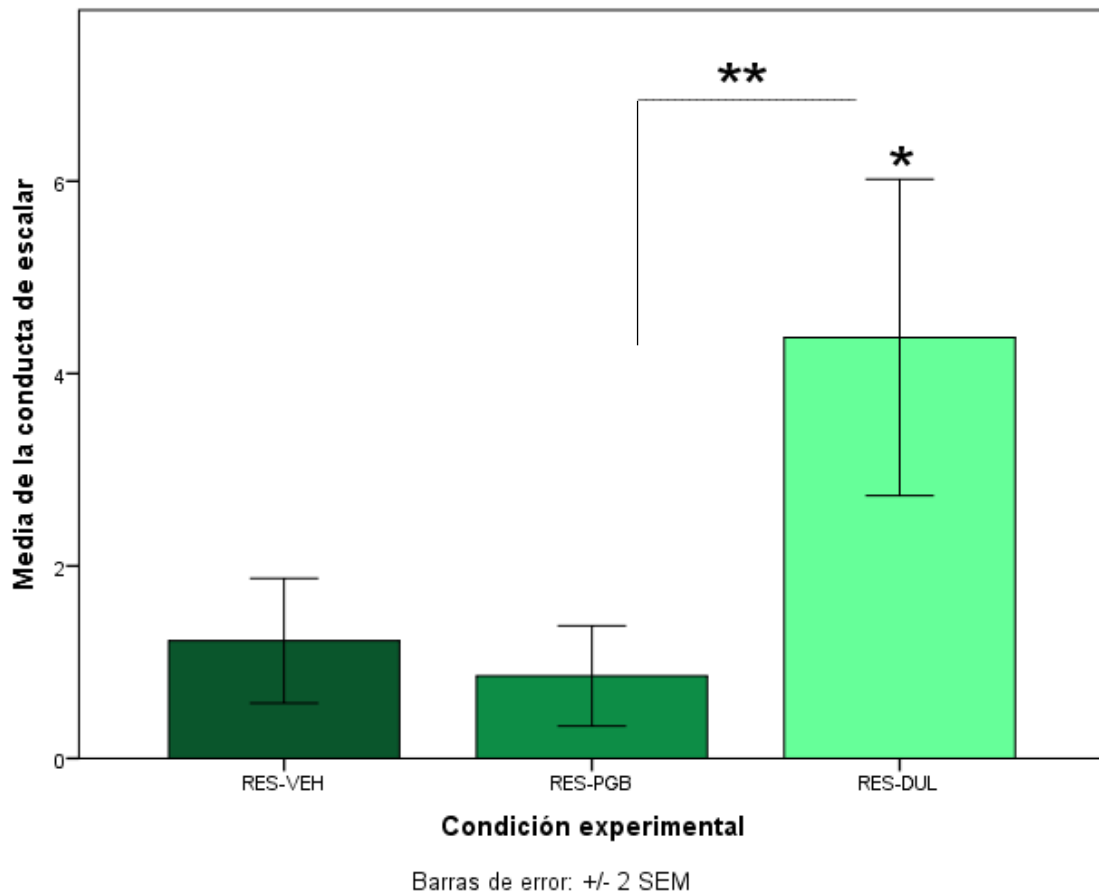


Figura 4.2.1.2.2: En el gráfico se muestra un aumento significativo de la conducta de nadar en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) y respecto a las tratadas con Pregabalina (RES-PGB) en el FST. * Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto a RES-PGB. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

En cuanto a la conducta de INMOVILIDAD, el test ANOVA evidencia diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=77,930$; $p<0,05$) (Tabla 4.2.1.2.8). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al análisis post-hoc de Games-Howell. Como podemos observar en la tabla 4.2.1.2.9, todos los grupos muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p<0,05$). Estos resultados se muestran representados gráficamente en la figura 4.2.1.2.3.

ANOVA

Inmovilidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1297,768	2	648,884	77,930	,000
Dentro de grupos	174,857	21	8,327		
Total	1472,625	23			

Tabla 4.2.1.2.8: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de la conducta de INMOVILIDAD en el FST. $F= 77,930$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

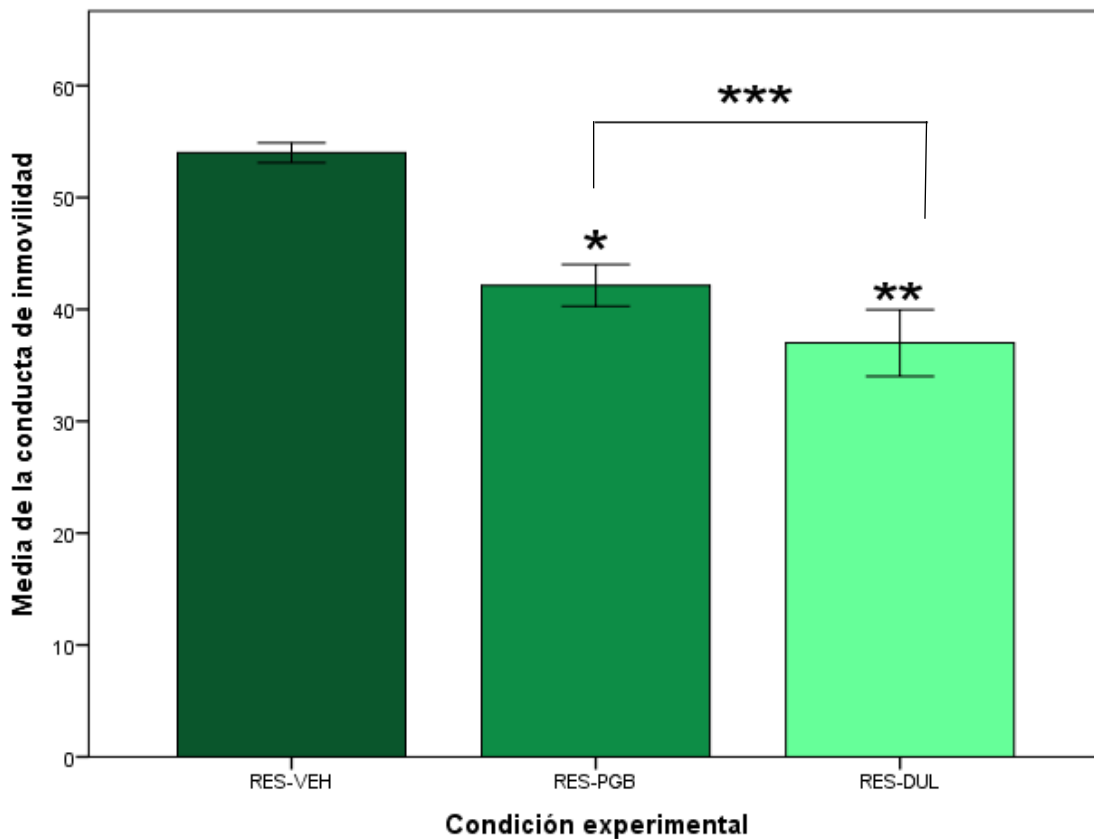
Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Inmovilidad

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Games-Howell	RES-VEH	RES-PGB	11,857 [*]	1,035	,000	8,94	14,77
		RES-DUL	17,000 [*]	1,552	,000	12,59	21,41
	RES-PGB	RES-VEH	-11,857 [*]	1,035	,000	-14,77	-8,94
		RES-DUL	5,143 [*]	1,758	,033	,43	9,86
	RES-DUL	RES-VEH	-17,000 [*]	1,552	,000	-21,41	-12,59
		RES-PGB	-5,143 [*]	1,758	,033	-9,86	-,43

Tabla 4.2.1.2.9: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Games-Howell. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). También existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos tratados con fármaco (RES-DUL y RES-PGB). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

El siguiente gráfico muestra una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la conducta de INMOVILIDAD en el grupo tratado con Duloxetina y el tratado con Pregabalina respecto al grupo tratado con vehículo en la fase de test del FST. Sin embargo, la disminución de la conducta de inmovilidad del grupo tratado con Pregabalina no llega al nivel de la observada en el grupo tratado con Duloxetina, y por ello también existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con fármaco ($p < 0,05$) (Figura 4.2.1.2.3).



Barras de error: ± 2 SEM

Figura 4.2.1.2.3: En el gráfico se muestra una disminución significativa de la conducta de inmovilidad en FST de las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH); asimismo, se muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos RES-DUL y RES-PGB. * Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. *** Significación $p < 0,05$ entre RES-DUL y RES-PGB. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

En la Figura 4.2.1.2.4 pueden observarse las diferencias entre las conductas de nadar, escalar e inmovilidad en la fase de test del FST entre los grupos tratados con fármaco o con vehículo. Se pueden observar las diferencias significativas entre el grupo tratado con Duloxetina y el grupo tratado con vehículo en las conductas de nadar, inmovilidad, y de escalada; sin embargo, en el caso del grupo tratado con Pregabalina, encontramos diferencias en las conductas de nadar y de inmovilidad respecto al grupo tratado con vehículo, pero no en la conducta de escalada. Asimismo, hay una diferencia entre los grupos tratados con fármaco en las conductas de escalar y de inmovilidad.

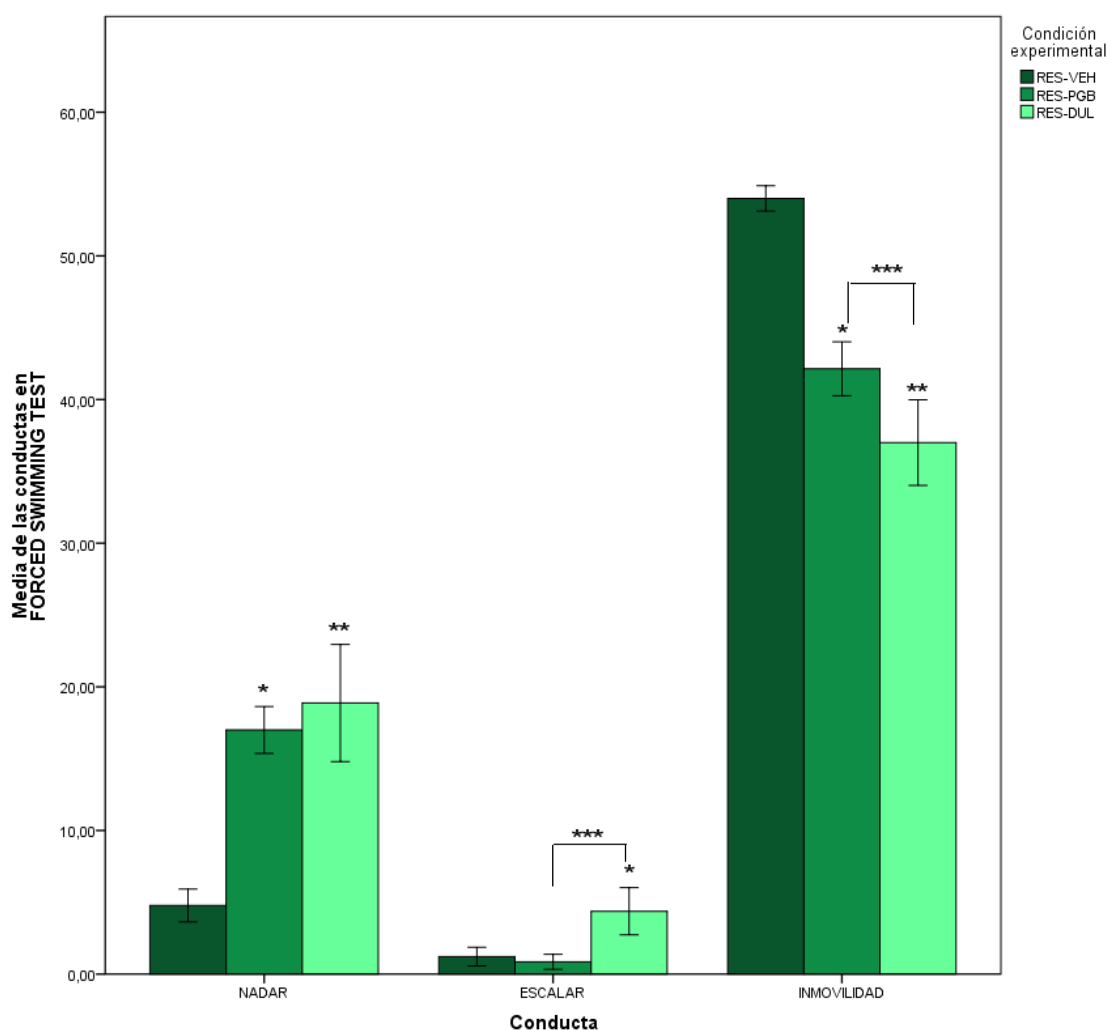


Figura 4.2.1.2.4: Media de todas las conductas estudiadas en FST (NADAR, ESCALAR E INMOVILIDAD). Se encuentran diferencias estadísticamente significativas de RES-DUL con respecto a RES-VEH en todas las conductas. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre RES-PGB y RES-VEH en las conductas de NADAR e INMOVILIDAD. Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-DUL y RES-PGB en las conductas de ESCALAR e INMOVILIDAD. *Significación $p < 0,05$ con respecto a RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. ***Significación $p < 0,05$ de RES-DUL respecto a RES-PGB. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2

4.2.2. Novelty-Suppressed Feeding Test

4.2.2.1 Estudio del consumo de comida

En la Tabla 4.2.2.1.1 se muestran los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos en el estudio del consumo de comida de los animales a los que se les realizó el Novelty-suppressed feeding test (NSFT). Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo IV.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
	Comida ingerida (g)	42	18,9702	2,90842	-,433	,365	1,730
Día de registro de ingesta	42	,5000	,50606	,000	,365	-2,103	,717
Condición experimental	42	1,0476	,79487	-,087	,365	-1,396	,717
N válido (por lista)	42						

Tabla 4.2.2.1.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para el estudio de ingesta de comida realizado a los animales cuyos síntomas depresivos fueron analizados mediante NSFT. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk para muestras inferiores a 30 casos muestra que el supuesto de normalidad se cumple en todos los casos (Tabla 4.2.2.1.2). Por otra parte, el supuesto de homogeneidad de las varianzas también se cumple, este supuesto lo hemos comprobado mediante el test de Levene para la homogeneidad de las varianzas (Tabla 4.2.2.1.3).

Pruebas de normalidad

Condición experimental		Shapiro-Wilk		
Comida ingerida (g)	RES-VEH	,869	12	,064
	RES-PGB	,936	16	,306
	RES-DUL	,911	14	,161

Tabla 4.2.2.1.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio de ingesta de comida realizado a los animales sometidos al NSFT. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p < 0,05$.

Prueba de homogeneidad de varianza

	Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
Comida ingerida (g) Se basa en la media	3,136	2	39	,055

Tabla 4.2.2.1.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio de ingesta de comida de los animales sometidos al NSFT. El estadístico empleado es Levene. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas. Significación $p < 0,05$.

La reserpina produce una anorexia muy notable en su fase de efecto más agudo, pero disminuye progresivamente desde su última dosis, alcanzando valores similares a los observados durante el período de habituación aproximadamente después del cuarto día después de la administración de reserpina (Blasco-Serra et al., 2015). Para comprobar que no haya diferencias en la ingesta de comida entre los días de habituación de cada animal y el día antes de comenzar la primera deprivación, realizamos una T de Student para muestras independientes entre la media de ingesta de comida de la habituación y la ingesta el día antes de la primera deprivación para cada condición experimental. Como se puede observar en la tabla 4.2.2.1.4, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las variables ($T=1,236$; $p > 0,05$).

Prueba de muestras independientes

Comida ingerida (g) (Se asumen varianzas iguales)	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
	3,482	,069	1,236	40	,224	1,10238	,89183	-,70008	2,90485

Tabla 4.2.2.1.4: Prueba T de student para muestras independientes entre la media de los valores de ingesta del período de habituación y la ingesta del día anterior a la primera deprivación. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El nivel de significación se ha establecido en $p < 0,05$.

En la figura 4.2.2.1.1 puede observarse que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la media de la ingesta del período de habituación y la ingesta del día anterior a la primera privación en cada uno de los grupos.

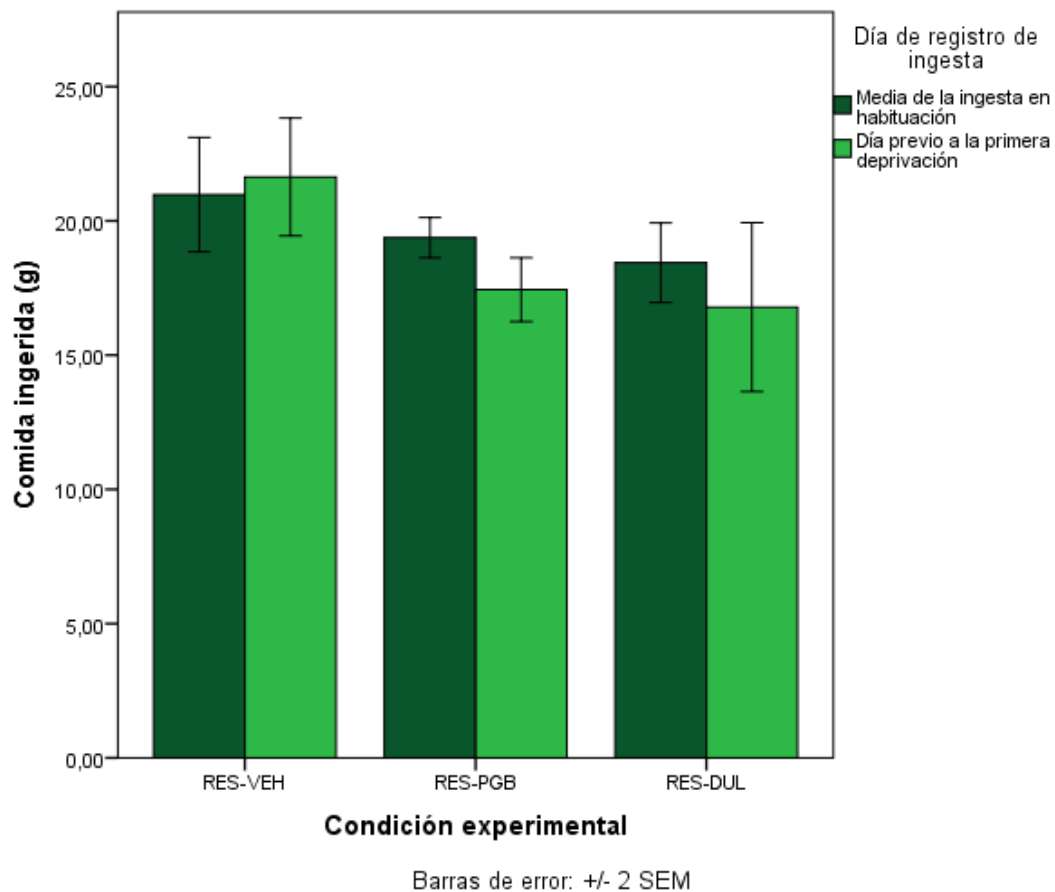


Figura 4.2.2.1.1: Media de la cantidad de comida ingerida en el período de habituación y la cantidad de comida ingerido el día anterior a la primera privación. Se han agrupado en condiciones experimentales. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las ingestas. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.2.2.2 Estudio de conducta durante el test

En la Tabla 4.2.2.2.1 se muestran los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos en el estudio mediante Novelty-suppressed feeding test de síntomas depresivos. Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo V.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
Tiempo en comer	22	434,6818	175,20638	-,561	,491	-1,433	,953
Acercamiento (veces por minuto)	22	,6605	,54886	1,463	,491	2,510	,953
Tocar/Oler (veces por minuto)	22	,4409	,30655	,542	,491	-,503	,953
(En jaula) Tiempo en comer (En jaula)	22	50,4091	19,01293	-,091	,491	-,957	,953
Cantidad de comida ingerida	22	1,8273	,80545	1,042	,491	,752	,953
Condición experimental	22	2,05	,844	-,091	,491	-1,606	,953
Come antes de los 5 minutos	22	,41	,503	,397	,491	-2,037	,953
N válido (por lista)	22						

Tabla 4.2.2.2.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para el estudio de las conductas analizadas en NSFT y posteriormente las conductas de regreso a la jaula. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk para muestras inferiores a 30 casos muestra que el supuesto de normalidad no se cumple en todos los casos, sino que tenemos excepciones en las conductas de Tiempo en comer en el test (TIEMPO EN COMER) para los grupos RES-VEH ($W=0,779$; $p<0,05$) y RES-PGB ($W=0,800$; $p<0,05$) y en la conducta de comida ingerida en jaula (EN JAULA- CANTIDAD DE COMIDA INGERIDA) para el grupo RES-DUL ($W=0,748$; $p<0,05$), como se puede observar en la tabla 4.2.2.2.2. En estos casos de no cumplimiento del supuesto, en la estadística inferencial usaremos un test no paramétrico correspondiente a ANOVA de un factor, el test Kruskal-Wallis para variables independientes.

Pruebas de normalidad

Condición experimental		Shapiro-Wilk		
Tiempo en comer	RES-VEH	,779	7	,025
	RES-DUL	,930	7	,552
	RES-PGB	,800	8	,029
Acercamiento (veces por minuto)	RES-VEH	,899	7	,325
	RES-DUL	,806	7	,050
	RES-PGB	,880	8	,187
Tocar/Oler (veces por minuto)	RES-VEH	,909	7	,392
	RES-DUL	,821	7	,066
	RES-PGB	,944	8	,653
(En jaula) Tiempo en comer	RES-VEH	,965	7	,863
	RES-DUL	,926	7	,521
	RES-PGB	,926	8	,484
(En jaula) Cantidad de comida ingerida	RES-VEH	,974	7	,928
	RES-DUL	,748	7	,012
	RES-PGB	,930	8	,520

Tabla 4.2.2.2.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio de las conductas analizadas en NSFT y posteriormente las conductas de regreso a la jaula. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. En el caso de la variable Tiempo en comer, los grupos RES-VEH y RES-PGB no cumplen el supuesto de normalidad. En el caso de la variable (En jaula) Cantidad de comida ingerida, el grupo RES-DUL no cumple el supuesto de normalidad. Significación $p<0,05$.

Utilizamos el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.2.2.2.3). El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas salvo para las conductas de tiempo en comer en el test (TIEMPO EN COMER) ($F=4,280$; $p<0,05$) y veces por minuto que el animal se acerca al centro del test (ACERCAMIENTO-VECES POR MINUTO-) ($F=4,741$; $p<0,05$). En el caso de la conducta de Acercamiento (veces por minuto), esto no afectará a la estadística inferencial puesto que el análisis ANOVA se considera robusto para la homogeneidad de varianzas, pero sí al análisis post-hoc, en el cual utilizaremos el análisis Games-Howell, indicado cuando no pueden asumirse varianzas homogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianza

	Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
Tiempo en comer Se basa en la media	4,280	2	19	,029
Acercamiento (veces por minuto) Se basa en la media	4,741	2	19	,021
Tocar/Oler (veces por minuto) Se basa en la media	2,443	2	19	,114
(En jaula) Tiempo en comer Se basa en la media	,373	2	19	,694
(En jaula) Cantidad de comida ingerida Se basa en la media	1,848	2	19	,185

Tabla 4.2.2.2.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio de las conductas analizadas en NSFT y posteriormente las conductas de regreso a la jaula. El estadístico empleado es Levene. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas excepto en los casos de las variables Tiempo en comer ($F=4,280$; $p<0,05$) y Acercamiento (Veces por minuto) ($F=4,741$; $p<0,05$). Significación $p<0,05$.

4.2.2.2.1 Tiempo en comer

Continuando con la estadística inferencial; en primer lugar, analizamos la conducta de la variable tiempo en comer entre los tres grupos. El análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para muestras independientes muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$) (Tabla 4.2.2.2.1.1).

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Tiempo en comer es la misma entre las categorías de Condición experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,001	Rechaza la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

Tabla 4.2.2.2.1.1: Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para muestras independientes en el registro del tiempo que tarda en comer del centro del NSFT. $p < 0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Las correspondientes pruebas post-hoc de comparación por pares evidencian que esas diferencias son entre el grupo RES-DUL respecto a los grupos RES-VEH y RES-PGB. Sin embargo, los grupos RES-VEH y RES-PGB no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí (Tabla 4.2.2.2.2).

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de prueba	Estándar Error	Dev. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajust.
RES-DUL-RES-VEH	9,643	3,435	2,808	,005	,015
RES-DUL-RES-PGB	-12,188	3,325	-3,665	,000	,001
RES-VEH-RES-PGB	-2,545	3,325	-,765	,444	1,000

Tabla 4.2.2.2.1.2: Comparaciones por pares post-hoc al Kruskal-Wallis para la variable tiempo en comer en el NSFT. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p < 0,05$) y entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-PGB ($p < 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (Figura 4.2.2.2.1.1) muestra un descenso significativo de la latencia en comer en el grupo experimental tratado con Duloxetina respecto a los grupos tratados o bien con vehículo o bien con Pregabalina ($p < 0,05$).

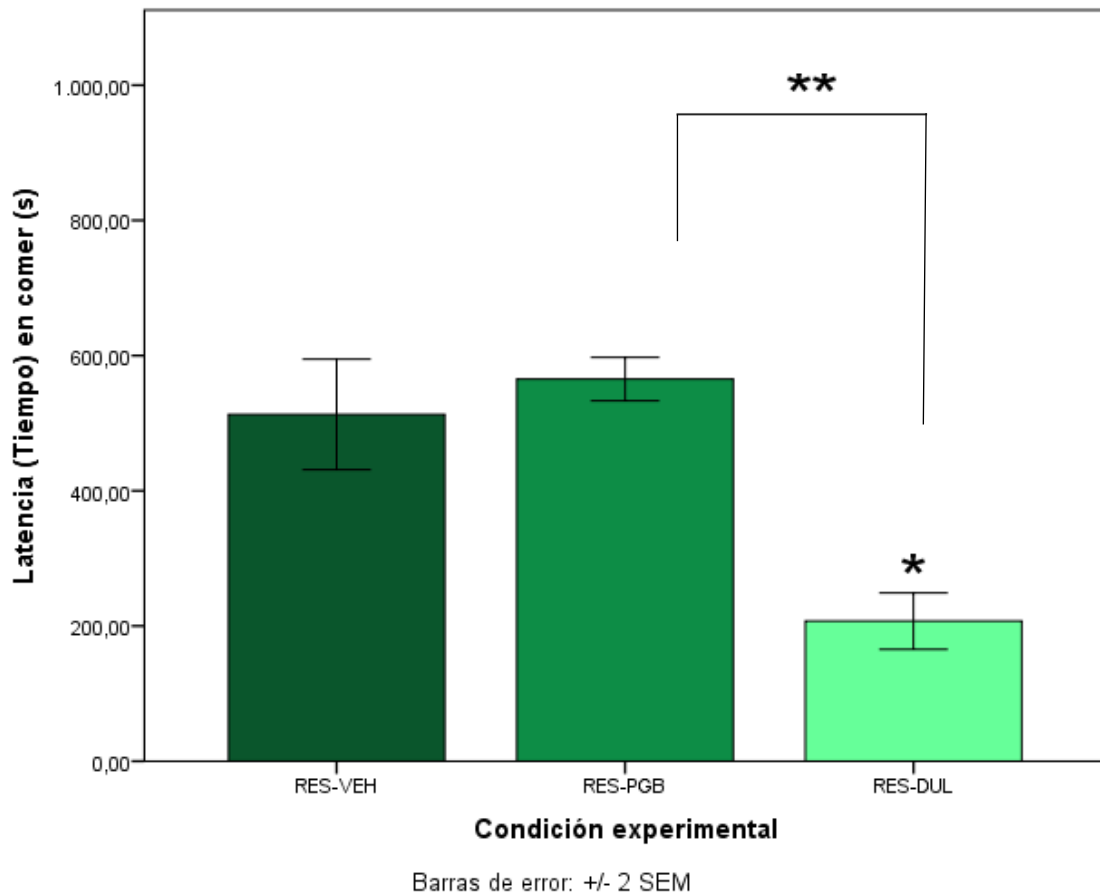


Figura 4.2.2.2.1.1: En el gráfico se muestra un descenso significativo de la latencia en comer (el tiempo que tardan en comer del centro del test) en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) con respecto a las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) y a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) * Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto a RES-PGB. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.2.2.2.2 Acercamiento (veces por minuto)

En segundo lugar, realizamos una prueba ANOVA de un factor para muestras independientes para la comparación de los grupos en la variable veces que el animal se acerca al centro del test por minuto (ACERCAMIENTO-VECES POR MINUTO). Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Tabla 4.2.2.2.2.1) ($F=7,520$; $p<0,05$). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al correspondiente análisis post-hoc de Games-Howell, puesto que en este caso no se cumplía el supuesto de homogeneidad de la varianza. Como podemos ver en la tabla 4.2.2.2.2.2, las diferencias se encuentran entre los grupos experimentales que han sido tratados bien con Pregabalina bien con Duloxetina respecto al grupo tratado con vehículo.

ANOVA

Acercamiento (veces por minuto)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,831	2	,915	7,520	,004
Dentro de grupos	2,313	19	,122		
Total	4,144	21			

Tabla 4.2.2.2.2.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de la conducta de acercamiento (veces por minuto) en el NSFT. $F= 7,520$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Acercamiento (veces por minuto)

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Games-Howell	RES-VEH	RES-DUL	-,60714 [*]	,18871	,032	-1,1528	-,0615
		RES-PGB	-,62946 [*]	,13708	,002	-1,0019	-,2571
	RES-DUL	RES-VEH	,60714 [*]	,18871	,032	,0615	1,1528
		RES-PGB	-,02232	,21449	,994	-,6027	,5581
	RES-PGB	RES-VEH	,62946 [*]	,13708	,002	,2571	1,0019
		RES-DUL	,02232	,21449	,994	-,5581	,6027

Tabla 4.2.2.2.2.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Games-Howell. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$) y entre el grupo RES-PGB y el grupo RES-VEH. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (Figura 4.2.2.2.1) muestra un aumento significativo de los acercamientos al centro del test tanto en el grupo experimental tratado con Duloxetina como en el grupo tratado con Pregabalina con respecto al grupo tratado con vehículo ($p < 0,05$).

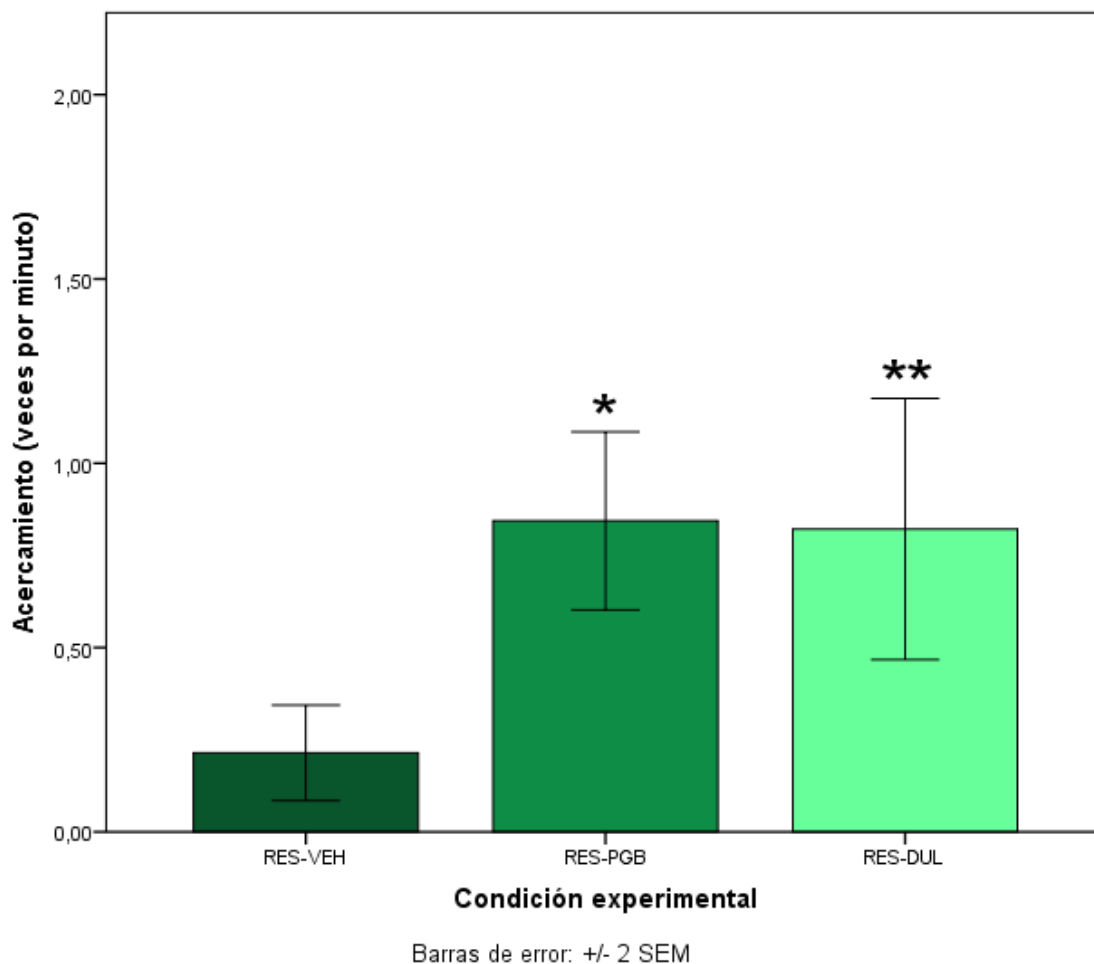


Figura 4.2.2.2.1: En el gráfico se muestra un aumento significativo de las veces por minuto que el animal se acerca al centro del test en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) y las ratas tratadas con Pregabalina (RES-PGB) con respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) * Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. ** Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.2.2.2.3 *Tocar/Oler (veces por minuto)*

En último lugar, realizamos una prueba ANOVA de un factor para muestras independientes para la comparación de los grupos en la conducta de toca y/u oler la comida emplazada en el centro del test. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=4,371$, $p<0,05$) (Tabla 4.2.2.2.3.1). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al test post-hoc de Bonferroni de comparaciones múltiples. En la tabla 4.2.2.2.3.2 podemos comprobar cómo estas diferencias se dan entre el grupo experimental tratado con Duloxetina y el grupo tratado con vehículo.

ANOVA

Tocar/Oler (veces por minuto)

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,622	2	,311	4,371	,027
Dentro de grupos	1,352	19	,071		
Total	1,973	21			

Tabla 4.2.2.2.3.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de la conducta de tocar/oler (veces por minuto) en el NSFT. $F= 4,371$; $p<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Tocar/Oler (veces por minuto)

(I)	(J)		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Bonferroni	RES-VEH	RES-DUL	-,42143 [*]	,14256	,024	-,7957	-,0472
		RES-PGB	-,20339	,13803	,471	-,5657	,1590
	RES-DUL	RES-VEH	,42143 [*]	,14256	,024	,0472	,7957
		RES-PGB	,21804	,13803	,392	-,1443	,5804
	RES-PGB	RES-VEH	,20339	,13803	,471	-,1590	,5657
		RES-DUL	-,21804	,13803	,392	-,5804	,1443

Tabla 4.2.2.2.3.2: Tabla post-hoc de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-DUL y el grupo RES-VEH ($p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (Figura 4.2.2.3.1) muestra un aumento significativo de la conducta de tocar y/u oler la comida del centro del test en el grupo experimental tratado con Duloxetina con respecto al grupo tratado con vehículo, pero no respecto al grupo tratado con Pregabalina ($p < 0,05$). Asimismo, el grupo tratado con Pregabalina y el grupo tratado con vehículo no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0,05$).

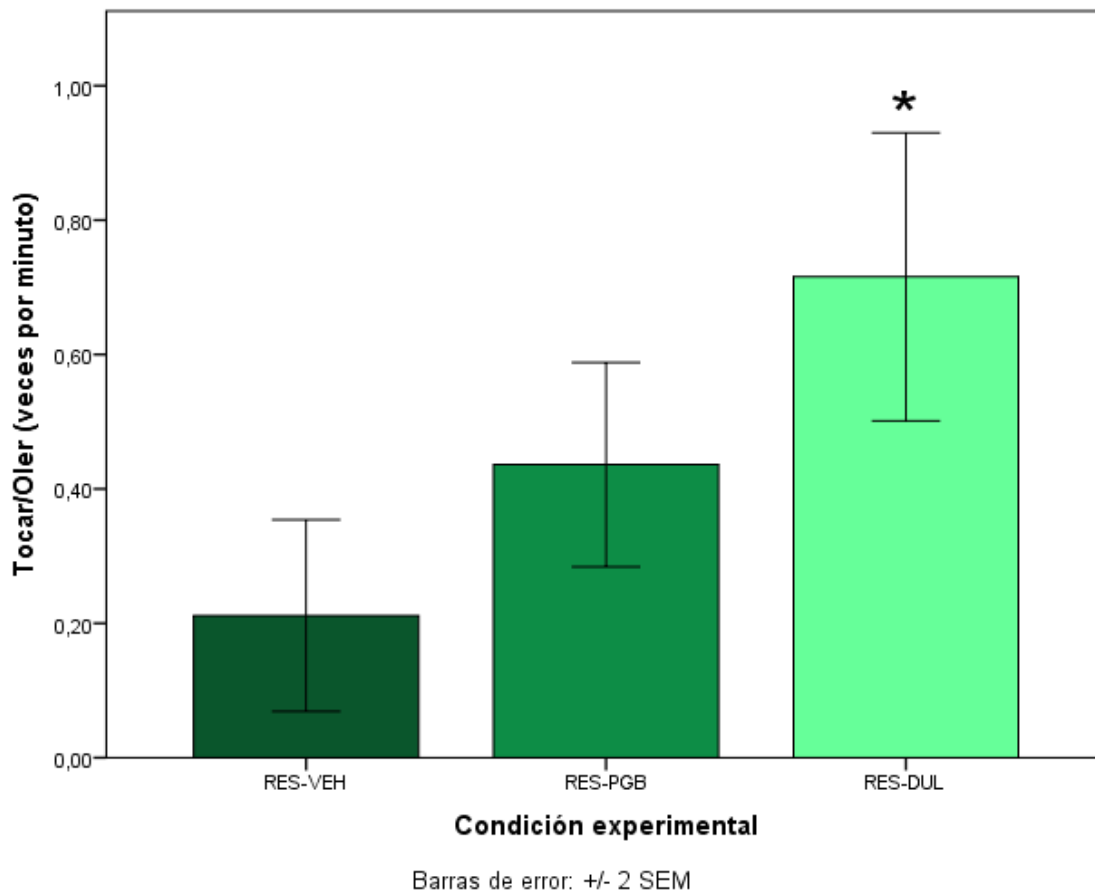


Figura 4.2.2.3.1: En el gráfico se muestra un descenso significativo de las veces por minuto que el animal toca y/o huele la comida (pero no llega a comer) del centro del test en las ratas tratadas con Duloxetina (RES-DUL) con respecto a las ratas tratadas con vehículo (RES-VEH) * Significación $p < 0,05$ respecto a RES-VEH. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.2.2.2.4 Conductas en jaula

Por otra parte, hemos analizado la latencia en comer y la cantidad de comida ingerida una vez devuelto cada animal a su propia jaula durante los diez minutos inmediatamente posteriores a la realización del test. De este modo, nos aseguramos de que las conductas observadas en el test son consecuencia de un estado de ánimo depresivo y no a causa del hambre que los animales estén sintiendo en ese momento. Para este propósito, compararemos la muestra con un ANOVA de un factor para la variable tiempo en comer en jaula y un test no paramétrico de Kruskal-Wallis para la variable cantidad de comida ingerida en la jaula.

En caso de la primera variable, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Tabla 4.2.2.4.1) ($F=1,525$; $p>0,05$).

ANOVA

(En jaula) Tiempo en comer

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1049,890	2	524,945	1,525	,243
Dentro de grupos	6541,429	19	344,286		
Total	7591,318	21			

Tabla 4.2.2.4.1: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes en el registro de la conducta de latencia en comer (tiempo en comer) una vez regresado cada animal a su jaula inmediatamente después del test. $F= 1,525$; $p>0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

En caso de la segunda variable, tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p>0,05$). (Tabla 4.2.2.4.2).

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de (En jaula) Cantidad de comida ingerida es la misma entre las categorías de Condición experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,217	Conserve la hipótesis nula.

Tabla 4.2.2.4.2: Prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes en el registro de la conducta de cantidad de comida ingerida) una vez regresado cada animal a su jaula inmediatamente después del test. $P<0,05$. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Estos resultados evidencian que todos los animales han comido al mismo tiempo y en la misma cantidad independientemente de su condición experimental una vez de vuelta a sus jaulas, alejadas de circunstancias ansiogénicas y de la lucha por la supervivencia.

En las figuras que vemos a continuación (Figura 4.2.2.4.1a, 4.2.2.4.1b) se muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables medidas en jaula.

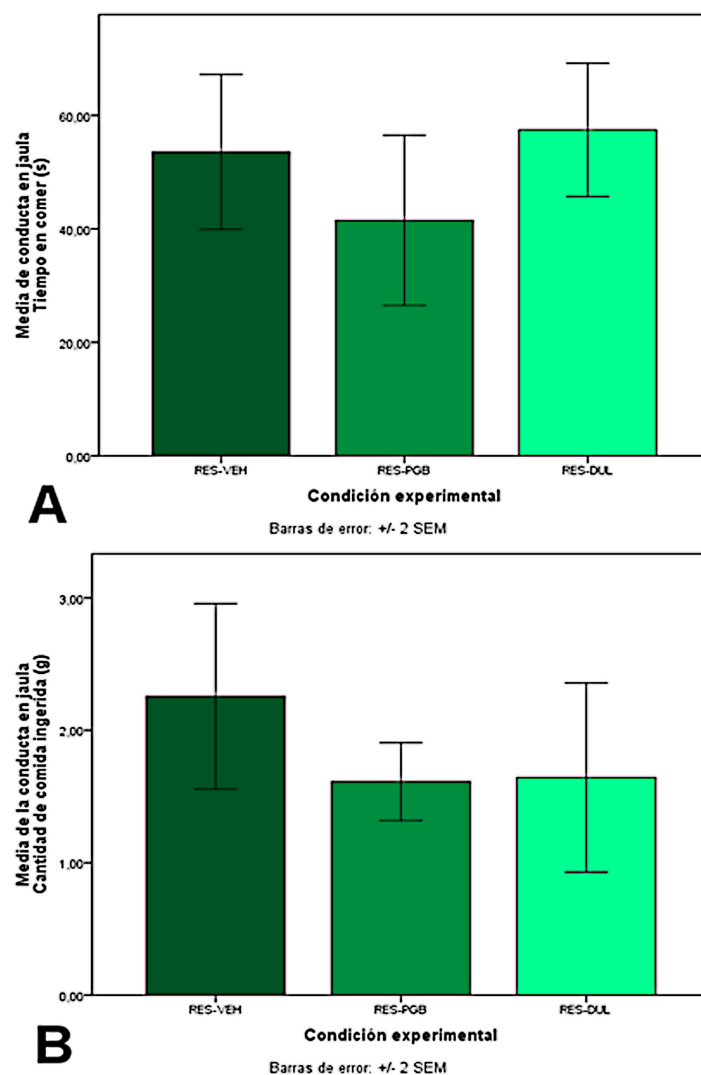


Figura 4.2.2.4.1a: El gráfico expone que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la latencia en comer una vez los animales han regresado a la jaula tras el test. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Figura 4.2.2.4.1b: El gráfico expone que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la cantidad de comida ingerida una vez los animales han regresado a la jaula tras el test. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

4.3 Resultados del estudio inmunohistoquímico

4.3.1 Resultados de Locus Coeruleus

4.3.1.1 Locus Coeruleus: Estudio de la evolución de los patrones de activación tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina

En primer lugar, vamos a realizar un análisis de la evolución temporal de los patrones de activación de LC tras 6 horas, 5 días y 15 días de haber implantado el modelo de FMS inducido por reserpina sin la aplicación de Formalin Test (Tabla 4.3.1.1.1). Los datos obtenidos representan % de área marcada con Fos, TH o ambos, respecto al total del núcleo. Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo VI.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
% Área TH	25	44,88072	8,299756	,364	,464	-,878	,902
% Área FOS	25	2,12300	3,269705	1,438	,464	,481	,902
%Área colocalización	25	2,19212	3,081748	1,157	,464	-,392	,902
N válido (por lista)	25						

Tabla 4.3.1.1.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de inmunofluorescencia tomadas del núcleo LC tras la administración de reserpina. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk muestra que el supuesto de normalidad se cumple en todos los casos (Tabla 4.3.1.1.2).

Pruebas de normalidad

Condición Experimental		Shapiro-Wilk		
% Área TH	RES-FOS-6H	,920	8	,430
	RES-FOS-5D	,896	8	,265
	RES-FOS-15D	,941	9	,593
% Área FOS	RES-FOS-6H	,922	8	,444
	RES-FOS-5D	,904	8	,316
	RES-FOS-15D	,897	9	,236
% Área colocalización	RES-FOS-6H	,882	8	,196
	RES-FOS-5D	,914	8	,380
	RES-FOS-15D	,849	9	,073

Tabla 4.3.1.1.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de LC tras la administración de reserpina. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W). Significación $p < 0,05$.

Por otra parte, se ha utilizado el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.3.1.1.3). El conjunto de datos sólo presenta homogeneidad de varianzas para el % Área TH ($F=1,578$; $p > 0,05$), por lo que el resto no cumple el supuesto de homogeneidad. Esto no afectará a la estadística inferencial puesto que el análisis ANOVA se considera robusto para la homogeneidad de varianzas, pero sí al análisis post-hoc, en el cual utilizaremos la corrección de Games-Howell, indicada cuando no pueden asumirse varianzas homogéneas.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
% Área TH	Se basa en la media	1,578	5	49	,184
% Área FOS	Se basa en la media	14,297	5	49	,000
% Área colocalización	Se basa en la media	14,408	5	49	,000

Tabla 4.3.1.1.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de LC tras la administración de reserpina. El estadístico empleado es Levene. % Área TH es la única variable que cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas ($F=1,578$; $p > 0,05$). Significación $p < 0,05$.

Continuando con la estadística inferencial; el análisis ANOVA de un factor para muestras independientes muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para las variables % Área FOS y % Área colocación ($p < 0,05$) (Tabla 4.3.1.1.4). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al correspondiente análisis post-hoc de Games-Howell (puesto que no se cumple el supuesto de homogeneidad de la varianza en estas variables). Como podemos ver en la tabla 4.3.1.1.5, observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-6H y los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D ($p < 0,05$). Los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0,05$). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el % de área de TH.

ANOVA

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
% Área TH	Entre grupos	378,435	2	189,218	3,265	,057
	Dentro de grupos	1274,828	22	57,947		
	Total	1653,263	24			
% Área FOS	Entre grupos	178,429	2	89,215	25,113	,000
	Dentro de grupos	78,154	22	3,552		
	Total	256,583	24			
% Área colocalización	Entre grupos	198,459	2	99,230	74,070	,000
	Dentro de grupos	29,473	22	1,340		
	Total	227,932	24			

Tabla 4.3.1.1.4: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes para las medidas de inmunofluorescencia de LC tras la administración de reserpina. Se observan diferencias estadísticamente significativas en % Área FOS ($F=26,113$; $p < 0,05$) y en % Área colocación ($F= 74,070$; $p < 0,05$). No se observan diferencias entre los grupos respecto a % Área TH ($F= 3,265$; $p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente		(I)Condición Experimental	(J)Condición Experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
							Límite inferior	Límite superior
Games-Howell	% Área FOS	RES-FOS-6H	RES-FOS-5D	5,828625*	1,175845	,004	2,36827	9,28898
			RES-FOS-15D	5,631847*	1,179239	,005	2,17110	9,09260
		RES-FOS-5D	RES-FOS-6H	-5,828625*	1,175845	,004	-9,28898	-2,36827
			RES-FOS-15D	-,196778	,110587	,221	-,49489	,10134
		RES-FOS-15D	RES-FOS-6H	-5,631847*	1,179239	,005	-9,09260	-2,17110
			RES-FOS-5D	-,196778	,110587	,221	-,10134	,49489
	%Área colocalización	RES-FOS-6H	RES-FOS-5D	6,116000*	,717559	,000	4,00647	8,22553
			RES-FOS-15D	5,969819*	,722424	,000	3,85947	8,08017
		RES-FOS-5D	RES-FOS-6H	-6,116000*	,717559	,000	-8,22553	-4,00647
			RES-FOS-15D	-,146181	,103668	,369	-,42557	,13321
		RES-FOS-15D	RES-FOS-6H	-5,969819*	,722424	,000	-8,08017	-3,85947
			RES-FOS-5D	-,146181	,103668	,369	-,13321	,42557

Tabla 4.3.1.1.5: Prueba post-hoc de comparaciones múltiples de Games-Howell. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el grupo RES-FOS-6H con respecto a los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D ($p < 0,05$) tanto en el % de área de Fos como en el % de colocalización. Por otra parte, los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Dada la elevada diferencia entre la media de % de área de TH y la % de área de fos y colocalización, los datos se representan gráficamente en figuras aparte: % de área de TH (4.3.1.1.1) y % de área de fos y colocalización (Figura 4.3.1.1.2).

La figura que vemos a continuación (Figura 4.3.1.1.2) muestra un descenso significativo del total de área del núcleo LC ocupada por células fos-positivas en los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D con respecto al grupo RES-FOS-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D con respecto al grupo RES-FOS-6H ($p < 0,05$) tras la administración de reserpina.

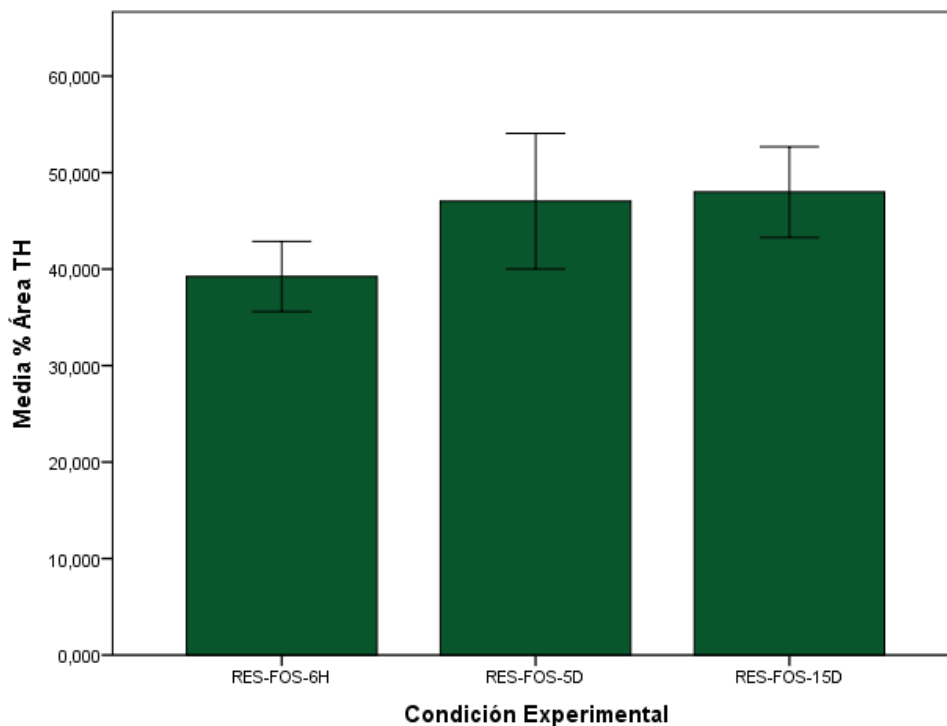


Figura 4.3.1.112: Representación gráfica de la comparación de las medias de % Área TH entre los grupos RES-FOS-6H, RES-FOS-5D Y RES-FOS15D. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

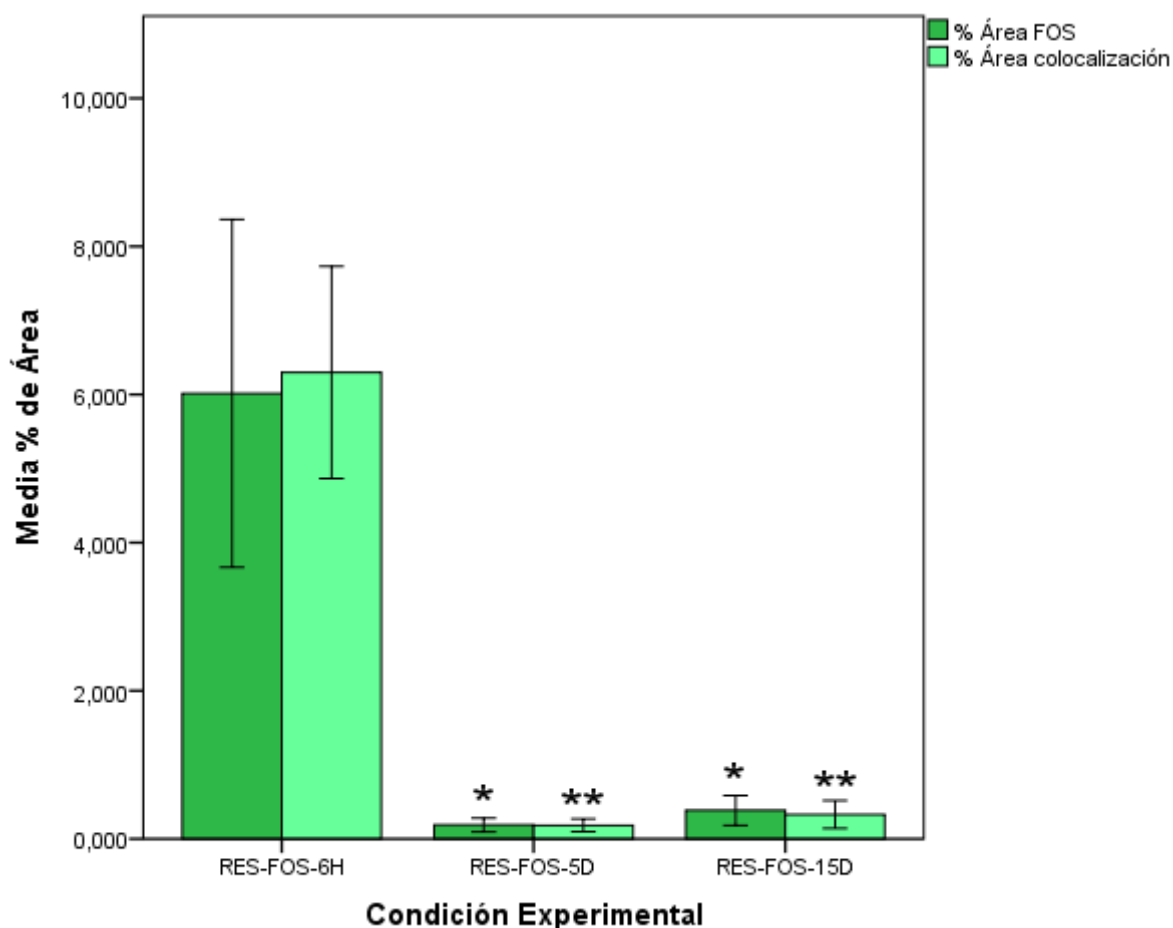


Figura 4.3.1.1.2: En el gráfico se muestra un descenso significativo del total de área del núcleo LC ocupada por células fos-positivas en RES-FOS-5D y RES-FOS-15D con respecto a RES-FOS-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en RES-FOS-5D y RES-FOS-15D con respecto a RES-FOS-6H ($p < 0,05$). * Significación $p < 0,05$ de % Área FOS respecto a RES-FOS-6H. ** Significación $p < 0,05$ % Área colocalización respecto a RES-FOS-6H. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra la evolución en la colocalización desde las 6 horas tras la última reserpinización hasta el 15 día tras la última reserpinización sin la aplicación de formalin test.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-6H	94%	6%
RES-FOS-5D	99%	1%
RES-FOS-15D	99%	1%

Tabla 4.3.1.1.6: Porcentajes de colocalización total TH-FOS en la condición a la que no se le aplica Formalin Test. Los porcentajes de colocalización se mantienen muy altos durante toda la evolución temporal.

4.3.1.2 Locus Coeruleus: Estudio de la evolución de los patrones de activación tras el Test de Formalina en el modelo de FMS inducido por reserpina

Realizamos un análisis de la evolución temporal de los patrones de activación de LC en los animales a los que se les ha realizado el test de la formalina (FT) a las 4 horas de la tercera administración de reserpina (se perfunden a las 6 horas de la última dosis de reserpina), a los 5 días y a los 15 días de la tercera administración de reserpina (Tabla 4.3.1.2.1). Un estudio más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo VII.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
				Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
% Área TH	30	49,03987	9,230453	,611	,427	,172	,833
% Área FOS	30	2,37987	3,260780	,934	,427	-,927	,833
%Área colocalización	30	1,99250	2,752162	,967	,427	-,785	,833
N válido (por lista)	30						

Tabla 4.3.1.2.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de inmunofluorescencia tomadas del núcleo LC tras el test de la formalina en las ratas reserpinizadas. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

Pruebas de normalidad

Condición Experimental		Shapiro-Wilk		
% Área TH	RES-FOS-FT-6H	,918	10	,340
	RES-FOS-FT-5D	,914	10	,308
	RES-FOS-FT-15D	,965	10	,842
% Área FOS	RES-FOS-FT-6H	,946	10	,618
	RES-FOS-FT-5D	,765	10	,005
	RES-FOS-FT-15D	,710	10	,001
% Área colocalización	RES-FOS-FT-6H	,935	10	,504
	RES-FOS-FT-5D	,792	10	,012
	RES-FOS-FT-15D	,688	10	,001

Tabla 4.3.1.2.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico en LC de los animales a los que se les ha realizado el FT tras administrar la reserpina. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W). Significación $p < 0,05$.

El test de normalidad Shapiro-Wilk muestra que el supuesto de normalidad no se cumple en la variable % Área FOS para los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D, y en la variable % colocalización para los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D (Tabla 4.3.1.2.2).

Por otra parte, se ha utilizado el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.3.1.2.3). El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas para % Área TH ($F=0,753$; $p>0,05$), pero el resto no cumple el supuesto de homogeneidad.

Prueba de homogeneidad de varianza

	Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
% Área TH	,753	2	27	,481
% Área FOS	10,640	2	27	,000
% Área colocalización	24,781	2	27	,000

Tabla 4.3.1.2.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico en LC de los animales a los que se les ha realizado el FT tras administrar la reserpina. El estadístico empleado es Levene. % Área TH es la única variable que cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas ($F=0,753$; $p>0,05$). Significación $p<0,05$.

Dado que no todas las condiciones experimentales cumplen el supuesto de normalidad, recurriremos al test no paramétrico equivalente al ANOVA para muestras independientes, el análisis Kruskal-Wallis para muestras independientes, con su correspondiente análisis post-hoc de comparación por pares. El análisis de la variable % Área TH, al cumplir todos los supuestos, se realizará con un test ANOVA de un factor para muestras independientes y con un post-hoc de Bonferroni.

El análisis ANOVA de un factor para muestras independientes no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para la variable % Área TH ($p > 0,05$) (Tabla 4.3.1.2.4).

ANOVA

% Área TH

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	46,611	2	23,305	,260	,773
Dentro de grupos	2424,226	27	89,786		
Total	2470,837	29			

Tabla 4.3.1.2.4: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes. No se observan diferencias entre los grupos respecto al % de área de TH ($F = 0,260$; $p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

El test no paramétrico Kruskal-Wallis muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables % Área FOS y % Área colocación ($p < 0,05$) (Tabla 4.3.1.2.5). Para saber cómo son esas diferencias, hemos recurrido a un post-hoc de comparación por pares. En ambos casos, las diferencias estadísticamente significativas residen entre la condición experimental RES-FOS-FT-6H y las condiciones RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p < 0,05$) (Tablas 4.3.1.2.6 y 4.3.1.2.7). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D en ninguna de las variables ($p > 0,05$).

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área colocación es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.

Tabla 4.3.1.2.5: Pruebas Kruskal-Wallis para muestras independientes para las variables % Área FOS y % Área colocación. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas en ambos casos ($p < 0,05$).

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de prueba	Estándar Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajust.
RES-FOS-FT-15D-RES-FOS-FT-5D	3,000	3,937	,762	,446	1,000
RES-FOS-FT-15D-RES-FOS-FT-6H	16,500	3,937	4,191	,000	,000
RES-FOS-FT-5D-RES-FOS-FT-6H	13,500	3,937	3,429	,001	,002

Tabla 4.3.1.2.6: Tabla de comparación por parejas post-hoc no paramétrica de % Área FOS. Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-FT-6H y los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p < 0,05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p > 0,05$).

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de prueba	Estándar Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajust.
RES-FOS-FT-15D-RES-FOS-FT-5D	,900	3,931	,229	,819	1,000
RES-FOS-FT-15D-RES-FOS-FT-6H	15,450	3,931	3,930	,000	,000
RES-FOS-FT-5D-RES-FOS-FT-6H	14,550	3,931	3,701	,000	,001

Tabla 4.3.1.2.7: Tabla de comparación por parejas post-hoc no paramétrica de % Área colocación. Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-FT-6H y los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p < 0,05$). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p > 0,05$).

Dada la elevada diferencia entre la media de % de área de TH y la % de área de fos y colocación, los datos se representan gráficamente en figuras aparte: % de área de TH (4.3.1.2.1) y % de área de fos y colocación (Figura 4.3.1.2.2).

La figura que vemos a continuación (Figura 4.3.1.2.2) muestra un descenso significativo del total de área del núcleo LC ocupada por células fos-positivas en los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D con respecto al grupo RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocación de células fos-positivas en los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D con respecto al grupo RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$).

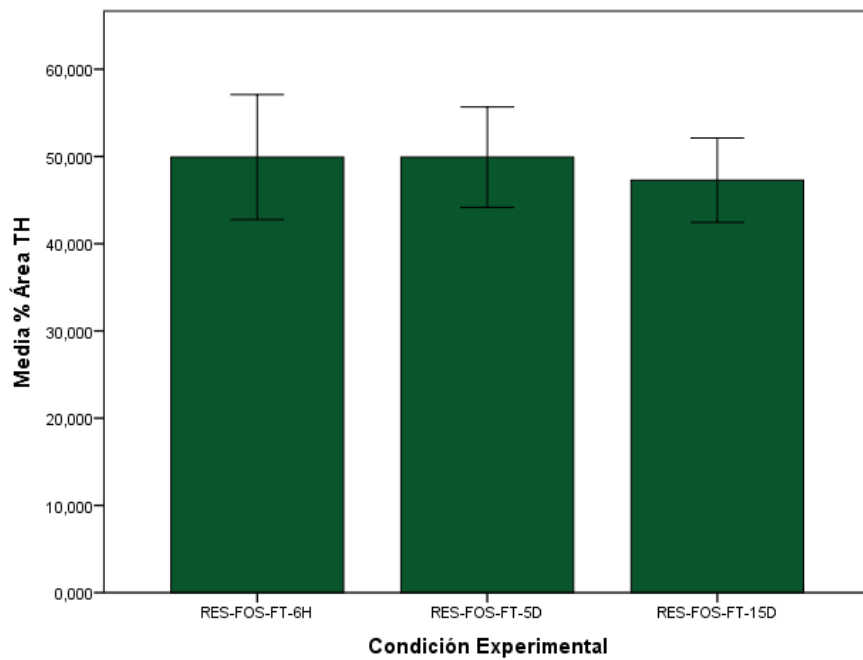


Figura 4.3.1.2.1: Representación gráfica de la comparación de media de % área de TH entre los grupos RES-FOS-FT-6H, RES-FOS-FT-6H, RES-FOS-FT-5D Y RES-FOS-FT-15D. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

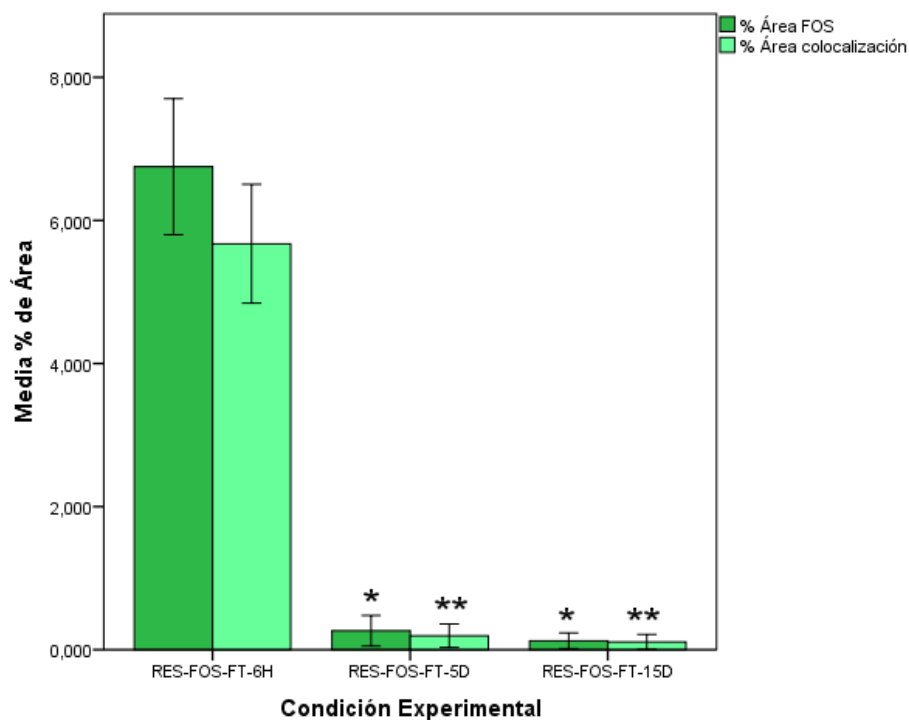


Figura 4.3.1.2.2: En el gráfico se muestra un descenso significativo del total de área del núcleo LC ocupada por células fos-positivas en RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D con respecto a RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D con respecto a RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$). * Significación $p < 0,05$ de %Área FOS respecto a RES-FOS-FT-6H. ** Significación $p < 0,05$ de %Área colocalización respecto a RES-FOS-FT-6H. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra la evolución en la colocalización desde las 6 horas tras la última reserpinización hasta el 15 día tras la última reserpinización y contando con la aplicación de formalin test.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-FT-6H	90%	10%
RES-FOS-FT-5D	99%	1%
RES-FOS-FT-15D	99%	1%

Tabla 4.3.1.1.6: Porcentajes de colocalización total TH-FOS en la condición a la que se le aplica Formalin Test. Los porcentajes de colocalización se mantienen muy altos durante toda la evolución temporal.

4.3.1.3 Locus Coeruleus: Estudio comparativo de las condiciones sin y con Test de la Formalina tras la reserpinización.

Por último, analizaremos por separado las condiciones experimentales del mismo día sin y con Test de la Formalina posterior al procedimiento de reserpinización.

En cuanto a la comparación de las variables correspondientes a las 6 horas después de la última administración de reserpina (RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H), realizamos una prueba T de Student para muestras independientes, puesto que, como hemos analizado anteriormente, en ambas se cumple el supuesto de normalidad. Aunque el supuesto de homogeneidad no se cumple para % Área FOS y el % Área colocalización, la prueba T es robusta para la falta de este supuesto. Como vemos en la siguiente tabla (Tabla 4.3.1.3.1), no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna de las variables a estudio, tanto en % Área TH ($t= 1,189$; $p>0,05$), en % Área FOS ($t= -0,554$; $p>0,05$) y en Área colocalización ($t=1,464$; $p>0,05$).

Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.1.3.1.

Prueba de muestras independientes

Prueba de Levene de homogeneidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias								
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
% Área TH	Se asumen varianzas iguales	,826	,381	1,189	12	,257	,989900	,832643	-,824272	2,804072
% Área FOS	Se asumen varianzas iguales	,989	,340	-,554	12	,590	-,063750	,115028	-,314374	,186874
% Área colocalización	Se asumen varianzas iguales	,167	,690	1,464	12	,169	,208600	,142534	-,101955	,519155

Tabla 4.3.1.3.1: Pruebas T de Student para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H en ninguna de las variables a estudio (% Área TH ($t= 1,189$; $p>0,05$), % Área FOS ($t= -0,554$; $p>0,05$) y el % Área colocalización ($t=1,464$; $p>0,05$)). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

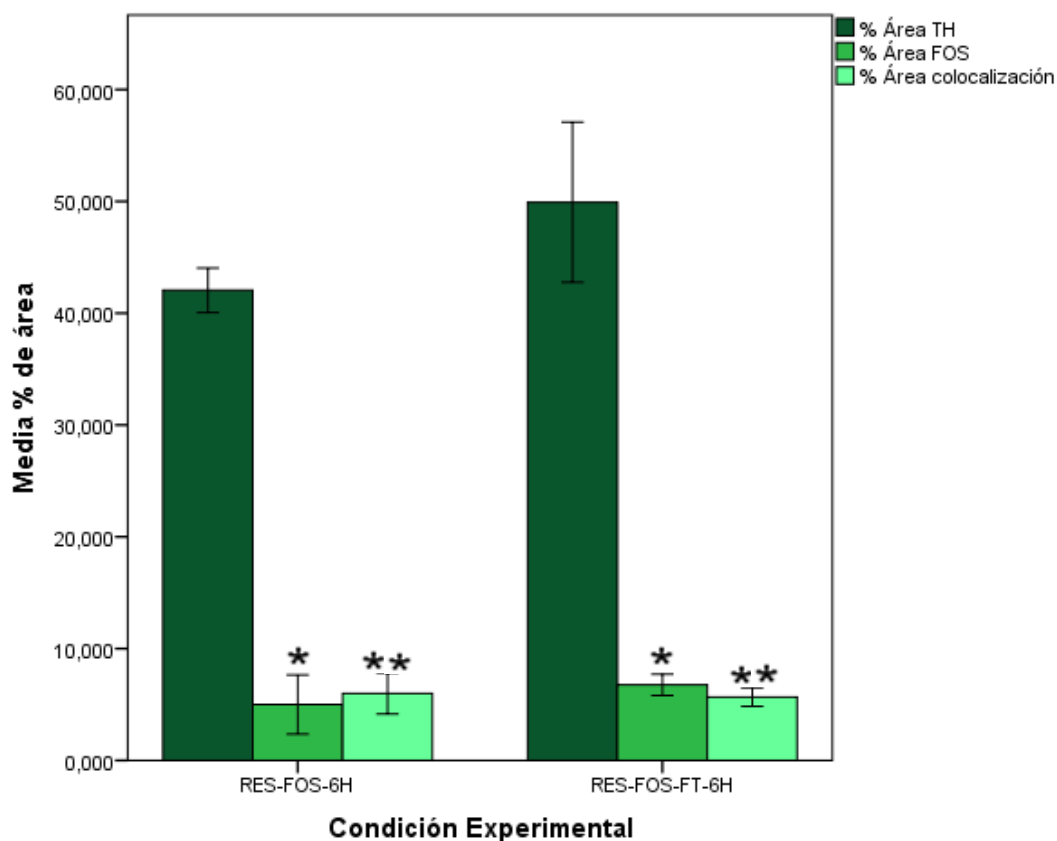


Figura 4.3.1.3.1: La figura muestra la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables % Área TH ($t = 1,189$; $p > 0,05$), % Área FOS ($t = -0,554$; $p > 0,05$) y % Área colocalización. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que en la condición RES-FOS-6H un 94% de las células fos-positivas son células Th-positivas. En cambio, en la condición RES-FOS-FT-6H colocaliza una menor proporción, 90%.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-6H	94%	6%
RES-FOS-FT-6H	90%	10%

Tabla 4.3.1.3.2: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 94% de las células fos-positivas de RES-FOS-6H son células Th-positivas frente al 90% de las de RES-FOS-FT-6H.

En la figura 4.3.1.3.2 se muestra un ejemplo de LC en los grupos RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocación de ambos, TH+FOS.

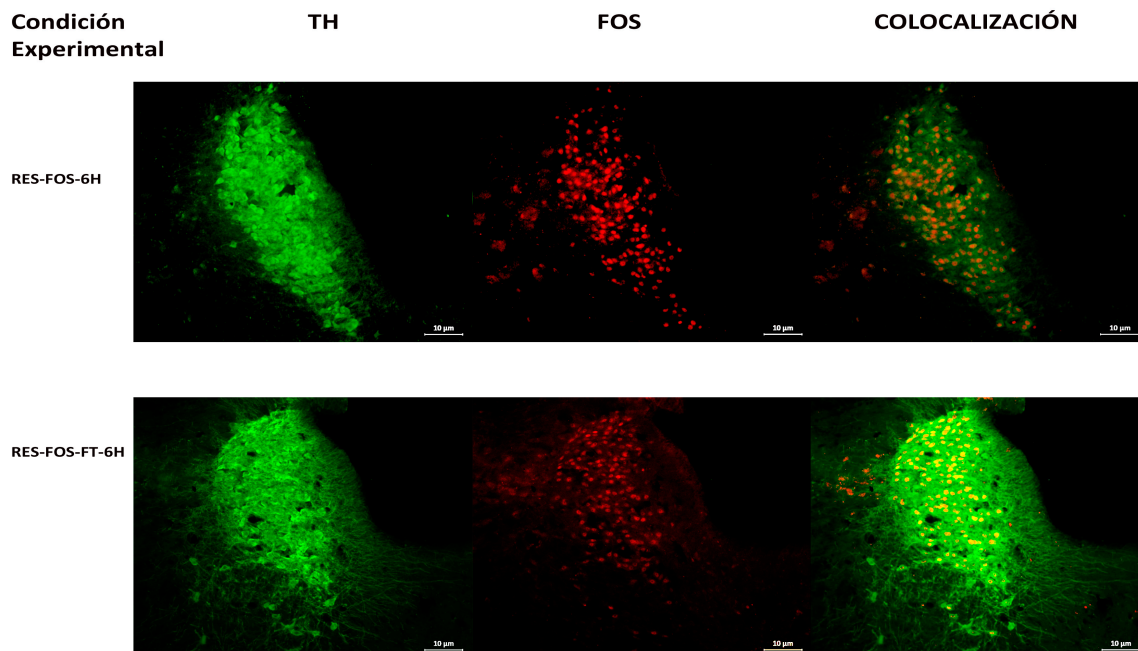


Figura 4.3.1.3.2: Imagen del marcaje de LC con TH, FOS y su colocación para las condiciones experimentales RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

Por otra parte, analizaremos las variables correspondientes a los 5 días tras la última administración de reserpina (RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D). Respecto a la variable % Área TH, realizamos una prueba T de Student para muestras independientes, puesto que, como hemos analizado anteriormente, en ambas se cumplen los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Respecto a las variables % Área FOS y % Área colocación, al no cumplir el supuesto de normalidad, acudiremos a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras independientes. Como vemos en la tabla 4.3.1.3.3, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en % Área TH ($t= 0,908$; $p>0,05$). Asimismo, en la tabla 4.3.1.3.4, observamos que tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas en % Área FOS ($p>0,05$) y % Área colocación ($p>0,05$).

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
% Área TH	Se asumen varianzas iguales	3,066	,108	,908	11	,383	4,847810	5,337050	-6,898958	16,594577

Tabla 4.3.1.3.3: Prueba T de Student para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D en % Área TH ($t=0,908$; $p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,628 ¹	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área colocalización es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,366 ¹	Conserve la hipótesis nula.

Tabla 4.3.1.3.4: Pruebas U de Mann-Whitney para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D en % Área FOS ($p<0,05$) ni en % Área colocalización ($p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Estos datos se muestran gráficamente en las figuras 4.3.1.3.3 y 4.3.1.3.4 Dada la elevada diferencia entre la media de % de área de TH y la % de área de fos y colocación, los datos se representan gráficamente en figuras aparte: % de área de TH (4.3.1.3.3) y % de área de fos y colocación (Figura 4.3.1.3.4).

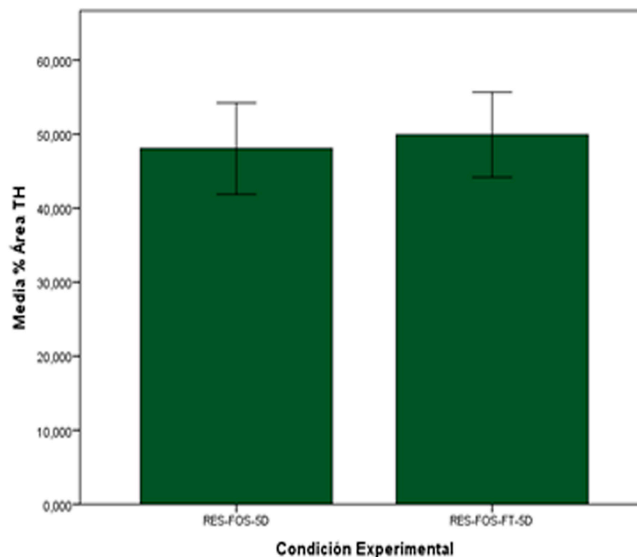


Figura 4.3.1.3.3: Representación gráfica de la comparación de medias de % Área TH entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

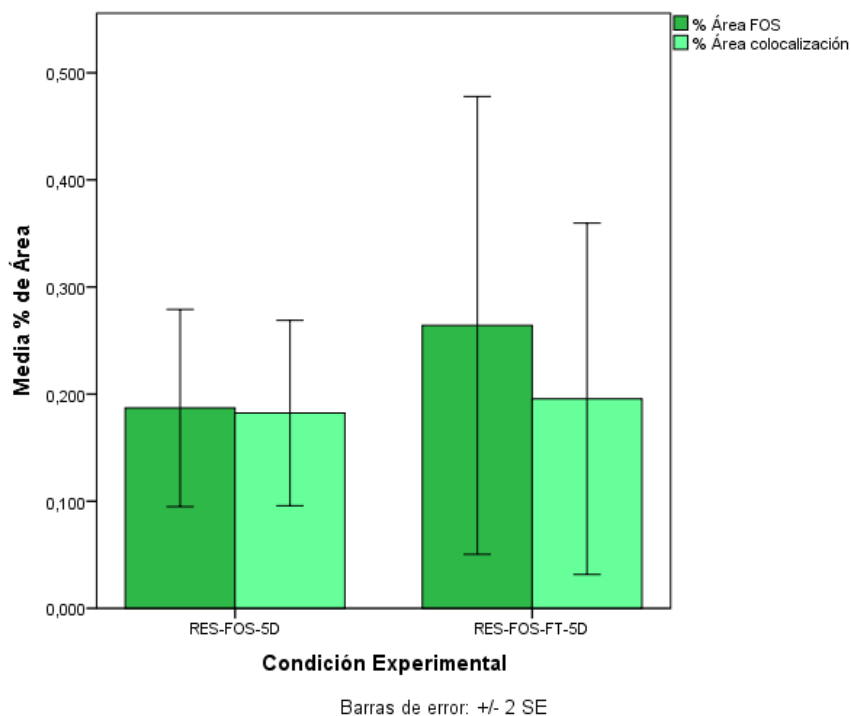


Figura 4.3.1.3.4: Representación gráfica de la comparación de media de % área de Fos y el % de Área de colocación entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que en ambas condiciones, RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D, un 99% de las células fos-positivas son células Th-positivas.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-5D	99%	1%
RES-FOS-FT-5D	99%	1%

Tabla 4.3.1.3.5: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 99% de las células fos-positivas de RES-FOS-5D y de RES-FOS-FT-5D son células Th-positivas.

Asimismo, en la figura 4.3.1.3.5 se muestra un ejemplo de LC en los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocalización de ambos, TH+FOS.

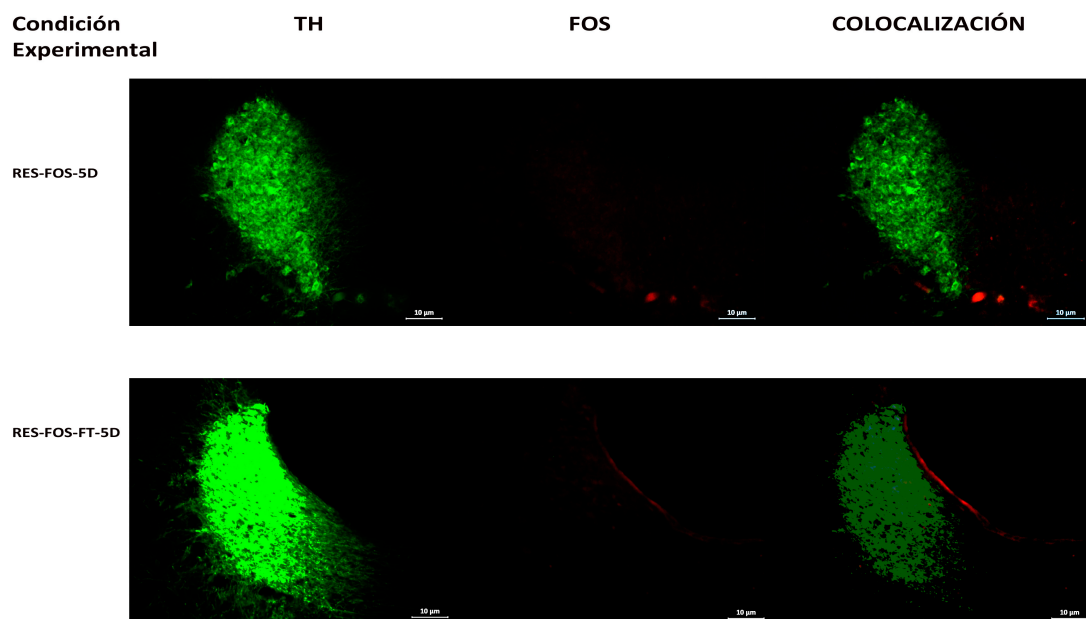


Figura 4.3.1.3.5: Imagen del marcaje de LC con TH, FOS y su colocalización para las condiciones experimentales RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

Para finalizar con el estudio de Locus Coeruleus, analizaremos las variables correspondientes a los 15 días tras la última administración de reserpina (RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D). Respecto a la variable % Área TH, realizamos una prueba T de Student para muestras independientes, puesto que, como hemos analizado anteriormente, en ambas se cumplen los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Respecto a las variables % Área FOS y % Área colocalización, al no cumplir en supuesto de normalidad, acudiremos a la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras independientes. Como vemos en la tabla 4.3.1.3.6, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en % Área TH ($t = -0,278$; $p > 0,05$). Asimismo, en la tabla 4.3.1.3.7, observamos que tampoco se encuentran diferencias estadísticamente significativas en % Área FOS ($p > 0,05$) y el % Área colocalización ($p > 0,05$).

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
% Se asumen Área TH iguales varianzas iguales	,001	,978	-,278	17	,785	-,922567	3,321987	-7,93134	6,08621

Tabla 4.3.1.3.6: Prueba T de Student para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en % Área TH ($t = -0,278$; $p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,121 ¹	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área colocalización es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,121 ¹	Conserve la hipótesis nula.

Tabla 4.3.1.3.7: Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D ni en % Área FOS ($p > 0,05$) ni en % Área colocalización ($p > 0,05$).

Estos datos se muestran gráficamente en las figuras 4.3.1.3.5 y 4.3.1.3.6. Dada la elevada diferencia entre la media de % de área de TH y la % de área de fos y colocalización, los datos se representan gráficamente en figuras aparte: % de área de TH (4.3.1.3.6) y % de área de fos y colocalización (Figura 4.3.1.3.7).

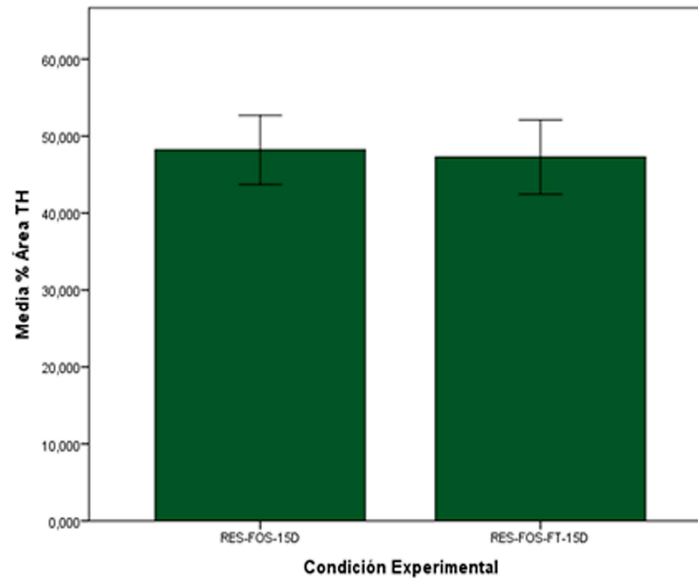


Figura 4.3.1.3.6: Representación gráfica de la comparación de medias de % Área TH entre los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

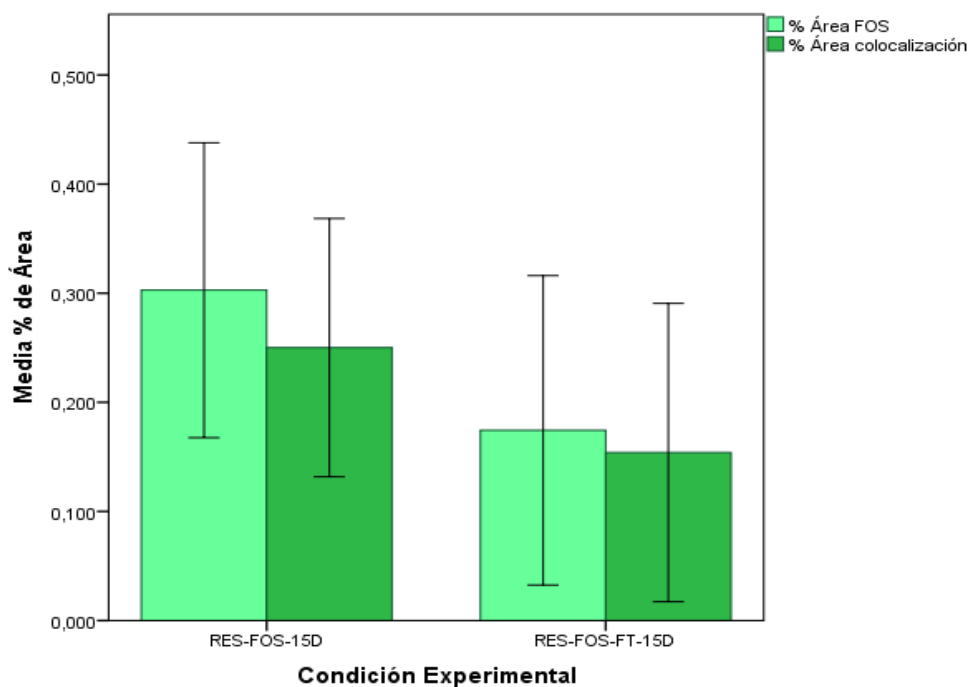


Figura 4.3.1.3.7: Representación gráfica de la comparación de medias de % Área FOS y % Área colocalización entre los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que tanto en RES-FOS-15D como en RES-FOS-FT-15D, un 99% de las células fos-positivas son células Th-positivas.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-15D	99%	1%
RES-FOS-FT-15D	99%	1%

Tabla 4.3.1.3.: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 99% de las células fos-positivas de RES-FOS-15D y de RES-FOS-FT-15D son células Th-positivas.

En la figura 4.3.1.3.8 se muestra un ejemplo de LC en los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocalización de ambos, TH+FOS.

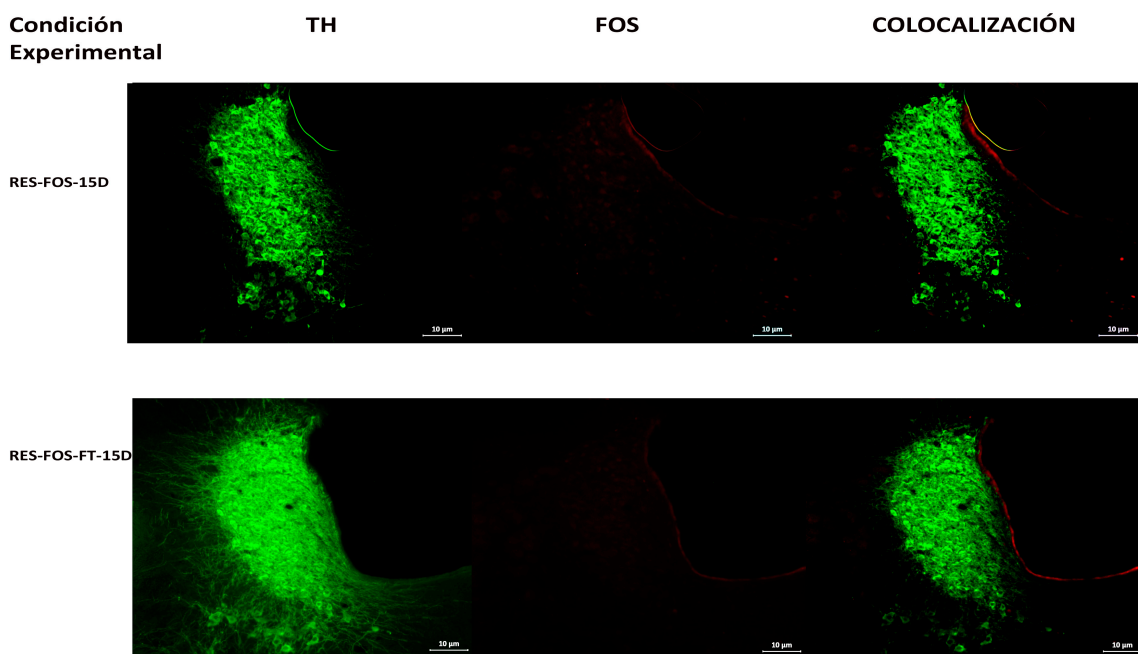


Figura 4.3.1.3.8: Imagen del marcaje de LC con TH, FOS y su colocalización para las condiciones experimentales RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

4.3.2 Resultados de A5

4.3.2.1 A5: Estudio de la evolución de los patrones de activación tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina

Realizamos un análisis de la evolución temporal de los patrones de activación de A5 a las 6 horas, 5 días y 15 días posteriores a la tercera administración de reserpina (Tabla 4.3.2.1.1). Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo VIII.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
% Área TH	17	1,67465	,859347	,320	,550	-,688	1,063
% Área FOS	17	,25918	,231408	1,480	,550	2,130	1,063
%Área COLOCALIZACIÓN	17	,11171	,111990	1,394	,550	1,617	1,063
N válido (por lista)	17						

Tabla 4.3.2.1.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de inmunofluorescencia tomadas del núcleo A5 en distintos momentos temporales tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk muestra que el supuesto de normalidad se cumple en todos los casos (Tabla 4.3.2.1.2).

Por otra parte, se ha utilizado el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.3.2.1.3). El conjunto de datos sólo presenta homogeneidad de varianzas para % Área FOS ($F=2,310$; $p>0,05$), por lo que el resto no cumple el supuesto de homogeneidad. Esto no afectará a la estadística inferencial puesto que el análisis ANOVA se considera robusto para la homogeneidad de varianzas, pero sí al análisis post-hoc, en el cual utilizaremos la corrección de Games-Howell, indicada cuando no pueden asumirse varianzas homogéneas.

Pruebas de normalidad

Condición Experimental		Shapiro-Wilk		
% Área TH	RES-FOS-6H	,893	7	,290
	RES-FOS-5D	,948	4	,707
	RES-FOS-15D	,861	6	,193
% Área FOS	RES-FOS-6H	,954	7	,762
	RES-FOS-5D	,924	4	,559
	RES-FOS-15D	,916	6	,479
% Área colocalización	RES-FOS-6H	,894	7	,297
	RES-FOS-5D	,991	4	,961
	RES-FOS-15D	,824	6	,095

Tabla 4.3.2.1.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de A5 tras la implantación del modelo de FMS mediante reserpinización. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W). Significación $p < 0,05$.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
% Área TH	Se basa en la media	4,818	2	14	,026
% Área FOS	Se basa en la media	2,310	2	14	,136
% Área colocalización	Se basa en la media	6,106	2	14	,012

Tabla 4.3.2.1.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de A5 tras la tercera administración de reserpina. El estadístico empleado es Levene. Las variables % Área TH ($F = 4,818$, $p < 0,05$) y % Área colocalización ($F = 6,106$; $p < 0,05$) no cumplen el supuesto de homogeneidad de varianzas. Significación $p < 0,05$.

Respecto a la estadística inferencial, el análisis ANOVA de un factor para muestras independientes muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para las variables % Área FOS y % Área colocalización ($p < 0,05$) (Tabla 4.3.2.1.4). Para saber cómo son esas diferencias, realizamos el análisis post-hoc de Bonferroni en % Área FOS, y la corrección de Games-Howell en % Área colocalización (puesto que no se cumple el supuesto de homogeneidad de la varianza en esta variable). Como podemos ver en la tabla 4.3.2.1.5, observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-6H y los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D ($p < 0,05$). Los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0,05$). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en % Área TH.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
% Área TH	Entre grupos	2,226	2	1,113	1,625	,232
	Dentro de grupos	9,590	14	,685		
	Total	11,816	16			
% Área FOS	Entre grupos	,482	2	,241	9,023	,003
	Dentro de grupos	,374	14	,027		
	Total	,857	16			
% Área Colocalización	Entre grupos	,113	2	,057	9,034	,003
	Dentro de grupos	,088	14	,006		
	Total	,201	16			

Tabla 4.3.2.1.4: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes para las medidas de inmunofluorescencia de A5 tras implantar el modelo de FMS inducido por reserpina. Se observan diferencias estadísticamente significativas en % Área FOS ($F=9,023$; $p<0,05$) y en % Área colocalización ($F= 9,034$; $p<0,05$). No se observan diferencias entre los grupos en % Área TH ($F= 1,625$; $p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Condición Experimental	(J) Condición Experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza			
						Límite inferior	Límite superior		
Bonferroni	% Área FOS	RES-FOS-6H	RES-FOS-5D	,328536*	,102487	,019	,05000	,60707	
			RES-FOS-15D	,350786*	,090970	,005	,10355	,59802	
		RES-FOS-5D	RES-FOS-6H	-,328536*	,102487	,019	-,60707	-,05000	
			RES-FOS-15D	,022250	,105547	1,000	-,26460	,30910	
		RES-FOS-15D	RES-FOS-6H	-,350786*	,090970	,005	-,59802	-,10355	
			RES-FOS-5D	-,022250	,105547	1,000	-,30910	,26460	
	Games-Howell	% Área Colocalización	RES-FOS-6H	RES-FOS-5D	,152214*	,046464	,027	,01976	,28467
				RES-FOS-15D	,173381*	,045351	,013	,04303	,30374
		RES-FOS-5D	RES-FOS-6H	-,152214*	,046464	,027	-,28467	-,01976	
			RES-FOS-15D	,021167	,025585	,700	-,05472	,09705	
		RES-FOS-15D	RES-FOS-6H	-,173381*	,045351	,013	-,30374	-,04303	
			RES-FOS-5D	-,021167	,025585	,700	-,09705	,05472	

Tabla 4.3.2.1.5: Comparaciones post-hoc de Bonferroni para la variable % Área FOS y comparaciones post-hoc de Games-Howell para la variable % Área colocalización. En ambos casos, existen diferencias estadísticamente significativas en el grupo RES-FOS-6H con respecto a los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D ($p < 0,05$). No se encuentran diferencias entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D ($p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (Figura 4.3.2.1.1) muestra un descenso significativo del total de área del núcleo A5 ocupada por células fos-positivas en los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15 con respecto al grupo RES-FOS-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15 con respecto al grupo RES-FOS-6H ($p < 0,05$).

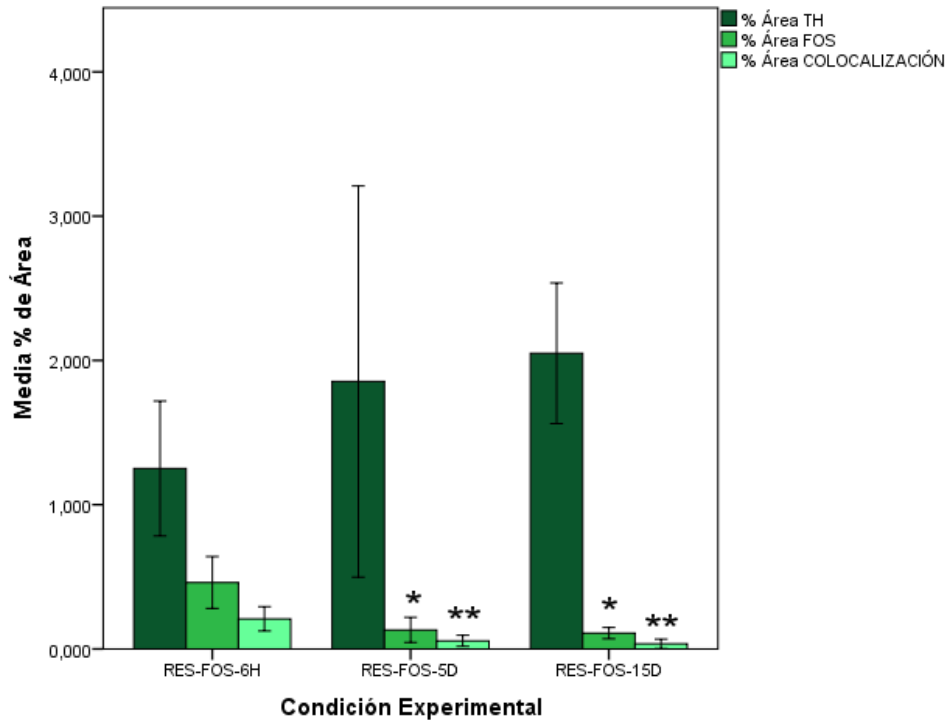


Figura 4.3.2.1.1: En el gráfico se muestra un descenso significativo del total de área del núcleo A5 ocupada por células fos-positivas en RES-FOS-5D y RES-FOS-15 con respecto a RES-FOS-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en RES-FOS-5D y RES-FOS-15 con respecto a RES-FOS-6H ($p < 0,05$). * Significación $p < 0,05$ en % Área FOS respecto a RES-FOS-6H. ** Significación $p < 0,05$ en % Área colocalización respecto a RES-FOS-6H. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra la evolución en la colocalización desde las 6 horas tras la última reserpinización hasta el 15 día tras la última reserpinización sin la aplicación de formalin test.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-6H	70%	30%
RES-FOS-5D	65%	35%
RES-FOS-15D	22%	78%

Tabla 4.3.2.1.6: Porcentajes de colocalización total TH-FOS en la condición a la que no se le aplica Formalin Test. Los porcentajes de colocalización descienden durante la evolución temporal.

4.3.2.2 A5: Estudio de la evolución de los patrones de activación tras el Test de Formalina en el modelo de FMS inducido por reserpina.

Realizamos un análisis de la evolución temporal de los patrones de activación de A5 en los animales a los que se les ha realizado el test de la formalina (FT) a las 4 horas de la tercera administración de reserpina (se perfunden a las 6 horas de la última dosis de reserpina), a los 5 días y a los 15 días de la tercera administración de reserpina (Tabla 4.3.2.2.1). Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo IX.

Estadísticos descriptivos

	N		Media		Desviación estándar		Asimetría		Curtosis			
	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar		
% Área TH	19		2,43684		,973659		,219		,524		-,815	1,014
% Área FOS	19		,35868		,417232		1,207		,524		-,125	1,014
%Área Colocalización	19		,27984		,406216		1,397		,524		,574	1,014
N válido (por lista)	19											

Tabla 4.3.2.2.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de inmunofluorescencia tomadas del núcleo A5 tras la realización del test de la formalina en los animales reserpinizados. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk muestra que el supuesto de normalidad sólo se cumple en el caso RES-FOS-FT-6H para la variable % Área TH, en los casos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D para la variable % Área FOS, y en el caos RES-FOS-FT-15D para la variable % Área colocalización. Esto nos indica que en la estadística inferencial debemos usar la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para muestras independientes (Tabla 4.3.2.2.2).

Por otra parte, se ha utilizado el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.3.2.2.3). El conjunto de datos sólo presenta homogeneidad de varianzas en % Área colocalización ($F=4,971$ $p<0,05$).

Pruebas de normalidad

Condición Experimental		Shapiro-Wilk		
% Área TH	RES-FOS-FT-6H	,828	5	,135
	RES-FOS-FT-5D	,732	7	,008
	RES-FOS-FT-15D	,801	7	,042
% Área FOS	RES-FOS-FT-6H	,771	5	,046
	RES-FOS-FT-5D	,926	7	,515
	RES-FOS-FT-15D	,827	7	,075
% Área Colocalización	RES-FOS-FT-6H	,678	5	,006
	RES-FOS-FT-5D	,734	7	,009
	RES-FOS-FT-15D	,835	7	,090

Tabla 4.3.2.2.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de A5 tras el test de la formalina en ratas reserpinizadas. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W).

Significación $p < 0,05$. Sólo se cumple el supuesto de normalidad en el caso de RES-FOS-FT-6H en la variable % Área TH, en los casos de RES-FOS-FT-6H y RES-FOS-FT-5D en % Área FOS y, en último lugar, en el caso de RES-FOS-FT-15D en la variable % Área colocalización.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
% Área TH	Se basa en la media	,112	2	16	,895
% Área FOS	Se basa en la media	1,627	2	16	,227
% Área Colocalización	Se basa en la media	4,971	2	16	,021

Tabla 4.3.2.2.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de A5 tras el test de la formalina en ratas reserpinizadas. El estadístico empleado es Levene. La variable y % de área de colocalización ($F = 4,971$; $p < 0,05$) no cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas. Significación $p < 0,05$.

El test no paramétrico Kruskal-Wallis muestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables % Área FOS y % Área colocalización ($p < 0,05$) (Tabla 4.3.2.2.4). Para saber cómo son esas diferencias, hemos recurrido a un post-hoc de comparación por pares. En ambos casos, las diferencias estadísticamente significativas residen entre la condición experimental RES-FOS-FT-6H y las condiciones RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p < 0,05$) (Tablas 4.3.1.2.5 y 4.3.1.2.6). No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D en ninguna de las variables ($p > 0,05$). Por otra parte, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en la variable % Área TH ($p > 0,05$).

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área TH es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,651	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,004	Rechace la hipótesis nula.
3	La distribución de % Área Colocalización es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,004	Rechace la hipótesis nula.

Tabla 4.3.2.2.4: Pruebas de Kruskal-Wallis para muestras independientes. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables % Área FOS y % Área colocalización. Significación $p < 0,05$.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de prueba	Estándar Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajust.
RES-FOS-FT-15D-RES-FOS-FT-5D	,429	2,967	,144	,885	1,000
RES-FOS-FT-15D-RES-FOS-FT-6H	9,714	3,250	2,989	,003	,008
RES-FOS-FT-5D-RES-FOS-FT-6H	9,286	3,250	2,857	,004	,013

Tabla 4.3.2.2.5: Pruebas post-hoc de comparaciones por pares para la variable % Área FOS. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-FT-6H con respecto a los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p < 0,05$). No se encuentran diferencias entre los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de prueba	Estándar Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajust.
RES-FOS-FT-15D-RES-FOS-FT-5D	1,857	2,983	,623	,534	1,000
RES-FOS-FT-15D-RES-FOS-FT-6H	10,429	3,267	3,192	,001	,004
RES-FOS-FT-5D-RES-FOS-FT-6H	8,571	3,267	2,623	,009	,026

Tabla 4.3.2.2.6: Pruebas post-hoc de comparaciones por pares para la variable % Área colocalización. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-FT-6H con respecto a los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p < 0,05$). No se encuentran diferencias entre los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (Figura 4.3.2.2.1) muestra un descenso significativo del total de área del núcleo A5 ocupada por células fos-positivas en los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D con respecto al grupo RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D con respecto al grupo RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$).

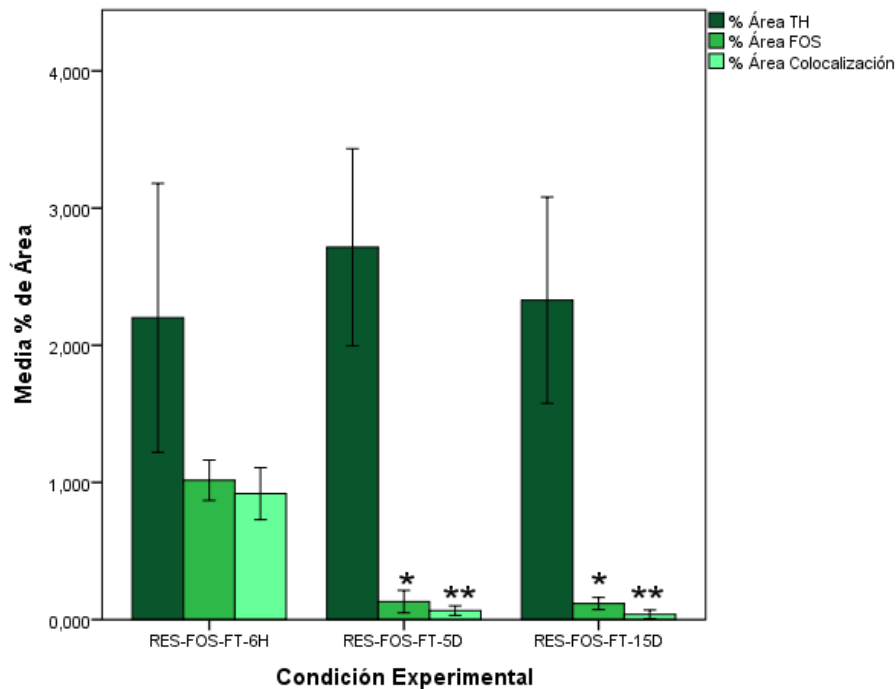


Figura 4.3.2.2.1: En el gráfico se muestra un descenso significativo del total de área del núcleo A5 ocupada por células fos-positivas en RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15 con respecto a RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15 con respecto a RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$). * Significación $p < 0,05$ de % Área FOS respecto a RES-FOS-6H. ** Significación $p < 0,05$ de % Área colocalización respecto a RES-FOS-6H. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra la evolución en la colocalización desde las 6 horas tras la última reserpinización hasta el 15 día tras la última reserpinización contando con la aplicación de formalin test.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-FT-6H	99%	1%
RES-FOS-FT-5D	65%	35%
RES-FOS-FT-15D	15%	85%

Tabla 4.3.2.1.6: Porcentajes de colocalización total TH-FOS en la condición a la que se le aplica Formalin Test. Los porcentajes de colocalización descienden durante la evolución temporal.

4.3.2.3 A5: Estudio comparativo de las condiciones sin y con Test de la Formalina tras la reserpinización.

Por último, analizaremos por separado las condiciones experimentales del mismo día sin y con Test de la Formalina posterior al procedimiento de reserpinización.

En cuanto a la comparación de las variables correspondientes a las 6 horas después de la última administración de reserpina (RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H), realizamos la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras independientes, puesto que, como hemos analizado anteriormente, en ciertos casos no se cumple el supuesto de normalidad. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en % Área TH ($p > 0,05$), pero sí en % Área FOS ($p < 0,05$) y en % Área colocalización ($p < 0,05$) (Tabla 4.3.2.3.1). Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.2.3.1.

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área TH es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,202	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,003	Rechace la hipótesis nula.
3	La distribución de % Área Colocalización es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,003	Rechace la hipótesis nula.

Tabla 4.3.2.3.1: Pruebas U de Mann-Whitney para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H en % Área TH ($p < 0,05$), pero sí en % Área FOS ($p < 0,05$) y en % Área colocalización ($p < 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

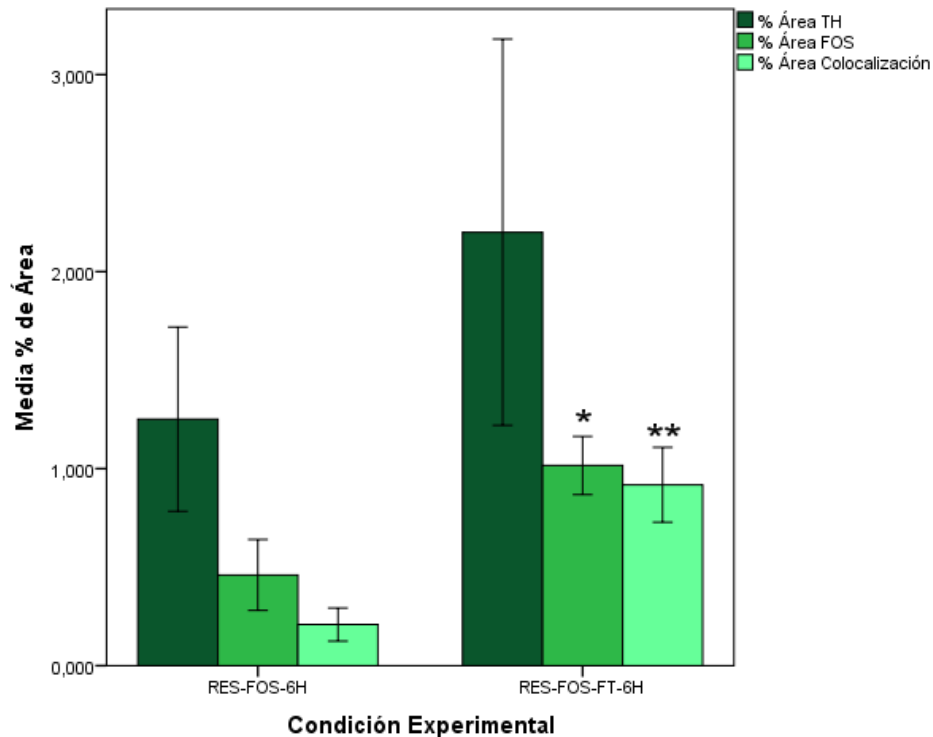


Figura 4.3.2.3.1: En la figura se representa gráficamente el aumento de media de % Área FOS y % Área colocalización en la condición RES-FOS-FT-6H con respecto a RES-FOS-6H. * Significación $p < 0,05$ de % Área FOS respecto a RES-FOS-6H. ** Significación $p < 0,05$ % Área colocalización respecto a RES-FOS-6H. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que en la condición RES-FOS-6H un 70% de las células fos-positivas son células Th-positivas, mientras que en la condición RES-FOS-FT-6H colocaliza una mayor proporción, 99%.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-6H	70%	30%
RES-FOS-FT-6H	99%	1%

Tabla 4.3.2.3.2: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 70% de las células fos-positivas de RES-FOS-6H son células Th-positivas frente al 99% de las de RES-FOS-FT-6H.

En la figura 4.3.2.3.2 se muestra un ejemplo de A5 en los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocación de ambos, TH+FOS.

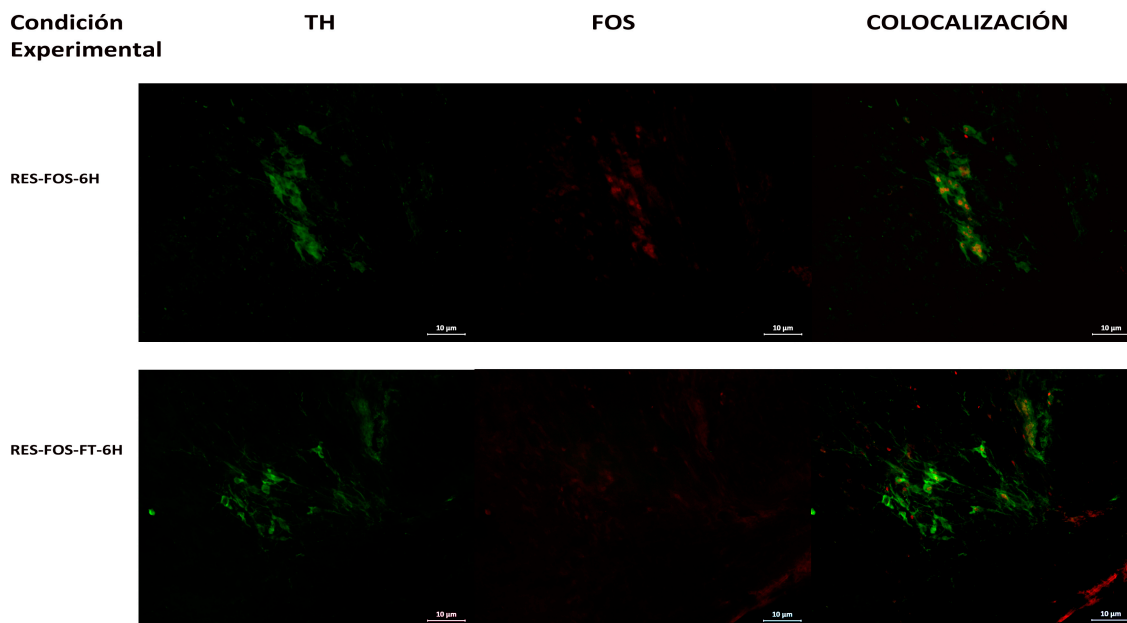


Figura 4.3.2.3.2: Imagen del marcaje de A5 con TH, FOS y su colocación para las condiciones experimentales RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

Por otra parte, analizaremos las variables correspondientes a los 5 días tras la última administración de reserpina (RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D). Realizamos la prueba no paramétrica U de Mann whitney para muestras independientes, puesto que, como hemos analizado anteriormente, en ciertos casos no se cumple el supuesto de normalidad. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en % Área TH ($p > 0,05$), ni % Área FOS ($p > 0,05$) ni en % Área colocación ($p > 0,05$) (Tabla 4.3.2.3.3). Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.2.3.3.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área TH es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,648 [†]	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,788 [†]	Conserve la hipótesis nula.
3	La distribución de % Área Colocalización es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,927 [†]	Conserve la hipótesis nula.

Tabla 4.3.2.3.3: Pruebas U de Mann-Whitney para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D en ninguna de las variables ($p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

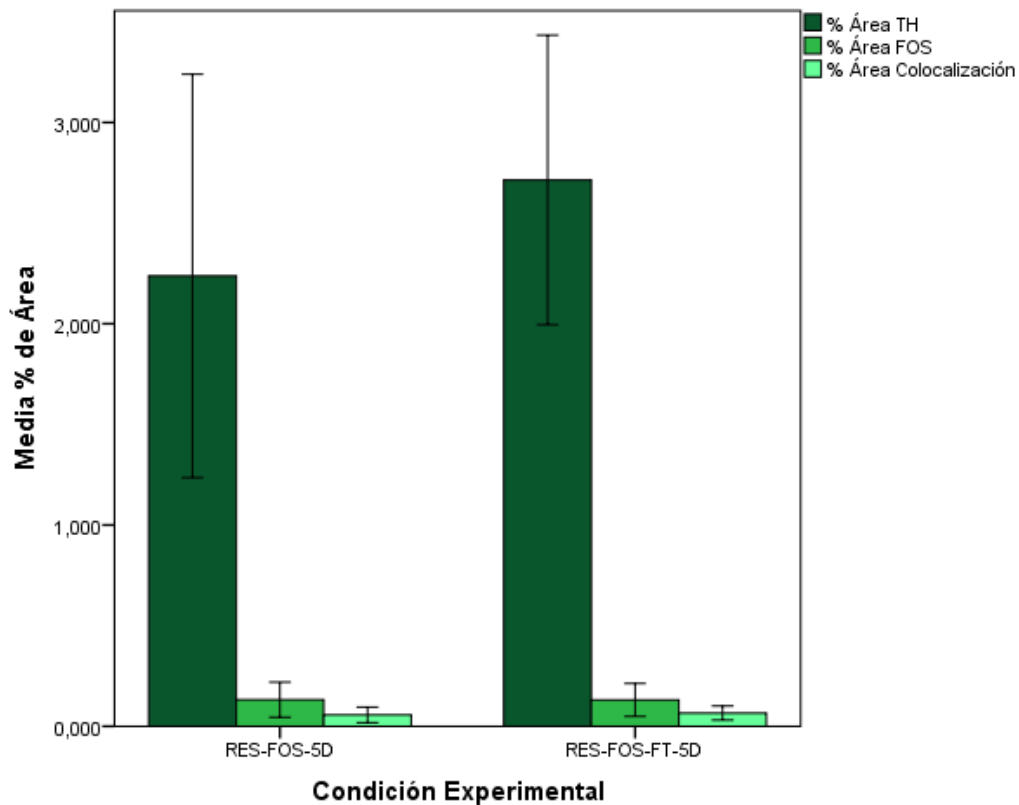


Figura 4.3.2.3.3: En la figura se representa gráficamente la falta de diferencias significativas entre los grupos, ya sea en % Área TH, en % Área FOS o % Área colocalización. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que ambas condiciones, RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D un 65% de las células fos-positivas son células Th-positivas.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-5D	65%	35%
RES-FOS-FT-5D	65%	35%

Tabla 4.3.1.3.4: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 65% de las células fos-positivas de RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D son células Th-positivas.

En la figura 4.3.2.3.4 se muestra un ejemplo de A5 en los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocalización de ambos, TH+FOS.

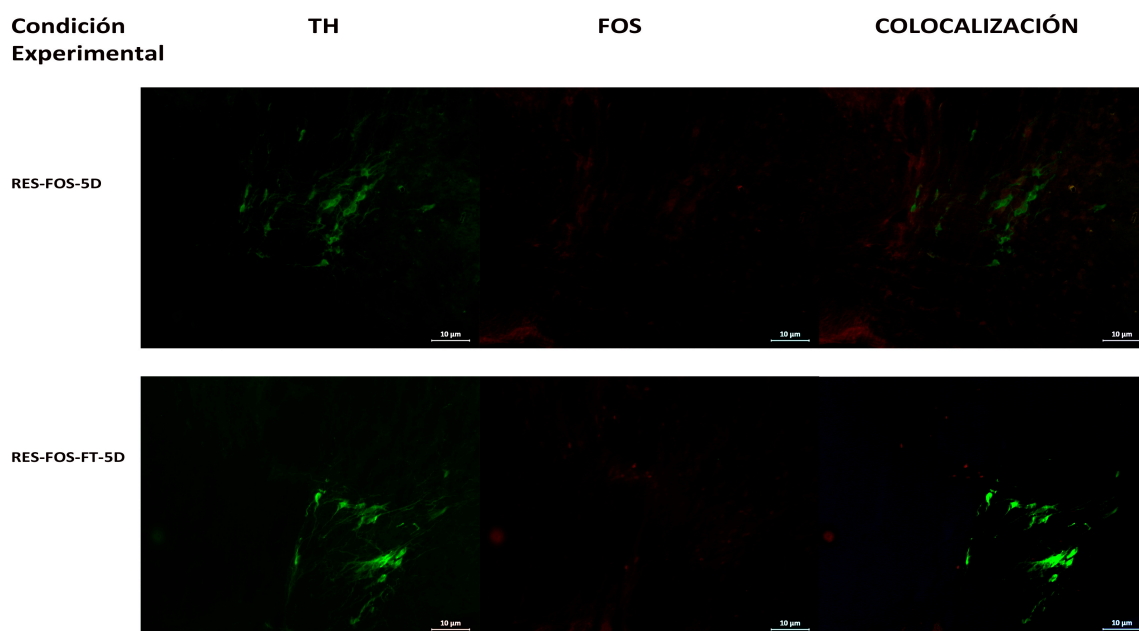


Figura 4.3.2.3.4: Imagen del marcaje de A5 con TH, FOS y su colocalización para las condiciones experimentales RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

Para finalizar con el estudio de A5, analizaremos las variables correspondientes a los 15 días tras la última administración de reserpina (RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D). Realizamos la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para muestras independientes, puesto que, como hemos analizado anteriormente, en ciertos casos no se cumple el supuesto de normalidad. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en % Área TH ($p > 0,05$), ni en % Área

FOS ($p > 0,05$) ni en % Área colocación ($p > 0,05$) (Tabla 4.3.2.3.5). Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.2.3.5.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área TH es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,517 [†]	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	1,000 [†]	Conserve la hipótesis nula.
3	La distribución de % Área Colocalización es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,383 [†]	Conserve la hipótesis nula.

Tabla 4.3.2.3.5: Pruebas U de Mann-Whitney para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en ninguna de las variables ($p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

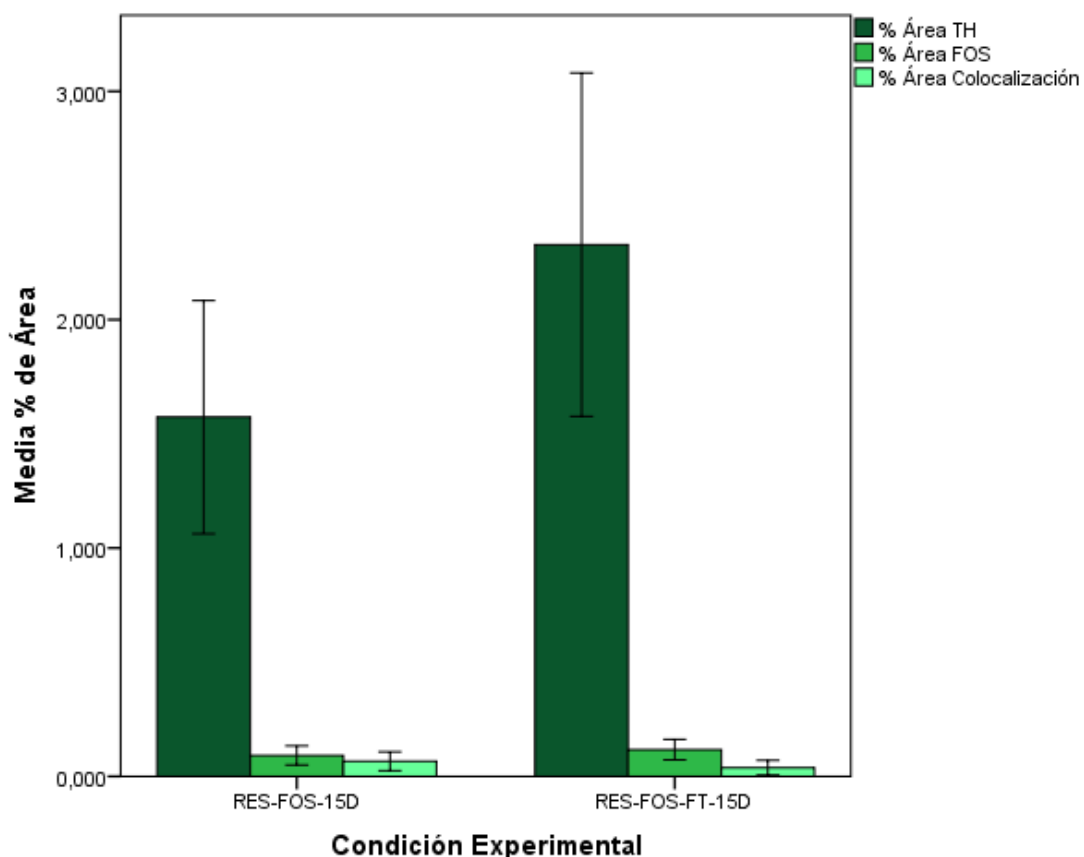


Figura 4.3.2.3.5: En la figura se representa gráficamente la falta de diferencias significativas entre los grupos, ya sea en % Área TH, en % Área FOS o en % Área colocación. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que en la condición RES-FOS-15D tan solo un 22% de las células fos-positivas son células Th-positivas. En la condición RES-FOS-FT-15D colocaliza incluso una menor proporción, 15%.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-15D	22%	78%
RES-FOS-FT-15D	15%	85%

Tabla 4.3.2.3.6: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 22% de las células fos-positivas de RES-FOS-15D son células Th-positivas frente al 15% de las que lo son en RES-FOS-FT-15D.

En la figura 4.3.2.3.6 se muestra un ejemplo de A5 en los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocalización de ambos, TH+FOS.

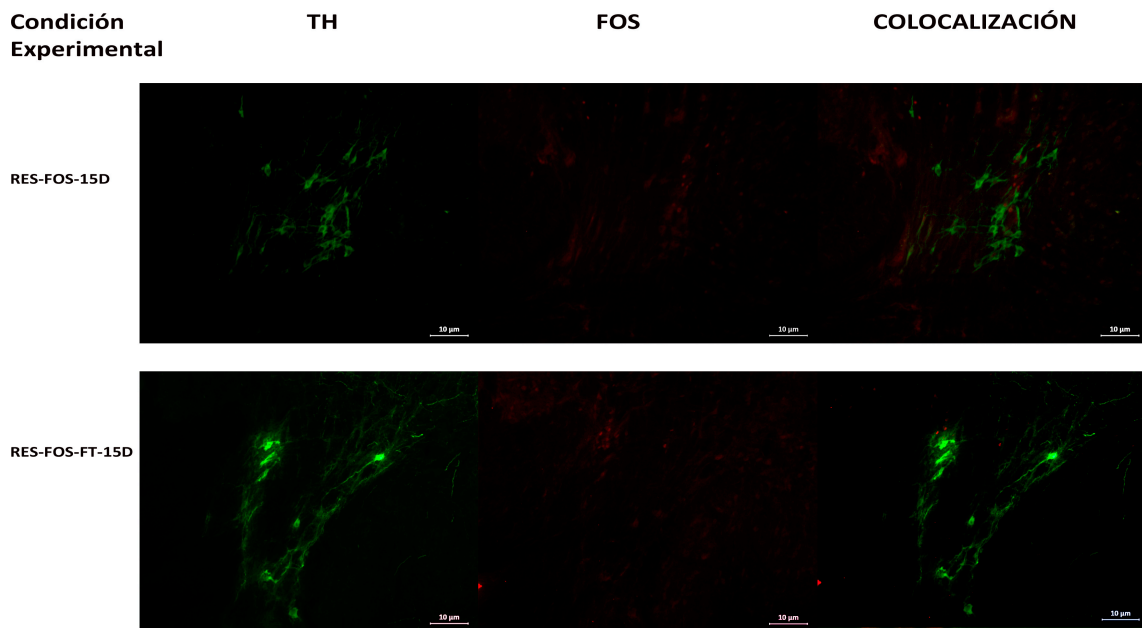


Figura 4.3.2.3.6: Imagen del marcaje de A5 con TH, FOS y su colocalización para las condiciones experimentales RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

4.3.3 Resultados de A7

4.3.3.1 A7: Estudio de la evolución de los patrones de activación tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina.

Realizamos un análisis de la evolución temporal de los patrones de activación de A7 a las 6 horas, 5 días y 15 días posteriores a la tercera administración de reserpina (Tabla 4.3.3.1.1). Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo X.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
	% ÁreaTH	27	3,55359	1,523681	1,867	,448	4,874
% Área FOS	27	,44641	,330195	,652	,448	-1,057	,872
%Área Colocalización	27	,26644	,264045	1,070	,448	-,020	,872
N válido (por lista)	27						

Tabla 4.3.3.1.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de inmunofluorescencia tomadas del núcleo A7 tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk muestra que el supuesto de normalidad se cumple en todos los casos a excepción de RES-FOS-15D, que falla en el supuesto de normalidad tanto en la variable % Área TH como en la variable % Área FOS (Tabla 4.3.3.1.2). Esto influirá en la estadística inferencial, puesto que en estas variables usaremos un test no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Por otra parte, se ha utilizado el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.3.3.2.3). El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas para las variables % Área TH y % Área FOS, pero no para la variable % colocalización.

Pruebas de normalidad

Condición Experimental		Shapiro-Wilk		
% ÁreaTH	RES-FOS-6H	,970	10	,888
	RES-FOS-5D	,933	6	,605
	RES-FOS-15D	,622	11	,000
% Área FOS	RES-FOS-6H	,908	10	,269
	RES-FOS-5D	,962	6	,837
	RES-FOS-15D	,808	11	,012
% Área Colocalización	RES-FOS-6H	,894	10	,188
	RES-FOS-5D	,934	6	,611
	RES-FOS-15D	,858	11	,054

Tabla 4.3.3.1.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de A7 tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W). El grupo RES-FOS-15D falla el supuesto para las variables % Área TH y % Área FOS. Significación $p < 0,05$.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
% ÁreaTH	Se basa en la media	,391	2	24	,681
% Área FOS	Se basa en la media	1,897	2	24	,172
% Área Colocalización	Se basa en la media	5,474	2	24	,011

Tabla 4.3.3.1.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de A7 tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina. El estadístico empleado es Levene. La variable % Área colocalización ($F=5,474$, $p < 0,05$) no cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas. Significación $p < 0,05$.

El análisis Kruskal-Wallis para muestras independientes muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para la variable % Área FOS ($p < 0,05$), pero no para la variable % Área TH (Tabla 4.3.3.1.4). Al analizar las comparaciones por pares, comprobamos que las diferencias se encuentran entre el grupo RES-FOS-6H y los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D. Entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D no existen diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.3.3.1.5).

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área TH es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,625	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,000	Rechace la hipótesis nula.

Tabla 4.3.3.1.4: Pruebas Kruskal-Wallis para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para la variable % Área TH ($p > 0,05$) pero sí se encuentran diferencias significativas entre los grupos en la variable % Área FOS ($p < 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de prueba	Estándar Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajust.
RES-FOS-5D-RES-FOS-15D	-,258	4,026	-,064	,949	1,000
RES-FOS-5D-RES-FOS-6H	13,667	4,097	3,336	,001	,003
RES-FOS-15D-RES-FOS-6H	13,409	3,466	3,868	,000	,000

Tabla 4.3.3.1.5: Pruebas post-hoc de comparaciones por pares. Las diferencias en % Área FOS se encuentran entre el grupo RES-FOS-6H y los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Por otra parte, el análisis ANOVA de un factor para muestras independientes realizado para la variable % Área colocación muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F = 20,561$; $p < 0,05$). Para saber cómo son esas diferencias, recurrimos al correspondiente análisis post-hoc de Games-Howell. Como podemos ver en la tabla 4.3.3.1.6, observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-6H y los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D ($p < 0,05$). Los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0,05$).

ANOVA

% Área Colocalización

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,145	2	,572	20,561	,000
Dentro de grupos	,668	24	,028		
Total	1,813	26			

Tabla 4.3.3.1.6: Prueba ANOVA de un factor para muestras independientes. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F=20,561$; $p<0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: % Área Colocalización

(I) Condición Experimental	(J) Condición Experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
					Límite inferior	Límite superior	
Games-Howell	RES-FOS-6H	RES-FOS-5D	,424067*	,082093	,001	,20281	,64533
		RES-FOS-15D	,427627*	,083339	,001	,20509	,65017
	RES-FOS-5D	RES-FOS-6H	-,424067*	,082093	,001	-,64533	-,20281
		RES-FOS-15D	,003561	,041949	,996	-,10601	,11313
	RES-FOS-15D	RES-FOS-6H	-,427627*	,083339	,001	-,65017	-,20509
		RES-FOS-5D	-,003561	,041949	,996	-,11313	,10601

Tabla 4.3.3.1.7: Pruebas post-hoc de Games-Howell de comparaciones múltiples. Las diferencias en % Área colocalización son estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-6H y los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-15D. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05

La figura que vemos a continuación (Figura 4.3.3.1.1) muestra un descenso significativo del total de área del núcleo A7 ocupada por células fos-positivas en RES-FOS-5D y RES-FOS-15 con respecto a RES-FOS-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en RES-FOS-5D y RES-FOS-15 con respecto a RES-FOS-6H ($p < 0,05$).

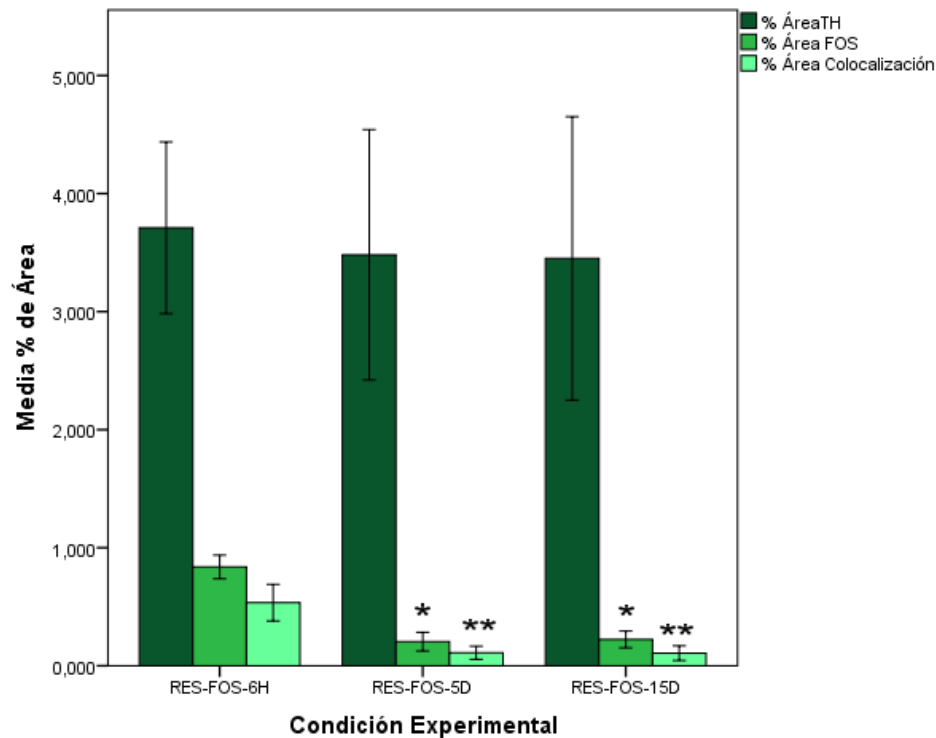


Figura 4.3.3.1.1: En el gráfico se muestra un descenso significativo del total de área del núcleo A7 ocupada por células fos-positivas de RES-FOS-5D y RES-FOS-15 con respecto a RES-FOS-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocalización de células fos-positivas en RES-FOS-5D y RES-FOS-15 con respecto a RES-FOS-6H ($p < 0,05$). * Significación $p < 0,05$ de % Área FOS respecto a RES-FOS-6H. ** Significación $p < 0,05$ de % Área colocalización respecto a RES-FOS-6H. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra la evolución en la colocalización desde las 6 horas tras la última reserpinización hasta el 15 día tras la última reserpinización sin la aplicación de formalin test.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-6H	65%	35%
RES-FOS-5D	56%	44%
RES-FOS-15D	50%	50%

Tabla 4.3.3.1.8: Porcentajes de colocalización total TH-FOS en la condición a la que no se le aplica Formalin Test. Los porcentajes de colocalización descienden durante la evolución temporal.

4.3.3.2 A7: Estudio de la evolución de los patrones de activación tras el Test de Formalina en el modelo de FMS inducido por reserpina.

Realizamos un análisis de la evolución temporal de los patrones de activación de A7 en los animales a los que se les ha realizado el test de la formalina (FT) a las 4 horas de la tercera administración de reserpina (se perfunden a las 6 horas de la última dosis de reserpina), a los 5 días y a los 15 días de la tercera administración de reserpina (Tabla 4.3.3.2.1). Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo XI.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
	% Área TH	13	4,44615	1,689485	,285	,616	-,676
% Área FOS	13	,33462	,339115	1,486	,616	1,576	1,191
%Área Colocalización	13	,30369	,333631	1,260	,616	,607	1,191
N válido (por lista)	13						

Tabla 4.3.3.2.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de inmunofluorescencia tomadas del núcleo A7 tras realizar el test de la formalina en animales a los que se les ha implantado el modelo de FMS inducido por reserpina. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk os muestra que el supuesto de normalidad se cumple en todos los casos (Tabla 4.3.3.2.2).

Por otra parte, se ha utilizado el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.3.3.2.3). El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas para todas las variables.

Pruebas de normalidad

Condición Experimental		Shapiro-Wilk		
% Área TH	RES-FOS-FT-6H	,916	4	,515
	RES-FOS-FT-5D	,840	4	,195
	RES-FOS-FT-15D	,863	5	,238
% Área FOS	RES-FOS-FT-6H	,890	4	,385
	RES-FOS-FT-5D	,995	4	,983
	RES-FOS-FT-15D	,770	5	,050
% Área Colocalización	RES-FOS-FT-6H	,900	4	,431
	RES-FOS-FT-5D	,838	4	,188
	RES-FOS-FT-15D	,907	5	,453

Tabla 4.3.3.2.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de A7 en los animales a los que se les ha realizado el test de la formalina tras ser reserpinizados. El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W). Significación $p < 0,05$.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
% Área TH	Se basa en la media	,043	2	10	,958
% Área FOS	Se basa en la media	3,991	2	10	,053
% Área Colocalización	Se basa en la media	1,973	2	10	,190

Tabla 4.3.3.2.3: Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de A7 en los animales tratados con reserpina a los que se les ha realizado posteriormente el test de la formalina. El estadístico empleado es Levene. EL supuesto se cumple en todos los casos. Significación $p < 0,05$.

El análisis ANOVA de un factor para muestras independientes muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para las variables % Área FOS ($F = 21,311$; $p < 0,05$) y % Área colocalización ($F = 26,727$; $p < 0,05$) pero no para % Área TH (Tabla 4.3.3.2.4). Para saber cómo son esas diferencias, acudimos al test post-hoc de Bonferroni puesto que en todos los casos se cumplen los supuestos de homogeneidad y normalidad. El post-hoc muestra que las diferencias se encuentran entre el grupo RES-FOS-FT-6H y los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D. Entre los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D no existen diferencias estadísticamente significativas (Tabla 4.3.3.2.5).

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
% Área TH	Entre grupos	,572	2	,286	,085	,919
	Dentro de grupos	33,680	10	3,368		
	Total	34,252	12			
% Área FOS	Entre grupos	1,118	2	,559	21,311	,000
	Dentro de grupos	,262	10	,026		
	Total	1,380	12			
%Área Colocalización	Entre grupos	1,125	2	,563	26,727	,000
	Dentro de grupos	,211	10	,021		
	Total	1,336	12			

Tabla 4.3.3.2.4: Pruebas ANOVA de un factor para muestras independientes para las medidas de inmunofluorescencia de A7 tras la realización del test de la formalina en animales reserpinizados. Se observan diferencias estadísticamente significativas en % Área FOS ($F=21,311$; $p<0,05$) y en % Área colocalización ($F= 74,070$; $p<0,05$). No se observan diferencias entre los grupos respecto % Área TH ($F= 26,727$; $p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Condición Experimental	(J) Condición Experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza		
						Límite inferior	Límite superior	
Bonferroni	% Área FOS	RES-FOS-FT-6H	RES-FOS-FT-5D	,604500*	,114510	,001	,27585	,93315
			RES-FOS-FT-15D	,656850*	,108633	,000	,34506	,96864
		RES-FOS-FT-5D	RES-FOS-FT-6H	-,604500*	,114510	,001	-,93315	-,27585
			RES-FOS-FT-15D	,052350	,108633	1,000	-,25944	,36414
		RES-FOS-FT-15D	RES-FOS-FT-6H	-,656850*	,108633	,000	-,96864	-,34506
			RES-FOS-FT-5D	-,052350	,108633	1,000	-,36414	,25944
	% Área Colocalización	RES-FOS-FT-6H	RES-FOS-FT-5D	,602750*	,102592	,000	,30830	,89720
			RES-FOS-FT-15D	,661300*	,097327	,000	,38196	,94064
		RES-FOS-FT-5D	RES-FOS-FT-6H	-,602750*	,102592	,000	-,89720	-,30830
			RES-FOS-FT-15D	,058550	,097327	1,000	-,22079	,33789
		RES-FOS-FT-15D	RES-FOS-FT-6H	-,661300*	,097327	,000	-,94064	-,38196
			RES-FOS-FT-5D	-,058550	,097327	1,000	-,33789	,22079

Tabla 4.3.3.2.5: Prueba post-hoc de Bonferroni de comparación por pares. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo RES-FOS-FT-6H y los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D ($p < 0,05$) tanto en % Área FOS como en % Área colocalización. Por otra parte, los grupos RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p > 0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La figura que vemos a continuación (Figura 4.3.3.2.1) muestra un descenso significativo del total de área del núcleo A7 ocupada por células fos-positivas en RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D con respecto a RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$), y un descenso significativo del total de área de colocación de células fos-positivas en RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D con respecto a RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$).

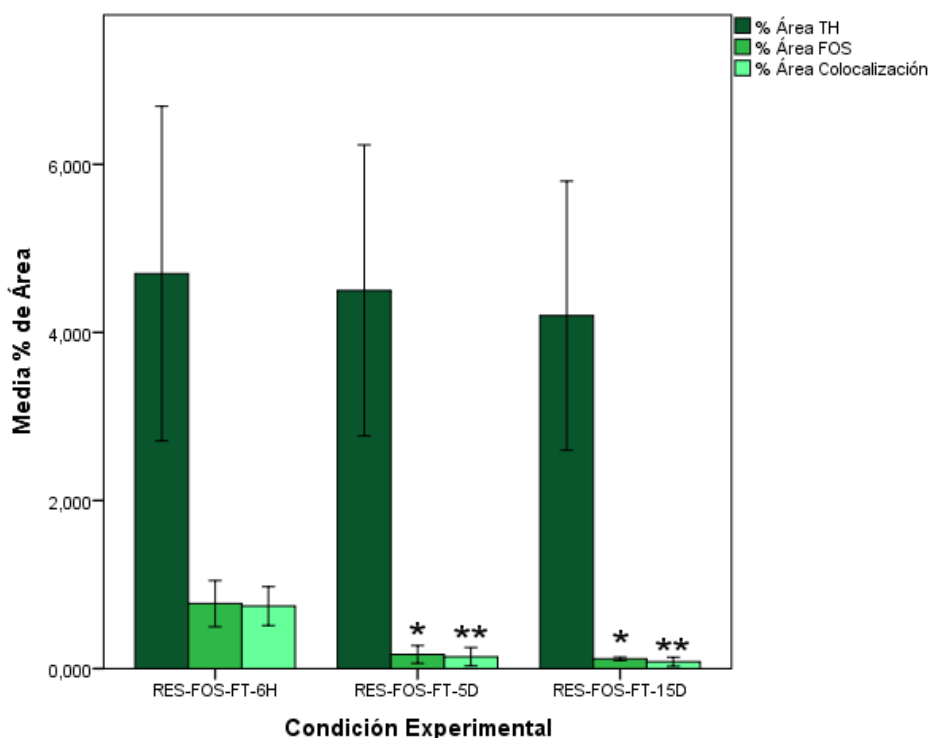


Tabla 4.3.3.2.1: En el gráfico se muestra un descenso significativo del total de área del núcleo A7 ocupada por células fos-positivas en RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15 con respecto a RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$) y un descenso significativo del total de área de colocación de células fos-positivas en RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15 con respecto a RES-FOS-FT-6H ($p < 0,05$). * Significación $p < 0,05$ de % Área FOS respecto a RES-FOS-FT-6H. ** Significación $p < 0,05$ de % Área colocación respecto a RES-FOS-FT-6H. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Un análisis de las medias del % de colocación total de TH-FOS nos muestra la evolución en la colocación desde las 6 horas tras la última reserpinización hasta el 15 día tras la última reserpinización contando con la aplicación de formalin test.

Condición experimental	% de colocación TH-FOS	% de no colocación TH-FOS
RES-FOS-FT-6H	77,5%	22,5%
RES-FOS-FT-5D	75%	25%
RES-FOS-FT-15D	70%	30%

Tabla 4.3.3.2.6: Porcentajes de colocación total TH-FOS en la condición a la que se le aplica Formalin Test. Los porcentajes de colocación descienden durante la evolución temporal.

4.3.3.3 A7: Estudio comparativo de las condiciones sin y con Test de la Formalina tras la reserpización.

El siguiente punto es analizar por separado las condiciones experimentales del mismo día sin y con la aplicación del test de la formalina.

En cuanto a la comparación de las variables correspondientes a las 6 horas después de la última administración de reserpina (RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H), realizamos la prueba T de Student para muestras independientes. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna variable: ni en % Área TH ($t= 2,196$; $p>0,05$), ni en % Área FOS ($t= -0,554$; $p>0,05$) ni en % Área colocalización ($t=1,464$; $p>0,05$) (Tabla 4.3.3.3.1). Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.3.3.1.

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
% Área TH	Se asumen varianzas iguales	,053	,822	2,196	12	,058	1,476700	,672359	,011755	2,941645
% Área FOS	Se asumen varianzas iguales	,989	,340	-,554	12	,590	-,063750	,115028	-,314374	,186874
% Área Colocalización	Se asumen varianzas iguales	,167	,690	1,464	12	,169	,208600	,142534	-,101955	,519155

Tabla 4.3.3.3.1: Pruebas T de Student para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H en ninguna de las variables a estudio, ni en % Área TH ($t= 2,196$; $p>0,05$), ni en % Área FOS ($t= -0,554$; $p>0,05$) ni en % Área colocalización ($t=1,464$; $p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

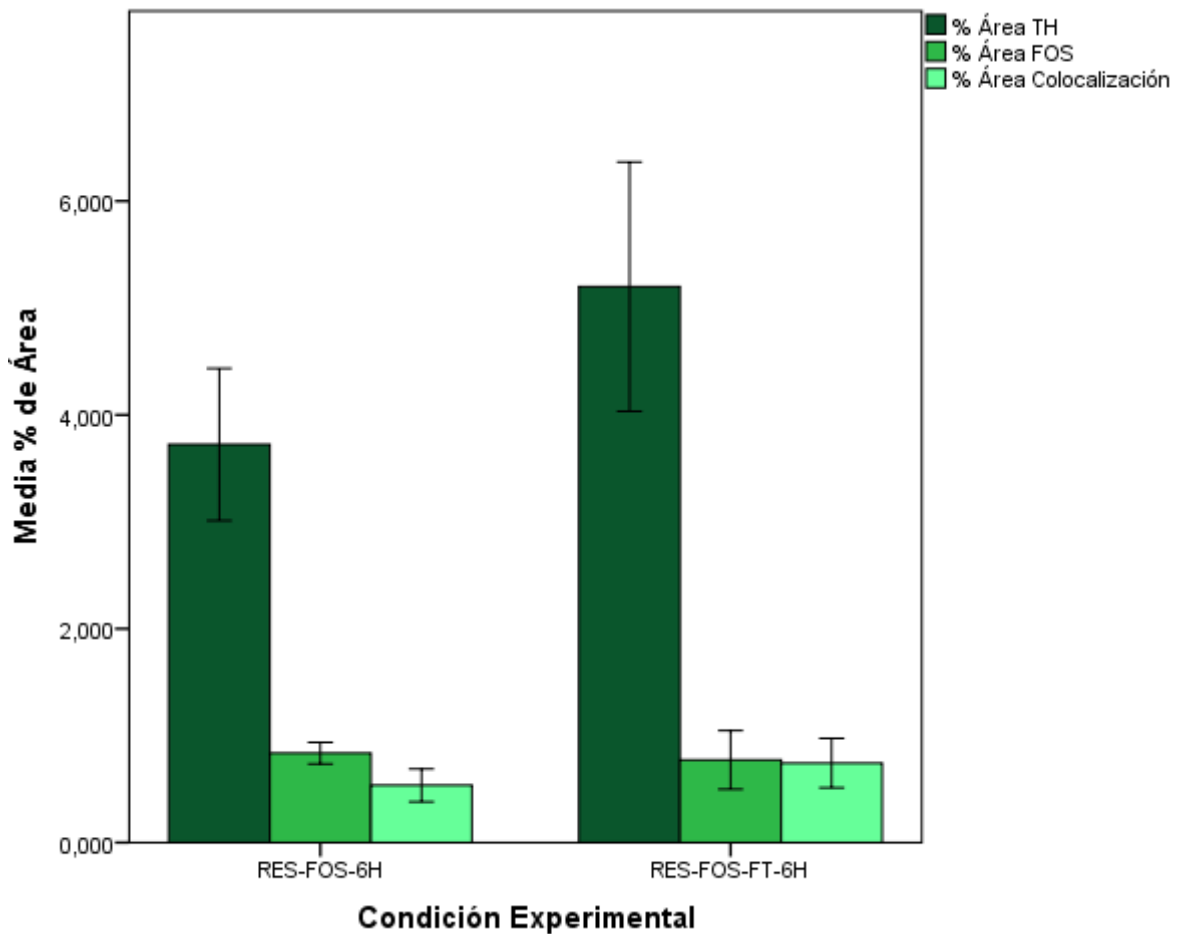


Figura 4.3.3.3.1: La figura muestra la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables % Área TH ($t= 2,196$; $p>0,05$), % Área FOS ($t= -0,554$; $p>0,05$) y % Área colocalización ($t=1,464$; $p>0,05$). Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que en la condición RES-FOS-6H un 65% de las células fos-positivas son células Th-positivas. En cambio, en la condición RES-FOS-FT-6H colocaliza una mayor proporción, 77,5%.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-6H	65%	35%
RES-FOS-FT-6H	77,5%	22,5%

Tabla 4.3.3.3.2: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 65% de las células fos-positivas de RES-FOS-6H son células Th-positivas frente al 77% de las que lo son en RES-FOS-FT-6H.

En la figura 4.3.3.3.2 se muestra un ejemplo de A7 en los grupos RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocación de ambos, TH+FOS.

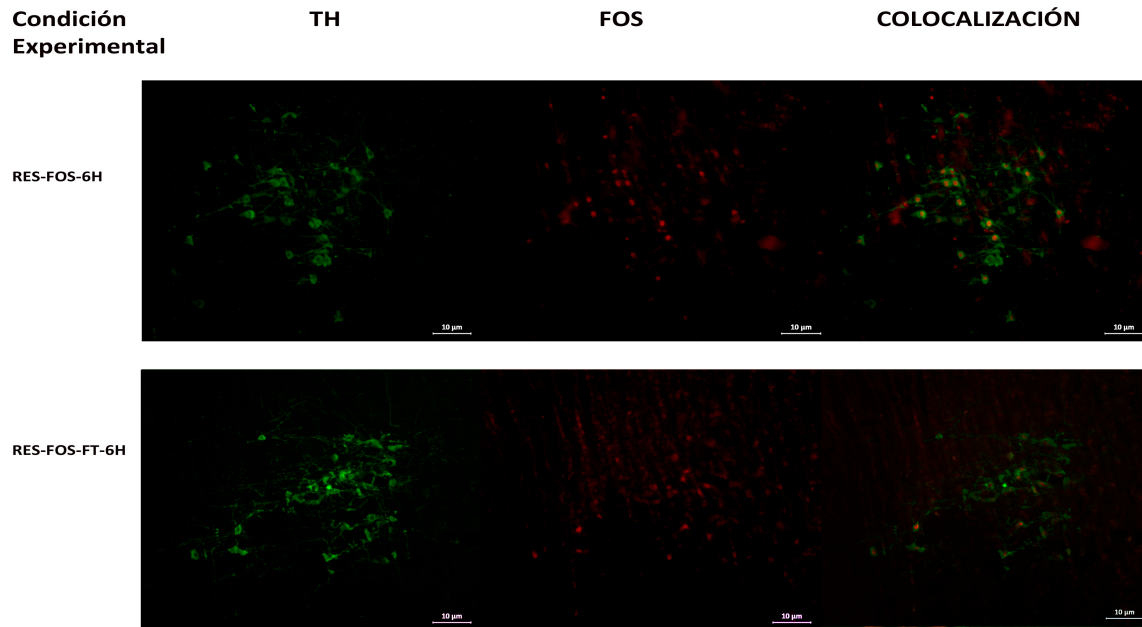


Figura 4.3.3.3.2: Imagen del marcaje de A7 con TH, FOS y su colocación para las condiciones experimentales RES-FOS-6H y RES-FOS-FT-6H. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

Por otra parte, analizaremos las variables correspondientes a los 5 días tras la última administración de reserpina (RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D). Realizamos la prueba T de Student para muestras independientes. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna variable: ni en % Área TH ($t= 1,069$; $p>0,05$), ni en el % Área FOS ($t= -0,563$; $p>0,05$), ni en % Área colocación ($0,429$; $p>0,05$) (Tabla 4.3.3.3.3). Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.3.3.3.

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias					95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Inferior	Superior
		% Área TH	Se asumen varianzas iguales	,212	,657	1,069	8	,316	1,018833	,952693
% Área FOS	Se asumen varianzas iguales	,022	,886	-,563	8	,589	-,036417	,064633	-,185460	,112626
% Área Colocalización	Se asumen varianzas iguales	,694	,429	,538	8	,605	,029917	,055577	-,098245	,158078

Tabla 4.3.3.3.3: Prueba T de Student para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D en ninguna de las variables de estudio, ni en % Área TH ($t= 1,069$; $p>0,05$), ni en % Área Fos ($t= -0,563$; $p>0,05$) y ni en % Área colocación ($t=0,538$; $p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

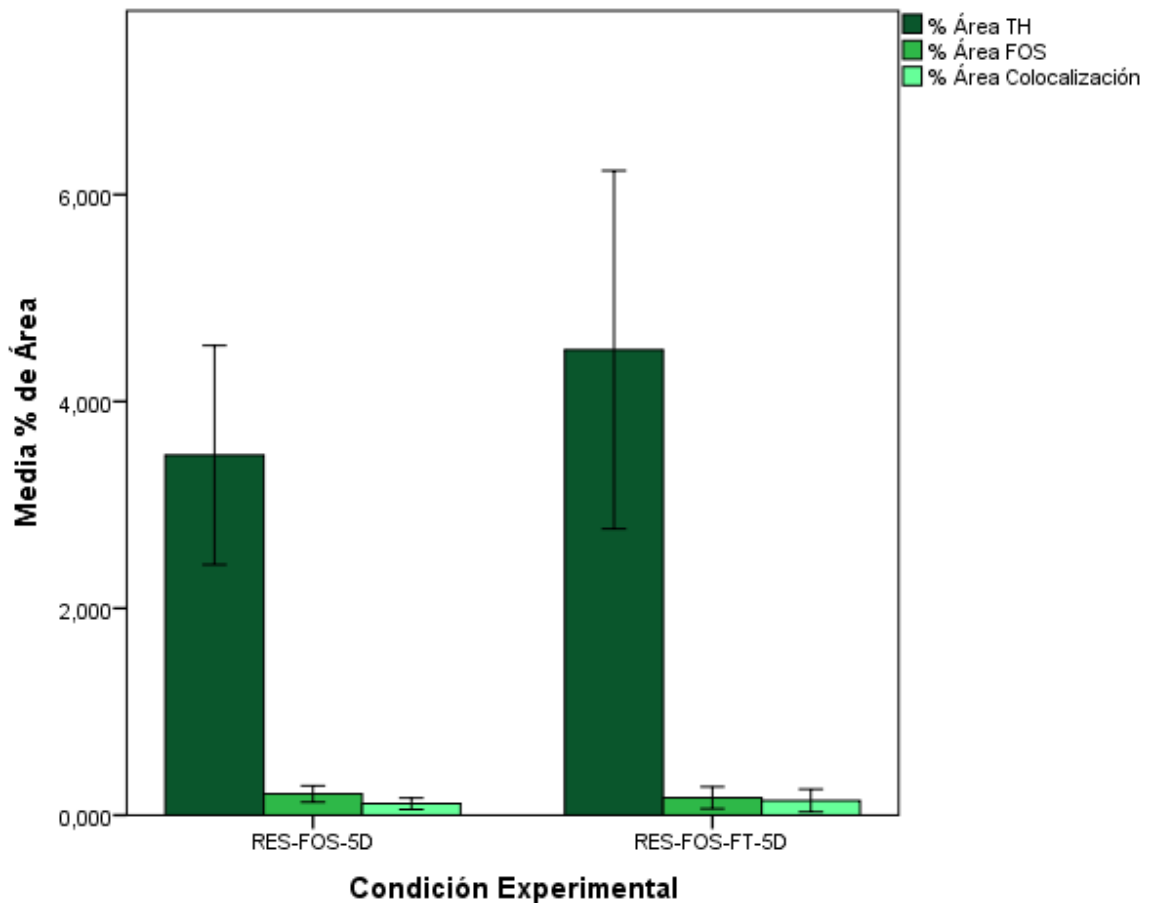


Figura 4.3.3.3: La figura muestra la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables % Área TH ($t= 2,196$; $p>0,05$), % Área FOS ($t= -0,554$; $p>0,05$) y % Área colocalización ($t=1,464$; $p>0,05$). Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que en la condición RES-FOS-5D un 56% de las células fos-positivas son células Th-positivas. En cambio, en la condición RES-FOS-FT-5D colocaliza una mayor proporción, 75%.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-6H	56%	44%
RES-FOS-FT-6H	75%	25%

Tabla 4.3.3.4: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 56% de las células fos-positivas de RES-FOS-5D son células Th-positivas frente al 75% de las que lo son en RES-FOS-FT-5d.

En la figura 4.3.3.3.4 se muestra un ejemplo de A7 en los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocación de ambos, TH+FOS.

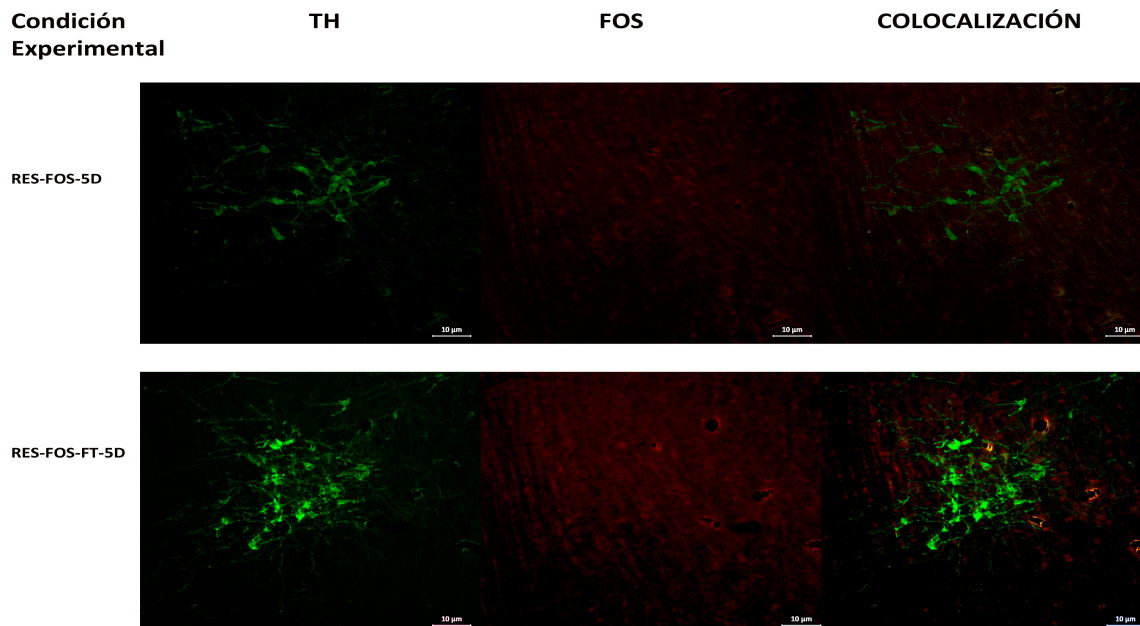


Figura 4.3.3.3.4: Imagen del marcaje de A7 con TH, FOS y su colocación para las condiciones experimentales RES-FOS-5D y RES-FOS-FT-5D. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

Para finalizar con el análisis del núcleo A7, realizamos la prueba no paramétrica U de Mann whitney para muestras independientes para analizar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguna de las variables: ni en % Área TH ($p > 0,05$), ni en % Área FOS ($p > 0,05$) ni en el % Área colocación ($p > 0,05$) (Tabla 4.3.3.3.4). Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.3.3.5.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de % Área TH es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,329	Conserve la hipótesis nula.
2	La distribución de % Área FOS es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,052	Conserve la hipótesis nula.
3	La distribución de % Área Colocalización es la misma entre las categorías de Condición Experimental.	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,329	Conserve la hipótesis nula.

Tabla 4.3.3.3.4: Pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en ninguna de las variables a estudio, ni en % Área TH ($p>0,05$), ni en % Área FOS ($p>0,05$), ni en % Área colocalización ($p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

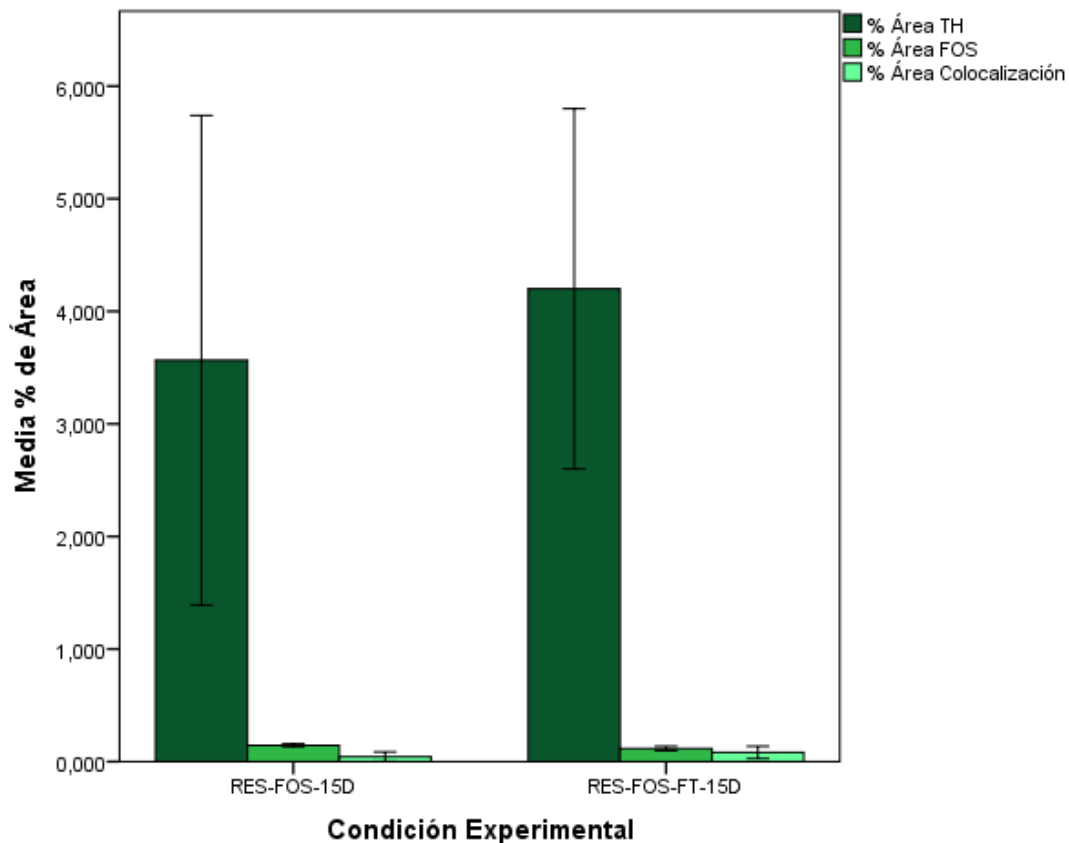


Figura 4.3.3.3.5: La figura muestra la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en las variables % Área TH, % Área FOS y % Área colocalización ($p>0,05$). Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Un análisis de las medias del % de colocalización total de TH-FOS nos muestra que en la condición RES-FOS-5D tan solo un 50% de las células fos-positivas son células Th-positivas. En cambio, en la condición RES-FOS-FT-5D colocaliza una mayor proporción, 70%.

Condición experimental	% de colocalización TH-FOS	% de no colocalización TH-FOS
RES-FOS-15D	50%	50%
RES-FOS-FT-15D	70%	30%

Tabla 4.3.3.3.5: Porcentajes de colocalización total TH-FOS. Un 50% de las células fos-positivas de RES-FOS-15D son células Th-positivas frente al 70% de las de RES-FOS-FT-15D.

Por último, en la figura 4.3.3.3.6 se muestra un ejemplo de A7 en los grupos RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D en cada uno de los marcajes de fluorescencia analizados: marcaje de TH (verde), marcaje de FOS (rojo) y colocalización de ambos, TH+FOS.

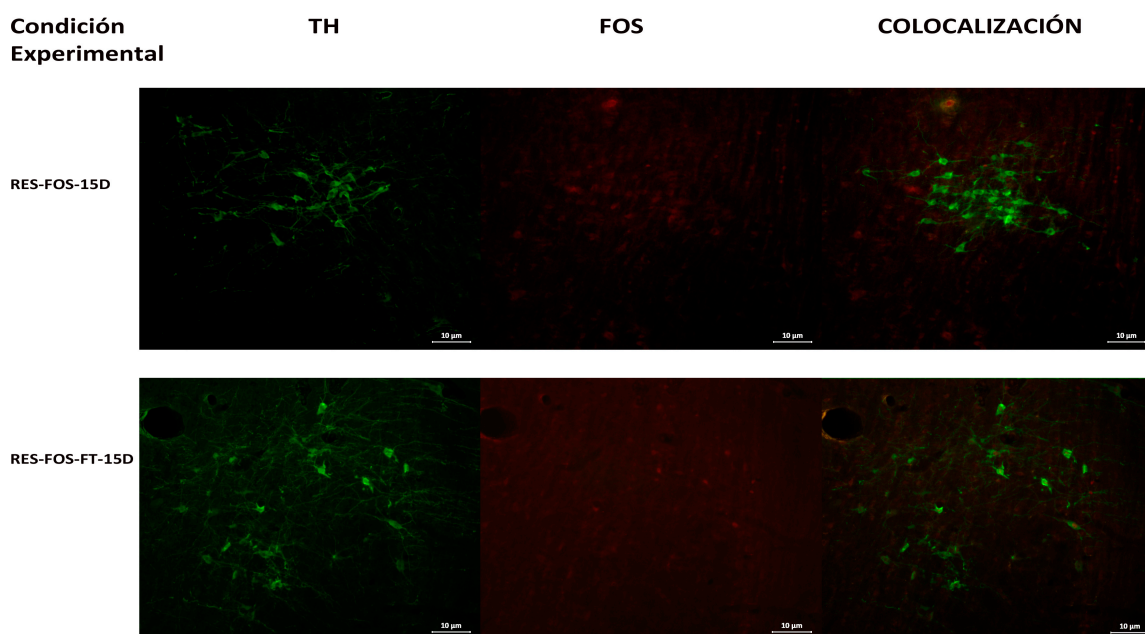


Figura 4.3.3.3.6: Imagen del marcaje de A7 con TH, FOS y su colocalización para las condiciones experimentales RES-FOS-15D y RES-FOS-FT-15D. Imágenes aumentadas con un objetivo de 10x.

4.3.4 Estudio de la evolución de la activación de las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal tras aplicación de dolor inflamatorio (Test de la Formalina) en ratas sometidas al modelo de FMS inducido por reserpina en rata

En este caso vamos a analizar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones RES-FOS-FT-6H, RES-FOS-FT-5D y RES-FOS-FT-15D en la cantidad de células fos-positivas existentes en las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal.

En primer lugar, realizaremos un estudio de la estadística descriptiva (Tabla 4.3.4.1). Un análisis más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo XII.

Estadísticos descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Estadístico	Error estándar	Estadístico	Error estándar
Células fospositivas	70	15,5857	12,12435	,157	,287	-1,616	,566
N válido (por lista)	70						

Tabla 4.3.4.1: Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de inmunofluorescencia tomadas de las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal en los grupos a los que se les ha realizado el Test de la Formalina tras el protocolo de reserpinización. Se han obtenido recuento de casos, media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Kolmogorov-Smirnov para muestras mayores a 30 casos muestra que el supuesto de normalidad sólo se cumple en la condición RES-FOS-FT-5D (Tabla 4.3.4.2), con lo que afectará a la estadística inferencial: Usaremos el test no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Por otra parte, se ha utilizado el estadístico de Levene para estimar la homogeneidad de varianzas (Tabla 4.3.4.3). El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas.

Pruebas de normalidad

Condición experimental		Kolmogorov-Smirnov		
Células fos-positivas	RES-FOS-FT-6H	,241	26	,000
	RES-FOS-FT-5D	,174	24	,059
	RES-FOS-FT-15D	,261	20	,001

Tabla 4.3.4.2: Pruebas de normalidad de los datos obtenidos para el estudio inmunohistoquímico de las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal tras la realización del Test de la Formalina en ratas reserpinizadas. El estadístico empleado es Kolmogorov-Smirnov (W), indicado para muestras mayores de 30 casos. El supuesto falla en los grupos RES-FOS-FT-6H y RES-FOS-FT-15D. Significación $p > 0,05$.

Prueba de homogeneidad de varianza

		Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
Células fos-positivas	Se basa en la media	,717	2	67	,492

Tabla 4.3.4.3: Prueba de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos para el estudio estudio inmunohistoquímico de las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal tras la realización del Test de la Formalina en ratas reserpinizadas. El estadístico empleado es Levene. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas. Significación $p > 0,05$.

En cuanto a la estadística inferencial, el test no paramétrico Kruskal-Wallis muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0,05$) (Tabla 4.3.4.4). Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.4.1.

Resumen de contrastes de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de Células fospositivas es la misma entre las categorías de Condición experimental.	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	,376	Conserve la hipótesis nula.

Tabla 4.3.4.4: Análisis no paramétrico Kruskal-Wallis para muestras independientes. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p > 0,05$).

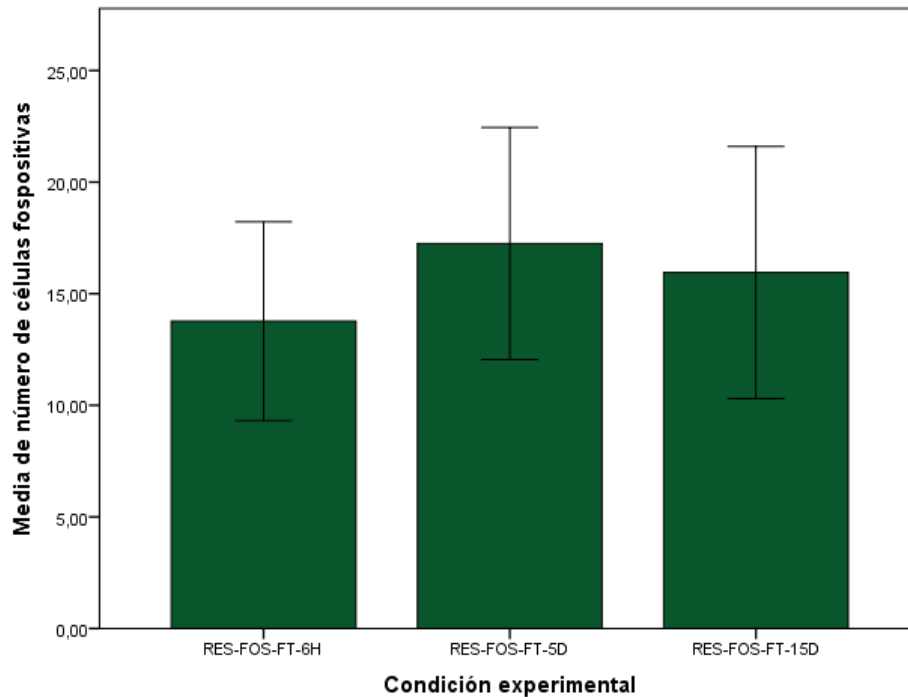


Figura 4.3.4.1: La figura muestra la falta de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en el número de células fos-positivas halladas en las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal. Las barras de error muestran el error típico de la media +/- 2.

Por otra parte, se ha analizado si existen diferencias estadísticamente significativas entre las astas medulares posteriores ipsilateral y contralateral al Test de la Formalina, dependiendo del tiempo en que se hubiese realizado el test desde la implantación del modelo (6 horas, 5 días o 15 días) mediante un test ANOVA de medidas repetidas con un factor intersujeto. La prueba de esfericidad de Mauchly (Tabla 4.3.4.5), muestra que los datos no cumplen el supuesto de esfericidad ($W= 1$; $p<0,05$), por lo que miraremos la corrección de Huynh-Feldt. Los datos muestran diferencias estadísticamente significativas entre los lados ($F=85,998$; $p<0,05$) pero no entre las condiciones experimentales (en los diferentes días tras la implantación del modelo) ($F=0,481$; $p>0,05$) (Tabla 4.3.4.6). Estos datos se muestran gráficamente en la figura 4.3.4.2.

Prueba de esfericidad de Mauchly

Medida: MEASURE_1

Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
	1,000	,000	0	.	1,000	1,000	1,000

Tabla 4.3.4.5: Prueba de esfericidad de Mauchly. los datos no cumplen el supuesto de esfericidad ($W= 1$; $p<0,05$). Sin embargo, el valor de Huynh-Feldt en épsilon es alto (Huynh-Feldt=1).

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Células fospositivas según lateralidad	Esfericidad asumida	6930,225	1	6930,225	85,998	,000
	Greenhouse- Geisser	6930,225	1,000	6930,225	85,998	,000
	Huynh-Feldt	6930,225	1,000	6930,225	85,998	,000
	Límite inferior	6930,225	1,000	6930,225	85,998	,000
Células fospositivas según lateralidad y según condicion experimental	Esfericidad asumida	77,460	2	38,730	,481	,621
	Greenhouse- Geisser	77,460	2,000	38,730	,481	,621
	Huynh-Feldt	77,460	2,000	38,730	,481	,621
	Límite inferior	77,460	2,000	38,730	,481	,621
Error	Esfericidad asumida	5399,283	67	80,586		
	Greenhouse- Geisser	5399,283	67,000	80,586		
	Huynh-Feldt	5399,283	67,000	80,586		
	Límite inferior	5399,283	67,000	80,586		

Tabla 4.3.4.6: ANOVA de medidas repetidas con un factor intersujeto. Hallamos diferencias estadísticamente significativas en el número de células fos-positivas entre el lado ipsi- y contralateral a la aplicación del Test de la Formalina (Dolor inflamatorio) en las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal ($F=85,998$; $p<0,05$) pero no hallamos esa diferencia entre las ipsi- las contra en los diferentes días tras la implantación del modelo ($F=0,481$; $p>0,05$). La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

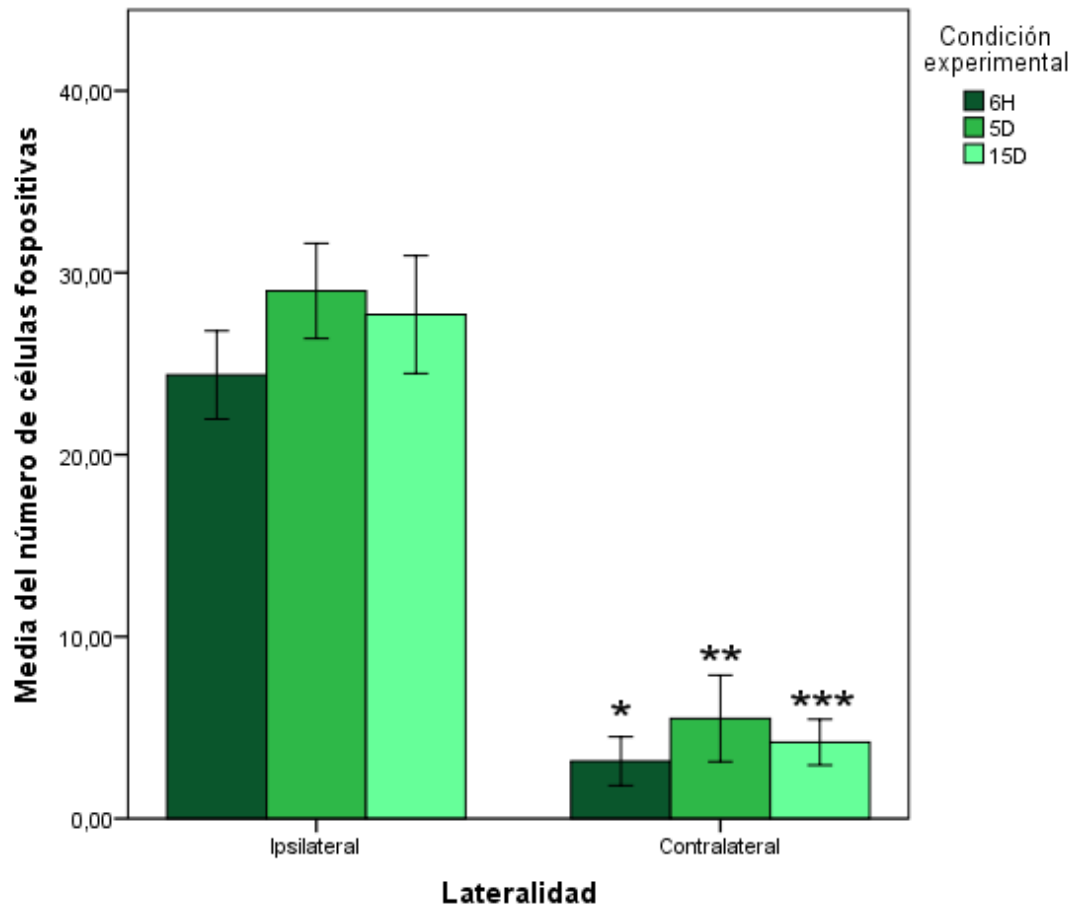


Figura 4.3.4.2: La figura muestra las diferencias estadísticamente significativas entre los lados ipsi- y contralateral a la aplicación del Test de la Fomalina en el número de células fos-positivas halladas en las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal ($F=85,998$; $p<0,05$). No hallamos diferencias estadísticamente significativas entre las ipsi- y las contra- en los diferentes días tras la implantación del modelo ($F=0,481$; $p>0,05$). * Significación $p<0,05$ con respecto al lado ipsilateral de las 6 horas tras la última administración de reserpina. ** Significación $p<0,05$ con respecto al lado ipsilateral de los 5 días tras la última administración de reserpina. *** Significación $p<0,05$ con respecto al lado ipsilateral de los 15 días tras la última administración de reserpina. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

En la siguiente figura se muestran cortes del asta posterior de la médula ipsi- y contralateral al Test de la Formalina del estudio de inmunofluorescencia de cada una de las condiciones experimentales. Se puede apreciar la diferencia de marcaje de FOS en las láminas I y II según la lateralidad.

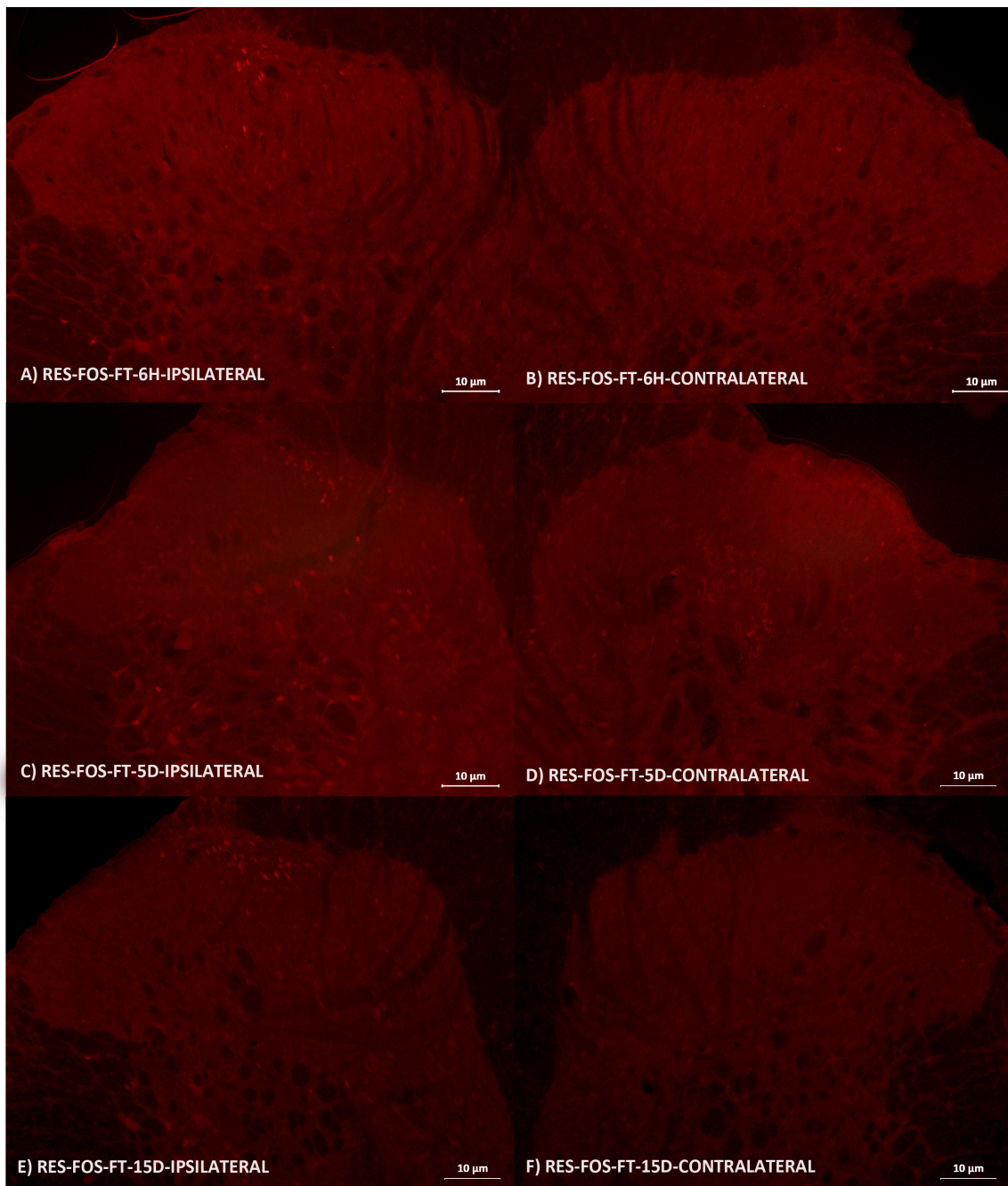


Figura 4.3.4.3: Muestras de cortes de asta posterior de médula del estudio de inmunofluorescencia con marcaje de c-fos de cada condición: A) Muestra ipsilateral de la condición RES-FOS-FT-6H. B) Muestra contralateral de la condición RES-FOS-FT-6H.. C) Muestra ipsilateral de la condición RES-FOS-FT-5D. D) Muestra contralateral de la condición RES-FOS-FT-5D. E) Muestra ipsilateral de la condición RES-FOS-FT-15D. F) Muestra contralateral de la condición RES-FOS-FT-15D.

05

DISCUSIÓN

El síndrome de fibromialgia (FMS) es una patología de etiología desconocida caracterizada por dolor musculoesquelético generalizado, acompañado de otros síntomas entre los que destacan la fatiga crónica, el sueño no reparador y los trastornos depresivos. Este síndrome tiene una prevalencia relativamente importante en nuestra sociedad y un elevado impacto socio-económico, dado que su sintomatología es altamente incapacitante y compromete la funcionalidad de las personas para realizar las actividades de la vida diaria. El desconocimiento de su etiopatogenia determina que actualmente el tratamiento del FMS no consiga alcanzar un grado de eficacia satisfactorio. Por todo ello, es necesario avanzar en la validación de un modelo animal de fibromialgia, capaz de reproducir no sólo la sintomatología de dolor, sino también los principales síntomas comórbidos, y así poder profundizar en los mecanismos subyacentes a esta patología y poder avanzar en la investigación de terapias y fármacos más efectivos.

El objetivo de este estudio es aportar validez robusta al modelo de fibromialgia inducido por reserpina en rata propuesto por Nagakura et al. en 2009. Estudios previos de nuestro laboratorio han reafirmado la presencia de alteraciones en el procesamiento del dolor y de sintomatología depresiva, así como alteraciones del sueño similares a la descritas en pacientes con FMS. En el presente trabajo, hemos utilizado pregabalina y duloxetina, dos de los fármacos aprobados para el tratamiento de FMS, para evaluar su eficacia sobre la sintomatología algica y depresiva existente en este modelo animal. Se administró siguiendo un tratamiento crónico equiparable al tratamiento crónico estandarizado en humanos. En primer lugar, evaluamos su efecto analgésico sobre la presencia de alteraciones en el procesamiento del dolor mediante pruebas conductuales de alodinia táctil e hiperalgesia mecánica (*Electrovonfrey test* y el *Randall and Selitto test*, respectivamente), y el efecto antidepresivo ante la presencia de sintomatología depresiva (mediante *Forced Swimming test* y *Novelty-Suppressed Feeding test*). En segundo lugar, analizamos la modificación y evolución de los patrones de activación de los principales centros supramedulares noradrenérgicos (Locus Coeruleus y áreas A7 y A5) tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina en rata, así como las variaciones de estos patrones tras la introducción de un dolor inflamatorio (test de formalina) en distintos momentos temporales desde la

implantación del modelo, tanto en los centros noradrenérgicos de estudio como en el asta dorsal de la médula espinal. Para ello, hemos empleado técnicas de inmunodetección de la proteína Fos, codificada por el gen de expresión temprana *c-fos*. La inmunodetección de Fos se realizó conjuntamente con la de tiroxina hidroxilasa, la enzima limitante en la síntesis de noradrenalina, para comprobar que las neuronas que modificaban su patrón de activación eran de naturaleza noradrenérgica.

Los resultados obtenidos muestran, por una parte, que el tratamiento con duloxetina durante 15 días a dosis de 30 mg/kg/día disminuye la hiperalgesia mecánica y la alodinia táctil, así como los síntomas depresivos en las ratas sometidas al modelo de FMS inducido por reserpina en rata (Nagakura et al. 2009). Una dosis aguda de duloxetina también reduce la alodinia táctil y la sintomatología depresiva, pero no la hiperalgesia.

Por otra parte, el tratamiento con pregabalina durante 15 días a dosis de 30 mg/kg/día disminuye la hiperalgesia mecánica y la alodinia táctil en las ratas sometidas al modelo de FMS inducido por reserpina en rata (Nagakura et al. 2009); en cambio, la dosis aguda de pregabalina no muestra efectos sobre la alteración en el procesamiento de dolor. Por el contrario, el tratamiento crónico con pregabalina no resulta efectivo sobre la sintomatología depresiva, pero sí produce mejora de estos síntomas en dosis aguda.

Por último, los resultados obtenidos en el estudio de inmunofluorescencia muestran, por una parte, que la administración de reserpina en rata siguiendo el modelo descrito por Nagakura y sus colaboradores produce una elevada expresión de Fos en los centros noradrenérgicos a las 6 horas de haber sido administrada la tercera dosis de reserpina, mientras que a los 5 días y a los 15 días de esta última dosis, el número de células Fos positivas se reduce drásticamente. Este mismo patrón se describe entre las 6 horas, 5 y 15 días de la administración de reserpina en los grupos a los que se les introdujo un dolor inflamatorio (test de formalina) antes de ser perfundidos. El análisis de colocalización de células Fos-positivas y Th-positivas muestra en LC un menor porcentaje de colocalización a las 6 horas de la implantación del modelo, que a los días 5 y 15, de forma contraria a lo que ocurre en las áreas A5 y A7. Por último, la aplicación del dolor inflamatorio no modifica los patrones de activación de células noradrenérgicas en los centros estudiados en ninguno de los tiempos en comparación

con el grupo reserpinizado al que no se le administró formalina. La introducción del test de formalina sí produce un aumento en la expresión de Fos en las láminas ipsilaterales I y II de la médula espinal, y este aumento es similar independientemente del tiempo transcurrido entre el periodo de reserpinización y la administración de formalina.

5.1 Discusión del estudio de los umbrales del dolor

Nuestros resultados muestran que la administración de 30 mg/kg/día de duloxetina o pregabalina en un tratamiento continuado de 15 días revierte la hiperalgesia y la alodinia producidos por el modelo de FMS inducido por reserpina en rata. La dosis aguda de duloxetina también ha resultado efectiva en revertir la alodinia táctil. Por el contrario, no se observa mejora de los síntomas de dolor en los 15 días posteriores a la implantación del modelo cuando se administra vehículo.

Para este estudio de los umbrales de dolor hemos empleado el Electrovonfrey Test y el Randall and Selitto Test, que miden alodinia táctil e hiperalgesia mecánica, respectivamente. Estos test no producen lesiones en los animales, son de fácil aplicación y no invasivos, por lo que generan poco estrés durante su aplicación (Cunha et al., 2004; Nagakura et al., 2009; Santos-Nogueira et al., 2012). Además, realizamos un procedimiento de habituación a la manipulación del animal por parte del investigador, al entorno de experimentación y a los aparatos y procedimientos requeridos para las mediciones, con el fin de reducir al máximo el fenómeno de analgesia inducida por estrés (Schmitt y Hiemke, 1998; Butler y Finn, 2009; Yilmaz et al., 2010), que podría interferir y falsear nuestros resultados. Es por ello que consideramos las pruebas y los procedimientos empleados fiables para la determinación de los cambios producidos en la percepción del dolor de las ratas como consecuencia de la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina y del tratamiento con fármacos o vehículo.

Para realizar este estudio empleamos un total de 42 ratas macho, 21 para cada test. Tras un periodo de habituación de cinco días, realizamos dos medidas de línea base para conocer los umbrales basales de percepción del dolor de cada rata en condiciones

fisiológicas, y con ello comparar las variaciones producidas por la implantación del modelo y su posterior tratamiento. Una vez establecida la línea base, administramos a las ratas 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante tres días consecutivos para implantar el modelo de FMS (Nagakura et al., 2009). El tratamiento farmacológico se llevó a cabo durante los 15 días posteriores a la última administración de reserpina. Las medidas del efecto de los fármacos / vehículo sobre los umbrales de dolor se realizaron los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 de tratamiento. La primera medida se realizó a las 2 horas de la primera administración oral de fármaco, con lo que podemos considerar esta medida como medida aguda.

Los fármacos escogidos para evaluar su eficacia sobre el modelo de FMS inducido por reserpina fueron la duloxetina y la pregabalina. Estos fármacos son de los pocos oficialmente autorizados para el tratamiento de pacientes con FMS en muchos países y actualmente han sido reafirmados como tal por organizaciones como el EULAR (Calandre et al., 2015; MacFarlane et al., 2017).

El grupo de Nagakura et al. probaron el efecto de una dosis aguda de 3mg/kg; 10 mg/kg y 30 mg/kg de pregabalina o duloxetina el día 5 después de la última inyección de reserpina. Obtuvieron una recuperación de los umbrales de dolor en las dosis de 10 y 30 mg/kg para la hiperalgesia muscular y en la dosis de 30 mg/kg para la alodinia táctil. En nuestros resultados, la dosis aguda de 30 mg/kg de pregabalina no tiene efectos significativos en la recuperación de los umbrales de dolor. Esta incongruencia entre los estudios puede deberse a la diferencia en el tiempo transcurrido desde el establecimiento del modelo y la administración de la dosis aguda. En nuestro estudio, la dosis aguda se administra el primer día tras la implantación del modelo, mientras que el grupo de Nagakura se administra el quinto día. Dado el mecanismo de acción de la reserpina sobre los sistemas monoaminérgicos, es posible que la afectación el primer día tras la reserpinización sea demasiado pronunciada como para que el efecto de la pregabalina llegue a alcanzar niveles significativos. A pesar de ello, en nuestro trabajo sí podemos observar una tendencia a la recuperación de los umbrales. No se han encontrado estudios actuales que testen de nuevo anticonvulsivantes en este modelo animal, ya que los recientes trabajos se han centrado en nuevos IRSN por su mayor efecto sobre el sistema monoaminérgico. Aun así, es necesario el aumento de

la experimentación de fármacos gabapentinoides e IRSN en sinergia por su amplia efectividad tanto en la sintomaología principal como en la comórbida en el FMS.

Estudios actuales en dolor neuropático han demostrado que, aunque la pregabalina tiene una acción antialodínica a corto plazo después de una administración aguda, ésta es transitoria y reaparece en las dos horas siguientes a la administración de pregabalina. Por el contrario, la mejora en los umbrales del dolor en el tratamiento con pregabalina se mantiene tras tres días de administración oral, lo que es congruente con los resultados obtenidos en otros modelos de dolor neuropático, y en este caso, en nuestro modelo de FMS (Kremer et al., 2016). Actuales estudios sobre la administración de la pregabalina en el tratamiento de accidentes isquémicos han evidenciado que ésta tiene un interesante factor de protección tras una isquemia cerebral y efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antiapoptóticos y neuroprotectores (Aşci et al., 2016). El efecto analgésico de la pregabalina está vinculado a su capacidad para unirse a los canales de calcio voltaje-dependientes en el sistema nervioso central (Dooley et al., 2000; Takeuchi et al., 2007; Tanabe et al., 2008).

En general, los estudios indican que la pregabalina tiene efectos antinociceptivos tanto en el dolor neuropático como en la sintomatología dolorosa del FMS (Mease et al., 2008; Argoff, 2017; Kia y Choy, 2017).

Considerando ahora los estudios en pacientes con FMS, se ha demostrado una mejora de más del 50% en el dolor con un tratamiento continuado de 450 mg/día de pregabalina, así como mejoras en diversos síntomas comórbidos como la calidad del sueño y la fatiga. En este sentido, nuestros resultados son congruentes con los hallados durante las últimas décadas en humanos. Sin embargo, los pacientes de diversas patologías son reticentes al uso de pregabalina por su perfil de efectos secundarios como mareos, somnolencia, aumento de peso, edema periférico y efectos neurocognitivos negativos (Crofford et al., 2005; Häuser et al., 2009; Kia y Choy, 2017). Por lo que respecta a nuestros resultados empleando duloxetina, no difieren sustancialmente de los hallazgos obtenidos por Nagakura et al. Este grupo no encontró mejora de la alodinia táctil, pero sí de la hiperalgesia mecánica a una dosis aguda de duloxetina de 30mg/kg el quinto día tras la última administración de reserpina (Nagakura et al., 2009). En nuestro estudio, la dosis aguda de 30 mg/kg de duloxetina el primer día posterior a la administración de reserpina mejora los síntomas de

alodinia táctil pero no de hiperalgesia, aunque produce un aumento no significativo de los umbrales. Cabe destacar que no son completamente comparables nuestros resultados con los del grupo de Nagakura, ya que ellos prueban el efecto de una dosis aguda de fármaco el quinto día tras la implantación del modelo, y nosotros el primer día. Siguiendo esta línea, el grupo de Murai et al. encontró una mejoría significativa de la hiperalgesia mecánica tras dosis de 10 y 30 mg/kg de duloxetina oral en dosis aguda el quinto día tras la última administración de reserpina; asimismo, no apreciaron síntomas de problemas locomotores o de coordinación a causa de la dosis (Murai et al., 2015).

Nuestros resultados exponen que el tratamiento crónico de 15 días con duloxetina aumenta de forma estadística los umbrales del dolor (con respecto a los animales tratados con vehículo) tanto en alodinia táctil como en hiperalgesia mecánica, mostrando ciertos picos de actividad en hiperalgesia mecánica los días 7 y 15 de tratamiento. No hemos encontrado estudios que analicen el efecto de un tratamiento farmacológico crónico sobre la modificación de los umbrales de dolor en el modelo.

En el estudio del grupo de Zhang et al. de 2016 encontraron una mejora de la alodinia táctil tras una dosis aguda de 50 mg/kg de duloxetina (entre otros) el quinto día tras la última administración de reserpina. Los resultados de este estudio dieron lugar a la hipótesis que postula que el aumento combinado de 5-HT y NA podría ser más beneficioso en la atenuación del dolor persistente que un aumento en cualquiera de los dos agentes por sí solos. Nuestros resultados son parcialmente congruentes con los del grupo de Zhang et al. y apoyan la evidencia de que los IRSN muestran efectos antialodínicos en este modelo animal de fibromialgia (Zhang et al., 2016).

En 2016, el grupo de Tamano desarrolló un modelo de dolor crónico mediante la administración intratecal a nivel del espacio intervertebral L4-L5 de una dosis diaria de 3, 10 ó 30 nanomoles de reserpina, durante tres días consecutivos, para estudiar la contribución de los sistemas monoaminérgicos inhibitorios descendentes de la médula espinal en la sensibilidad al dolor. Tras la implantación del modelo, la administración intratecal de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina (ISRSN), concretamente milnacipran en dosis de 30 a 300 nanomoles, y duloxetina en dosis de 10 a 300 nanomoles, produjo una disminución de la hiperalgesia mecánica dosis- dependiente. Este grupo pudo concluir, de esta forma, que la disfunción de los

sistemas descendentes de control del dolor modulados por neuronas espinales serotoninérgicas y noradrenérgicas juegan un importante rol en los síndromes de dolor crónico, y que los antidepresivos ISRSN producen efectos analgésicos independientes de sus efectos antidepresivos (Tamano et al., 2016).

Nuestros resultados son congruentes con los estudios realizados en humanos en las últimas décadas, que muestran una mejora significativa de la sintomatología dolorosa tras un tratamiento crónico con duloxetina a dosis 60/120 mg/día. También han referenciado mayor efectividad de la duloxetina sobre los síntomas dolor y los trastornos de sueño frente a otros fármacos IRSN como el milnacipran, aun teniendo en cuenta que la duloxetina tiene un efecto cinco veces mayor sobre la serotonina que sobre la noradrenalina, y que el milnaciprán es un IRSN más equilibrado. Otros fármacos IRSN como la venlafaxina no son normalmente prescritos en pacientes con FMS por falta de evidencia robusta de mejora de los síntomas (Kia y Choy, 2017). A su vez, no hay ningún fármaco aprobado oficialmente en la actualidad para el tratamiento de los casos de síndrome de fibromialgia juvenil (JFMS) (Gmuca y Sherry, 2017). Por otra parte, hay autores que indican que los pacientes que mejoran con medicación representan una proporción baja del total, característica común a otras patologías de dolor crónico (Hauser et al., 2017).

Por todo ello, consideramos que este modelo es válido para avanzar tanto en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a las alteraciones descritas en el procesamiento del dolor en el FMS como para el desarrollo e investigación de nuevos fármacos para el tratamiento de este síndrome.

5.2 Discusión del estudio de la sintomatología depresiva

Nuestros resultados muestran que tanto la pregabalina como la duloxetina son capaces de revertir la sintomatología depresiva provocada por el modelo de FMS inducido por reserpina en un tratamiento agudo, medido con el Forced Swimming test. Sin embargo, el tratamiento crónico durante 15 días con pregabalina no es capaz de mejorar esta sintomatología, al contrario de lo que ocurre con la duloxetina, analizada mediante el Novelty- Suppressed Feeding test.

Las ratas reserpinizadas tratadas con vehículo (agua común) bien a dosis aguda o bien durante 15 días consecutivos no muestran mejoría de la sintomatología depresiva ni a corto ni a largo plazo.

5.2.1 Discusión del estudio Forced Swimming Test

El Forced Swimming Test (FST) se ha convertido en el modelo más utilizado para evaluar el efecto antidepresivo de fármacos de nueva generación en animales. Esto se debe en gran parte a su alto rendimiento, facilidad de uso, fiabilidad interlaboratorios y especificidad. Además, esta prueba ha demostrado ser sensible al efecto agudo de los tratamientos antidepresivos, así como a los estados depresivos inducidos por varios factores (Slattery y Cryan, 2014). El FST se basa en la observación de las conductas de escape o pasividad cuando los animales son introducidos en un cilindro con agua. Estas conductas pueden clasificarse como natación (descrita como los movimientos horizontales que el animal realiza en el cilindro), escalada (descrita como movimientos verticales que el animal realiza con las patas delanteras contra la pared del cilindro), o inmovilidad (descrita como el tiempo que el animal está flotando o realiza ligeros movimientos de las extremidades con el único fin de mantener la nariz fuera del agua). El comportamiento inmóvil refleja un fracaso en persistir con los intentos de escape dirigido (indefensión aprendida) (Porsolt et al., 1978; Lucki, 1997; Slattery y Cryan, 2012).

En el test clásico descrito por Porsolt et al. en 1977, se analizan las diferencias en el tiempo total de inmovilidad durante el test entre el grupo experimental y el grupo control para determinar la presencia de síntomas depresivos (Porsolt et al., 1977). Este procedimiento resultó eficaz para medir el efecto de los antidepresivos de primera generación, pero es poco efectivo para medir los efectos antidepresivos de los nuevos antidepresivos, como los ISRS o los ISRSN (Slattery y Cryan, 2014; Cryan et al., 2002; Lucki, 1997; Slattery y Cryan, 2012). Es por ello que el grupo de Lucki modificó en 1997 los parámetros del test para adaptarlos a las nuevas necesidades. Esta modificación consistió en aumentar la profundidad del cilindro de natación (de 15-18 cm a 30 cm) para evitar que las ratas se estabilizaran apoyando la cola en el fondo del cilindro, y disminuyendo así el tiempo de inmovilidad; y en el establecimiento de una técnica de

muestreo de conductas en el que se las conductas activas se dividen en dos categorías, y se registra el comportamiento predominante cada cinco segundos de las conductas anteriormente descritas.

El registro de las conductas activas y su clasificación en dos categorías durante el test resulta en una mejora sustancial del test original, ya que mediante el uso de estudios farmacológicos y de lesión se ha propuesto que estos dos comportamientos activos se encuentran bajo el control de sistemas de neurotransmisores diferentes (Cryan et al., 2005; Cryan y Sweeney, 2011). Se ha propuesto que la conducta de natación estaría mediada por la acción serotoninérgica, mientras que la de escalada estaría mediada por noradrenalina. Por ello, los antidepresivos catecolaminérgicos aumentarían selectivamente la conducta de escalada, mientras que los serotoninérgicos aumentarían selectivamente la conducta de nadar. Esto implica que el FST tiene el beneficio adicional de determinar si un nuevo agente farmacológico activa predominantemente cualquiera de estos sistemas neurotransmisores.

Sin embargo, el FST presenta algunas limitaciones, pues muchos autores consideran que está basado en factores de estrés (aunque hay evidencia de que existe un vínculo entre la depresión y el estrés). A pesar de ello, este test es el más indicado para estudiar los mecanismos subyacentes a los efectos antidepresivos agudos de varios compuestos (Cryan et al., 2002, Cryan y Slattery, 2007).

En el estudio mediante Forced Swimming Test se emplearon 24 ratas macho Sprague-Dawley, de las cuales 9 fueron tratadas con reserpina-vehículo, 8 con reserpina-duloxetine y 7 con reserpina-pregabalina. Cabe destacar que, a diferencia del estudio realizado por el grupo de Nagakura en 2009, la realización del FST por nuestro grupo de estudio incluyó una metodología estrictamente estandarizada siguiendo los pasos que Slattery y Cryan perfeccionaron en 2012.

No se han analizado las conductas en el pretest puesto que todos los animales han sido sometidos al mismo protocolo de reserpinización. Estudios anteriores han evidenciado una ausencia de diferencias estadísticamente significativas en las conductas de inmovilidad, natación y escalada en esa fase de pretest entre animales reserpinizados y animales no reserpinizados, lo que desecha la idea de una inducción de hipocinesia por efecto de este químico (Antkiewicz-Michaluk et al., 2014; Minor et al., 2003; Nagakura et al., 2009).

Los animales sometidos al modelo de FMS inducido por reserpina mostraron mejora en sus síntomas depresivos al recibir dos dosis de 30 mg/kg de duloxetina (una posterior al pretest y una segunda 2 horas antes que el test). Concretamente, mostraron un aumento significativo en la conducta de natación y un incremento significativo en la conducta de escalada, así como un descenso significativo en el tiempo que pasaron flotando inmóviles en la fase de test comparado con las ratas tratadas con vehículo.

Nuestros resultados apoyan las evidencias que defienden que la duloxetina posee un efecto agudo precoz y una gran eficacia en tratar los síntomas físicos de la depresión, y que ese efecto es dependiente de un aumento agudo temprano en los niveles de 5-HT y NA en el SNC en este modelo animal de FMS (Shibrya et al., 2017; Zomkowski et al., 2012). Estos resultados son también congruentes con los encontrados en modelos de dolor neuropático que cursan con depresión (Hu et al., 2016), reforzando la evidencia de que dolor y depresión comparten vías reguladas por las aminas biógenas (Delgado, 2004; Rodríguez-Gaztelumendi et al., 2014; Benson et al., 2015). Todo ello potencia la sugerencia de que las vías noradrenérgicas y serotoninérgicas podrían ser objetivos prometedores para tratar la significativa comorbilidad clínica del dolor crónico y la depresión. Por otra parte, hay autores que defienden una participación de los receptores NMDA y de la vía L-arginina-NO-cGMP en el efecto antidepresivo de la duloxetina en el FST, lo que abriría una nueva línea de investigación para estudiar nuevas dianas terapéuticas (Zomkowski et al., 2012).

Por lo que respecta a estudios en humanos, sin embargo, algunas revisiones han expuesto que la duloxetina no parece proporcionar una ventaja significativa en su eficacia sobre otros agentes antidepresivos para el tratamiento en fase aguda de la depresión mayor (Cipriani et al., 2012). Por ello muchas veces se plantea el por qué órganos como la FDA o el EULAR decidieron incluir a este fármaco como uno de los pocos indicados para el tratamiento de un síndrome tan complejo como es el FMS (incluso en casos raros como FMS en la adolescencia) (Calandre et al., 2016). Paradójicamente, diversos estudios aportan evidencias de una mayor eficacia de la duloxetina frente a otros IRNS en el tratamiento del FMS, tanto en sintomatología dolorosa como en depresión e incluso en ciertos aspectos de los síntomas cognitivos. Asimismo, todos proponen a la duloxetina como fármaco de primera opción para

pacientes de FMS en los que predomine la depresión como síntoma comórbido (Schatzberg, 2007; Russell, 2008; Scholz et al., 2009; Häuser et al., 2011; Lee y Song, 2016) y algunos recalcan que, aunque es efectiva, hay una necesidad de mejorar la eficacia de los tratamientos farmacológicos para aumentar sustancialmente esta eficacia, abarcar más aspectos sintomatología comórbida y reducir los efectos adversos (Kim et al., 2013).

Por otro lado, los animales sometidos al modelo de FMS inducido por reserpina mostraron mejora en sus síntomas depresivos al recibir dos dosis de 30 mg/kg de pregabalina (una posterior al pretest y otra 2 horas antes del test). En concreto, mostraron un aumento significativo en la conducta de natación así como un descenso significativo en el tiempo que pasaron flotando inmóviles en la fase de test comparado con las ratas tratadas con vehículo; sin embargo, no se observaron cambios significativos en la conducta de escalada.

Hay que señalar que no se han encontrado estudios experimentales preclínicos en los que se testase este fármaco antiepiléptico en un test de depresión. De hecho, como hemos señalado con anterioridad, no se ha estudiado el papel de la pregabalina en los trastornos del estado de ánimo en el FMS (Roskell et al., 2011; Chinn et al., 2016; Derry et al., 2016; Gerardi et al., 2016). Durante la última década, en todo el mundo se ha extendido el uso de la pregabalina como analgésico y se ha aprobado para diversas patologías que cursan con dolor, como el dolor neuropático asociado con neuropatía periférica diabética en EE.UU. y México, neuralgia postherpética (NPH) en los EE.UU., dolor neuropático central y periférico en Europa y FMS en Estados Unidos, México y Canadá (Darbà et al., 2014; Parker et al., 2015). La pregabalina ha resultado ser más que efectiva en FMS, siendo la primera terapia farmacológica aprobada por la FDA para el manejo de este síndrome (Boomershine, 2010; Bellato et al., 2012; Russell, 2013; Schug y Goddard, 2014; Forte et al., 2015; Gerardi et al., 2016; Chinn et al., 2016). En un reciente estudio se expone que, en los casos en los que se ha observado una mejora de la sintomatología comórbida depresiva en los pacientes con FMS debida a la pregabalina, no se ha tenido en cuenta ni el resto de terapias no farmacológicas ni la coexistencia de tratamientos con otros fármacos (Arnold et al., 2015).

Parece haber un vínculo común entre las diferentes indicaciones en las que se usan antiepilépticos: son estados subyacentes de hiperexcitabilidad que pueden

manifestarse como trastornos del sueño, cambios de humor o impulsividad. Existen varias hipótesis sobre una fisiopatología subyacente común, como los flujos excesivos de sodio y calcio. Algunos autores señalan que puede encontrarse cierto efecto antidepresivo agudo y ansiolítico en estos fármacos, que puede explicarse, al menos en parte, mediante la modulación aguda de la serotonina, dopamina, noradrenalina y la acción gabaérgica del ácido γ -aminobutírico (GABA) (Grunze, 2008; Kawalec et al., 2014). En contraposición, un estudio realizado en ratones llevado a cabo por el grupo de Kaygisiz expuso que el sistema serotoninérgico no modula el efecto antinociceptivo de la pregabalina pero que, de forma contraria, parece haber una participación de la vía opioidérgica en este efecto (Kaygisiz et al., 2014).

Nuestra hipótesis principal a estos resultados es que este “efecto antidepresivo agudo” se debe, en efecto, a una modulación aguda de las monoaminas y al efecto analgésico de la pregabalina, con lo que los animales se encontrarían en un estado de mejoría temprana de los síntomas, que motivaría las conductas activas de escape en el test. Sin embargo, no encontraremos los mismos resultados en el NSFT, el cual mide el efecto antidepresivo a largo plazo.

5.2.2 Discusión del estudio Novelty-Suppressed feeding test

El Novelty-Suppressed Feeding Test (NSFT) se basa en el fenómeno de la hiponeofagia, es decir, la inhibición de la ingesta producida por la exposición a una novedad, como un ambiente desconocido o una comida nueva (Dulawa y Hen, 2005). En este paradigma, los roedores se enfrentan a un conflicto entre evitar un entorno desconocido y altamente iluminado (debido a su miedo innato a espacios abiertos y nuevos) y la necesidad de alimentarse. Los test basados en fenómenos de hiponeofagia se describieron inicialmente para estudiar la eficacia de los tratamientos ansiolíticos, pero se utilizan cada vez más para estudiar tratamientos antidepresivos subcrónicos y crónicos en roedores (David et al., 2009; Nestler y Hyman, 2010).

En el centro del campo abierto se emplaza una placa de Petri sobre una plataforma blanca que contiene una pequeña cantidad de comida. En nuestro estudio, los animales fueron motivados a acercarse al centro del campo abierto y a comer

utilizando dos estrategias paralelas: 1) los animales fueron expuestos a un protocolo de privación progresivo (Stedenfeld et al., 2011; Blasco-Serra et al., 2017); y 2) se enriqueció la comida habitual de los animales (pellets estándar de 12 mm, Global Diet 2014, de ENVIGO) con una solución de sacarosa al 50% para convertirla en más reforzante y deseable (Dulawa y Hen, 2005). Se emplearon los pellets estándar para evitar el rechazo de algunos animales a un nuevo alimento, y así evitar introducir un factor no estandarizado al estudio. Por otro lado, la comida enriquecida con sacarosa se les administró a las ratas desde el primer día del proceso de habituación hasta el final del procedimiento, para evitar que fuera percibido en el momento del experimento como novedoso y extraño, y previniendo de este modo que la comida tuviese un efecto ansiogénico extra que influyera en los resultados del NSFT.

En el estudio mediante Novelty-Suppressed Feeding Test se emplearon 22 ratas macho Sprague-Dawley, de las cuales 7 fueron tratadas con reserpina-vehículo, 7 con reserpina-duloxetina y 8 con reserpina-pregabalina.

En primer lugar debemos mencionar que la reserpina produce una anorexia muy notable en su fase aguda (Blasco-Serra et al., 2015). Este efecto adverso se observa en los animales tratados con reserpina, pero disminuye progresivamente hasta desaparecer. Hemos verificado que no hay diferencias significativas entre los sujetos al comparar la media de gramos de ingesta del día anterior a la primera privación y la media de gramos de ingesta del período de habituación. Esta anorexia es un factor a tener en cuenta cuando se utiliza un inductor químico de la depresión.

Por otra parte, hemos medido los parámetros “Tiempo (que tardan los animales) en comer” y “cantidad de comida ingerida” en jaula para asegurar que los resultados obtenidos en el test son debidos a signos de conducta depresiva, y no a otros factores como la falta de hambre o problemas digestivos derivados de la administración de los fármacos.

Los resultados muestran que el tratamiento con duloxetina a dosis de 30 mg/kg revierte los síntomas depresivos producidos por la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina. El efecto de la administración crónica de duloxetina fue testado el día 14 de tratamiento. En el test, las mejoras se observaron por un mayor número de veces por minuto que los animales se acercaban a la comida y que los

animales olían/tocaban la comida con respecto al grupo tratado con vehículo, así como por la disminución de la latencia en comer.

No se han encontrado estudios experimentales preclínicos que testeen el tratamiento a largo plazo con duloxetina en NSFT y parece ser que todavía no se ha investigado este modelo de FMS a largo plazo en casi ningún aspecto. Sin embargo, nuestros resultados son congruentes con los encontrados en humanos tras un tratamiento de aproximadamente 3 meses. Se ha observado que el efecto de la duloxetina en FMS es mayor sobre la sintomatología comórbida depresiva que sobre la sintomatología dolorosa (Angeletti et al., 2013; Lunn et al., 2014; Chinn et al., 2016).

Por otro lado, los resultados muestran que el tratamiento con pregabalina a dosis de 30 mg/kg no mejora los síntomas depresivos producidos por la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina. El efecto de la administración crónica de pregabalina fue testado el día 14 de tratamiento. En el test, se observó un aumento de las conductas de acercamiento y contacto con la comida, pero los animales no redujeron el tiempo que tardaren en comer del centro con respecto al grupo tratado con vehículo.

Hasta la fecha la pregabalina no ha sido testada en tratamiento crónico ni en este modelo animal de FMS ni en otros modelos animales que cursan con dolor. Cabe destacar que la pregabalina no es un fármaco antidepresivo y que no se le conocen efectos sobre la depresión, más allá de los derivados de la mejora del dolor en cuadros crónicos.

En humanos los datos obtenidos del efecto de la pregabalina sobre el estado de ánimo de pacientes con FMS sugieren que no es un efecto directo, y que si nos basamos en las categorías de Cohen, el efecto de la pregabalina versus placebo sobre la depresión no es sustancial (Üçeyler et al., 2013). Esto sería congruente con nuestros resultados, puesto que en el efecto agudo sí hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas con respecto a la sintomatología depresiva pero no hemos encontrado una mejora sustancial de estos síntomas a largo plazo. Los datos experimentales sugieren, como hemos señalado anteriormente, que la pregabalina activa el sistema noradrenérgico supraespinal del control descendente inhibitorio del dolor, y todas las hipótesis de un efecto modulador de monoaminas centrales por parte de la pregabalina son de efecto agudo, no se han mostrado evidencias a largo plazo

(Takeuchi et al., 2007; Grunze, 2008; Tanabe et al., 2008; Kawalec et al., 2014). Por otra parte, y en relación a la diferente sintomatología comórbida, este fármaco sí ha demostrado tener un beneficio específico con respecto a los trastornos del sueño, fatiga y ansiedad (Russell et al., 2009; Arnold et al., 2015; Silverman et al., 2017).

5.3 Discusión del estudio inmunohistoquímico

Nuestros resultados evidencian una elevada activación de los centros noradrenérgicos pontinos (A5, LC y A7) a las 6 horas de la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina. A los 5 y 15 días desde la implantación, estos núcleos disminuyen drásticamente su activación. Los datos de colocalización con tirosina hidroxilasa indican un porcentaje elevado de colocalización, que se mantiene a lo largo del tiempo en LC, pero que disminuye en los 5 y 15 días posteriores a la reserpinización. Este patrón en la evolución temporal no se modifica por la introducción de un estímulo agudo inflamatorio (test de la formalina) dos horas antes de las perfusiones.

La comparación entre los grupos a los que se les administra formalina y los grupos sin formalina tampoco evidencia diferencias en los patrones de activación. Es decir, los centros noradrenérgicos afectados por el modelo de FMS inducido por reserpina no presentan cambios en su activación como consecuencia de la introducción de un estímulo de inflamación aguda, ni a las 6 horas ni a los 5 o 15 días tras haber administrado la reserpina. Únicamente en A5 a las 6 horas tras la última administración de reserpina, se observa un mayor número de células fospositivas y mayor porcentaje de de colocalización en la condición en la que se ha aplicado un dolor inflamatorio.

Asimismo, hemos comparado la activación de las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal tras la aplicación de dolor inflamatorio en los tres días de estudio, y no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones. Sí se puede observar el ascenso de la información dolorosa en estas láminas al comparar la activación entre el lado ipsilateral y el contralateral a la inyección de formalina.

Los sistemas monoaminérgicos (sistema dopaminérgico, sistema serotoninérgico y sistema noradrenérgico) están involucrados en la mayoría de las funciones cerebrales,

además, está ampliamente demostrado que la modificación de su actividad está relacionada con enfermedades neuropsiquiátricas y neurológicas (Di Giovanni et al., 2016). En estos últimos años, grupos de investigación de todo el mundo están aportando evidencias a la hipótesis de que el FMS también podría estar relacionado con una alteración en estos sistemas (Nagakura et al., 2009; Schmidt-Wilcke y Clauw, 2010; Schmidt-Wilcke y Clauw, 2011; Blasco-Serra et al., 2015).

De estos sistemas, el sistema noradrenérgico tiene entre sus funciones más importantes la regulación del dolor (Pertovaara, 2013). Los grupos de células noradrenérgicas agrupadas en núcleos se clasifican de A1 a A7. La fuente principal de noradrenalina en las vías descendentes es el sistema nervioso pontoespinal noradrenérgico, originado en los grupos de células A5, A6 (Locus Coeruleus) y A7 (Howorth et al., 2009). Las principales vías ascendentes de proyección noradrenérgica del sistema nervioso central son los haces dorsales y ventrales y el haz periventricular (Cooper et al., 2003; Alba-Delgado et al., 2013). LC, A5 y A7 son, en este orden, los núcleos con mayor porcentaje de neuronas noradrenérgicas en el sistema pontino supramedular (Howorth et al., 2009; Llorca-Torrallba, 2016).

El LC se localiza en el tegmento pontino dorsolateral superior, y es el mayor productor de noradrenalina del sistema nervioso: contiene casi el 50% de todas las neuronas noradrenérgicas (Howorth et al., 2009; Llorca-Torrallba, 2016; Benarroch, 2017). A pesar de que también se producen pequeñas cantidades de otras sustancias en el LC (por ejemplo, vasopresina, neurotensina y galanina), NA es el principal y más importante neurotransmisor sintetizado por estas neuronas, ejerciendo su acción en receptores adrenérgicos específicos. Sus neuronas tienen axones extensamente ramificados que se proyectan a lo largo del neuroaxis, proporcionando la fuente principal de noradrenalina (NA) al neocórtex, al hipocampo, a la amígdala, al tálamo, al cerebelo y a la médula espinal (Lindvall y Bjorklund 1974; Benarroch, 2017). Las neuronas de la LC se identifican por su inmunoreactividad para la tirosina hidroxilasa y a la dopamina- β -hidroxilasa, las dos enzimas implicadas críticamente en la biosíntesis de NA (Benarroch, 2017).

El papel del LC en el dolor en humanos no se ha estudiado en profundidad puesto que es una estructura de ínfimo tamaño y que varía según diferentes factores; sin embargo, la mayoría de los datos disponibles en roedores sugieren que las neuronas

LC no están implicadas significativamente en el mantenimiento del umbral basal del dolor, pero cuando ocurre una lesión más persistente (como en condiciones inflamatorias agudas), el reclutamiento del sistema noradrenérgico descendente es responsable de atenuar la sensación de dolor, es decir, tras los cambios plásticos inducidos por una lesión o inflamación, la contribución del sistema noradrenérgico en el control del dolor se incrementa. Este sistema noradrenérgico también contribuye a la inducción y el mantenimiento de la actividad neuronal del cerebro anterior y el estado conductual apropiado para la adquisición de la información sensorial (Pertovaara, 2013; Llorca-Torralba, 2016).

En cuanto a la vía ascendente noradrenérgica, las evidencias indican que está implicada con los componentes cognitivo-evaluativos y emotivo-afectivos del dolor, lo que podría deberse principalmente a la red formada por el LC y sus proyecciones ascendentes. Los aportes noradrenérgicos que alcanzan las áreas encefálicas no sólo están relacionados con la sensación de dolor, sino también con los componentes emocional y cognitivo. De hecho, varios estudios han abordado la posible implicación del sistema LC-noradrenérgico en el deterioro afectivo inducido por el dolor (Alba-Delgado et al., 2013; Pertovaara, 2013; Llorca-Torralba, 2016).

Además, la activación del sistema LC parece estar implicada en algunos efectos analgésicos que implican la actividad tanto de las vías ascendentes como descendentes y posiblemente la actividad de otros sistemas de neurotransmisión (por ejemplo, el sistema opioide y glutamatérgico). Se ha evidenciado que la desinhibición y el desequilibrio de NA en la vía endógena inhibitoria del dolor puede contribuir a la generación de dolor persistente, y podría causar sensibilización central y síntomas de dolor en los pacientes con FMS (Ren y Dubner, 2002; Millan, 2002; Nagakura et al., 2009; Llorca-Torralba et al., 2016).

Los resultados obtenidos en el presente estudio en el núcleo LC evidencian que, tras la implantación del modelo de FMS, es decir, en una depleción central monoaminérgica, este núcleo se comporta de la misma forma tanto si se aplica un dolor inflamatorio agudo como si no. A las 6 horas de la implantación del modelo se produce una activación notable de LC, que podría deberse a dos causas. Por un lado, a una respuesta de estas neuronas a la demanda de NA por parte de sus aferencias. Debido a la incapacidad de las vesículas para almacenar y liberar este neurotransmisor a la

hendidura sináptica como consecuencia de la administración de reserpina, los sistemas monoaminérgicos quedarían parcialmente vacíos de estos neurotransmisores, lo que aumentaría la demanda y los mecanismos de *feedback* activarían la producción del mismo, reflejándose en un aumento de la actividad de la célula.

Por otro lado, puede ser debido a una activación neuronal aberrante por una sobreactivación de la MAO al intentar oxidar el exceso de neurotransmisor que no ha podido ser liberado a la hendidura sináptica, o de los transportadores de aminas biógenas, como el NAT en caso de la NA, el cual protege las células de los efectos tóxicos de los altos niveles intracelulares de aminas biógenas (Eisenhofer et al., 2004; Antkiewicz-Michaluk et al., 2015; Minor y Hanff, 2015).

Un estudio in-vitro realizado en 2015 muestra que el tratamiento con reserpina también inhibe el flujo autofágico normal y conduce a la acumulación de la proteína alfa-sinucleína y p62, e interviene en la formación de autolisosomas, contribuyendo a la muerte celular, lo que afianza su implicación en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson (Lee et al., 2015).

Estas opciones se sumarían a la desestabilización del sistema monoaminérgico general por la depleción simultánea de NA, DA y 5-HT; de hecho, la depleción simultánea de 5-HT y NA se ha estudiado como modelo de depresión (Delgado y Moreno, 2000). El hecho de que estos resultados sean igual en la condición a la que se le ha añadido un dolor inflamatorio sugiere que esta activación no sea debida a la condición dolorosa per se, sino a la depleción monoaminérgica en su fase temprana. De ser cierta esta hipótesis, la atenuación descendente noradrenérgica regida por LC del dolor inflamatorio agudo en este modelo de FMS inducido por reserpina en rata se vería comprometida, así como la vía ascendente noradrenérgica que participa en componentes cognitivo-evaluativos y emotivo-afectivos del dolor. La alteración del LC, que además también contribuye en el estado de vigilia, podría estar relacionado con otro ítem de la sintomatología comórbida: las alteraciones del sueño, las cuales conducirían a una serie de cambios secundarios directos, incluyendo la reducción de la síntesis de proteínas, disminución de la secreción de la hormona del crecimiento, reducción de la saturación de hemoglobina de oxígeno durante la noche, reducción de la actividad inmune y alteraría la percepción del dolor (Chaitow, 2003; Berridge y Waterhouse, 2003; Bouret y Sara, 2005; Samuels y Szabadi, 2008).

La implicación del LC bajo circunstancias de dolor neuropático a largo plazo o crónico ha sido discutida recientemente. Paradójicamente, aunque la actividad LC-médula se ha asociado predominantemente con la inhibición del dolor neuropático e inflamatorio, hay evidencia creciente que sugiere que el LC modula el dolor de forma bidireccional, y que en algunos casos llega a ser incluso el que inicia y mantiene el dolor neuropático (Brightwell y Taylor, 2009; Kaushal et al., 2016; Taylor y Westlund, 2016). Taylor y Westlund, a través de una extensa revisión sobre diversos estudios de LC y de su implicación en vías noradrenérgicas ascendentes y descendentes, propusieron que, durante una activación intensa o prolongada después de una lesión nerviosa, los descensos del flujo modulador del dolor de LC hacia médula espinal, así como las corrientes ascendentes de flujo analógico de la LC a la corteza prefrontal medial (mPFC), se convierten predominantemente en facilitadores del dolor. Mediante estudios multidisciplinarios implicando diversas técnicas, como la optogenética, se ha evidenciado que, mientras las neuronas que contribuyen al efecto antinociceptivo de LC se encuentran en la región ventral del núcleo, un claro grupo de neuronas que participan en la facilitación del dolor está alojado en la parte más dorsal del LC (Suzuki et al., 2004; Heinricher, et al., 2009; Hickey et al., 2014).

En resumen, el efecto neto de la activación la vía LC-noradrenérgica del dolor neuropático cambia con el tiempo, comenzando con una inhibición, mediada por proyecciones descendentes del LC ventral al asta posterior medular y, posteriormente, cambia a la facilitación mediada por el ascenso de proyecciones del LC dorsal a la mPFC (Brightwell y Taylor, 2009, Kaushal et al., 2016). Estos cambios aparentemente contribuyen a la transición del dolor agudo al dolor crónico (Taylor y Westlund, 2016).

Además, se ha estipulado que el equilibrio dinámico entre las salidas inhibitorias y excitatorias de los centros moduladores del dolor (incluyendo LC, la médula rostral ventromedial (RVM), la sustancia gris periacueductal (PAG), núcleo dorsal reticular (DRt) y la médula ventrolateral) determina la presencia o ausencia de dolor neuropático después de una lesión nerviosa (Heinricher et al., 2009).

Por otra parte, a los 5 días y 15 días, se produce una disminución drástica en la activación de los centros noradrenérgicos estudiados, tanto con dolor inflamatorio agudo como sin dolor, lo que evidencia ese vaciamiento mantenido de aminas biógenas (en concreto, NA) y la imposibilidad del núcleo para responder a una

condición de dolor. Estos datos son congruentes con la sintomatología presente en el modelo, es decir, alteraciones en la percepción del dolor, en el estado de ánimo y en la regulación del sueño. La ausencia de influencia descendente inhibitoria se evidencia también en las láminas I y II del asta posterior de la médula espinal, pues tras la aplicación de un dolor inflamatorio en los tres momentos estudiados, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de células fosforizadas. Esto último se traduce en un fallo de LC en la inhibición descendente de modulación del dolor una vez implantado el modelo, independientemente del momento en el que estemos 6 horas tras la implantación, 5 días o 15 días tras la implantación).

También, hemos de tener presente los sistemas con los que la noradrenalina interactúa puesto que probablemente también presentarán algún tipo de alteración. Un ejemplo de ello sería el sistema colinérgico, el cual media en parte en la supresión noradrenérgica del dolor en la médula espinal, y en los compuestos noradrenérgicos que actúan sobre el adrenoceptor α_2 promoviendo el efecto analgésico de los agonistas de los receptores opioides (Hylden et al., 1991; Li y Eisenach, 2002; Pertovaara, 2013).

En lo referente a las áreas A5 y A7, estos grupos celulares noradrenérgicos también participan en la modulación descendente del dolor a nivel de la médula espinal y actúan como neuronas premotoras simpáticas inervando la columna de células intermedias en la médula espinal torácica y activan el sistema simpático-adrenal para responder a los estímulos dolorosos (Millan, 2002; Mravec et al., 2012). Diversos estudios inmunohistoquímicos y de trazadores clásicos han mostrado que los axones de los grupos celulares pontinos A5-A7 inervan densamente, junto a LC, el asta dorsal de la médula espinal. Esta disposición de las sinapsis catecolaminérgicas constituye la base para la modulación del procesamiento de las señales nociceptivas a nivel de la médula espinal (Byrum et al., 1984, Clark y Proudfit 1991; 1993). Otros estudios probaron su participación en los sistemas inhibidores descendentes monoaminérgicos y en la modulación de los procesos nociceptivos en la médula espinal mediante la aplicación de *Formalin Test* y con métodos de estimulación eléctrica y química (Omote et al., 1998; Nuseir y Proudfit, 2000; Marques-Lopes et al., 2010).

El estudio del grupo de Mravec en 2012 observó las consecuencias de lesiones en las áreas A5 y A7. Los resultados hallados tras lesionar A7 sugieren que las neuronas

noradrenérgicas de este núcleo tienen un efecto menor en la liberación de catecolaminas periféricas relacionadas con el dolor. Por otra parte, las lesiones bilaterales producidas en A5 no impiden una respuesta ante estímulos dolorosos de naturaleza inflamatoria a corto plazo (liberación NA aguda). En resumen, este grupo de investigación evidenció que ante la lesión de un único núcleo noradrenérgico, el sistema intenta compensarse desde otro punto, y esta capacidad puede ser clave para la supervivencia en condiciones adversas (Mravec et al., 2012). Al haber caído todo el sistema noradrenérgico, nuestros resultados evidencian que estos núcleos se comportan como LC a lo largo del tiempo en condiciones basales de dolor y tras una aplicación de un dolor inflamatorio, lo que expone que ningún núcleo noradrenérgico es capaz de compensar el fallo del otro.

En estos núcleos, la no colocalización (independientemente de la aplicación o no de dolor) aumenta según el momento del tiempo, hasta llegar a un 80-85% el día 15 tras la última administración de reserpina en A5 y hasta un 39-50% en el caso de A7. Esto podría ser debido a un intento de recuperar el equilibrio por parte de otro sistema alejado del monoaminérgico (sistema gabaérgico o glutamatérgico) o la activación de un sistema alternativo al que la población noradrenérgica estaba inhibiendo.

5.4 Consideraciones finales

Tras el análisis de los resultados obtenidos, consideramos válido el modelo de FMS inducido por reserpina en rata propuesto por Nagakura et al. en 2009. Nuestro estudio aporta validez al modelo mediante pruebas farmacológicas a corto y a largo plazo en dos de los síntomas más relevantes del FMS: dolor y síntomas depresivos, ya que los resultados obtenidos en el presente trabajo son congruentes con los resultados hallados en humanos con FMS tratados con pregabalina y duloxetina. Asimismo, nuestro estudio evidencia que este modelo provoca alteraciones en la actividad noradrenérgica de 3 de los principales núcleos noradrenérgicos pontinos: A5, LC y A7, los cuales están directamente relacionados con la regulación del dolor, del sueño y del estado de ánimo, síntomas predominantes en el FMS.

El presente estudio nos acerca un poco más al conocimiento del FMS, a su posible etiopatogenia y a futuros targets de tratamiento, y además nos abre la puerta a nuevas preguntas que nos suscitan a seguir investigando en esta línea.

Una de las primeras líneas que estamos empezando a investigar es la caracterización de las alteraciones que en estudios previos encontramos en otros núcleos monoaminérgicos. En el caso de los núcleos serotoninérgicos, sería imprescindible centrarnos en los núcleos Rafe Magno (RMg) y Rafe Dorsal (DR), implicados en el procesamiento del dolor y el estado de ánimo. En caso de los núcleos dopaminérgicos, sería interesante caracterizar las alteraciones en el núcleo ventral tegmental (VTA) y en la Substantia Nigra (SN), e intentar correlacionar su alteración con la sintomatología descrita en el modelo. Las poblaciones neuronales monoaminérgicas (NA, DA y 5-HT, según el núcleo), coexisten con diferentes poblaciones neuronales dentro de estos núcleos, como por ejemplo la de células gabaérgicas o glutamatérgicas, las cuales podrían ser las que modificasen su patrón de activación tras la administración de reserpina. Por ello, sería conveniente realizar pruebas inmunohistoquímicas que caracterizaran la naturaleza de las neuronas activas que no presentan colocalización con tirosina hidroxilasa en nuestro estudio.

Otro complemento al estudio sería analizar las proyecciones de Locus Coeruleus para ver en qué manera les ha afectado la depleción monoaminérgica, en concreto, las áreas más interesantes serían mPFC, amígdala e hipocampo, pues, junto a test conductuales cognitivos, nos permitirían evaluar la sintomatología cognitiva, la cual se encuentra en humanos y las últimas investigaciones han nombrado como “*Fibrofog*” (Kravitz y Katz, 2015). Por otra parte, también sería un complemento adecuado analizar el efecto de la duloxetina y la pregabalina sobre estos núcleos tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina.

Desde otro punto de vista, el hecho de que el porcentaje de área de TH no varíe tras la administración de reserpina nos indica que no se ha producido muerte neuronal, al menos identificable mediante técnicas de inmunofluorescencia. Sería conveniente emplear técnicas que nos permitieran evaluar el daño neuronal, como la microscopía electrónica. Esta técnica de imagen genera imágenes altamente detalladas de los circuitos neuronales, incluyendo la arquitectura de una neurona, el estado de sus árboles dendríticos y axonales, sus terminales sinápticos y el estado de las neuronas

adyacentes. El mayor inconveniente de esta técnica es la exponencialidad de las consecuencias ante la existencia de un mínimo error (Schneider-Mizell et al., 2016).

Sería también recomendable realizar pruebas de Western-Blotting para observar las fluctuaciones de metabolitos de noradrenalina (tanto dentro del LC como en general en el encéfalo) o de MAO intraneuronal derivadas de la administración de reserpina o de un tratamiento con un fármaco IRSN. El Western-Blot se utiliza en la actualidad en investigación en biología celular y molecular para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tal como la que se presenta en extractos celulares o de tejidos. La ampliación de este trabajo con dicha técnica permitiría documentar los cambios en las concentraciones de metabolitos monoaminérgicos que ocurren en el cerebro de las ratas tratadas con reserpina y compararlo con un grupo control y con un grupo que haya recibido un tratamiento con fármaco, con el fin de aumentar nuestro conocimiento sobre el comportamiento del cerebro de estas ratas, y determinar la concentración de metabolitos en los diferentes grupos experimentales, así como correlacionar estos niveles con las conductas estudiadas (Fernández et al., 2006; Mahmood y Yang, 2012; Kurien y Scofield, 2015; Lin et al., 2016).

Del mismo modo, sería interesante realizar estudios con trazadores o estudios de electrofisiología, ya que esto nos permitiría relacionar el grado de actividad de los centros que mandan y reciben información de LC con el estado de mayor o menor activación de este núcleo, y también nos ayudaría a explicar su diferente comportamiento.

Un aspecto que es necesario mencionar es el motivo por el que nuestro estudio sólo ha incluido ratas macho, puesto que clásicamente se ha postulado que el FMS es un síndrome predominante en mujeres. En primer lugar, usamos ratas macho con el objetivo de replicar el estudio original de Nagakura et al. (2009). Se puede argumentar que la ausencia de ratas hembra constituye una limitación de nuestro estudio, sin embargo, como hemos comentado con anterioridad en la introducción, estudios recientes evidencian que, gracias al empleo de los criterios diagnósticos de la ACR, esta prevalencia entre hombres y mujeres no es tan alta como se ha descrito históricamente (Jones et al., 2015). En segundo lugar, y aunque esa prevalencia siga siendo algo mayor en mujeres que en hombres, no hay que olvidar que también hay hombres afectados por este síndrome y los síntomas no difieren del sexo opuesto

(Wolfe et al., 2013). En tercer lugar, con respecto al sexo de los animales, hay que destacar que los estudios de las alteraciones de dolor y estado de ánimo se realizan comúnmente en machos, debido a la influencia que las hormonas sexuales y los ciclos hormonales ejercen sobre estos sistemas en las hembras (Slattery y Cryan, 2014; Fillingim y Ness, 2000). Las evidencias muestran que en los estudios relacionados con el procesamiento del dolor tanto en ratas hembra como en mujeres con o sin FMS, en los cuales se realiza un control de sus ciclos hormonales, los resultados obtenidos resultan controvertidos (Aloisi y Bonifazi, 2006; Okifuji y Turk, 2006). Además, en los estudios sobre test que emplean el fenómeno de hiponeofagia también existe controversia en los resultados obtenidos entre machos y hembras respecto a las diferencias entre ambos grupos (Dulawa y Hen, 2005).

Igualmente, el grupo de Nagakura no encontró diferencias significativas entre ratas macho y hembra en cuanto a la sensibilidad al dolor en su modelo. No obstante, en la metodología no se especificó si a las ratas hembra se les controló el ciclo menstrual, o si se tuvo siquiera en cuenta; por tanto, estas pruebas deberían replicarse prestando atención al ciclo hormonal de las hembras.

Otro punto a tratar es, dados todos los resultados obtenidos y las evidencias encontradas sobre la pregabalina y la duloxetina en el tratamiento tanto de sintomatología depresiva como de sintomatología dolorosa, hay que destacar que una terapia farmacológica para un síndrome tan complejo como es el FMS no debería ser, en ningún caso, basado en un único fármaco (monoterapia), sino que debería incluir las sinergias entre varios fármacos que abarquen una mejora de diferentes síntomas (y que no planteen un acúmulo de efectos adversos por su uso simultáneo). Es esto por lo que cada vez más se plantea y se insiste (y este mismo año el EULAR lo ha implantado como norma) en el uso combinado de duloxetina y pregabalina para el tratamiento del FMS. Actualmente no hay evidencia que apoye el uso de múltiples terapias para FMS, aunque se prescriben estas sinergias de forma común en la práctica clínica. Por ello, es un futuro objetivo de nuestro laboratorio el incluir dos sinergias farmacológicas en nuestros estudios conductuales: Duloxetina y pregabalina, por una parte, y la terapia que parece que está cobrando más importancia por la cantidad de sintomatología comórbida que abarca, tramadol-paracetamol (Angeletti et al., 2013; Marlow et al., 2017; Kia y Choy, 2017; Macfarlane et al., 2017).

Otro posible punto de estudio sobre este modelo sería el análisis de la fatiga y la sintomatología cognitiva, otros de los síntomas comórbidos que más afecta a la calidad de vida de los pacientes con FMS. Una vez comprobada la presencia de estos síntomas en el modelo, podría estudiarse el efecto de la duloxetina y la pregabalina sobre ellos. Los síntomas de fatiga se podrían estudiar mediante el *Rotarod Test* (RRT) o el *Exhaustive Running Test* (ERT) (Stemmelin et al., 2008; Liu et al., 2017). Para el screening de la sintomatología cognitiva se podría usar el Test de la piscina de Morris (*Morris Water Maze Test*) (el cual ya se está utilizando para observar los efectos cognitivos de la privación de sueño) o el *Novel object recognition task* (NORT) (Redrobe et al., 2010; Bromley-Brits et al., 2011; Saygin et al., 2017; Idowu et al., 2017; Canale et al., 2017).

El FMS es una enfermedad con un nivel de prevalencia significativo en nuestro entorno y un considerable grado de afectación de la calidad de vida de quienes la sufren. Asimismo, a día de hoy no sólo no se dispone de un tratamiento eficaz y eficiente, sino que tampoco se dispone de un biomarcador que permita un diagnóstico concluyente de FMS. Es por ello un deber de la comunidad científica hacer un esfuerzo para avanzar tanto en el conocimiento de su etiopatogenia como en perfeccionar un modelo animal sobre el que poder investigar y dar un paso más allá en el tratamiento de este síndrome tan complicado y tan incomprendido.

Disponer de un modelo animal válido capaz de reproducir una enfermedad supone un avance acelerado en la investigación experimental, lo que se traduce en un acercamiento cada vez más rápido de los resultados de la investigación básica a la práctica clínica, aportando material sobre el que trabajar en medicina translacional. En el presente estudio no sólo hemos aportado validez sobre el modelo, sino que hemos detectado cambios importantes en la funcionalidad del SNC y hemos observado los beneficios y déficits del tratamiento farmacológico del FMS a corto y largo plazo, lo que no sólo abre las puertas al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del FMS, sino que además aporta evidencias sólidas acerca de su posible mecanismo etiopatogénico.

06

CONCLUSIONES

1. El tratamiento crónico durante 15 días con duloxetina o pregabalina a una dosis de 30 mg/kg al día aumenta los umbrales de dolor tanto en alodinia táctil como en hiperalgesia mecánica respecto al grupo tratado con vehículo en los animales sometidos al modelo de FMS inducido por reserpina en rata.
2. Una dosis aguda de 30 mg/kg de duloxetina, administrada 24 horas tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina en rata aumenta los umbrales del dolor únicamente sobre la alodinia táctil, mientras que la dosis aguda de pregabalina no produce un aumento significativo de los umbrales de dolor en estas ratas.
3. El tratamiento con duloxetina a dosis de 30 mg/kg, tanto en administración aguda como en tratamiento crónico de 15 días, mejora la sintomatología depresiva de los animales sujetos al modelo de FMS inducido por reserpina en rata.
4. El tratamiento con pregabalina en dosis aguda de 30 mg/kg mejora la sintomatología depresiva de los animales sometidos al modelo de FMS inducido por reserpina. Esta mejora no se observa tras un tratamiento crónico de 15 días con pregabalina a dosis de 30 mg/kg.
5. Los animales sometidos al modelo de FMS inducido por reserpina en rata muestran una elevada activación de los centros noradrenérgicos pontinos A5, A6 (Locus Coeruleus) y A7 a las 6 horas de la implantación del modelo. Esta activación disminuye drásticamente a los 5 y 15 días de haberse administrado la última dosis de reserpina.
6. Las neuronas de A5, LC y A7 que modifican su patrón de activación tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina en rata son aproximadamente en un 90% noradrenérgicas.

7. La evolución de los patrones de activación de los centros noradrenérgicos A5, LC y A7 tras la implantación del modelo de FMS inducido por reserpina en rata no se ve afectada al introducir un estímulo inflamatorio agudo dos horas antes de la perfusión. Tampoco se observan diferencias entre los grupos producidas por la aplicación del dolor inflamatorio.
8. Las neuronas de A5, LC y A7 que modifican su patrón de activación tras la aplicación de un estímulo inflamatorio agudo en las ratas sometidas al modelo de FMS inducido por reserpina en rata son aproximadamente en un 90% noradrenérgicas.
9. La aplicación de un dolor inflamatorio agudo aumenta la activación de las láminas I y II del asta posterior de la médula ipsilateral a la lesión en los animales sometidos al modelo de FMS inducido por reserpina en rata. Esta activación no varía en función del tiempo transcurrido entre la implantación del modelo de FMS y la aplicación del estímulo inflamatorio.

07

BIBLIOGRAFÍA

1. Agüera-Ortiz, L., Failde, I., Mico, J. A., Cervilla, J., & López-Ibor, J. J. (2011). Pain as a symptom of depression: prevalence and clinical correlates in patients attending psychiatric clinics. *Journal of Affective Disorders*, 130(1-2), 106–112. <http://doi.org/10.1016/j.jad.2010.10.022>
2. Aguglia, A., Salvi, V., Maina, G., Rossetto, I., & Aguglia, E. (2011). Fibromyalgia syndrome and depressive symptoms: comorbidity and clinical correlates. *Journal of Affective Disorders*, 128(3), 262–266. <http://doi.org/10.1016/j.jad.2010.07.004>
3. Akiskal, H. S., & McKinney, W. T. (1973). Depressive disorders: toward a unified hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 182(4107), 20–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4199732>
4. Alba-Delgado, C., Llorca-Torralla, M., Horrillo, I., Ortega, J. E., Mico, J. A., Sánchez-Blázquez, P., & Berrocoso, E. (2013). Chronic pain leads to concomitant noradrenergic impairment and mood disorders. *Biological psychiatry*, 73(1), 54-62.
5. Alciati, A., Sgiarovello, P., Atzeni, F., & Sarzi-Puttini, P. (2012). Psychiatric problems in fibromyalgia: clinical and neurobiological links between mood disorders and fibromyalgia. *Reumatismo*, 64(4), 268–274. <http://doi.org/10.4081/reumatismo.2012.268>
6. Almeida, T. F., Roizenblatt, S., & Tufik, S. (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, 1000(1-2), 40–56. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.073>
7. Aloisi, A. M., & Bonifazi, M. (2006). Sex hormones, central nervous system and pain. *Hormones and Behavior*, 50(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.12.002>
8. Amutio A., Franco C., Pérez-Fuentes M. C., Gázquez J. J., & Mercader I. (2015). Mindfulness training for reducing anger, anxiety, and depression in fibromyalgia patients. *Frontiers in Psychology* 5:1572. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.01572>
9. Angeletti, C., Guetti, C., Piroli, A., Angeletti, P.M., Paladini, A., Ciccozzi, A., Marinangeli, F., & Varrassi, G. (2013). Duloxetine and pregabalin for pain management in multiple rheumatic diseases associated with fibromyalgia. *Pain Practice*, 13(8):657-62.

<http://doi.org/10.1111/papr.12009>

10. Annemans, L., Wessely, S., Spaepen, E., Caekelbergh, K., Caubère, J. P., Lay, K. L., & Taïeb, C. (2008). Health economic consequences related to the diagnosis of fibromyalgia syndrome. *Arthritis & Rheumatism*, 58(3), 895–902. <http://doi.org/10.1002/art.23265>
11. Antkiewicz-Michaluk, L., Wąsik, A., Romańska, I., Michaluk, J., & Możdżeń, E. (2014). Antidepressant-like Effect of Tetrahydroisoquinoline Amines in the Animal Model of Depressive Disorder Induced by Repeated Administration of a Low Dose of Reserpine: Behavioral and Neurochemical Studies in the Rat. *Neurotoxicity Research*, 26(1), 85–98. <http://doi.org/10.1007/s12640-013-9454-8>
12. Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., & Schweinhardt, P. (2013). Representation of Pain in the Brain. En: McMahon S.B., Koltzenburg M., Tracey I., Turk D.C. (6ª ed), *Wall and Melzack's textbook of pain*, (111-128). Philadelphia: Elsevier.
13. Argoff, C. Pregabalin is effective in reducing fibromyalgia pain (2017). *Evidence Based Medicine*. 22(2),70-71. <http://doi.org/10.1136/ebmed-2016-110630>
14. Arnold, L. M., Hess, E. V., Hudson, J. I., Welge, J. A., Berno, S. E., & Keck, P. E. (2002). A randomized, placebo-controlled, double-blind, flexible-dose study of fluoxetine in the treatment of women with fibromyalgia. *The American Journal of Medicine*, 112(3), 191–197.
15. Arnold, L. M. (2006). Biology and therapy of fibromyalgia. New therapies in fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*, 8(4), 212. <http://doi.org/10.1186/ar1971>
16. Arnold, L.M., Clauw, D.J., & McCarberg, B.H. (2011). FibroCollaborative. Improving the recognition and diagnosis of fibromyalgia. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(5):457-64. <http://doi.org/10.4065/mcp.2010.0738>
17. Arnold, L.M., Sarzi-Puttini, P., Arsenault, P., Khan, T., Bhadra-Brown, P., Clair, A., Scavone, J.M., Driscoll, J., Landen, J., & Pauer, L. (2015). Efficacy and Safety of Pregabalin in Patients with Fibromyalgia and Comorbid Depression Taking Concurrent Antidepressant Medication: A Randomized, Placebo-controlled Study. *Journal Of*

- Rheumatology*,42(7):1237-44. <http://doi.org/10.3899/jrheum.141196>
18. Arora, V., Kuhad, A., Tiwari, V., & Chopra, K. (2011). Curcumin ameliorates reserpine-induced pain-depression dyad: behavioural, biochemical, neurochemical and molecular evidences. *Psychoneuroendocrinology*, 36(10), 1570–1581. <http://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.04.012>
19. Aşçı, S., Demirci, S., Aşçı, H., Doğuç, D.K., & Onaran, İ. (2016). Neuroprotective Effects of Pregabalin on Cerebral Ischemia and Reperfusion. *Balkan Medical Journal*, 33(2):221-7. <http://doi.org/10.5152/balkanmedj.2015.15742>
20. Astin, J. A., Berman, B. M., Bausell, B., Lee, W.L., Hochberg, M., & Forys, K. L. (2003). The efficacy of mindfulness meditation plus Qigong movement therapy in the treatment of fibromyalgia: a randomized controlled trial. *The Journal of Rheumatology*, 30(10), 2257–2262.
21. Baek, S.H., Seok, H.Y., Koo, Y.S., & Kim, B.J. (2016). Lengthened Cutaneous Silent Period in Fibromyalgia Suggesting Central Sensitization as a Pathogenesis. *PLoS One*, 12;11(2) <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0149248>
22. Basbaum, A.I., Jessell, T.M. (2013) Pain. En: Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A. J. (5ª ed). *Principles of neural science*. (530-555). New York: McGraw-Hill.
23. Bauer, C. S., Nieto-Rostro, M., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Ferron, L., Douglas, L., & Dickenson, A. H. (2009). The increased trafficking of the calcium channel subunit $\alpha 2\delta$ -1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the $\alpha 2\delta$ ligand pregabalin. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 4076-4088.
24. Bauer, C.S., Rahman, W., Tran-van-Minh, A., Lujan, R., Dickenson, A.H., & Dolphin, A.C. (2012). The anti-allodynic alpha(2)delta ligand pregabalin inhibits the trafficking of the calcium channel alpha(2)delta-1 subunit to presynaptic terminals in vivo. *Biochemical Society Transactions*,38(2):525-8. <http://doi.org/10.1042/BST0380525>

25. Beam, W., George, M., Reeves, S. T., Short, B., & Borckardt, J. J. (2009). Non-invasive brain stimulation approaches to fibromyalgia pain, 2(3)(1), 259–276.
26. Becker, S., & Schweinhardt, P. (2012). Dysfunctional neurotransmitter systems in fibromyalgia, their role in central stress circuitry and pharmacological actions on these systems. *Pain Research and Treatment*, 2012(9), 741746–10. <http://doi.org/10.1155/2012/741746>
27. Bellato, E., Marini, E., Castoldi, F., Barbasetti, N., Mattei, L., Bonasia, D. E., & Blonna, D. (2012). Fibromyalgia syndrome: etiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Pain Research and Treatment*, 2012(6), 426130–17. <http://doi.org/10.1155/2012/426130>
28. Belzung, C., & Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of Mood & Anxiety Disorders*, 1(1), 9. <http://doi.org/10.1186/2045-5380-1-9>
29. Benarroch, E. E. (2017). Locus coeruleus. *Cell and Tissue Research*, 1-12.
30. Bennett, G.J., Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33, 87–107.
31. Bennett, R. M., Jones, J., Turk, D. C., Russell, I. J., & Matallana, L. (2007). An internet survey of 2,596 people with fibromyalgia. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 8, 27. <http://doi.org/10.1186/1471-2474-8-27>
32. Benson, C., Mifflin, K., Kerr, B., Jesudasan, S.J., Dursun, S., & Baker, G. (2015). Biogenic Amines and the Amino Acids GABA and Glutamate: Relationships with Pain and Depression. *Modern Trends in Pharmacopsychiatry*, 30:67-79. <http://doi.org/10.1159/000435933>
33. Bernik, M., Sampaio, T. P. A., & Gandarela, L. (2013). Fibromyalgia comorbid with anxiety disorders and depression: combined medical and psychological treatment. *Current Pain and Headache Reports*, 17(9), 358–9. <http://doi.org/10.1007/s11916-013-0358-3>
34. Berridge, C. W., & Waterhouse, B. D. (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Research*.

- Brain Research Reviews*, 42(1), 33–84. [http://doi.org/10.1016/S0165-0173\(03\)00143-7](http://doi.org/10.1016/S0165-0173(03)00143-7)
35. Bjersing, J. L., Larsson, A., Palstam, A., Ernberg, M., Bileviciute-Ljungar, I., Löfgren, M., & Mannerkorpi, K. (2017). Benefits of resistance exercise in lean women with fibromyalgia: involvement of IGF-1 and leptin. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 18, 106. <http://doi.org/10.1186/s12891-017-1477-5>
36. Blasco-Serra, A., Escrihuela-Vidal, F., González-Soler, E. M., Martínez-Expósito, F., Blasco-Ausina, M. C., Martínez-Bellver, S., et al. (2015). Depressive-like symptoms in a reserpine-induced model of fibromyalgia in rats. *Physiology & Behavior*, 151(C), 456–462. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.07.033>
37. Blasco-Serra, A., González-Soler, E.M., Cervera-Ferri, A., Teruel-Martí, V., Valverde-Navarro, A.A. (2017). A standardization of the Novelty-Suppressed Feeding Test protocol in rats. *Neuroscience Letters*, 10;658:73-78. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.019>
38. Boomershine, C. S., Ormseth, M. J., Eyler, A. E., & Hammonds, C. L. (2010). Milnacipran for the management of fibromyalgia syndrome., 3, 15–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3004654&tool=pmcentrez&endertype=abstract>
39. Bouret, S., & Sara, S. J. (2005). Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function. *Trends in Neurosciences*, 28(11), 574–582. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2005.09.002>
40. Bourne, S., Machado, A.G., & Nagel, S.J. (2014). Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurgery Clinics of North America*, 25(4):629-38. <http://doi.org/10.1016/j.nec.2014.06.001>
41. Branco, J. C., Spaeth, M., Bannwarth, B., Failde, I., Carbonell, J. A., Abello Carbonell, J., et al. (2010). Prevalence of Fibromyalgia: A Survey in Five European Countries. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 39(6), 448–453. <http://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.12.003>
42. Brightwell, J.J., & Taylor, B.K. (2009). Noradrenergic neurons in the locus coeruleus contribute to neuropathic pain. *Neuroscience*, 160:174–185.

43. Bromley-Brits, K., Deng, Y., & Song, W. (2011). Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (53): 2920. <http://doi.org/10.3791/2920>
44. Burke, J. P., Sanchez, R. J., Joshi, A. V., Cappelleri, J. C., Kulakodlu, M., & Halpern, R. (2012). Health care costs in patients with fibromyalgia on pregabalin vs. duloxetine. *Pain Practice: the Official Journal of World Institute of Pain*, 12(1), 14–22. <http://doi.org/10.1111/j.15332500.2011.00470.x>
45. Buskila, D., & Sarzi-Puttini, P. (2006). Biology and therapy of fibromyalgia. Genetic aspects of fibromyalgia syndrome. *Arthritis Research & Therapy*, 8(5), 218. <http://doi.org/10.1186/ar2005>
46. Buskila, D., & Cohen, H. (2007). Comorbidity of fibromyalgia and psychiatric disorders. *Current Pain and Headache Reports*, 11(5), 333–338.
47. Buskila, D. (2009). Developments in the scientific and clinical understanding of fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*, 11(5), 242. <http://doi.org/10.1186/ar2720>
48. Butler, R. K., & Finn, D. P. (2009). Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology*, 88(3), 184–202. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.003>
49. Bymaster, F.P., Dreshfield-Ahmad, L.J., Threlkeld, P.G., Shaw, J.L., Thompson, L., Nelson, D.L., Hemrick-Luecke, S.K., Wong, D.T. (2001). Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors. *Neuropsychopharmacology*, 25(6):871-80.
50. Byrum, C. E., Stornetta, R., & Guyenet, P. G. (1984): Electrophysiological properties of spinally-projecting A5 noradrenergic neurons. *Brain Research*, 303: 15–29 [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90206-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(84)90206-3)
51. Calandre, E.P., Rico-Villademoros, F., & Slim, M. (2015). An update on pharmacotherapy for the treatment of fibromyalgia. *Expert Opinions Pharmacotherapy*, 16(9):1347-68.

<http://doi.org/10.1517/14656566.2015.1047343>

52. Calandre, E.P., Rico-Villademoros, F., & Slim, M. (2017). Pharmacological treatment of fibromyalgia: is the glass half empty or half full?. *Pain Management*, 7(1):5-10.
53. Canale, V., Partyka, A., Kurczab, R., Krawczyk, M., Kos, T., Satała, G., Kubica, B., Jastrzębska-Więsek, M., Wesolowska, A., Bojarski, A.J., Popik, P., & Zajdel, P. (2017). Novel 5-HT(7)R antagonists, arylsulfonamide derivatives of (aryloxy)propyl piperidines: Add-on effect to the antidepressant activity of SSRI and DRI, and pro-cognitive profile. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15;25(10):2789-2799. <http://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.057>
54. Carmona, L., Ballina, J., Gabriel, R., Laffon, A., EPISER Study Group. (2001). The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 60(11), 1040–1045. <http://doi.org/10.1136/ard.60.11.1040>
55. Casanueva, B., Belenguer, R., Moreno-Muelas, J.V., Urtiaga, J., Urtiaga, B., Hernández, J.L., Pina, T., & González-Gay, M.A. (2016). Validation of the Spanish version of the fibromyalgia rapid screening tool to detect fibromyalgia in primary care health centres. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 34(2 Suppl 96):S125-8.
56. Casanueva, B., García-Fructuoso, F., Belenguer, R., Alegre, C., Moreno-Muelas, J.V., Hernández, J.L., Pina, T., & González-Gay, M.Á. (2016). The Spanish version of the 2010 American College of Rheumatology Preliminary Diagnostic Criteria for fibromyalgia: reliability and validity assessment. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 34(2 Suppl 96):S55-8.
57. Castelli, L., Tesio, V. (2016). Commentary: Mindfulness training for reducing anger, anxiety, and depression in fibromyalgia patients. *Frontiers in Psychology*, 19;7:740. <http://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00740>
58. Castro-Sánchez, A. M., García-López, H., Matarán-Peñarrocha, G. A., Fernández-Sánchez, M., Fernández-Sola, C., Granero-Molina, J., & Aguilar-Ferrándiz, M. E. (2017). Effects of Dry Needling on Spinal Mobility and Trigger Points in Patients with Fibromyalgia Syndrome. *Pain Physician*, 20, 37-52.

59. Chinn, S., Caldwell, W., & Gritsenko, K. (2016). Fibromyalgia Pathogenesis and Treatment Options Update. *Current Pain and Headache Reports*, 20(4), 25–10. <http://doi.org/10.1007/s11916016-0556-x>
60. Chaitow, L. (2003). *Fibromyalgia Syndrome*. University of Westminster, London, UK. Churchill Livingstone/Elsevier.
61. Chaitow, L. (2010) *Fibromyalgia syndrome. A practitioner guide to treatment*. Edinburgh, Churchill Livingstone; 3rd ed: 1-21
62. Chan, S.Y., Tang, L.C. (1984). Effect of reserpine on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Contraception*, 30(4):363-9.
63. Cipriani, A., Koesters, M., Furukawa, T.A., Nosè, M., Purgato, M., Omori, I.M., Trespidi, C., & Barbui, C. (2012). Duloxetine versus other anti-depressive agents for depression. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 7(10):CD006533. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD006533.pub>
64. Clark, S., Tindall, E., Bennett, R.M. (1985). A double blind crossover trial of prednisone versus placebo in the treatment of fibrositis. *Journal Of Rheumatology*, 12:980-83.
65. Clark, F. M., Proudfit, H. K. (1991): The projection of noradrenergic neurons in the A7 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat demonstrated by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Research*, 547, 279–288 [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90972-X](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(91)90972-X)
66. Clark, F. M., Proudfit, H. K. (1993): The projections of noradrenergic neurons in the A5 catecholamine cell group to the spinal cord in the rat: anatomical evidence that A5 neurons modulate nociception. *Brain Research*, 616, 200–210 [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90210-E](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)90210-E)
67. Clauw, D. J., Arnold, L. M., McCarberg, B. H., FibroCollaborative. (2011). The science of fibromyalgia. *Mayo Clinic Proceedings*, 86(9), 907–911.

<http://doi.org/10.4065/mcp.2011.0206>

68. Clauw, D.J. (2014) Fibromyalgia: a clinical review. *JAMA*, 311(15):1547-55.
<http://doi.org/10.1001/jama.2014.3266>
69. Collado, A., Alijotas, J., Benito, P., Alegre, C., Romera, M., Sañudo, I., et al. (2002). Documento de consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la fibromialgia en Cataluña. *Medicina Clínica*, 118(19), 745–749. [http://doi.org/10.1016/S0025-7753\(02\)72517-7](http://doi.org/10.1016/S0025-7753(02)72517-7)
70. Consoli, G., Marazziti, D., Ciapparelli, A., Bazzichi, L., Massimetti, G., Giacomelli, C., et al. (2012). The impact of mood, anxiety, and sleep disorders on fibromyalgia. *Comprehensive Psychiatry*, 53(7), 962–967. <http://doi.org/10.1016/j.comppsy.2012.03.008>
71. Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, H.R. (2003). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, Oxford.
72. Cordero, M. D., Alcocer-Gómez, E., Cano-García, F. J., de Miguel, M., Sánchez-Alcázar, J. A., & Moreno Fernández, A. M. (2010). Bajos valores de serotonina en suero se correlacionan con la gravedad de los síntomas de la fibromialgia. *Medicina Clínica*, 135(14), 644–646.
<http://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.05.009>
73. Costa ID, Gamundí A, Miranda JG, França LG, De Santana CN, & Montoya P. (2017). Altered Functional Performance in Patients with Fibromyalgia. *Frontiers in Human Neuroscience*, 26;11:14. <http://doi.org/10.3389/fnhum.2017.00014>
74. Crofford, L.J., Rowbotham, M.C., Mease, P.J., Russell, I.J., Dworkin, R.H., Corbin, A.E., Young, J.P., Jr., LaMoreaux, L.K., Martin, S.A., & Sharma, U. (2005). Pregabalin for the treatment of fibromyalgia syndrome: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatology*, 52, 1264–1273.
75. Crossman, A. R., & Neary, D. (2014). *Neuroanatomy: an illustrated colour text*. Elsevier Health Sciences.

76. Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238–245. [http://doi.org/10.1016/S0165-6147\(02\)02017-5](http://doi.org/10.1016/S0165-6147(02)02017-5)
77. Cryan, J.F, Slattery, D.A. (2007). Animal models of mood disorders: Recent developments. *Current Opinion in Psychiatry*, 20(1):1-7.
78. Cryan, J. F., & Sweeney, F. F. (2011). The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1129–1161. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01362.x>
79. Cuatrecasas, G., Alegre, C., Fernandez-Solà, J., Gonzalez, M.J., Garcia-Fructuoso, F., Poca-Dias, V., Nadal, A., Cuatrecasas, G., Navarro, F., Mera, A., Lage, M., Peinó, R., Casanueva, F., Liñan, C., Sesmilo, G., Coves, M.J., Izquierdo, J.P., Alvarez, I., Granados, E., & Puig-Domingo, M. (2012). Growth hormone treatment for sustained pain reduction and improvement in quality of life in severe fibromyalgia. *Pain*, 16:1382–1389. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2012.02.012>
80. Cuatrecasas, G., Gonzalez, M.J., Alegre, C., Sesmilo, G., Fernandez-Solà, J., Casanueva, F.F., Garcia-Fructuoso, F., Poca-Dias, V., Izquierdo, J.P., & Puig-Domingo, M. High prevalence of growth hormone deficiency in severe fibromyalgia syndromes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 10(16):4331–4337. <http://doi.org/10.1210/jc.2010-0061>
81. Cunha, T. M., Verri, W. A., Vivancos, G. G., Moreira, I. F., Reis, S., Parada, C. A., et al. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(3), 401–407. <http://doi.org/10.1590/S0100-879X2004000300018>
82. Darbà, J., Kaskens, L., Pérez, C., Álvarez, E., Navarro-Artieda, R., Sicras-Mainar, A. (2014). Pharmacoeconomic outcomes for pregabalin: a systematic review in neuropathic pain, generalized anxiety disorder, and epilepsy from a Spanish perspective. *Advances in Therapy*, 31(1):1-29. <http://doi.org/10.1007/s12325-013-0088-2>
83. Darwin, C. (1993). *Autobiografía*. Madrid, Alianza, S. A.

84. David D.J., Samuels B.A., Rainer Q., Wang J.W., Marsteller D., Mendez I., Drew M., Craig D.A., Guiard B.P., Guilloux J.P., Artymyshyn R.P., Gardier A.M., Gerald C., Antonijevic I.A., Leonardo E.D., Hen R. (2009). Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression. *Neuron*, 62 479–493. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.017>
85. Delgado, P. L., Moreno, F. A. (2000). Role of norepinephrine in depression. *The Journal of clinical psychiatry*, 61, 5-12.
86. DeSantana, J. M., da Cruz, K. M. L., & Sluka, K. A. (2013). Animal models of fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*, 15(6), 222. <http://doi.org/10.1186/ar4402>
87. De Souza Ramiro, F., Ramiro, F. de S., Júnior, I. L., da Silva, R. C. B., Silva, R. C. B. D., Montesano, F. T., et al. (2014). Investigation of stress, anxiety and depression in women with fibromyalgia: A comparative study. *Revista Brasileira De Reumatologia (English Edition)*, 54(1), 27–32. <http://doi.org/10.1016/j.rbre.2014.02.003>
88. Delgado, P.L. (2004). Common pathways of depression and pain. *Journal of Clinical Psychiatry*, 65(suppl 12):16–19.
89. Derry, S., Cording, M., Wiffen, P.J., Law, S., Phillips, T., Moore, R.A. (2016). Pregabalin for pain in fibromyalgia in adults. *Cochrane Database Systematic Reviews* 29(9).
90. Di Giovanni, G., Svob Strac, D., Sole, M., Unzeta, M., Tipton, K.F., Mück-Šeler, D., Bolea, I., Della Corte, L., Nikolac Perkovic, M., Pivac, N., Smolders, I.J., Stasiak, A., Fogel, W.A., & De Deurwaerdère, P. (2016). Monoaminergic and Histaminergic Strategies and Treatments in Brain Diseases. *Frontiers in Neuroscience*, 24(10):541.
91. Dommerholt, J. (2011). Dry needling — peripheral and central considerations. *The Journal of Manual & Manipulative Therapy*, 19(4), 223–227. <http://doi.org/10.1179/106698111X13129729552065>
92. Dooley, D.J., Donovan, C.M., & Pugsley, T.A. (2000). Stimulus-dependent modulation of [3 H]norepinephrine release from rat neocortical slices by gabapentin and pregabalin. *Journal*

- of *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295:1086–93.
93. Dostrovsky, J.O., Craig, A.D. (2013). Ascending projection systems. En: McMahon S.B., Koltzenburg M., Tracey I., Turk D.C., editors (6ª ed). *Wall and Melzack's textbook of pain*. Philadelphia: Elsevier (182-197).
94. Dulawa, S. C., Hen, R., & Hen, R. (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 771–783. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.017>
95. Ehrlich, G.E. (2003). Pain is real; fibromyalgia isn't. *The Journal Of Rheumatology*, 30(8):1666-7.
96. Ehrlich, G.E. (2003). Fibromyalgia, a virtual disease. *Clinical Rheumatology*, 22(1):8-11.
97. Eisenhofer, G., Kopin, I.J., Goldstein, D.S. (2004). Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*, 56: 331–349.
98. Elhwuegi, A. S. (2004). Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 28(3): 435–451. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2003.11.018>
99. Elvin, A., Siösteen, A.-K., Nilsson, A., & Kosek, E. (2006). Decreased muscle blood flow in fibromyalgia patients during standardised muscle exercise: a contrast media enhanced colour Doppler study. *European Journal of Pain*, 10(2): 137–144. <http://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.02.001>
100. Escobar, W., Ramirez, K., Avila, C., Limongi, R., Vanegas, H., & Vazquez, E. (2012). Metamizol, a non-opioid analgesic, acts via endocannabinoids in the PAG-RVM axis during inflammation in rats. *European Journal of Pain*, 16(5): 676–689. <http://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2011.00057.x>
101. Favero, G., Trapletti, V., Bonomini, F., Stacchiotti, A., Lavazza, A., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2017). Oral Supplementation of Melatonin Protects against Fibromyalgia-

- Related Skeletal Muscle Alterations in Reserpine-Induced Myalgia Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7): 1389. <http://doi.org/10.3390/ijms18071389>
102. Fernandez, E., Koek, W., Ran, Q., Gerhardt, G.A., France, C.P., & Strong, R. (2006). Monoamine metabolism and behavioral responses to ethanol in mitochondrial aldehyde dehydrogenase knockout mice. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 30(10):1650-8
103. Field, T. (2014). Massage Therapy Research Review. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 20(4): 224–229. <http://doi.org/10.1016/j.ctcp.2014.07.002>
104. Field, T. (2016). Massage therapy research review. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 24: 19–31. <http://doi.org/10.1016/j.ctcp.2016.04.005>
105. Fietta, Pierluigi, Fietta, P., & Manganelli, P. (2007). Fibromyalgia and psychiatric disorders. *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis*, 78(2): 88–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17933276>
106. Fillingim, R. B., & Ness, T. J. (2000). Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(4): 485–501. [http://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00017-8](http://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00017-8)
107. Fitzcharles, M. A., Boulos, P. (2003). Inaccuracy in the diagnosis of fibromyalgia syndrome: analysis of referrals. *Rheumatology*, 42(2), 263–267. <http://doi.org/10.1093/rheumatology/keg075>
108. Fitzcharles, M.A., Shir, Y., Ablin, J.N., Buskila, D., Amital, H., Henningsen, P., & Häuser, W. (2013). Classification and clinical diagnosis of fibromyalgia syndrome: recommendations of recent evidence-based interdisciplinary guidelines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 528952. <http://doi.org/10.1155/2013/528952>
109. Fitzcharles, M.A., Rampakakis, E., Ste-Marie, P.A., Sampalis, J.S., & Shir, Y. (2014). The association of socioeconomic status and symptom severity in persons with fibromyalgia. *The Journal of rheumatology*, 41:1398–404.

110. Forte, M. L., Butler, M., Andrade, K. E., Vincent, A., Schousboe, J. T., & Kane, R. L. (2015). Treatments for Fibromyalgia in Adult Subgroups.
111. Fuchs, E. A., & Flugge, G. (2004). Celular consequences of stress and depression. *Dialogs in Clinical Neuroscience*, 6(2): 171–183.
112. Furlong, L.V., Zautra, A., Puente, C.P., López-López, A., & Valero, P.B. (2010). Cognitive-affective assets and vulnerabilities: two factors influencing adaptation to fibromyalgia. *Psychology & Health*, 25(2):197-212. <http://doi.org/10.1080/08870440802074656>
113. Furuta, A., Suzuki, Y., Honda, M., Koike, Y., Naruoka, T., Asano, K., et al. (2012). Time-dependent changes in bladder function and plantar sensitivity in a rat model of fibromyalgia induced by hydrochloric acid injection into the gluteus. *Bju*, 2(109): 306–310. <http://doi.org/doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10258.x>
114. Gardner, E.P., Johnson, K.O. (2013). The somatosensory system: receptors and central pathways. En: Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A. J., editors. (5ª ed). *Principles of neural science*. (475-497). New York: McGraw-Hill
115. Gerardi, M.C., Atzeni, F., Batticciotto, A., Di Franco, M., Rizzi, M., & Sarzi-Puttini, P. (2016). The safety of pregabalin in the treatment of fibromyalgia. *Expert Opinion on Drug Safety*, 11:1-8.
116. Ghini, M., Carpenito, G., & Mascia, M.T. (2016). Effects of a paracetamol and tramadol fixed-dose combination on pain, asthenia, cognitive disorders and sleep quality in fibromyalgia. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 34(2 Suppl 96): 152.
117. Gilron, I., Chaparro, L.E., Tu, D., Holden, R.R., Milev, R., Towheed, T., DuMerton-Shore, D., & Walker, S. (2016). Combination of pregabalin with duloxetine for fibromyalgia: a randomized controlled trial. *Pain*, (7):1532-40. <http://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000558>
118. Giovengo, S. L., Russell, I. J., Larson, A. A. (1999). Increased concentrations of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of patients with fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 26(7): 1564–1569.

119. Gmuca, S., Sherry, D.D. (2017). Fibromyalgia: Treating Pain in the Juvenile Patient. *Paediatric Drugs*, 23. <http://doi.org/10.1007/s40272-017-0233-5>
120. Giacomelli, C., Sernissi, F., Sarzi-Puttini, P., Di Franco, M., Atzeni, F., Bazzichi, L. Fibromyalgia: a critical digest of the recent literature. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 2013 Nov-Dec;31(6 Suppl 79):S153-7.
121. Goldenberg, D. L. (2004). Fibromyalgia: to diagnose or not. Is that still the question?. *The Journal Of Rheumatology*, 31(4):633-5.
122. Goldenberg, D. L. (2010). Pain/Depression dyad: a key to a better understanding and treatment of functional somatic syndromes. *The American Journal of Medicine*, 123(8): 675–682. <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.01.014>
123. Gota, C. E., Kaouk, S., & Wilke, W. S. (2015). The impact of depressive and bipolar symptoms on socioeconomic status, core symptoms, function and severity of fibromyalgia. *International Journal of Rheumatic Diseases*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/1756-185X.12603>
124. Gracely, R.H, Petzke, F., Wolf, J.M., Clauw, D.J. (2002). Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatology*, 46(5):1333-43.
125. Green, P. G., Alvarez, P., Gear, R. W., Mendoza, D., & Levine, J. D. (2011). Further validation of a model of fibromyalgia syndrome in the rat. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, 12(7): 811–818. <http://doi.org/10.1016/j.jpain.2011.01.006>
126. Green, A. R., Gabrielsson, J., & Fone, K. (2012). Translational neuropharmacology and the appropriate and effective use of animal models. *British Journal of Pharmacology*, 164(4): 1041–1043. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01361.x>
127. Grossman, P., Tiefenthaler-Gilmer, U., Raysz, A., & Kesper, U. (2007). Mindfulness training as an intervention for fibromyalgia: evidence of postintervention and 3-year follow-up benefits in well-being. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 76(4): 226–233.

<http://doi.org/10.1159/000101501>

128. Grouleff, J., Ladefoged, L.K., Koldsø, H., & Schiøtt, B. (2015). Monoamine transporters: Insights from molecular dynamics simulations. *Frontiers in Pharmacology*, 16;(6):235. <http://doi.org/10.3389/fphar.2015.00235>
129. Grunze, H. C. R. (2008). The effectiveness of anticonvulsants in psychiatric disorders. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 10(1): 77–89.
130. Hale, M. W., Lowry, C. A. (2011). Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology*, 213(2-3): 243-264.
131. Hamon, M., & Blier, P. (2013). Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45: 54–63. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.009>
132. Haines, D. E. (2013). Principios de neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas. Barcelona: Elsevier España.
133. Hanff, T. C., Furst, S. J., & Minor, T. R. (2010). Biochemical and anatomical substrates of depression and sickness behavior. *The Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences*, 47(1): 64–71.
134. Harden, R. N., Bruehl, S., Stanton-Hicks, M., & Wilson, P. R. (2007). Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome. *Pain Medicine*, 8(4): 326–331. <http://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2006.00169.x>
135. Harris, R. E., & Clauw, D. J. (2008). Newer treatments for fibromyalgia syndrome. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(6): 1331–1342.
136. Hassett, A. L., & Gevirtz, R. N. (2009). Nonpharmacologic Treatment for Fibromyalgia: Patient Education, Cognitive-Behavioral Therapy, Relaxation Techniques, and Complementary and Alternative Medicine. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 35(2): 393–407. <http://doi.org/10.1016/j.rdc.2009.05.003>

137. Häuser, W.; Bernardy, K.; Üçeyler, N.; & Sommer, C. (2009). Treatment of fibromyalgia syndrome with gabapentin and pregabalin—A meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA*, 145: 69–81.
138. Häuser, W., Petzke, F., Üçeyler, N., & Sommer, C. (2011). Comparative efficacy and acceptability of amitriptyline, duloxetine and milnacipran in fibromyalgia syndrome: a systematic review with meta-analysis. *Rheumatology (Oxford)*, 50(3):532-43. <http://doi.org/10.1093/rheumatology/keq354>
139. Häuser, W., Walitt, B., Fitzcharles, M.A, & Sommer, C. (2014). Review of pharmacological therapies in fibromyalgia syndrome. *Arthritis Research & Therapy*, 16(1):201.
140. Häuser, W., Brähler, E., Wolfe, F., Henningsen, P. (2014). Patient Health Questionnaire 15 as a generic measure of severity in fibromyalgia syndrome: surveys with patients of three different settings. *Journal of Psychosomatic Research*, 76:307-11.
141. Häuser, W., Ablin, J., Perrot, S., Fitzcharles, M.A. (2017). Management of fibromyalgia: practical guides from recent evidence-based guidelines. *Polish Archives of Internal Medicine*, 127(1):47-56. <http://doi.org/10.20452/pamw.3877>
142. Hawley, D.J., Wolfe, F. (1991). Pain, disability, and pain/disability relationships in seven rheumatic disorders: a study of 1,522 patients. *The Journal Of Rheumatology*, 18(10):1552-7.
143. Heinricher, M.M., Tavares, I., Leith, J.L., Lumb, B.M. (2009). Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews*, 60:214–225.
144. Heinricher, M.M., Fields, H.L. Central nervous system mechanisms of pain modulation. En: McMahon S.B., Koltzenburg M., Tracey I., Turk D.C., editores. Wall and Melzack's textbook of pain. 6ª ed. Philadelphia: Elsevier; 2013. p. 129-142.
145. Hench, P.K. (1976). Nonarticular rheumatism. *Arthritis & Rheumatology* 19(6): 1081–1088

146. Hench, P.K., Mitler, M.M. (1986) Fibromyalgia: Review of a common rheumatologic syndrome. *Postgraduate Medical Journal*, 80:47–56.
147. Herdegen, T., Kovary, K., Leah, J., & Bravo, R. (1991). Specific temporal and spatial distribution of JUN, FOS, and KROX-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *The Journal of Comparative Neurology*, 313(1): 178–191. <http://doi.org/10.1002/cne.903130113>
148. Hickey, L., Li, Y., Fyson, S.J., Watson, T.C., Perrins, R., Hewinson, J., Teschemacher, A.G., Furue, H., Lumb, B.M., Pickering, A.E. (2014). Optoactivation of locus ceruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. *The Journal of Neuroscience*, 34:4148–4160.
149. Howorth, P.W., Teschemacher, A.G., Pickering, A.E. (2009). Retrograde adenoviral vector targeting of nociceptive pontospinal noradrenergic neurons in the rat in vivo. *Journal of Comparative Neurology*, 512: 141–157.
150. Hylden, J.L.K., Thomas, D.A., Iadarola, M.J., Nahin, R.L., Dubner, R. (1991). Spinal opioid analgesic effects in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: possible involvement of noradrenergic mechanisms. *European Journal Of Pharmacology*, 194: 135–143
151. Iacono, M. I., Neufeld, E., Akinagbe, E., Bower, K., Wolf, J., Vogiatzis Oikonomidis, I., Angelone, L. M. (2015). MIDA: A Multimodal Imaging-Based Detailed Anatomical model of the Human Head and Neck. *PLoS ONE*, 10(4): e0124126. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0124126>
152. IARC. (1976). Reserpine. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 10:217-29.
153. Idowu, A.J., Olatunji-Bello, I.I., & Olagunju, J.A. (2017). Neuronal Function in Male Sprague Dawley Rats During Normal Ageing. *Nigerian journal of physiological sciences*, 31(2):127-131.
154. Inanici, F., & Yunus, M. B. (2004). History of fibromyalgia: past to present. *Current Pain and Headache Reports*, 8(5): 369–378.

155. Ivanovski, B., & Malhi, G. S. (2007). The psychological and neurophysiological concomitants of mindfulness forms of meditation. *Acta Neuropsychiatrica*, 19(2): 76–91. <http://doi.org/10.1111/j.1601-5215.2007.00175.x>
156. Iyengar, S., Webster, A.A., Hemrick-Luecke, S.K., Xu, J.Y., & Simmons, R.M. (2004). Efficacy of duloxetine, a potent and balanced serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor in persistent pain models in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2):576-84.
157. Jensen, K. B., Kosek, E., Petzke, F., Carville, S., Fransson, P., Marcus, H., et al. (2009). Evidence of dysfunctional pain inhibition in Fibromyalgia reflected in rACC during provoked pain. *Pain*, 144(1), 95–100. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2009.03.018>
158. Jones, G. T., Atzeni, F., Beasley, M., Fließ, E., Sarzi-Puttini, P., & Macfarlane, G. J. (2015). The prevalence of fibromyalgia in the general population: a comparison of the American College of Rheumatology 1990, 2010, and modified 2010 classification criteria. *Arthritis & Rheumatology*, 67(2): 568–575. <http://doi.org/10.1002/art.38905>
159. Kalia, M. (2005). Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism*, 54(5): 24–27. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.01.009>
160. Kaneko, K., Umehara, M., Homan, T., Okamoto, K., Oka, M., & Oyama, T. (2014). The analgesic effect of tramadol in animal models of neuropathic pain and fibromyalgia. *Neuroscience Letters*, 562: 28–33. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.007>
161. Kaushal, R., Taylor, B.K., Jamal, A.B., Zhang, L., Ma, F., Donahue, R., & Westlund, K.N. (2016). GABA-A receptor activity in the noradrenergic locus coeruleus drives trigeminal neuropathic pain in the rat; contribution of NAA1 receptors in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*, 334:148–159.
162. Kawalec, P., Cierniak, A., Pilc, A., & Nowak, G. (2015). Pregabalin for the treatment of social anxiety disorder. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 24(4):585-94. <http://doi.org/10.1517/13543784.2014.979283>

163. Kaygisiz, B., Kilic, F.S., Senguleroglu, N., Baydemir, C., & Erol, K. (2015). The antinociceptive effect and mechanisms of action of pregabalin in mice. *Pharmacological Reports*, 67(1):129-33. <http://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.08.013>
164. Kehl, L. J., Trempe, T. M., & Hargreaves, K. M. (2000). A new animal model for assessing mechanisms and management of muscle hyperalgesia. 85(3), 333–343. <http://doi.org/S0304395999002821>
165. Kia, S., Choy, E. (2017). Update on Treatment Guideline in Fibromyalgia Syndrome with Focus on Pharmacology. *Biomedicines*, 8;5(2). <http://doi.org/10.3390/biomedicines5020020>
166. Kim, S.C., Landon, J.E., & Solomon, D.H. (2013). Clinical characteristics and medication uses among fibromyalgia patients newly prescribed amitriptyline, duloxetine, gabapentin, or pregabalin. *Arthritis Care & Research (Hoboken)*, 65(11):1813-9.
167. Kim, J., Loggia, M.L., Cahalan, C.M., Harris, R.E., Beissner, F., Garcia, R.G., Kim, H., Barbieri, R., Wasan, A.D., Edwards, R.R., & Napadow, V. (2015). The somatosensory link in fibromyalgia: functional connectivity of the primary somatosensory cortex is altered by sustained pain and is associated with clinical/autonomic dysfunction. *Arthritis & Rheumatology*, 67(5):1395-405. <http://doi.org/10.1002/art.39043>
168. Kindler, L. L., Bennett, R. M., & Jones, K. D. (2011). Central sensitivity syndromes: mounting pathophysiologic evidence to link fibromyalgia with other common chronic pain disorders. *Pain Management Nursing: Official Journal of the American Society of Pain Management Nurses*, 12(1): 15–24. <http://doi.org/10.1016/j.pmn.2009.10.003>
169. Kittelberg, K.P., Borsook, D. Bases neurológicas del dolor. (1999). En: Borsook D, LeBel AA, McPeck B, eds. (8-25). Massachusetts General Hospital tratamiento del Dolor Marbán, S.L., Madrid
170. Knight, T., Schaefer, C., Chandran, A., Zlateva, G., Winkelmann, A., Perrot, S. (2013). Health-resource use and costs associated with fibromyalgia in France, Germany, and the United States. *ClinicoEconomics and Outcomes Research*, 23(5):171-80.

<http://doi.org/10.2147/CEOR.S41111>

171. Kravitz, H.M., Katz, R.S. (2015). Fibrofog and fibromyalgia: a narrative review and implications for clinical practice. *Rheumatology International*, 35(7):1115-25.
<http://doi.org/10.1007/s00296-014-3208-7>
172. Kremer, M., Salvat, E., Muller, A., Yalcin, I., Barrot, M. (2016). Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. *Neuroscience*, 3(338):183-206.
<http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.06.057>
173. Kumar, P. (2015). Neurophysiology of Exercise: Current State of Learning. *Advances in Life Science and Medicine*, 1(1): 24–32.
174. Kurien, B.T., Scofield, R.H. (2015). Western blotting of high and low molecular weight proteins using heat. *Methods in Molecular Biology*, 1312:247-55.
http://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7_26
175. Kurtze, N., Gundersen, K.T., Svebak, S. (1999). Quality of life, functional disability and lifestyle among subgroups of fibromyalgia patients: the significance of anxiety and depression. *British Journal of Medical Psychology*, 72 (Pt 4):471-84.
176. Kwon, M., Altin, M., Duenas, H., Alev, L. (2014). The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. *Pain Practice*, 14(7):656-67.
<http://doi.org/10.1111/papr.12145>
177. Lacasse, A., Bourgault, P., & Choinière, M. (2016). Fibromyalgia-related costs and loss of productivity: a substantial societal burden. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17: 168.
<http://doi.org/10.1186/s12891-016-1027-6>.
178. Laske, C., Stransky, E., Eschweiler, G. W., Klein, R., Wittorf, A., Leyhe, T., et al. (2007). Increased BDNF serum concentration in fibromyalgia with or without depression or antidepressants. *Journal of Psychiatric Research*, 41(7): 600–605.
<http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.02.007>

179. Lau, B. K., & Vaughan, C. W. (2014). Descending modulation of pain: the GABA disinhibition hypothesis of analgesia. *Current Opinion in Neurobiology*, 29:159–164. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2014.07.010>
180. Lawson, K. (2016). Potential drug therapies for the treatment of fibromyalgia. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 25(9):1071-81. <http://doi.org/10.1080/13543784.2016.1197906>
181. Le Cudennec, C., Castagné, V. (2014). Face-to-face comparison of the predictive validity of two models of neuropathic pain in the rat: analgesic activity of pregabalin, tramadol and duloxetine. *European Journal of Pharmacology*, 15(735) :17-25. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.04.003>
182. Leão, A. H. F. F., Sarmiento-Silva, A. J., Santos, J. R., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2015). Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 25(4): 377–390. <http://doi.org/10.1111/bpa.12253>
183. LeDoux, J. (1996). *The Emotional Brain: The Mysterious Underpinnings of Emotional Life*. New York: Simon & Schuster.
184. Lee, Y. H., Choi, S. J., Ji, J. D., & Song, G. G. (2012). Candidate gene studies of fibromyalgia: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatology International*, 32(2): 417–426. <http://doi.org/10.1007/s00296-010-1678-9>
185. Lee, K. I., Kim, M. J., Koh, H., Lee, J. I., Namkoong, S., Oh, W. K., & Park, J. (2015). The antihypertensive drug reserpine induces neuronal cell death through inhibition of autophagic flux. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 462(4): 402–408. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.145>
186. Lee, Y.H., Song, G.G. (2016). Comparative efficacy and tolerability of duloxetine, pregabalin, and milnacipran for the treatment of fibromyalgia: a Bayesian network meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatology International*, 36(5):663-72. <http://doi.org/10.1007/s00296-016-3468-5>

187. Legangneux, E., Mora, J. J., Spreux-Varoquaux, O., Thorin, I., Herrou, M., Alvado, G., & Gomeni, C. (2001). Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites, plasma-rich platelet serotonin and imipramine reuptake in the primary fibromyalgia syndrome. *Rheumatology (Oxford, England)*, 40(3): 290–296.
188. Lemke, K. A. (2004). Understanding the pathophysiology of perioperative pain. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(5): 405–413.
189. Li, X., Eisenach, J.C. (2002). Nicotinic acetylcholine receptor regulation of spinal norepinephrine release. *Anesthesiology*, 96: 1450–1456.
190. Li, Y., Wang, F., Feng, C., Yang, X., & Sun, Y. (2014). Massage Therapy for Fibromyalgia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *PLoS ONE*, 9(2): e89304. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0089304>
191. Liedberg, G. M., Björk, M., & Börsbo, B. (2015). Self-reported nonrestorative sleep in fibromyalgia - relationship to impairments of body functions, personal function factors, and quality of life. *Journal of Pain Research*, 8: 499–505. <http://doi.org/10.2147/JPR.S86611>
192. Lindell, L., Bergman, S., Petersson, I. F., Jacobsson, L. T., & Herrström, P. (2000). Prevalence of fibromyalgia and chronic widespread pain. *Scandinavian Journal of Primary Health Care*, 18(3): 149–153.
193. Lin, Y.E., Lin, S.H., Chen, W.C., Ho, C.T., Lai, Y.S., Panyod, S., Sheen, L.Y. (2016). Antidepressant-like effects of water extract of *Gastrodia elata* Blume in rats exposed to unpredictable chronic mild stress via modulation of monoamine regulatory pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 1: 187:57-65. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.032>
194. Lindh, M., Johansson, G., Hedberg, M., Henning, G. B., & Grimby, G. (1995). Muscle fiber characteristics, capillaries and enzymes in patients with fibromyalgia and controls. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 24(1): 34–37.

195. Lindvall, O., Bjorklund, A. (1974) The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, 412:1–48.
196. Liu, Y., Li, L., An, S., Zhang, Y., Feng, S., Zhao, L., Teng, L., Wang, D. Antifatigue Effects of *Antrodia cinnamomea* Cultured Mycelium via Modulation of Oxidative Stress Signaling in a Mouse Model. *Biomedical Research International*, 2017:9374026. <http://doi.org/10.1155/2017/9374026>
197. Llorca-Torralba, M., Borges, G., Neto, F., Mico, J. A., & Berrocoso, E. (2016). Noradrenergic locus coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience*, 338: 93-113.
198. Loeser, J.D., Treede, R.D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 31;137(3):473-7. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>
199. Londhey, V.A. (2015). Pathophysiology of Pain. *Journal of the Association of Physicians of India*, 63(2 Suppl):5-7.
200. Lucki I. (1995). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behavioral Pharmacology*, 8(6-7):523-32.
201. Lunn, M. P. T., Hughes, R. A. C., & Wiffen, P. J. (2014). Duloxetine for treating painful neuropathy, chronic pain or fibromyalgia. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 1, CD007115. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD007115.pub3>
202. Lyon, P., Cohen, M., & Quintner, J. (2011). An evolutionary stress-response hypothesis for chronic widespread pain (fibromyalgia syndrome). *Pain Medicine*, 12(8): 1167–1178. <http://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01168.x>
203. Ma, Q.P., Yin, G.F., Ai, M.K., Han, J.S. (1991). Serotonergic projections from the nucleus raphe dorsalis to the amygdala in the rat. *Neuroscience Letters*, 134 (1): 21-4. [http://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90499-J](http://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90499-J)
204. Macfarlane, G.J., Kronisch, C., Dean, L.E., Atzeni, F., Häuser, W., Fluß, E., Choy, E., Kosek, E., Amris, K., Branco, J., Dincer, F., Leino-Arjas, P., Longley, K., McCarthy, G.M.,

- Makri, S., Perrot, S., Sarzi-Puttini, P., Taylor A., & Jones, G.T. (2017). EULAR revised recommendations for the management of fibromyalgia. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 76(2):318-328. <http://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209724>
205. Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9): 429–434. <http://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
206. Maldonado, M., & Maeyama, K. (2015). The metabolism of histamine in rat hypothalamus and cortex after reserpine treatment. *Neurochemistry International*, 85-86: 31–39. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2015.04.005>
207. Mannerkorpi, K., Landin-Wilhelmsen, K., Larsson, A., Cider, Å., Arodell, O., & Bjersing, J. L. (2017). Acute effects of physical exercise on the serum insulin-like growth factor system in women with fibromyalgia. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 18: 37. <http://doi.org/10.1186/s12891-017-1402-y>
208. Mantyh, P.W. (1983). Connections of midbrain periaqueductalgray in the monkey. II. Descending efferent projections. *Journal of Neurophysiology*, 49:582–594.
209. Marlow, N.M., Simpson, K.N., Vaughn, I.A., Jo, A., Zoller, J.S., & Short, E.B. (2017). Healthcare Costs and Medication Adherence Among Patients with Fibromyalgia: Combination Medication vs. Duloxetine, Milnacipran, Venlafaxine, and Pregabalin Initiators. *Pain Practice*, 18. <http://doi.org/10.1111/papr.12585>
210. Marques-Lopes, J., Pinho, D., Albino-Teixeira, A., Tavares, I. (2010): The hyperalgesic effects induced by the injection of angiotensin II into the caudal ventrolateral medulla are mediated by the pontine A5 noradrenergic cell group. *Brain Research*, 1325: 41–52 <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.043>
211. Marques, A.P., Santo, A.S., Berssaneti, A.A., Matsutani, L.A., & Yuan, S.L. (2016). Prevalence of fibromyalgia: literature review update. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 18. pii: S0482-5004(16)30174-7. <http://doi.org/10.1016/j.rbr.2016.10.004>

212. Martín, J., Torre, F., Padierna, A., Aguirre, U., González, N., Matellanes, B., & Quintana, J. M. (2014). Impact of interdisciplinary treatment on physical and psychosocial parameters in patients with fibromyalgia: results of a randomised trial. *International Journal of Clinical Practice*, 68(5): 618–627. <http://doi.org/10.1111/ijcp.12365>
213. Martínez-Lavín, M., Amigo, M.C., Coindreau, J., Canoso, J. (2000). Fibromyalgia in Frida Kahlo's life and art. *Arthritis & Rheumatology*, 43(3):708-9.
214. Marson, P., Pasero, G. (2008). [Historical evolution of the concept of fibromyalgia: the main stages]. *Reumatismo*,60(4):301-4.
215. Martín, J., Torre, F., Padierna, A., Aguirre, U., González, N., Matellanes, B., & Quintana, J. M. (2014). Impact of interdisciplinary treatment on physical and psychosocial parameters in patients with fibromyalgia: results of a randomised trial. *International Journal of Clinical Practice*, 68(5): 618–627. <http://doi.org/10.1111/ijcp.12365>
216. Massart, R., Mongeau, R., & Lanfumey, L. (2012). Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 5;367(1601):2485-94. <http://doi.org/10.1098/rstb.2012.0212>
217. McClelland, D., Evans, R.M., Barkworth, L., Martin, D.J., & Scott, R.H. (2004). A study comparing the actions of gabapentin and pregabalin on the electrophysiological properties of cultured DRG neurones from neonatal rats. *BMC Pharmacol*, 4(4):14.
218. McIver, K. L., Evans, C., Kraus, R. M., Ispas, L., Sciotti, V. M., & Hickner, R. C. (2006). NO-mediated alterations in skeletal muscle nutritive blood flow and lactate metabolism in fibromyalgia. *Pain*, 120(1-2): 161–169. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2005.10.032>
219. Mease, P.J., Seymour, K. (2008). Fibromyalgia: should the treatment paradigm be monotherapy or combination pharmacotherapy? *Current Pain and Headache Reports*, 12(6):399-405.

220. Meeus, M., & Nijs, J. (2006). Central sensitization: a biopsychosocial explanation for chronic widespread pain in patients with fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Clinical Rheumatology*, 26(4), 465–473. <http://doi.org/10.1007/s10067-006-0433-9>
221. Melzack, R., Wall, P. D. (1965). Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150(3699):971–979. <http://doi.org/10.1126/science.150.3699.971>
222. Melzack, R. (1996). Gate control theory: On the evolution of pain concepts. En: *Pain forum* (128-138). Churchill Livingstone.
223. Menzies, V. (2016). CE: fibromyalgia syndrome: current considerations in symptom management. *The American Journal of Nursing*, 116 (24–32). <http://doi.org/10.1097/01.NAJ.0000476162.13177.ae>
224. Merskey, H., & Bogduk, N. (2012). Classification of chronic pain, IASP Task Force on Taxonomy. Seattle, WA: International Association for the Study of Pain Press (Revised).
225. Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in neurobiology*, 66(6), 355-474.
226. Min, B.W., Kim, Y., Cho, H.M., Park, K.-S., Yoon, P. W., Nho, J.H., Moon, K.-H. (2016). Perioperative Pain Management in Total Hip Arthroplasty: Korean Hip Society Guidelines. *Hip & Pelvis*, 28(1): 15–23. <http://doi.org/10.5371/hp.2016.28.1.15>
227. Minor, T. R., Huang, Q., & Foley, E. A. (2003). Cytokine-purine interactions in behavioral depression in rats. *Integrative Physiological and Behavioral Science: The Official Journal of the Pavlovian Society*, 38(3): 189–202.
228. Minor, T. R., & Hanff, T. C. (2015). Adenosine signaling in reserpine-induced depression in rats. *Behavioural Brain Research*, 286: 184–191. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.032>
229. Mogil, J. S., Davis, K. D., & Derbyshire, S. W. (2010). The necessity of animal models in pain research. *Pain*, 151(1): 12–17. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2010.07.015>

230. Moloney, R. D., O'Mahony, S. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Stress-Induced Visceral Pain: Toward Animal Models of Irritable-Bowel Syndrome and Associated Comorbidities. *Frontiers in Psychiatry*, 6: 15. <http://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00015>
231. Moret, C., & Briley, M. (2006). Antidepressants in the treatment of fibromyalgia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2(4): 537–548. <http://doi.org/10.2147/ndt.2006.2.4.537>
232. Morris, A. (2004). Fibromyalgia--real or imagined? *The Journal Of Rheumatology*, 31(4):827-8.
233. Mravec, B., Bodnar, I., Uhreczky, G., Kvetnansky, R., & Palkovits, M. (2012). Effect of lesions of A5 or A7 noradrenergic cell group or surgical transection of brainstem catecholamine pathways on plasma catecholamine levels in rats injected subcutaneously by formalin. *General physiology and biophysics*, 31(3): 247.
234. Munro, G. (2010). Comment on Biogenic amine depletion as a putative animal model of fibromyalgia [Pain 2009; 146:26-33]. *Pain*, 148(1): 172–3– author reply 173. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2009.10.018>
235. Murai, N., Fushiki, H., Honda, S., Murakami, Y., Iwashita, A., Irie, M., Tamura, S., Nagakura, Y., & Aoki, T. (2015). Relationship between serotonin transporter occupancies and analgesic effects of AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, and duloxetine in reserpine-induced myalgia rats. *Neuroscience*, 19(289)262-9. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.12.065>
236. Naftel, J.P. Vías sensitivas viscerales. (2014). En: Haines D.E., editor. *Principios de Neurociencia. Aplicaciones básicas y clínicas*. (260-266). Barcelona: Elsevier.
237. Nagakura, Y., Oe, T., Aoki, T., & Matsuoka, N. (2009). Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. *Pain*, 146(1-2): 26–33. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2009.05.024>
238. Nakayama, T., Nakamura, W. (1978). Radioprotective effect of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on mammalian cells irradiated in vitro. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine*, 34(1):81-09.

239. Nampiaparampil, D.E., Shmerling, R.H. (2004). A review of fibromyalgia. *American Journal of Managed Care* 10(11 Pt 1):794-800.
240. National Toxicology Program. (2011). Reserpine. *Report on Carcinogens*, 12:370-1.
241. Neeck, G. (2002). Pathogenic mechanisms of fibromyalgia. *Ageing Research Reviews*, 1(2): 243–255.
242. Nestler, E.J; Hyman, S.E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders, *Nature Neuroscience*, 13: 1161–1169. <http://doi.org/10.1038/nn.2647>
243. Nestler, E. J., Barrot, M., DiLeone, R. J., Eisch, A. J., Gold, S. J., & Monteggia, L. M. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, 34(1): 13–25. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00653-0](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00653-0)
244. Nishiyori, M., & Ueda, H. (2008). Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Molecular Pain*, 4: 52. <http://doi.org/10.1186/1744-8069-4-52>
245. Ngian, G. S., Guymer, E. K., & Littlejohn, G. O. (2011). The use of opioids in fibromyalgia. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 14(1): 6–11. <http://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2010.01567.x>
246. Noguchi, R., Sekizawa, Y., So, M., Yamaguchi, S., & Shimizu, E. (2017). Effects of five-minute internet-based cognitive behavioral therapy and simplified emotion-focused mindfulness on depressive symptoms: a randomized controlled trial. *BMC Psychiatry*, 17: 85. <http://doi.org/10.1186/s12888-017-1248-8>
247. Nuseir, K., Proudfit, H. K. (2000): Bidirectional modulation of nociception by GABA neurons in the dorsolateral pontine tegmentum that tonically inhibit spinally projecting noradrenergic A7 neurons. *Neuroscience*, 96: 773–783.
248. O'Brien, E. M., Staud, R. M., Hassinger, A. D., McCulloch, R. C., Craggs, J. G., Atchison, J. W., et al. (2010). Patient-centered perspective on treatment outcomes in chronic pain. *Pain Medicine*, 11(1): 6–15. <http://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2009.00685.x>

249. Oe, T., Tsukamoto, M., & Nagakura, Y. (2010). Reserpine causes biphasic nociceptive sensitivity alteration in conjunction with brain biogenic amine tones in rats. *Neuroscience*, 169(4): 1860–1871. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.06.061>
250. Ohayon, M. M. (2009). Pain sensitivity, depression, and sleep deprivation: links with serotonergic dysfunction. *Journal of Psychiatric Research*, 43(16): 1243–1245. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2009.10.007>
251. Ogino, S., Nagakura, Y., Tsukamoto, M., Watabiki, T., Ozawa, T., Oe, T., et al. (2013). Systemic administration of 5-HT(2C) receptor agonists attenuates muscular hyperalgesia in reserpine-induced myalgia model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 108: 8–15. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.04.007>
252. Okifuji, A., & Turk, D. C. (2006). Sex hormones and pain in regularly menstruating women with fibromyalgia syndrome. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, 7(11): 851–859. <http://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.04.005>
253. Omote, K., Kawamata, T., Kawamata, M., Namiki, A. (1998): Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. *Brain Research*, 814: 194–198 [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)01086-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01086-5)
254. Osorio, M. V., Frutos, J. P. (1995). Bases anatómicas del dolor. *Clínicas Urológicas de la Complutense*, (4): 13.
255. Ossipov, M. H., Dussor, G. O., & Porreca, F. (2010). Central modulation of pain. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(11): 3779–3787. <http://doi.org/10.1172/JCI43766>
256. Pae, C.U., Luyten, P., Marks, D. M., Han, C., Park, S.H., Patkar, A. A., et al. (2008). The relationship between fibromyalgia and major depressive disorder: a comprehensive review. *Current Medical Research and Opinion*, 24(8): 2359–2371. <http://doi.org/10.1185/03007990802288338>

257. Pagano, T., Matsutani, L.A., Ferreira, E.A., Marques, A.P., & Pereira, C.A. (2004). Assessment of anxiety and quality of life in fibromyalgia patients. *Sao Paulo Medical Journal*, 4;122(6):252-8.
258. Palmer, R. H., Palmer, R. H., Periclou, A., Periclou, A., Banerjee, P., & Banerjee, P. (2010). Milnacipran: a selective serotonin and norepinephrine dual reuptake inhibitor for the management of fibromyalgia. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2(4): 201–220. <http://doi.org/10.1177/1759720X10372551>
259. Patkar, A.A., Masand, P.S., Krulewicz, S. (2007). A randomized, controlled, trial of controlled release paroxetine in fibromyalgia. *The American Journal of Medicine*, 120(5):448–454.
260. Parent, A. J., Beaudet, N., Daigle, K., Sabbagh, R., Sansoucy, Y., Marchand, S., et al. (2015). Relationship between blood- and cerebrospinal fluid-bound neurotransmitter concentrations and conditioned pain modulation in pain-free and chronic pain subjects. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, 16(5): 436–444. <http://doi.org/10.1016/j.jpain.2015.01.007>
261. Parker, L., Huelin, R., Khankhel, Z., Wasiak, R., Mould, J. (2015). A systematic review of pharmacoeconomic studies for pregabalin. *Pain Practice*, 15(1):82-94. <http://doi.org/10.1111/papr.12193>
262. Paxinos, G.; Watson, C. (201). Paxinos and Watson's The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (7th Ed), Academic Press, San Diego
263. Pereira, A., Jr. (2013). Triple-Aspect Monism: A Framework for the Science of Human Consciousness. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
264. Pérez-Cajaraville, J., Gil-Aldea, I. (2006). Nuevas perspectivas en el tratamiento del dolor neuropático: Duloxetina. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 6: 421-427.
265. Pertovaara, A. (2006). Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology*, 80(2): 53–83. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.08.001>

266. Pertovaara, A. (2013). The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *European Journal of Pharmacology*, 716(1-3): 2–7. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.01.067>
267. Petersel, D. L., Dror, V., & Cheung, R. (2011). Central amplification and fibromyalgia: disorder of pain processing. *Journal of Neuroscience Research*, 9(1): 29–34. <http://doi.org/10.1002/jnr.22512>
268. Phillips, K., & Clauw, D. J. (2011). Central pain mechanisms in chronic pain states – Maybe it is all in their head. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 25(2): 141–154. <http://doi.org/10.1016/j.berh.2011.02.005>
269. Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 21;266(5604):730-2.
270. Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, 15;47(4):379-91.
271. Praisman, S. (2008). Mindfulness-based stress reduction: A literature review and clinician's guide. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 20(4): 212–216. <http://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2008.00306.x>
272. Pró, E. A. (2012). *Anatomía clínica*. Médica Panamericana.
273. Puebla, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico. *Oncología*, 28(3): 33- 37.
274. Queiroz, L.P. (2013) Worldwide epidemiology of fibromyalgia. *Current Pain and Headache Reports*, 17: 356.
275. Radden, J. (2003). "Is This Dame Melancholy? Equating Today's Depression and Past Melancholia." *Philosophy, Psychiatry, & Psychology*, 1 (10): 37-52. Project MUSE, <http://doi.org/10.1353/ppp.2003.0081>

276. Rao S.G., Bennett R.M. (2003). Pharmacological therapies in fibromyalgia. *Best Pract Res Clinical Rheumatology*, 17(4):611-27.
277. Reddy, M.S. (2010). Depression: the disorder and the burden. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 32(1):1-2. <http://doi.org/10.4103/0253-7176.70510>
278. Redrobe, J.P., Bull, S., Plath, N. (2010). Translational aspects of the novel object recognition task in rats abstinent following sub-chronic treatment with phencyclidine (PCP): effects of modafinil and relevance to cognitive deficits in schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 1:146.
279. Ren, K., Dubner, R. (2002). Descending modulation in persistent pain: an update. *Pain*, 100(1-2): 1-6.
280. Ringkamp, M., Raja, S.N., Campbell, J.N., Meyer, R.A. (2013). Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. En: McMahon S.B., Koltzenburg M., Tracey I., Turk D.C., *Wall and Melzack's textbook of pain*. (1-30) 6ª ed. Philadelphia: Elsevier.
281. Rivera, J., Rejas, J., Esteve-Vives, J., & Vallejo, M. A., Grupo ICAF. (2009). Resource utilisation and health care costs in patients diagnosed with fibromyalgia in Spain. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 27(5 Suppl 56): S39–45.
282. Rodríguez-Gaztelumendi, A., Rojo, M.L., Pazos, A., Díaz, A. (2014). An altered spinal serotonergic system contributes to increased thermal nociception in an animal model of depression. *Experimental Brain Research*, 232(6):1793-803. <http://doi.org/10.1007/s00221-014-3871-7>
283. Romera, E., Perena, M. J., Perena, M. F., & Rodrigo, M. D. (2000). Neurofisiología del dolor. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 7(Supl II): 11-17.
284. Romeyke, T., Scheuer, H. C., & Stummer, H. (2015). Fibromyalgia with severe forms of progression in a multidisciplinary therapy setting with emphasis on hyperthermia therapy – a prospective controlled study. *Clinical Interventions in Aging*, 10: 69–79. <http://doi.org/10.2147/CIA.S74949>

285. Roskell, N.S., Beard, S.M., Zhao, Y., Le, T.K. (2011). A meta-analysis of pain response in the treatment of fibromyalgia. *Pain Practice*, 11(6):516-27. <http://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2010.00441.x>
286. Rosenzweig, S., Greeson, J. M., Reibel, D. K., Green, J. S., Jasser, S. A., & Beasley, D. (2010). Mindfulness-based stress reduction for chronic pain conditions: variation in treatment outcomes and role of home meditation practice. *Journal of Psychosomatic Research*, 68(1): 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychores.2009.03.010>
287. Russell, I. J., Vaeroy, H., Javors, M., & Nyberg, F. (1992). Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 35(5): 550–556.
288. Russell, I. J., Kamin, M., Bennett, R. M., Schnitzer, T. J., Green, J. A., & Katz, W. A. (2000). Efficacy of tramadol in treatment of pain in fibromyalgia. *Journal of Clinical Rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases*, 6(5): 250–257.
289. Russell, I.J. (2008). Efficacy and safety of duloxetine for treatment of fibromyalgia in patients with or without major depressive disorder: Results from a 6-month, randomized, double-blind, placebo-controlled, fixed-dose trial. *Pain*, 136(3):432–444.
290. Russell, I.J., Crofford, L.J., Leon, T. (2009). The effects of pregabalin on sleep disturbance symptoms among individuals with fibromyalgia syndrome. *Sleep Medicine*, 10: 604–610
291. Russell, I.J. (2013). Fibromyalgia syndrome and myofascial pain syndrome. En: McMahon S.B., Koltzenburg M., Tracey I., Turk D.C., editores. (6ª Ed.) *Wall and Melzack's textbook of pain*. (658-682). Philadelphia: Elsevier.
292. Salazar, A.P., Stein, C., Marchese, R.R., Plentz, R.D., Pagnussat, A.S. (2017). Electric Stimulation for Pain Relief in Patients with Fibromyalgia: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *Pain Physician*, 20(2):15-25.

293. Salemi, S., Rethage, J., Wollina, U., Michel, B. A., Gay, R. E., Gay, S., & Sprott, H. (2003). Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 30(1): 146–150.
294. Samuels, E. R., Szabadi, E. (2008). Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part II: physiological and pharmacological manipulations and pathological alterations of locus coeruleus activity in humans. *Current Neuropharmacology*, 6(3): 254–285. <http://doi.org/10.2174/157015908785777193>
295. Sandkühler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiology Reviews*, 89(2):707-58. <http://doi.org/10.1152/physrev.00025.2008>
296. Santos-Nogueira, E., Redondo Castro, E., Mancuso, R., & Navarro, X. (2012). Randall-Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, 29(5): 898–904. <http://doi.org/10.1089/neu.2010.1700>
297. Sañudo, B., Galiano, D., Carrasco, L., de Hoyo, M. (2010). Evidencias para la prescripción de ejercicio físico en pacientes con fibromyalgia. *Medicina del deporte*, 3(4): 159-169.
298. Sarzi-Puttini, P., Gerardi, M. C., Batticciotto, A., Talotta, R., Di Franco, M., Atzeni, F. (2016): Novel Pharmaceutical Options for Treating Fibromyalgia. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(4): 559-565. <http://doi.org/10.1586/17512433.2016.1145052>
299. Saygin, M., Ozguner, M.F., Onder, O., Doguc, D.K., Ilhan, I., Peker, Y. (2017). The impact of sleep deprivation on hippocampal-mediated learning and memory in rats. *Bratislava Medical Journal*, 118(7):408-416. http://doi.org/10.4149/BLL_2017_080
300. Schäfers, M., Sorkin, L. S., & Sommer, C. (2003). Intramuscular injection of tumor necrosis factoralpha induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain*, 104(3): 579–588. [http://doi.org/10.1016/S0304-3959\(03\)00115-5](http://doi.org/10.1016/S0304-3959(03)00115-5)

301. Schatzberg, A.F. (2007). Safety and tolerability of antidepressants: weighing the impact on treatment decisions. *Journal of Clinical Psychiatry*, 68(Suppl 8):26–34
302. Schmidt-Wilcke, T., & Clauw, D. J. (2010). Pharmacotherapy in fibromyalgia (FM)—implications for the underlying pathophysiology. *Pharmacology & therapeutics*, 127(3): 283-294.
303. Schmidt-Wilcke, T., Clauw, D.J. (2011). Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. *Nature Reviews: Rheumatology*, 19;7(9):518-27. <http://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.98>
304. Schmitt, U., Hiemke, C. (1998). Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(4): 807–811. [http://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00502-9](http://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00502-9)
305. Schneider-Mizell, C. M., Gerhard, S., Longair, M., Kazimiers, T., Li, F., Zwart, M. F., Cardona, A. (2016). Quantitative neuroanatomy for connectomics in *Drosophila*. *eLife*, 5, e12059. <http://doi.org/10.7554/eLife.12059>
306. Scholz, B.A., Hammonds, C.L., Boomershine, C.S. (2009). Duloxetine for the management of fibromyalgia syndrome. *Journal of Pain Research*, 21(2) :99-108.
307. Schug, S.A., Goddard, C. (2014). Recent advances in the pharmacological management of acute and chronic pain. *Annals of Palliative Medicine*, 3(4):263-75. <http://doi.org/10.3978/j.issn.2224-5820.2014.10.02>
308. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U. (2015). *Prometheus. Texto y atlas de anatomía. Tomo 3. Cabeza, cuello y neuroanatomía*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
309. Schwenkreis, P., Voigt, M., Hasenbring, M., Tegenthoff, M., Vorgerd, M., Kley, R.A. (2011). Central mechanisms during fatiguing muscle exercise in muscular dystrophy and fibromyalgia syndrome: a study with transcranial magnetic stimulation. *Muscle Nerve*, 43(4):479–84. <http://doi.org/10.1002/mus.21920>

310. Sephton, S. E., Salmon, P., Weissbecker, I., Ulmer, C., Floyd, A., Hoover, K., & Studts, J. L. (2007). Mindfulness meditation alleviates depressive symptoms in women with fibromyalgia: results of a randomized clinical trial. *Arthritis & Rheumatism*, 57(1): 77–85. <http://doi.org/10.1002/art.22478>
311. Sherbourne, C.D., Wells, K.B., Hays, R.D., Rogers, W., Burnam, M.A., Judd, L.L. (1994). Subthreshold depression and depressive disorder: clinical characteristics of general medical and mental health specialty outpatients. *American Journal of Psychiatry*, 151(12):1777-84.
312. Shibrya, E.E., Radwan, R.R., Abd El Fattah, M.A., Shabaan, E.A., Kenawy, S.A. (2017). Evidences for amelioration of reserpine-induced fibromyalgia in rat by low dose of gamma irradiation and duloxetine. *International Journal of Radiation Biology*, 93(5):553-560. <http://doi.org/10.1080/09553002.2017.1270475>
313. Silverman, S.L., Backonja, M., Pauer, L., Landen, J., Bhadra Brown, P., Scavone, J.M., Vissing, R., Clair, A. (2017). Effect of Baseline Characteristics on the Pain Response to Pregabalin in Fibromyalgia Patients with Comorbid Depression. *Pain Med*, 19. <http://doi.org/10.1093/pm/pnx091>
314. Skaer, T.L., Kwong, W.J. (2016). Illness perceptions and burden of disease in fibromyalgia. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research*, 20:1-7. <http://doi.org/10.1080/14737167.2017.1270207>
315. Skrabek, R.Q., Galimova, L., Ethans, K., et al. (2008). Nabilone for the treatment of pain in fibromyalgia. *The Journal of Pain*, 9:164–73
316. Slattery, D.A., Cryan, J.F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*, 7(6):1009-14. <http://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>
317. Slattery, D.A., Cryan, J.F. (2014). The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. *ILAR J*, 55(2):297-309. <http://doi.org/10.1093/ilar/ilu026>

318. Sluka, K. A., Kalra, A., & Moore, S. A. (2001). Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle & Nerve*, 24(1): 37–46.
319. Sluka, K. A. (2009). Is it possible to develop an animal model of fibromyalgia? *Pain*, 146(1-2): 3–4. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2009.07.032>
320. Smith, H. S., Bracken, D., & Smith, J. M. (2010). Duloxetine: a review of its safety and efficacy in the management of fibromyalgia syndrome. *Journal of Central Nervous System Disease*, 2: 57–72. <http://doi.org/10.4137/JCNSD.S4127>
321. Smythe, H. (1989). Fibrositis syndrome: a historical perspective. *The Journal Of Rheumatology Suppl*, 19:2–6.
322. Snedecor, S. J., Sudharshan, L., Cappelleri, J. C., Sadosky, A., Desai, P., Jalundhwala, Y. J., & Botteman, M. (2013). Systematic review and comparison of pharmacologic therapies for neuropathic pain associated with spinal cord injury. *Journal of Pain Research*, 6: 539–547. <http://doi.org/10.2147/JPR.S45966>
323. Soriano-Maldonado, A., Amris, K., Ortega, F. B., Segura-Jiménez, V., Estévez-López, F., Alvarez-Gallardo, I. C., et al. (2015). Association of different levels of depressive symptoms with symptomatology, overall disease severity, and quality of life in women with fibromyalgia. *Quality of Life Research: an International Journal of Quality of Life Aspects of Treatment, Care and Rehabilitation*, 24(12): 2951–2957. <http://doi.org/10.1007/s11136-015-1045-0>
324. Staud, R. (2011). Peripheral pain mechanisms in chronic widespread pain. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 25(2): 155–164. <http://doi.org/10.1016/j.berh.2010.01.010>
325. Stedenfeld, K. A., Clinton, S. M., Kerman, I. A., Akil, H., Watson, S. J., & Sved, A. F. (2011). Noveltyseeking behavior predicts vulnerability in a rodent model of depression. *Physiology & Behavior*, 103(2): 210–216. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.02.001>
326. Stemmelin, J., Cohen, C., Terranova, J.P., Lopez-Grancha, M., Pichat, P., Bergis, O., Decobert, M., Santucci, V., Françon, D., Alonso, R., Stahl, S.M., Keane, P., Avenet, P., Scatton, B., le Fur, G., Griebel, G. (2008). Stimulation of the beta3-Adrenoceptor as a novel

- treatment strategy for anxiety and depressive disorders. *Neuropsychopharmacology*, 33(3):574-87.
327. Suarez-Roca, H., Quintero, L., Arcaya, J. L., Maixner, W., & Rao, S. G. (2006). Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: differential effect of milnacipran. *Physiology & Behavior*, 88(1-2): 82–87. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.03.010>
328. Sueiro-Blanco, F., Estévez Schwarz, I., Ayán, C., Cancela, J., & Martín, V. (2008). Potential Benefits of Non-Pharmacological Therapies in Fibromyalgia. *The Open Rheumatology Journal*, 2: 1–6. <http://doi.org/10.2174/1874312900802010001>
329. Suzuki, R., Rygh, L.J., Dickenson, A.H. (2004). Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25:613–617.
330. Taguchi, T., Katanosaka, K., Yasui, M., Hayashi, K., Yamashita, M., Wakatsuki, K., et al. (2015). Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. *Pain*, 156(3): 415–427. <http://doi.org/10.1097/01.j.pain.0000460334.49525.5e>
331. Takayama, K., Suzuki, T., & Miura, M. (1994). The comparison of effects of various anesthetics on expression of Fos protein in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 176(1): 59–62.
332. Takeuchi, Y., Takasu, K., Ono, H., Tanabe, M. (2007). Pregabalin, S-(+)-3-isobutylgaba, activates the descending noradrenergic system to alleviate neuropathic pain in the mouse partial sciatic nerve ligation model. *Neuropharmacology*, 53: 842–853.
333. Tamano, R., Ishida, M., Asaki, T., Hasegawa, M., Shinohara, S. (2016). Effect of spinal monoaminergic neuronal system dysfunction on pain threshold in rats, and the analgesic effect of serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors. *Neuroscience Letters*, 26(615):78-82. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.025>
334. Tanabe, M., Takasu, K., Takeuchi, Y., Ono, H. (2008). Pain relief by gabapentin and pregabalin via supraspinal mechanisms after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroscience Research*, 15:3258–3264.

335. Taylor, B. K., & Westlund, K. N. (2016). The noradrenergic locus coeruleus as a chronic pain generator. *Journal of neuroscience research*, 95(6):1336-1346. <http://doi.org/10.1002/jnr.23956>
336. Theoharides, T. C., Tsilioni, I., Arbetman, L., Panagiotidou, S., Stewart, J. M., Gleason, R. M., & Russell, I. J. (2015). Fibromyalgia syndrome in need of effective treatments. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 355(2),:255–263. <http://doi.org/10.1124/jpet.115.227298>
337. Torta, R., Pennazio, F., & Ieraci, V. (2014). Anxiety and depression in rheumatologic diseases: the relevance of diagnosis and management. *Reumatismo*, 66(1): 92–97. <http://doi.org/10.4081/reumatismo.2014.769>
338. Üçeyler, N., Sommer, C., Walitt, B., Häuser, W. (2013). Anticonvulsants for fibromyalgia. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 16;(10):CD010782. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD010782>
339. Valverde Navarro A.A., Navalón Martínez H., Ferrer Piquer S., Blasco Serra A. (2015). Anatomofisiología del dolor. En: Tornero Tornero C., director. *Anestesia. Fundamentos y manejo clínico*. (204-216). Madrid. Editorial Médica Panamericana.
340. Van Gordon, W., Shonin, E., Dunn, T. J., Garcia-Campayo, J. and Griffiths, M. D. (2017), Meditation awareness training for the treatment of fibromyalgia syndrome: A randomized controlled trial. *British Journal of Health Psychology*, 22: 186–206. <http://doi.org/10.1111/bjhp.12224>
341. Vanderah, T.W. (2007). Pathophysiology of pain. *Medical Clinics of North America*, 91(1):1-12.
342. Villanueva, V. L., & Valía, J. C. (2004). Fibromialgia: diagnóstico y tratamiento. El estado de la cuestión. 430–443. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s1134-80462004000700005&script=sci_arttext
343. Vincent A., Lahr B.D., Wolfe F., Clauw D.J., Whipple M.O., Oh T.H., Barton D.L., St Sauver J. (2013). Prevalence of fibromyalgia: a population-based study in Olmsted County,

- Minnesota, utilizing the Rochester Epidemiology Project. *Arthritis Care & Research (Hoboken)*, 65(5):786-92. <http://doi.org/10.1002/acr.21896>
344. Vitali, C., Del Papa, N. (2015). Pain in primary Sjögren's syndrome. *Best Pract Res Clinical Rheumatology*, 29(1):63-70. <http://doi.org/10.1016/j.berh.2015.05.002>
345. Walitt B., Klose P., Fitzcharles M.A., Phillips T., Häuser W. (2016). Cannabinoids for fibromyalgia. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 18(7):CD011694. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD011694.pub2>
346. Wang, J., Cui, Y., Feng, W., Zhang, Y., Wang, G., Wang, X., & Zhou, G. (2014). Involvement of the central monoaminergic system in the antidepressant-like effect of catalpol in mice. *BioScience Trends*, 8(5): 248–252. <http://doi.org/10.5582/bst.2014.01029>
347. Wang, F., Pereira, A., Jr. (2016). Neuromodulation, Emotional feelings and affective disorders. *Mens Sana Monographs*, 14(1):5-29. <http://doi.org/10.4103/0973-1229.154533>
348. Ware, M.A., Fitzcharles, M.A., Joseph, L., et al. (2010). The effects of nabilone on sleep in fibromyalgia: results of a randomized controlled trial. *Anesthesia & Analgesia*, 110:604–10.
349. Warren, S., Capra, N.F., Yezierski, R.P. (2014a). Sistema Somatosensitivo I: tacto discriminativo y sensibilidad postural. En: Haines D.E., editor (4ª ed). *Principios de Neurociencia. Aplicaciones básicas y clínicas*. (226-240) Barcelona: Elsevier.
350. Warren, S., Yezierski, R.P., Capra, N.F. (2014b). Sistema Somatosensitivo II: nocicepción, sensibilidad térmica y tacto no discriminativo. En: Haines D.E., editor (4ª ed). *Principios de Neurociencia. Aplicaciones básicas y clínicas*. (241-259). Barcelona: Elsevier.
351. Wells, J. A., Shibata, S., Fujikawa, A., Takahashi, M., Saga, T., & Aoki, I. (2017). Functional MRI of the Reserpine-Induced Putative Rat Model of Fibromyalgia Reveals Discriminatory Patterns of Functional Augmentation to Acute Nociceptive Stimuli. *Scientific Reports*, 7: 38325. <http://doi.org/10.1038/srep38325>

352. Westlund, K.N., Willis, W.D. Pain System. (2015) En: Paxinos G., editor. (4ª ed). The rat nervous system (703-731). Sydney: Elsevier.
353. White, K.P. (2004). Fibromyalgia: the answer is blowin' in the wind. *The Journal of Rheumatology*,31(4):636-9.
354. Wolfe, F., Smythe, H. A., Yunus, M. B., Bennett, R. M., Bombardier, C., Goldenberg, D. L., et al. (1990). The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis & Rheumatism*, 33(2): 160–172.
355. Wolfe, F., Anderson, J., Harkness, D., Bennett, R.M., Caro, X.J., Goldenberg, D.L., Russell, I.J., Yunus, M.B. (1997). A prospective, longitudinal, multicenter study of service utilization and costs in fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatology*, 40(9):1560-70.
356. Wolfe, F., Zhao, S., Lane, N. (2000). Preference for nonsteroidal antiinflammatory drugs over acetaminophen by rheumatic disease patients: a survey of 1,799 patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatology*,43(2):378-85.
357. Wolfe, F., Clauw, D. J., Fitzcharles, M.-A., Goldenberg, D. L., Katz, R. S., Mease, P., et al. (2010). The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care & Research*, 62(5): 600–610. <http://doi.org/10.1002/acr.20140>
358. Wolfe, F., Fitzcharles, M. A., Goldenberg, D. L., Clauw, D. J., Häuser, W., Katz, R. S., et al. (2011). Fibromyalgia Criteria and Severity Scales for Clinical and Epidemiological Studies: A Modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 38(6): 1113–1122. <http://doi.org/10.3899/jrheum.100594>
359. Wolfe, F., Brähler, E., Hinz, A., & Häuser, W. (2013). Fibromyalgia prevalence, somatic symptom reporting, and the dimensionality of polysymptomatic distress: results from a survey of the general population. *Arthritis Care & Research*, 65(5): 777–785. <http://doi.org/10.1002/acr.21931>

360. Wolfe, F., Walitt, B.T., Rasker, J.J., Katz, R.S., Häuser, W. (2015). The use of polysymptomatic distress categories in the evaluation of fibromyalgia (FM) and FM severity. *The Journal of Rheumatology*, 5(42):1494-501.
361. Wolfe, F., Walitt, B.T., Rasker, J.J., Katz, R.S., Häuser, W. (2016). The Polysymptomatic Distress Scale Is Simple, Useful, and Effective in Clinical Care and Clinical and Epidemiology Studies. *The Journal of Rheumatology*, 43(2): 454-454.
362. Wu, N., Boulanger, L., Wu, N., Chen, S. Y., Andrews, J. S., Chen, S.-Y., et al. (2012). Predictors of pain medication selection among patients diagnosed with fibromyalgia. *Pain Practice: The Official Journal of World Institute of Pain*, 12(4): 266–275. <http://doi.org/10.1111/j.15332500.2011.00497.x>
363. Xiao, Y., Russell, I. J., Liu, Y.-G. (2012). A brain-derived neurotrophic factor polymorphism Val66Met identifies fibromyalgia syndrome subgroup with higher body mass index and Creactive protein. *Rheumatology International*, 32(8): 2479–2485. <http://doi.org/10.1007/s00296-011-1990-z>
364. Yilmaz, P., Diers, M., Diener, S., Rance, M., Wessa, M., & Flor, H. (2010). Brain correlates of stressinduced analgesia. *Pain*, 151(2): 522–529. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2010.08.016>
365. Yunus, M.B., Masi, A.T., Aldag, J.C. (1989). Short term effects of ibuprofen in primary fibromyalgia syndrome: a double blind, placebo-controlled trial. *The Journal of Rheumatology*, 16:527-32.
366. Yunus, M. B. (2007). Fibromyalgia and Overlapping Disorders: The Unifying Concept of Central Sensitivity Syndromes. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 36(6): 339–356. <http://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2006.12.009>
367. Zhang, T., Xue, R., Zhu, L., Li, J., Fan, Q., Zhong, B., & Zhang, Y. (2016). Evaluation of the analgesic effects of amoxetine, a novel potent serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(9): 1154–1165. <http://doi.org/10.1038/aps.2016.45>

368. Zegarra Piérola, J. W. (2007). Bases fisiopatológicas del dolor. *Acta Médica Peruana*, 24(2): 35-38.
369. Zomkowski, A.D., Engel, D., Cunha, M.P., Gabilan, N.H., Rodrigues, A.L. (2012). The role of the NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of duloxetine in the forced swimming test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 103(2):408-17.
<http://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.011>

08

ANEXOS

ANEXO I. DESCRIPTIVOS DEL ELECTROVONFREY TEST

Descriptivos

Condición experimental			Estadístico	Error estándar	
EVF day 1 Norm	RES-DUL	Media	,9468	,05090	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,8334	
			Límite superior	1,0602	
		Media recortada al 5%	,9507		
		Mediana	,9185		
		Varianza	,029		
		Desviación estándar	,16883		
		Mínimo	,69		
		Máximo	1,14		
		Rango	,45		
		Rango intercuartil	,30		
		Asimetría	-,322	,661	
		Curtosis	-1,365	1,279	
			RES-VEH	Media	,6226
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior			,4323	
	Límite superior			,8128	
Media recortada al 5%	,6188				
Mediana	,5887				
Varianza	,014				
Desviación estándar	,11955				
Mínimo	,53				
Máximo	,78				
Rango	,26				
Rango intercuartil	,22				
Asimetría	1,081			1,014	
Curtosis	-,097			2,619	
	RES-PGB			Media	,8195
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7484	
			Límite superior	,8907	
		Media recortada al 5%	,8219		
		Mediana	,8373		
		Varianza	,005		
		Desviación estándar	,06777		
		Mínimo	,71		
		Máximo	,89		
		Rango	,17		
		Rango intercuartil	,12		
		Asimetría	-,854	,845	
		Curtosis	-,438	1,741	

EVF day 3 Norm	RES-DUL	Media		,7788	,02217		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7294			
			Límite superior	,8282			
		Media recortada al 5%		,7797			
		Mediana		,7880			
		Varianza		,005			
		Desviación estándar		,07353			
		Mínimo		,67			
		Máximo		,88			
		Rango		,21			
		Rango intercuartil		,15			
		Asimetría		-,300	,661		
		Curtosis		-1,414	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,4351	,04795
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,2825	
					Límite superior	,5877	
				Media recortada al 5%		,4338	
Mediana				,4234			
Varianza				,009			
Desviación estándar				,09590			
Mínimo				,33			
Máximo				,56			
Rango				,23			
Rango intercuartil				,18			
Asimetría				,647	1,014		
Curtosis				,487	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8293	,05510
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,6877	
					Límite superior	,9709	
				Media recortada al 5%		,8285	
		Mediana		,8008			
		Varianza		,018			
		Desviación estándar		,13496			
		Mínimo		,66			
		Máximo		1,01			
		Rango		,34			
		Rango intercuartil		,26			
		Asimetría		,337	,845		
		Curtosis		-1,589	1,741		

EVF day 5 Norm	RES-DUL	Media		,8262	,03853		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7403			
			Límite superior	,9120			
		Media recortada al 5%		,8227			
		Mediana		,7916			
		Varianza		,016			
		Desviación estándar		,12779			
		Mínimo		,66			
		Máximo		1,06			
		Rango		,41			
		Rango intercuartil		,19			
		Asimetría		,452	,661		
		Curtosis		-,700	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5104	,05913
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,3222	
Límite superior	,6986						
Media recortada al 5%				,5125			
Mediana				,5295			
Varianza				,014			
Desviación estándar				,11825			
Mínimo				,36			
Máximo				,62			
Rango				,25			
Rango intercuartil				,22			
Asimetría				-,565	1,014		
Curtosis				-2,444	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,7505	,02289
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,6917	
		Límite superior	,8093				
		Media recortada al 5%		,7537			
		Mediana		,7638			
		Varianza		,003			
		Desviación estándar		,05607			
		Mínimo		,65			
		Máximo		,80			
		Rango		,15			
		Rango intercuartil		,08			
		Asimetría		-1,654	,845		
		Curtosis		2,976	1,741		

EVF day 7 Norm	RES-DUL	Media		,8536	,04064		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7630			
			Límite superior	,9441			
		Media recortada al 5%		,8599			
		Mediana		,8776			
		Varianza		,018			
		Desviación estándar		,13477			
		Mínimo		,55			
		Máximo		1,04			
		Rango		,49			
		Rango intercuartil		,13			
		Asimetría		-,983	,661		
		Curtosis		1,390	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5754	,04352
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4369	
					Límite superior	,7139	
Media recortada al 5%				,5781			
Mediana				,6000			
Varianza				,008			
Desviación estándar				,08703			
Mínimo				,45			
Máximo				,65			
Rango				,20			
Rango intercuartil				,15			
Asimetría				-1,517	1,014		
Curtosis				2,845	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8727	,04854
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7479	
					Límite superior	,9975	
		Media recortada al 5%		,8733			
		Mediana		,8727			
		Varianza		,014			
		Desviación estándar		,11889			
		Mínimo		,73			
		Máximo		1,01			
		Rango		,28			
		Rango intercuartil		,23			
		Asimetría		-,052	,845		
		Curtosis		-2,434	1,741		

EVF day 9 Norm	RES-DUL	Media		,8157	,03170		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7451			
			Límite superior	,8864			
		Media recortada al 5%		,8205			
		Mediana		,8422			
		Varianza		,011			
		Desviación estándar		,10515			
		Mínimo		,60			
		Máximo		,95			
		Rango		,35			
		Rango intercuartil		,18			
		Asimetría		-,603	,661		
		Curtosis		,257	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,6406	,04160
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,5082	
Límite superior	,7730						
Media recortada al 5%				,6404			
Mediana				,6388			
Varianza				,007			
Desviación estándar				,08320			
Mínimo				,54			
Máximo				,74			
Rango				,20			
Rango intercuartil				,16			
Asimetría				,110	1,014		
Curtosis				-,564	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8756	,04046
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7716	
		Límite superior	,9796				
		Media recortada al 5%		,8797			
		Mediana		,9000			
		Varianza		,010			
		Desviación estándar		,09910			
		Mínimo		,70			
		Máximo		,98			
		Rango		,28			
		Rango intercuartil		,15			
		Asimetría		-1,258	,845		
		Curtosis		1,648	1,741		

EVF day 11 Norm	RES-DUL	Media		,8594	,02697		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7993			
			Límite superior	,9195			
		Media recortada al 5%		,8605			
		Mediana		,8462			
		Varianza		,008			
		Desviación estándar		,08944			
		Mínimo		,70			
		Máximo		1,00			
		Rango		,30			
		Rango intercuartil		,13			
		Asimetría		,240	,661		
		Curtosis		,083	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5526	,04370
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4136	
Límite superior	,6917						
Media recortada al 5%				,5573			
Mediana				,5944			
Varianza				,008			
Desviación estándar				,08741			
Mínimo				,42			
Máximo				,60			
Rango				,18			
Rango intercuartil				,14			
Asimetría				-1,979	1,014		
Curtosis				3,924	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8830	,04028
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7795	
		Límite superior	,9865				
		Media recortada al 5%		,8812			
		Mediana		,8500			
		Varianza		,010			
		Desviación estándar		,09866			
		Mínimo		,80			
		Máximo		1,00			
		Rango		,20			
		Rango intercuartil		,20			
		Asimetría		,453	,845		
		Curtosis		-2,394	1,741		

EVF day 13 Norm	RES-DUL	Media		,9191	,03395		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,8435			
			Límite superior	,9947			
		Media recortada al 5%		,9207			
		Mediana		,9810			
		Varianza		,013			
		Desviación estándar		,11259			
		Mínimo		,75			
		Máximo		1,06			
		Rango		,32			
		Rango intercuartil		,19			
		Asimetría		-,402	,661		
		Curtosis		-1,464	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5564	,04021
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4284	
Límite superior	,6843						
Media recortada al 5%				,5561			
Mediana				,5536			
Varianza				,006			
Desviación estándar				,08042			
Mínimo				,46			
Máximo				,66			
Rango				,20			
Rango intercuartil				,15			
Asimetría				,204	1,014		
Curtosis				1,483	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8837	,02793
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,8119	
		Límite superior	,9555				
		Media recortada al 5%		,8827			
		Mediana		,8783			
		Varianza		,005			
		Desviación estándar		,06841			
		Mínimo		,80			
		Máximo		,99			
		Rango		,19			
		Rango intercuartil		,12			
		Asimetría		,393	,845		
		Curtosis		-,731	1,741		

EVF day 15 Norm	RES-DUL	Media		,8083	,02723		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7476			
			Límite superior	,8690			
		Media recortada al 5%		,8065			
		Mediana		,8140			
		Varianza		,008			
		Desviación estándar		,09032			
		Mínimo		,69			
		Máximo		,96			
		Rango		,28			
		Rango intercuartil		,15			
		Asimetría		,235	,661		
		Curtosis		-1,229	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5841	,06590
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,3744	
Límite superior	,7938						
Media recortada al 5%				,5845			
Mediana				,5882			
Varianza				,017			
Desviación estándar				,13180			
Mínimo				,43			
Máximo				,73			
Rango				,31			
Rango intercuartil				,26			
Asimetría				-,151	1,014		
Curtosis				-1,186	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8418	,03695
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7469	
		Límite superior	,9368				
		Media recortada al 5%		,8413			
		Mediana		,8552			
		Varianza		,008			
		Desviación estándar		,09050			
		Mínimo		,72			
		Máximo		,97			
		Rango		,25			
		Rango intercuartil		,16			
		Asimetría		,017	,845		
		Curtosis		-,371	1,741		

ANEXO II. DESCRIPTIVOS DEL RANDALL AND SELITTO TEST

Descriptivos

Condición experimental			Estadístico	Error estándar		
R&S day 1 Norm	RES-DUL	Media	,7207	,07244		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,5593		
			Límite superior	,8821		
		Media recortada al 5%	,7222			
		Mediana	,7163			
		Varianza	,058			
		Desviación estándar	,24025			
		Mínimo	,29			
		Máximo	1,13			
		Rango	,84			
		Rango intercuartil	,33			
		Asimetría	,065	,661		
		Curtosis	-,097	1,279		
			RES-VEH	Media	,5808	,03377
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4733
Límite superior	,6883					
Media recortada al 5%	,5795					
Mediana	,5694					
Varianza	,005					
Desviación estándar	,06755					
Mínimo	,51					
Máximo	,67					
Rango	,16					
Rango intercuartil	,13					
Asimetría	,848			1,014		
Curtosis	,392			2,619		
	RES-PGB			Media	,7989	,05125
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,6672
		Límite superior	,9306			
		Media recortada al 5%	,7993			
		Mediana	,8254			
		Varianza	,016			
		Desviación estándar	,12554			
		Mínimo	,64			
		Máximo	,95			
		Rango	,31			
		Rango intercuartil	,25			
		Asimetría	-,330	,845		
		Curtosis	-1,746	1,741		

R&S day 3 Norm	RES-DUL	Media		1,0665	,04395		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,9685			
			Límite superior	1,1644			
		Media recortada al 5%		1,0681			
		Mediana		1,0773			
		Varianza		,021			
		Desviación estándar		,14575			
		Mínimo		,86			
		Máximo		1,25			
		Rango		,39			
		Rango intercuartil		,27			
		Asimetría		-,156	,661		
		Curtosis		-1,751	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,4366	,06204
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,2392	
Límite superior	,6340						
Media recortada al 5%				,4340			
Mediana				,4132			
Varianza				,015			
Desviación estándar				,12407			
Mínimo				,32			
Máximo				,60			
Rango				,29			
Rango intercuartil				,23			
Asimetría				,927	1,014		
Curtosis				,380	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8751	,10599
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,6026	
		Límite superior	1,1476				
		Media recortada al 5%		,8723			
		Mediana		,8768			
		Varianza		,067			
		Desviación estándar		,25963			
		Mínimo		,54			
		Máximo		1,26			
		Rango		,72			
		Rango intercuartil		,46			
		Asimetría		,241	,845		
		Curtosis		-,408	1,741		

R&S day 5 Norm	RES-DUL	Media		,7716	,07100		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,6134			
			Límite superior	,9298			
		Media recortada al 5%		,7683			
		Mediana		,8197			
		Varianza		,055			
		Desviación estándar		,23550			
		Mínimo		,45			
		Máximo		1,15			
		Rango		,71			
		Rango intercuartil		,44			
		Asimetría		-,044	,661		
		Curtosis		-1,214	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5974	,03832
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4755	
Límite superior	,7194						
Media recortada al 5%				,5944			
Mediana				,5700			
Varianza				,006			
Desviación estándar				,07665			
Mínimo				,54			
Máximo				,71			
Rango				,17			
Rango intercuartil				,13			
Asimetría				1,775	1,014		
Curtosis				3,373	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8585	,06172
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,6998	
		Límite superior	1,0172				
		Media recortada al 5%		,8562			
		Mediana		,8128			
		Varianza		,023			
		Desviación estándar		,15119			
		Mínimo		,66			
		Máximo		1,10			
		Rango		,44			
		Rango intercuartil		,23			
		Asimetría		,593	,845		
		Curtosis		,306	1,741		

R&S day 7 Norm	RES-DUL	Media		1,1344	,05203		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,0185			
			Límite superior	1,2503			
		Media recortada al 5%		1,1360			
		Mediana		1,0733			
		Varianza		,030			
		Desviación estándar		,17256			
		Mínimo		,83			
		Máximo		1,41			
		Rango		,57			
		Rango intercuartil		,28			
		Asimetría		-,085	,661		
		Curtosis		-,799	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,4998	,01180
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4623	
Límite superior	,5374						
Media recortada al 5%				,5001			
Mediana				,5018			
Varianza				,001			
Desviación estándar				,02361			
Mínimo				,47			
Máximo				,53			
Rango				,06			
Rango intercuartil				,05			
Asimetría				-,426	1,014		
Curtosis				-,197	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,8975	,05403
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7586	
		Límite superior	1,0364				
		Media recortada al 5%		,9002			
		Mediana		,9129			
		Varianza		,018			
		Desviación estándar		,13235			
		Mínimo		,69			
		Máximo		1,05			
		Rango		,36			
		Rango intercuartil		,23			
		Asimetría		-,511	,845		
		Curtosis		-,718	1,741		

R&S day 9 Nom	RES-DUL	Media		1,0901	,06465		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,9461			
			Límite superior	1,2341			
		Media recortada al 5%		1,0834			
		Mediana		1,1383			
		Varianza		,046			
		Desviación estándar		,21442			
		Mínimo		,78			
		Máximo		1,52			
		Rango		,73			
		Rango intercuartil		,32			
		Asimetría		,375	,661		
		Curtosis		,242	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5904	,05168
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4260	
Límite superior	,7549						
Media recortada al 5%				,5909			
Mediana				,5949			
Varianza				,011			
Desviación estándar				,10337			
Mínimo				,46			
Máximo				,71			
Rango				,25			
Rango intercuartil				,19			
Asimetría				-,257	1,014		
Curtosis				1,271	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		1,0024	,05207
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,8686	
		Límite superior	1,1363				
		Media recortada al 5%		1,0037			
		Mediana		1,0021			
		Varianza		,016			
		Desviación estándar		,12756			
		Mínimo		,81			
		Máximo		1,17			
		Rango		,37			
		Rango intercuartil		,21			
		Asimetría		-,278	,845		
		Curtosis		,142	1,741		

R&S day 11 Norm	RES-DUL	Media		1,0231	,07046		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,8661			
			Límite superior	1,1801			
		Media recortada al 5%		1,0148			
		Mediana		1,0345			
		Varianza		,055			
		Desviación estándar		,23369			
		Mínimo		,64			
		Máximo		1,56			
		Rango		,92			
		Rango intercuartil		,26			
		Asimetría		,785	,661		
		Curtosis		2,433	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,6232	,02544
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,5422	
Límite superior	,7042						
Media recortada al 5%				,6250			
Mediana				,6394			
Varianza				,003			
Desviación estándar				,05087			
Mínimo				,55			
Máximo				,66			
Rango				,12			
Rango intercuartil				,09			
Asimetría				-1,613	1,014		
Curtosis				2,859	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		1,0000	,08164
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7902	
		Límite superior	1,2099				
		Media recortada al 5%		,9928			
		Mediana		,9706			
		Varianza		,040			
		Desviación estándar		,19997			
		Mínimo		,79			
		Máximo		1,34			
		Rango		,55			
		Rango intercuartil		,30			
		Asimetría		1,012	,845		
		Curtosis		,892	1,741		

R&S day 13 Norm	RES-DUL	Media		1,0042	,08470		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,8154			
			Límite superior	1,1929			
		Media recortada al 5%		1,0084			
		Mediana		,9410			
		Varianza		,079			
		Desviación estándar		,28091			
		Mínimo		,52			
		Máximo		1,41			
		Rango		,90			
		Rango intercuartil		,43			
		Asimetría		,101	,661		
		Curtosis		-,557	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5721	,02119
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,5047	
Límite superior	,6396						
Media recortada al 5%				,5727			
Mediana				,5772			
Varianza				,002			
Desviación estándar				,04238			
Mínimo				,52			
Máximo				,62			
Rango				,10			
Rango intercuartil				,08			
Asimetría				-,605	1,014		
Curtosis				-,128	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,9807	,06485
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,8140	
		Límite superior	1,1475				
		Media recortada al 5%		,9756			
		Mediana		,9557			
		Varianza		,025			
		Desviación estándar		,15886			
		Mínimo		,79			
		Máximo		1,27			
		Rango		,48			
		Rango intercuartil		,18			
		Asimetría		1,201	,845		
		Curtosis		2,754	1,741		

R&S day 15 Norm	RES-DUL	Media		1,2509	,05201		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,1351			
			Límite superior	1,3668			
		Media recortada al 5%		1,2411			
		Mediana		1,1847			
		Varianza		,030			
		Desviación estándar		,17249			
		Mínimo		1,05			
		Máximo		1,63			
		Rango		,59			
		Rango intercuartil		,23			
		Asimetría		1,066	,661		
		Curtosis		1,060	1,279		
		RES-VEH	RES-VEH	Media		,5412	,04836
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,3873	
					Límite superior	,6951	
				Media recortada al 5%		,5371	
Mediana				,5044			
Varianza				,009			
Desviación estándar				,09672			
Mínimo				,47			
Máximo				,68			
Rango				,21			
Rango intercuartil				,16			
Asimetría				1,814	1,014		
Curtosis				3,409	2,619		
RES-PGB	RES-PGB			Media		,9355	,04193
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,8277	
					Límite superior	1,0432	
				Media recortada al 5%		,9357	
		Mediana		,9142			
		Varianza		,011			
		Desviación estándar		,10270			
		Mínimo		,81			
		Máximo		1,06			
		Rango		,25			
		Rango intercuartil		,20			
		Asimetría		,253	,845		
		Curtosis		-1,713	1,741		

ANEXO III. DESCRIPTIVOS DEL FORCED SWIMMING TEST_TEST

Descriptivos				Estadístico	Error estándar		
Condición experimental							
Nadar	RES	Media		4,78	,572		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	3,46			
			Límite superior	6,10			
		Media recortada al 5%		4,81			
		Mediana		5,00			
		Varianza		2,944			
		Desviación estándar		1,716			
		Mínimo		2			
		Máximo		7			
		Rango		5			
		Rango intercuartil		3			
		Asimetría		-,134	,717		
		Curtosis		-,825	1,400		
			RES-PGB	Media		17,00	,816
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	15,00	
Límite superior	19,00						
Media recortada al 5%				17,00			
Mediana				17,00			
Varianza				4,667			
Desviación estándar				2,160			
Mínimo				14			
Máximo				20			
Rango				6			
Rango intercuartil				4			
Asimetría				,000	,794		
Curtosis				-1,200	1,587		
	RES-DUL			Media		18,88	2,039
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	14,05	
		Límite superior	23,70				
		Media recortada al 5%		18,97			
		Mediana		20,00			
		Varianza		33,268			
		Desviación estándar		5,768			
		Mínimo		10			
		Máximo		26			
		Rango		16			
		Rango intercuartil		11			
		Asimetría		-,468	,752		
		Curtosis		-1,157	1,481		

Escarlar	RES	Media		1,22	,324		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,48			
			Límite superior	1,97			
		Media recortada al 5%		1,19			
		Mediana		1,00			
		Varianza		,944			
		Desviación estándar		,972			
		Mínimo		0			
		Máximo		3			
		Rango		3			
		Rango intercuartil		2			
		Asimetría		,502	,717		
		Curtosis		-,009	1,400		
		RES-PGB	RES-PGB	Media		,86	,261
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,22	
					Límite superior	1,50	
Media recortada al 5%				,84			
Mediana				1,00			
Varianza				,476			
Desviación estándar				,690			
Mínimo				0			
Máximo				2			
Rango				2			
Rango intercuartil				1			
Asimetría				,174	,794		
Curtosis				,336	1,587		
RES-DUL	RES-DUL			Media		4,25	1,098
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,65	
					Límite superior	6,85	
		Media recortada al 5%		4,22			
		Mediana		4,00			
		Varianza		9,643			
		Desviación estándar		3,105			
		Mínimo		0			
		Máximo		9			
		Rango		9			
		Rango intercuartil		6			
		Asimetría		,301	,752		
		Curtosis		-,669	1,481		

Inmovilidad	RES	Media		54,00	,441		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	52,98			
			Límite superior	55,02			
		Media recortada al 5%		54,00			
		Mediana		54,00			
		Varianza		1,750			
		Desviación estándar		1,323			
		Mínimo		52			
		Máximo		56			
		Rango		4			
		Rango intercuartil		2			
		Asimetría		,000	,717		
		Curtosis		-1,248	1,400		
		RES-PGB	RES-PGB	Media		42,14	,937
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	39,85	
					Límite superior	44,44	
				Media recortada al 5%		42,16	
Mediana				43,00			
Varianza				6,143			
Desviación estándar				2,478			
Mínimo				39			
Máximo				45			
Rango				6			
Rango intercuartil				5			
Asimetría				-,411	,794		
Curtosis				-1,841	1,587		
RES-DUL	RES-DUL			Media		37,00	1,488
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	33,48	
					Límite superior	40,52	
				Media recortada al 5%		37,06	
		Mediana		37,00			
		Varianza		17,714			
		Desviación estándar		4,209			
		Mínimo		30			
		Máximo		43			
		Rango		13			
		Rango intercuartil		7			
		Asimetría		-,307	,752		
		Curtosis		-,280	1,481		

ANEXO IV. DESCRIPTIVOS DEL NOVELTY-SUPPRESSED FEEDING TEST

Estudio del consume de comida

Descriptivos

Condición experimental			Estadístico	Error estándar	
Comida ingerida (g)	RES-VEH	Media	21,3042	,73522	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	19,6860	
			Límite superior	22,9224	
		Media recortada al 5%	21,2824		
		Mediana	20,0000		
		Varianza	6,487		
		Desviación estándar	2,54687		
		Mínimo	18,00		
		Máximo	25,00		
		Rango	7,00		
		Rango intercuartil	4,66		
		Asimetría	,393	,637	
		Curtosis	-1,623	1,232	
		RES-PGB	Media	18,4063	,42135
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	17,5082
	Límite superior			19,3043	
	Media recortada al 5%		18,4514		
	Mediana		19,0000		
	Varianza		2,841		
	Desviación estándar		1,68542		
	Mínimo		15,00		
	Máximo		21,00		
	Rango		6,00		
	Rango intercuartil		2,63		
	Asimetría		-,615	,564	
	Curtosis		-,348	1,091	
	RES-DUL		Media	17,6143	,86652
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	15,7423
		Límite superior		19,4863	
		Media recortada al 5%	17,7937		
		Mediana	18,8500		
		Varianza	10,512		
		Desviación estándar	3,24224		
Mínimo		10,00			
Máximo		22,00			
Rango		12,00			
Rango intercuartil		4,48			
Asimetría		-1,114	,597		
Curtosis		1,030	1,154		

ANEXO V. DESCRIPTIVOS DEL NOVELTY-SUPPRESSED FEEDING TEST

Estudio de conducta en Test y en Jaula

Descriptivos

Condición experimental			Estadístico	Error estándar	
Tiempo en comer	RES-VEH	Media	513,0000	40,86505	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	413,0068	
			Límite superior	612,9932	
		Media recortada al 5%	517,2222		
		Mediana	540,0000		
		Varianza	11689,67		
		Desviación estándar	108,1188		
		Mínimo	350,00		
		Máximo	600,00		
		Rango	250,00		
		Rango intercuartil	230,00		
		Asimetría	-,989	,794	
		Curtosis	-1,013	1,587	
			RES-DUL	Media	207,1429
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior			156,0068	
	Límite superior			258,2789	
Media recortada al 5%	206,2698				
Mediana	220,0000				
Varianza	3057,143				
Desviación estándar	55,29144				
Mínimo	140,00				
Máximo	290,00				
Rango	150,00				
Rango intercuartil	90,00				
Asimetría	,140			,794	
Curtosis	-1,287			1,587	
	RES-PGB			Media	565,2500
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	527,3007	
			Límite superior	603,1993	
		Media recortada al 5%	568,5000		
		Mediana	580,0000		
		Varianza	2060,500		
		Desviación estándar	45,39273		
		Mínimo	472,00		
		Máximo	600,00		
		Rango	128,00		
		Rango intercuartil	57,50		
		Asimetría	-1,350	,752	
		Curtosis	1,714	1,481	

Acercamiento (veces por minuto)	RES-VEH	Media		,2143	,06480	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,0557		
			Límite superior	,3729		
		Media recortada al 5%		,2103		
		Mediana		,1700		
		Varianza		,029		
		Desviación estándar		,17145		
		Mínimo		,00		
		Máximo		,50		
		Rango		,50		
		Rango intercuartil		,23		
		Asimetría		,583	,794	
		Curtosis		-,350	1,587	
		RES-DUL	Media		,8214	,17723
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,3878		
Límite superior	1,2551					
Media recortada al 5%		,8016				
Mediana		,5500				
Varianza		,220				
Desviación estándar		,46891				
Mínimo		,50				
Máximo		1,50				
Rango		1,00				
Rango intercuartil		1,00				
Asimetría		1,139	,794			
Curtosis		-,943	1,587			
RES-PGB	Media		,8438	,12080		
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,5581				
	Límite superior	1,1294				
Media recortada al 5%		,8431				
Mediana		,7250				
Varianza		,117				
Desviación estándar		,34167				
Mínimo		,40				
Máximo		1,30				
Rango		,90				
Rango intercuartil		,60				
Asimetría		,295	,752			
Curtosis		-1,811	1,481			

Tocar/Oler (veces por minuto)	RES-VEH	Media		,2114	,07133		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,0369			
			Límite superior	,3860			
		Media recortada al 5%		,2071			
		Mediana		,2000			
		Varianza		,036			
		Desviación estándar		,18872			
		Mínimo		,00			
		Máximo		,50			
		Rango		,50			
		Rango intercuartil		,34			
		Asimetría		,273	,794		
		Curtosis		-1,166	1,587		
			RES-DUL	Media		,7157	,10717
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,4535	
	Límite superior	,9779					
		Media recortada al 5%		,7175			
		Mediana		,7000			
		Varianza		,080			
		Desviación estándar		,28354			
		Mínimo		,40			
		Máximo		1,00			
		Rango		,60			
		Rango intercuartil		,59			
		Asimetría		-,012	,794		
		Curtosis		-2,481	1,587		
	RES-PGB	Media		,4363	,07602		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,2565			
			Límite superior	,6160			
		Media recortada al 5%		,4369			
		Mediana		,4350			
		Varianza		,046			
		Desviación estándar		,21500			
		Mínimo		,10			
		Máximo		,76			
		Rango		,66			
		Rango intercuartil		,29			
		Asimetría		-,057	,752		
		Curtosis		-,767	1,481		

(En jaula) Tiempo en comer	RES-VEH	Media		53,5714	6,82034	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		36,8827	
			Límite superior		70,2602	
		Media recortada al 5%		53,8016		
		Mediana		55,0000		
		Varianza		325,619		
		Desviación estándar		18,04492		
		Mínimo		25,00		
		Máximo		78,00		
		Rango		53,00		
		Rango intercuartil		32,00		
		Asimetría		-,200	,794	
		Curtosis		-,242	1,587	
		RES-DUL	Media		57,4286	5,86701
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		43,0725
Límite superior				71,7846		
Media recortada al 5%			57,6984			
Mediana			60,0000			
Varianza			240,952			
Desviación estándar			15,52264			
Mínimo			35,00			
Máximo			75,00			
Rango			40,00			
Rango intercuartil			32,00			
Asimetría			-,452	,794		
Curtosis			-1,425	1,587		
RES-PGB	Media			41,5000	7,49047	
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior		23,7879	
		Límite superior		59,2121		
	Media recortada al 5%		40,6111			
	Mediana		38,5000			
	Varianza		448,857			
	Desviación estándar		21,18625			
	Mínimo		18,00			
	Máximo		81,00			
	Rango		63,00			
	Rango intercuartil		32,00			
	Asimetría		,769	,752		
	Curtosis		,313	1,481		

(En jaula) Cantidad de comida ingerida	RES-VEH	Media		2,2571	,35041	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,3997		
			Límite superior	3,1146		
		Media recortada al 5%		2,2413		
		Mediana		2,2000		
		Varianza		,860		
		Desviación estándar		,92711		
		Mínimo		1,00		
		Máximo		3,80		
		Rango		2,80		
		Rango intercuartil		1,50		
		Asimetría		,482	,794	
		Curtosis		,160	1,587	
		RES-DUL	Media		1,6429	,35714
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,7690	
Límite superior	2,5168					
Media recortada al 5%			1,5754			
Mediana			1,0000			
Varianza			,893			
Desviación estándar			,94491			
Mínimo			1,00			
Máximo			3,50			
Rango			2,50			
Rango intercuartil			1,00			
Asimetría			1,503	,794		
Curtosis			1,982	1,587		
RES-PGB	Media			1,6125	,14692	
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	1,2651		
		Límite superior	1,9599			
	Media recortada al 5%		1,6083			
	Mediana		1,7000			
	Varianza		,173			
	Desviación estándar		,41555			
	Mínimo		1,00			
	Máximo		2,30			
	Rango		1,30			
	Rango intercuartil		,60			
	Asimetría		-,070	,752		
	Curtosis		,112	1,481		

ANEXO VI. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA_LOCUS COERULEUS (SIN FORMALIN TEST)

Descriptivos

Condición Experimental			Estadístico	Error estándar	
% Área TH	RES-FOS-6H	Media	39,23825	1,817891	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	34,93962	
			Límite superior	43,53688	
		Media recortada al 5%	39,32683		
		Mediana	39,81000		
		Varianza	26,438		
		Desviación estándar	5,141772		
		Mínimo	31,359		
		Máximo	45,523		
		Rango	14,164		
		Rango intercuartil	9,923		
		Asimetría	-,555	,752	
		Curtosis	-,765	1,481	
		RES-FOS-5D	Media	47,02950	3,514984
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	38,71788	
			Límite superior	55,34112	
	Media recortada al 5%		46,99878		
	Mediana		45,26150		
	Varianza		98,841		
	Desviación estándar		9,941877		
Mínimo	34,959				
Máximo	59,653				
Rango	24,694				
Rango intercuartil	20,133				
Asimetría	,175		,752		
Curtosis	-1,975		1,481		
RES-FOS-15D	Media		47,98622	2,350758	
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	42,56537	
			Límite superior	53,40708	
	Media recortada al 5%	47,98275			
	Mediana	46,67200			
	Varianza	49,735			
	Desviación estándar	7,052273			
	Mínimo	38,079			
	Máximo	57,956			
	Rango	19,877			
	Rango intercuartil	13,011			
	Asimetría	,067	,717		
	Curtosis	-1,547	1,400		

% Área FOS	RES-FOS-6H	Media		6,01563	1,174944
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	3,23732	
			Límite superior	8,79393	
		Media recortada al 5%		6,15392	
		Mediana		6,77600	
		Varianza		11,044	
		Desviación estándar		3,323244	
		Mínimo		,009	
		Máximo		9,533	
		Rango		9,524	
		Rango intercuartil		5,435	
		Asimetría		-,804	,752
		Curtosis		-,244	1,481
	RES-FOS-5D	Media		,18700	,046015
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,07819	
			Límite superior	,29581	
		Media recortada al 5%		,18167	
		Mediana		,16550	
		Varianza		,017	
		Desviación estándar		,130150	
		Mínimo		,012	
		Máximo		,458	
		Rango		,446	
		Rango intercuartil		,126	
		Asimetría		1,221	,752
		Curtosis		2,747	1,481
	RES-FOS-15D	Media		,38378	,100559
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,15189	
			Límite superior	,61567	
		Media recortada al 5%		,36536	
		Mediana		,35700	
		Varianza		,091	
		Desviación estándar		,301677	
		Mínimo		,067	
		Máximo		1,032	
		Rango		,965	
		Rango intercuartil		,420	
Asimetría			1,253	,717	
Curtosis			1,815	1,400	

% Área colocalización	RES-FOS-6H	Media		6,29838	,716254
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	4,60470	
			Límite superior	7,99205	
		Media recortada al 5%		6,35442	
		Mediana		6,71150	
		Varianza		4,104	
		Desviación estándar		2,025873	
		Mínimo		3,148	
		Máximo		8,440	
		Rango		5,292	
		Rango intercuartil		3,909	
		Asimetría		-,748	,752
		Curtosis		-,913	1,481
	RES-FOS-5D	Media		,18238	,043257
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,08009		
		Límite superior	,28466		
	Media recortada al 5%		,17786		
	Mediana		,16550		
	Varianza		,015		
	Desviación estándar		,122350		
Mínimo		,012			
Máximo		,434			
Rango		,422			
Rango intercuartil		,118			
Asimetría		1,108	,752		
Curtosis		2,603	1,481		
RES-FOS-15D	Media		,32856	,094212	
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,11130			
	Límite superior	,54581			
Media recortada al 5%		,30851			
Mediana		,22600			
Varianza		,080			
Desviación estándar		,282637			
Mínimo		,062			
Máximo		,956			
Rango		,894			
Rango intercuartil		,359			
Asimetría		1,532	,717		
Curtosis		2,403	1,400		

% FOS -TH colocalizado	RES-FOS-6H	Media		93,7016	,71625	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	92,0080		
			Límite superior	95,3953		
		Media recortada al 5%		93,6456		
		Mediana		93,2885		
		Varianza		4,104		
		Desviación estándar		2,02587		
		Mínimo		91,56		
		Máximo		96,85		
		Rango		5,29		
		Rango intercuartil		3,91		
		Asimetría		,748	,752	
		Curtosis		-,913	1,481	
		RES-FOS-5D	Media		99,8176	,04326
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	99,7153		
			Límite superior	99,9199		
	Media recortada al 5%			99,8221		
	Mediana			99,8345		
	Varianza			,015		
	Desviación estándar			,12235		
Mínimo			99,57			
Máximo			99,99			
Rango			,42			
Rango intercuartil			,12			
Asimetría			-1,108	,752		
Curtosis			2,603	1,481		
	RES-FOS-15D	Media		99,6714	,09421	
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	99,4542			
		Límite superior	99,8887			
Media recortada al 5%			99,6915			
Mediana			99,7740			
Varianza			,080			
Desviación estándar			,28264			
Mínimo			99,04			
Máximo			99,94			
Rango			,89			
Rango intercuartil			,36			
Asimetría			-1,532	,717		
Curtosis			2,403	1,400		

ANEXO VII. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA_LOCUS COERULEUS (CON FORMALIN TEST)

Descriptivos

Condición Experimental			Estadístico	Error estándar	
% Área TH	6H DOLOR	Media	49,92680	3,582921	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	41,82167	
			Límite superior	58,03193	
		Media recortada al 5%	49,38333		
		Mediana	47,72050		
		Varianza	128,373		
		Desviación estándar	11,33019		
		Mínimo	37,079		
		Máximo	72,557		
		Rango	35,478		
		Rango intercuartil	17,547		
		Asimetría	,966	,687	
		Curtosis	,249	1,334	
		5D DOLOR	Media	49,91570	2,873835
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	43,41463
	Límite superior			56,41677	
	Media recortada al 5%		49,76744		
	Mediana		46,03850		
	Varianza		82,589		
	Desviación estándar		9,087866		
	Mínimo		37,500		
	Máximo		65,000		
	Rango		27,500		
	Rango intercuartil		14,971		
	Asimetría		,458	,687	
	Curtosis		-1,174	1,334	
	15D DOLOR		Media	47,27710	2,416524
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	41,81054
		Límite superior		52,74366	
		Media recortada al 5%	47,48011		
		Mediana	46,95000		
		Varianza	58,396		
		Desviación estándar	7,641719		
Mínimo		31,900			
Máximo		59,000			
Rango		27,100			
Rango intercuartil		9,596			
Asimetría		-,556	,687		
Curtosis		,736	1,334		

% Área FOS	6H DOLOR	Media		6,75120	,475211
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	5,67620	
			Límite superior	7,82620	
		Media recortada al 5%		6,77317	
		Mediana		6,94800	
		Varianza		2,258	
		Desviación estándar		1,502750	
		Mínimo		4,295	
		Máximo		8,812	
		Rango		4,517	
	Rango intercuartil		2,272		
	Asimetría		-,319	,687	
	Curtosis		-,527	1,334	
	5D DOLOR	Media		,26410	,106869
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,02234	
			Límite superior	,50586	
		Media recortada al 5%		,23228	
		Mediana		,10400	
		Varianza		,114	
		Desviación estándar		,337951	
Mínimo			,009		
Máximo			1,092		
Rango			1,083		
Rango intercuartil		,393			
Asimetría		1,879	,687		
Curtosis		3,799	1,334		
15D DOLOR	Media		,12430	,054737	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,00048		
		Límite superior	,24812		
	Media recortada al 5%		,10633		
	Mediana		,05800		
	Varianza		,030		
	Desviación estándar		,173093		
	Mínimo		,006		
	Máximo		,566		
	Rango		,560		
Rango intercuartil		,164			
Asimetría		2,212	,687		
Curtosis		5,143	1,334		

% Área colocalización	6H DOLOR	Media		5,67370	,414997	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	4,73491		
			Límite superior	6,61249		
		Media recortada al 5%		5,65411		
		Mediana		5,50000		
		Varianza		1,722		
		Desviación estándar		1,312337		
		Mínimo		4,000		
		Máximo		7,700		
		Rango		3,700		
		Rango intercuartil		2,363		
		Asimetría		,286	,687	
		Curtosis		-1,315	1,334	
		5D DOLOR	Media		,19560	,082017
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,01007	
Límite superior	,38113					
Media recortada al 5%			,17567			
Mediana			,08850			
Varianza			,067			
Desviación estándar			,259360			
Mínimo			,000			
Máximo			,750			
Rango			,750			
Rango intercuartil			,419			
Asimetría			1,339	,687		
Curtosis			,891	1,334		
15D DOLOR	Media			,10820	,052209	
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	-,00990		
		Límite superior	,22630			
	Media recortada al 5%		,09056			
	Mediana		,05200			
	Varianza		,027			
	Desviación estándar		,165099			
	Mínimo		,000			
	Máximo		,534			
	Rango		,534			
	Rango intercuartil		,156			
	Asimetría		2,285	,687		
	Curtosis		5,504	1,334		

% DE FOS -TH COLOCALIZA	6H DOLOR	Media		85,2470	4,23452
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	75,6679	
			Límite superior	94,8261	
		Media recortada al 5%		86,0800	
		Mediana		89,5500	
		Varianza		179,311	
		Desviación estándar		13,39071	
		Mínimo		56,70	
		Máximo		98,80	
		Rango		42,10	
		Rango intercuartil		13,79	
		Asimetría		-1,431	,687
		Curtosis		1,364	1,334
	5D DOLOR	Media		55,6635	13,71346
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	24,6415	
			Límite superior	86,6855	
		Media recortada al 5%		56,2928	
		Mediana		62,1150	
		Varianza		1880,589	
		Desviación estándar		43,36576	
Mínimo			,00		
Máximo			100,00		
Rango			100,00		
Rango intercuartil			98,21		
Asimetría			-,361	,687	
Curtosis			-1,748	1,334	
15D DOLOR	Media		64,1480	11,14116	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	38,9449		
		Límite superior	89,3511		
	Media recortada al 5%		65,7200		
	Mediana		72,6500		
	Varianza		1241,255		
	Desviación estándar		35,23144		
	Mínimo		,00		
	Máximo		100,00		
	Rango		100,00		
	Rango intercuartil		63,14		
	Asimetría		-,687	,687	
	Curtosis		-,870	1,334	

ANEXO VIII. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA_A5 (SIN FORMALIN TEST)

Descriptivos

Condición Experimental			Estadístico	Error estándar	
% Área TH	RES-FOS-6H	Media	1,25114	,233794	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,67907	
			Límite superior	1,82322	
		Media recortada al 5%	1,25005		
		Mediana	1,00000		
		Varianza	,383		
		Desviación estándar	,618562		
		Mínimo	,382		
		Máximo	2,140		
		Rango	1,758		
		Rango intercuartil	1,000		
		Asimetría	,412	,794	
		Curtosis	-,551	1,587	
		RES-FOS-5D	Media	1,85375	,677853
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	-,30348
	Límite superior			4,01098	
	Media recortada al 5%		1,84267		
	Mediana		1,75400		
	Varianza		1,838		
	Desviación estándar		1,355707		
	Mínimo		,464		
	Máximo		3,443		
	Rango		2,979		
	Rango intercuartil		2,594		
	Asimetría		,272	1,014	
	Curtosis		-2,933	2,619	
	RES-FOS-15D		Media	2,04933	,243583
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,42318
		Límite superior		2,67548	
		Media recortada al 5%	2,05898		
		Mediana	2,26350		
		Varianza	,356		
		Desviación estándar	,596653		
Mínimo		1,263			
Máximo		2,662			
Rango		1,399			
Rango intercuartil		1,167			
Asimetría		-,599	,845		
Curtosis		-1,924	1,741		

% Área FOS	RES-FOS-6H	Media		,46029	,089984	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,24010		
			Límite superior	,68047		
		Media recortada al 5%		,45526		
		Mediana		,43600		
		Varianza		,057		
		Desviación estándar		,238075		
		Mínimo		,122		
		Máximo		,889		
		Rango		,767		
		Rango intercuartil		,270		
		Asimetría		,690	,794	
		Curtosis		1,509	1,587	
		RES-FOS-5D	Media		,13175	,043632
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	-,00711	
	Límite superior			,27061		
	Media recortada al 5%			,13378		
	Mediana			,15000		
	Varianza			,008		
	Desviación estándar			,087263		
	Mínimo			,017		
	Máximo			,210		
	Rango			,193		
	Rango intercuartil			,164		
	Asimetría			-,864	1,014	
	Curtosis			-,794	2,619	
	RES-FOS-15D		Media		,10950	,019483
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,05942	
		Límite superior		,15958		
		Media recortada al 5%		,10967		
		Mediana		,11250		
		Varianza		,002		
		Desviación estándar		,047723		
		Mínimo		,050		
		Máximo		,166		
		Rango		,116		
		Rango intercuartil		,101		
		Asimetría		-,140	,845	
		Curtosis		-1,742	1,741	

% Área COLOCALIZACIÓ N	RES-FOS-6H	Media		,20871	,042196	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,10546		
			Límite superior	,31196		
		Media recortada al 5%		,20413		
		Mediana		,16000		
		Varianza		,012		
		Desviación estándar		,111640		
		Mínimo		,100		
		Máximo		,400		
		Rango		,300		
		Rango intercuartil		,182		
		Asimetría		,880	,794	
		Curtosis		-,422	1,587	
		RES-FOS-5D	Media		,05650	,019453
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	-,00541	
	Límite superior			,11841		
	Media recortada al 5%			,05617		
	Mediana			,05350		
	Varianza			,002		
	Desviación estándar			,038906		
	Mínimo			,013		
	Máximo			,106		
	Rango			,093		
	Rango intercuartil			,075		
	Asimetría			,422	1,014	
	Curtosis			,482	2,619	
	RES-FOS-15D		Media		,03533	,016619
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	-,00739	
		Límite superior		,07805		
		Media recortada al 5%		,03381		
		Mediana		,01800		
		Varianza		,002		
		Desviación estándar		,040707		
		Mínimo		,002		
		Máximo		,096		
		Rango		,094		
		Rango intercuartil		,079		
		Asimetría		,887	,845	
		Curtosis		-1,363	1,741	

ANEXO IX. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA_A5 (CON FORMALIN TEST)

Descriptivos

Condición Experimental			Estadístico	Error estándar	
% Área TH	RES-FOS-FT-6H	Media	2,20000	,489898	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,83983	
			Límite superior	3,56017	
		Media recortada al 5%		2,16667	
		Mediana		2,00000	
		Varianza		1,200	
		Desviación estándar		1,095445	
		Mínimo		1,000	
		Máximo		4,000	
		Rango		3,000	
	Rango intercuartil		1,500		
	Asimetría		1,293	,913	
	Curtosis		2,917	2,000	
	RES-FOS-FT-5D	Media	2,71429	,359516	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,83458	
			Límite superior	3,59399	
		Media recortada al 5%		2,68254	
		Mediana		2,00000	
		Varianza		,905	
		Desviación estándar		,951190	
Mínimo		2,000			
Máximo		4,000			
Rango		2,000			
Rango intercuartil		2,000			
Asimetría		,764	,794		
Curtosis		-1,687	1,587		
RES-FOS-FT-15D	Media	2,32857	,375889		
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,40880		
		Límite superior	3,24834		
	Media recortada al 5%		2,34841		
	Mediana		3,00000		
	Varianza		,989		
	Desviación estándar		,994509		
	Mínimo		1,000		
	Máximo		3,300		
	Rango		2,300		
Rango intercuartil		2,000			
Asimetría		-,688	,794		
Curtosis		-1,706	1,587		

% Área FOS	RES-FOS-FT-6H	Media		1,01600	,073865	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,81092		
			Límite superior	1,22108		
		Media recortada al 5%		1,00667		
		Mediana		,98000		
		Varianza		,027		
		Desviación estándar		,165167		
		Mínimo		,900		
		Máximo		1,300		
		Rango		,400		
		Rango intercuartil		,250		
		Asimetría		1,825	,913	
		Curtosis		3,538	2,000	
		RES-FOS-FT-5D	Media		,13071	,040977
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,03045	
Límite superior	,23098					
Media recortada al 5%			,12829			
Mediana			,10000			
Varianza			,012			
Desviación estándar			,108414			
Mínimo			,005			
Máximo			,300			
Rango			,295			
Rango intercuartil			,190			
Asimetría			,314	,794		
Curtosis			-,903	1,587		
RES-FOS-FT-15D	Media			,11714	,022542	
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	,06198		
		Límite superior	,17230			
	Media recortada al 5%		,11627			
	Mediana		,10000			
	Varianza		,004			
	Desviación estándar		,059642			
	Mínimo		,050			
	Máximo		,200			
	Rango		,150			
	Rango intercuartil		,130			
	Asimetría		,786	,794		
	Curtosis		-,982	1,587		

% Área Colocalización	RES-FOS-FT-6H	Media		,91800	,094995	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,65425		
			Límite superior	1,18175		
		Media recortada al 5%		,90389		
		Mediana		,80000		
		Varianza		,045		
		Desviación estándar		,212415		
		Mínimo		,800		
		Máximo		1,290		
		Rango		,490		
		Rango intercuartil		,295		
		Asimetría		2,023	,913	
		Curtosis		4,115	2,000	
		RES-FOS-FT-5D	Media		,06571	,017438
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,02305	
Límite superior	,10838					
Media recortada al 5%			,06746			
Mediana			,09000			
Varianza			,002			
Desviación estándar			,046136			
Mínimo			,000			
Máximo			,100			
Rango			,100			
Rango intercuartil			,100			
Asimetría			-1,027	,794		
Curtosis			-1,096	1,587		
RES-FOS-FT-15D	Media			,03814	,016066	
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	-,00117		
		Límite superior	,07745			
	Media recortada al 5%		,03683			
	Mediana		,02000			
	Varianza		,002			
	Desviación estándar		,042507			
	Mínimo		,000			
	Máximo		,100			
	Rango		,100			
	Rango intercuartil		,087			
	Asimetría		,708	,794		
	Curtosis		-1,540	1,587		

ANEXO X. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA_A7 (SIN FORMALIN TEST)

Descriptivos

Condición Experimental		Estadístico	Error estándar				
% ÁreaTH	RES-FOS-6H	Media	3,71010	,363472			
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	2,88787			
			Límite superior	4,53233			
		Media recortada al 5%	3,70683				
		Mediana	3,76650				
		Varianza	1,321				
		Desviación estándar	1,149399				
		Mínimo	1,868				
		Máximo	5,611				
		Rango	3,743				
		Rango intercuartil	1,904				
		Asimetría	-,145	,687			
		Curtosis	-,500	1,334			
		RES-FOS-5D	RES-FOS-5D	Media	3,48117	,529981	
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	2,11881	
					Límite superior	4,84353	
Media recortada al 5%	3,44141						
Mediana	3,16350						
Varianza	1,685						
Desviación estándar	1,298182						
Mínimo	2,122						
Máximo	5,556						
Rango	3,434						
Rango intercuartil	2,269						
Asimetría	,803			,845			
Curtosis	-,391			1,741			
RES-FOS-15D	RES-FOS-15D			Media	3,45082	,600399	
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	2,11305	
					Límite superior	4,78859	
		Media recortada al 5%	3,23335				
		Mediana	2,87100				
		Varianza	3,965				
		Desviación estándar	1,991298				
		Mínimo	1,870				
		Máximo	8,946				
		Rango	7,076				
		Rango intercuartil	,461				
		Asimetría	2,526	,661			
		Curtosis	6,662	1,279			

% Área FOS	RES-FOS-6H	Media		,83700	,050204	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,72343		
			Límite superior	,95057		
		Media recortada al 5%		,83239		
		Mediana		,78800		
		Varianza		,025		
		Desviación estándar		,158760		
		Mínimo		,651		
		Máximo		1,106		
		Rango		,455		
		Rango intercuartil		,278		
		Asimetría		,569	,687	
		Curtosis		-1,170	1,334	
		RES-FOS-5D	Media		,20517	,039555
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,10349	
				Límite superior	,30685	
			Media recortada al 5%		,20630	
			Mediana		,21200	
			Varianza		,009	
Desviación estándar			,096890			
Mínimo			,066			
Máximo			,324			
Rango			,258			
Rango intercuartil			,187			
Asimetría			-,291	,845		
Curtosis			-,979	1,741		
RES-FOS-15D	Media			,22291	,035251	
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	,14436		
			Límite superior	,30145		
	Media recortada al 5%			,21312		
	Mediana			,16200		
	Varianza			,014		
	Desviación estándar		,116915			
	Mínimo		,122			
	Máximo		,500			
	Rango		,378			
	Rango intercuartil		,165			
	Asimetría		1,584	,661		
	Curtosis		2,181	1,279		

% Área Colocalización	RES-FOS-6H	Media		,53490	,077217
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,36022	
			Límite superior	,70958	
		Media recortada al 5%		,53267	
		Mediana		,60700	
		Varianza		,060	
		Desviación estándar		,244183	
		Mínimo		,185	
		Máximo		,925	
		Rango		,740	
	Rango intercuartil		,439		
	Asimetría		-,288	,687	
	Curtosis		-,794	1,334	
	RES-FOS-5D	Media		,11083	,027870
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,03919	
			Límite superior	,18248	
		Media recortada al 5%		,10998	
		Mediana		,11200	
		Varianza		,005	
		Desviación estándar		,068268	
Mínimo			,034		
Máximo			,203		
Rango			,169		
Rango intercuartil		,135			
Asimetría		,121	,845		
Curtosis		-1,714	1,741		
RES-FOS-15D	Media		,10727	,031352	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,03742		
		Límite superior	,17713		
	Media recortada al 5%		,10319		
	Mediana		,08100		
	Varianza		,011		
	Desviación estándar		,103982		
	Mínimo		,003		
	Máximo		,285		
	Rango		,282		
Rango intercuartil		,165			
Asimetría		,877	,661		
Curtosis		-,426	1,279		

ANEXO XI. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA_A7 (CON FORMALIN TEST)

Descriptivos

Condición Experimental			Estadístico	Error estándar	
% Área TH	RES-FOS-FT-6H	Media	4,70000	,994987	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,53351	
			Límite superior	7,86649	
		Media recortada al 5%	4,73333		
		Mediana	5,00000		
		Varianza	3,960		
		Desviación estándar	1,989975		
		Mínimo	2,000		
		Máximo	6,800		
		Rango	4,800		
		Rango intercuartil	3,600		
		Asimetría	-,877	1,014	
		Curtosis	1,934	2,619	
		RES-FOS-FT-5D	Media	4,50000	,866025
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,74392
	Límite superior			7,25608	
	Media recortada al 5%		4,44444		
	Mediana		4,00000		
	Varianza		3,000		
	Desviación estándar		1,732051		
	Mínimo		3,000		
	Máximo		7,000		
	Rango		4,000		
	Rango intercuartil		3,000		
	Asimetría		1,540	1,014	
	Curtosis		2,889	2,619	
	RES-FOS-FT-15D		Media	4,20000	,800000
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	1,97884
		Límite superior		6,42116	
		Media recortada al 5%	4,16667		
		Mediana	4,00000		
		Varianza	3,200		
		Desviación estándar	1,788854		
Mínimo		2,000			
Máximo		7,000			
Rango		5,000			
Rango intercuartil		2,500			
Asimetría		,821	,913		
Curtosis		2,363	2,000		

% Área FOS	RES-FOS-FT-6H	Media		,77325	,137478	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,33573		
			Límite superior	1,21077		
		Media recortada al 5%		,76622		
		Mediana		,71000		
		Varianza		,076		
		Desviación estándar		,274956		
		Mínimo		,512		
		Máximo		1,161		
		Rango		,649		
		Rango intercuartil		,492		
		Asimetría		1,280	1,014	
		Curtosis		2,422	2,619	
		RES-FOS-FT-5D	Media		,16875	,052652
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,00119	
				Límite superior	,33631	
			Media recortada al 5%		,16806	
Mediana			,16250			
Varianza			,011			
Desviación estándar			,105304			
Mínimo			,050			
Máximo			,300			
Rango			,250			
Rango intercuartil			,203			
Asimetría			,315	1,014		
Curtosis			-,006	2,619		
RES-FOS-FT-15D	Media			,11640	,010438	
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	,08742		
			Límite superior	,14538		
	Media recortada al 5%			,11544		
	Mediana		,10000			
	Varianza		,001			
	Desviación estándar		,023341			
	Mínimo		,100			
	Máximo		,150			
	Rango		,050			
	Rango intercuartil		,041			
	Asimetría		,934	,913		
	Curtosis		-1,469	2,000		

% Área Colocalización	RES-FOS-FT-6H	Media		,74350	,115442		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		,37611		
			Límite superior		1,11089		
		Media recortada al 5%		,73867			
		Mediana		,70000			
		Varianza		,053			
		Desviación estándar		,230883			
		Mínimo		,511			
		Máximo		1,063			
		Rango		,552			
		Rango intercuartil		,414			
		Asimetría		1,077	1,014		
		Curtosis		2,160	2,619		
		RES-FOS-FT-5D	Media		,14075	,054774	
			95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior		-,03357	
				Límite superior		,31507	
			Media recortada al 5%		,13694		
Mediana			,10650				
Varianza			,012				
Desviación estándar			,109549				
Mínimo			,050				
Máximo			,300				
Rango			,250				
Rango intercuartil			,190				
Asimetría			1,625	1,014			
Curtosis			3,029	2,619			
RES-FOS-FT-15D	Media			,08220	,026997		
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior		,00724		
			Límite superior		,15716		
	Media recortada al 5%			,08356			
	Mediana		,10000				
	Varianza		,004				
	Desviación estándar		,060367				
	Mínimo		,000				
	Máximo		,140				
	Rango		,140				
	Rango intercuartil		,116				
	Asimetría		-,598	,913			
	Curtosis		-1,810	2,000			

ANEXO XII. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA_LÁMINAS I Y II DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL TRAS APLICACIÓN DE FORMALIN TEST

Descriptivos

Condición experimental			Estadístico	Error estándar	
Células fosopositivas	RES-FOS-FT-6H	Media	13,7692	2,22870	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	9,1791	
			Límite superior	18,3593	
		Media recortada al 5%	13,5342		
		Mediana	12,5000		
		Varianza	129,145		
		Desviación estándar	11,36418		
		Mínimo	,00		
		Máximo	32,00		
		Rango	32,00		
		Rango intercuartil	21,25		
		Asimetría	,156	,456	
		Curtosis	-1,750	,887	
	RES-FOS-FT-5D	Media	17,2500	2,59825	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	11,8751	
			Límite superior	22,6249	
		Media recortada al 5%	17,0093		
		Mediana	18,0000		
		Varianza	162,022		
		Desviación estándar	12,72878		
		Mínimo	1,00		
		Máximo	39,00		
		Rango	38,00		
		Rango intercuartil	26,00		
		Asimetría	,054	,472	
		Curtosis	-1,679	,918	
	RES-FOS-FT-15D	Media	15,9500	2,82515	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	10,0369	
			Límite superior	21,8631	
		Media recortada al 5%	15,7222		
		Mediana	13,5000		
		Varianza	159,629		
		Desviación estándar	12,63443		
Mínimo		2,00			
Máximo		34,00			
Rango		32,00			
Rango intercuartil		24,50			
Asimetría		,198	,512		
Curtosis		-1,830	,992		

