

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



**“ESTUDIO CONDUCTUAL, ELECTROFISIOLÓGICO E
INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MODELO DE FIBROMIALGIA
INDUCIDO POR RESERPINA EN RATA”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

ARANTXA BLASCO SERRA

Dirigida por

Prof. Dr. Alfonso Amador Valverde Navarro

Valencia 2016

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Facultad de Medicina y Odontología



**“ESTUDIO CONDUCTUAL, ELECTROFISIOLÓGICO E
INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MODELO DE FIBROMIALGIA
INDUCIDO POR RESERPINA EN RATA”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

ARANTXA BLASCO SERRA

Dirigida por

Dr. Alfonso Amador Valverde Navarro

2016

**“ESTUDIO CONDUCTUAL, ELECTROFISIOLÓGICO E
INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MODELO DE
FIBROMIALGIA INDUCIDO POR RESERPINA EN
RATA”**

Trabajo de investigación que presenta

ARANTXA BLASCO SERRA

Para optar al grado de

**Doctor
por la Universidad de Valencia.**

Dirigido por el doctor

Alfonso Amador Valverde Navarro
Profesor Titular de Universidad

Realizado en el:

**Departamento
de Anatomía y Embriología Humana**
Universidad de Valencia

**Mayo 2016
VALENCIA**



Alfonso Amador Valverde Navarro, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Valencia

HACE CONSTAR:

Que Arantxa Blasco Serra ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral “ESTUDIO CONDUCTUAL, ELECTROFISIOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DEL MODELO DE FIBROMIALGIA INDUCIDO POR RESERPINA EN RATA”

Y para que así conste y surta efectos oportunos, firmo la presente en Valencia a 9 de Mayo de 2016.

Alfonso Amador Valverde Navarro

"Justo aquí, ahora, en este preciso momento, no tienes por qué 'resolver' el resto de tu vida, no importa lo que digan los demás. En este momento no necesitas todas las respuestas, vendrán a su tiempo, o no, o quizás aquella pregunta innecesaria simplemente se desvanecerá. No hay prisa. La vida no tiene prisa. Sé como las estaciones del año. El invierno no está tratando de convertirse en verano. A la primavera no le urge ser otoño. La misma hierba crece a su propio ritmo. Las elecciones que vayan a hacerse se harán y en eso no tienes ninguna otra opción. Las decisiones que se tomen se tomarán, los acontecimientos se irán revelando, sin embargo, en este momento tal vez no necesites saber las soluciones o los resultados o cuál es la mejor manera de proceder. Tal vez ese no saber es un huésped bienvenido al banquete de la vida, la apertura a todas las posibilidades. Tal vez incluso la confusión pueda llegar a descansar aquí. Y así, en lugar de querer 'arreglar' nuestras vidas, en lugar de tratar de resolver cuidadosamente lo imposible y así completar esa historia épica de un ficticio 'yo', simplemente nos relajamos en el absoluto no saber, desentrañando todo en el cálido abrazo del misterio, sumergiéndonos profundamente en el momento, saboreándolo plenamente con toda su singularidad y grandeza. Y entonces, tal vez sin ningún esfuerzo, sin lucha ni tensión, sin que 'tú' tengas que involucrarte en nada, las verdaderas respuestas surgirán dulcemente en su propio tiempo."

Jeff Foster

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, el haberme facilitado en todo momento el uso de su infraestructura, sin la que hubiera sido imposible llevar a cabo este trabajo.

La realización de esta tesis ha descrito una etapa de mi vida de aprendizaje y de crecimiento personal y profesional. He reído, he llorado, me he desesperado,...pero siempre con la mejor compañía. Tengo tanto que agradecer y a tantas personas...

Mi primer agradecimiento es sin duda a mi director, Alfonso. Mi director, mi mentor y mi guía. Gracias por haberme dado la oportunidad de vivir contigo y con mis compañeros esta experiencia. Siempre has confiado en mí y me has apoyado. Me abriste las puertas a la investigación y a la docencia, me has enseñado a ser una buena investigadora y me has enseñado el mundo de la anatomía, que me encanta. Gracias, eres el mejor maestro que he podido tener.

Respecto a mis compañeros, qué puedo decir, inmejorables.

Ali, mi primera compañera de investigación, me enseñaste todo lo que necesitaba saber para trabajar en el laboratorio y siempre cuidaste de mí. Gracias.

Eva, mi pequeña *padawan*, ha sido un placer compartir mis conocimientos contigo y, más aún, aprender tanto de ti. Hemos pasado tantas *penurias* en el tiempo que llevamos juntas...pero sin duda los buenos momentos las superan. Cuánto nos hemos reído!! Gracias por estar ahí, te has convertido en un gran apoyo en mi vida, y esto no es más que el principio.

Mis compañeros de GESADA, mis brillantes futuros médicos, Ferni y Francesc, no cambio nada de lo que he vivido con vosotros. Ferni, la de horas que nos hemos pasado con las ratas, qué barbaridad! Gracias, porque cada minuto que he pasado contigo me has hecho reír, y en momentos cruciales, sin tu apoyo no sé si hubiera podido seguir. Francesc, “coincidente laboral”, que sepas que para mí eres un amigo, aunque te pese. Gracias por haber estado ahí, por tu rigurosidad al trabajar, por tomarte tan en serio la investigación, por tu ayuda. Me encanta haberte conocido.

Mis compañeros predoctorales, Sergio, Aina, Ceci. Desde el máster que no os pierdo de vista, Aina, a ti más! Me encanta haber vivido con vosotros la etapa del doctorado, haber disfrutado y sufrido juntos las aventuras de la investigación. Gracias por las grandes conversaciones, los consejos, el apoyo, los ánimos, los cafés, las cervezas, las risas, la ayuda... Gracias por estar ahí, y...lo hemos conseguido!

Vicent, Ana, Joana. Sois grandes profesionales y mejores personas. He aprendido muchísimo a vuestro lado, no sólo a nivel profesional, también a nivel personal. Ana, a ti en particular tengo que agradecerte que el estudio del sueño haya salido adelante, sin ti no habría sido posible. Y también te agradezco que hayas compartido conmigo momentos de la preciosa Paula que me han alegrado el día!

Hernán, tengo tantas cosas que agradecerte. Eres el mejor novio, compañero y amigo que podría tener. Gracias por apoyarme siempre y por haber estado ahí en todo y para todo, en los momentos buenos y sobretodo en los malos, que no han sido pocos. Sin tu apoyo, tu comprensión, tus ánimos y tu amor, todo habría sido más difícil. Gracias cariño, te quiero.

Mi familia, única y peculiar. Gracias por haber sido vosotros, no os cambiaría por nada. Me habéis enseñado a trabajar duro y a no rendirme, a pelear por mis sueños y a seguir adelante, y me habéis apoyado siempre en mi vida, aunque a veces no haya sido fácil. Mamá, papá, Jessi, os quiero.

Gracias.

ÍNDICE

0.1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. DEFINICIÓN DEL SÍNDROME DE FIBROMIALGIA	3
1.2. EPIDEMIOLOGÍA E IMPORTANCIA SOCIO-ECONÓMICA DEL SÍNDROME DE FIBROMIALGIA.....	6
1.3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS	8
1.4. DESCRIPCIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA	11
1.4.1. <i>Síntoma principal: alteraciones en el procesamiento del dolor</i>	12
1.4.1.1. Bases anatómicas del procesamiento del dolor	12
1.4.1.2. Sistema de Control Endógeno de la Transmisión Nociceptiva	24
1.4.1.3. Alteraciones del procesamiento del dolor en el síndrome de fibromialgia	30
1.4.2. <i>Principales síntomas comórbidos</i>	35
1.4.2.1. Síntomas depresivos	36
1.4.2.1.1. Bases anatómicas de la depresión	37
1.4.2.1.2. Alteraciones depresivas en pacientes con síndrome de fibromialgia.....	40
1.4.2.2. Alteraciones del sueño	43
1.4.2.2.1. Bases anatómicas del sueño y la vigilia.....	43
1.4.2.2.1.1. Circuitos reguladores de la vigilia	45
1.4.2.2.1.2. Circuitos reguladores del sueño no-REM	47
1.4.2.2.1.3. Circuitos reguladores del sueño REM	49
1.4.2.2.2. Alteraciones del sueño en pacientes con FMS	50
1.5. HIPÓTESIS SOBRE LA ETIOPATOGENIA DEL SÍNDROME DE FIBROMIALGIA	52
1.5.1. <i>Alteraciones periféricas</i>	53
1.5.2. <i>Alteraciones hormonales</i>	54
1.5.3. <i>Alteraciones monoaminérgicas</i>	54
1.6. TRATAMIENTOS ACTUALES	55
1.6.1. <i>Tratamientos farmacológicos</i>	55
1.6.1.1. Analgésicos	57
1.6.1.2. Antidepresivos	58
1.6.1.3. Anticonvulsivantes.....	59
1.6.2. <i>Tratamientos no farmacológicos</i>	59
1.6.2.1. Ejercicio físico	60
1.6.2.2. La terapia cognitivo- conductual (TCC) y los modelos psicoeducativos	61
1.6.2.3. Mindfulness	61
1.7. NECESIDAD DE AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DEL SÍNDROME DE FIBROMIALGIA	62
1.7.1. <i>Importancia de modelos animales en investigación</i>	62
1.7.2. <i>Modelos animales de fibromialgia</i>	64
1.7.3. <i>Modelo de fibromialgia inducido por reserpina</i>	66
1.7.3.1. Efecto de la reserpina	66
1.7.3.2. Características del modelo	68
1.7.3.3. Críticas al modelo	69
02. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	71
2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	73
2.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO	75
2.3. OBJETIVOS	76
2.3.1. <i>Objetivo general</i>	76
2.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	76

03. MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
3.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN	81
3.1.1. <i>Condiciones ambientales y de estabulación</i>	81
3.1.2. <i>Consideraciones éticas</i>	81
3.1.3. <i>Control del estado físico y criterios de punto final</i>	82
3.1.4. <i>Casuística</i>	84
3.1.4.1. Distribución de los animales para los distintos estudios	84
3.1.4.1.1. Animales para el estudio de los umbrales de dolor	84
3.1.4.1.2. Animales para el estudio de los síntomas depresivos	85
3.1.4.1.3. Animales para el estudio de las alteraciones del sueño	85
3.1.4.1.4. Animales para el estudio de inmunodetección de Fos	86
3.1.4.1.5. Resumen de la casuística del estudio	86
3.2. HABITUACIÓN Y HANDLING.....	86
3.2.1. <i>Habitación a las maniobras y aparatos en el estudio del dolor</i>	87
3.2.1.1. Habitación al Electrovonfrey Test	88
3.2.1.2. Habitación al Randall y Selitto Test	88
3.2.2. <i>Habitación a las maniobras y aparatos en el estudio de los síntomas depresivos</i>	89
3.2.3. <i>Habitación a las maniobras y aparatos en el estudio del sueño</i>	89
3.2.4. <i>Habitación para el estudio de la inmunodetección de Fos</i>	90
3.3. ADMINISTRACIÓN DE RESERPINA/ VEHÍCULO	90
3.3.1. <i>Preparación de la reserpina/ vehículo</i>	91
3.4. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	91
3.4.1. <i>Estudio del dolor</i>	91
3.4.1.1. Electrovonfrey Test.....	92
3.4.1.2. Randall y Selitto Test	93
3.4.2. <i>Estudio de síntomas depresivos</i>	94
3.4.2.1. Forced Swimming Test.....	94
3.4.2.2. Novelty-Suppressed Feeding Test	95
3.4.3. <i>Estudio del sueño</i>	97
3.4.3.1. Procedimiento quirúrgico.....	98
3.4.3.2. Sistema de registro y adquisición	100
3.4.3.3. Procedimiento experimental	102
3.4.3.4. Análisis del comportamiento durante el sueño.....	102
3.4.3.5. Análisis de señales	103
3.4.3.5.1. Análisis espectral (Transformada rápida de Fourier y espectro de potencia)	104
3.4.3.5.2. Análisis de tiempo-frecuencia (Análisis Wavelet).....	105
3.4.3.5.3. Análisis de la actividad muscular: EMG-RMS.....	107
3.4.3.5.4. Clasificación de las ventanas en los distintos estados de sueño y determinación de transiciones.....	107
3.4.4. <i>Estudio inmunohistoquímico</i>	108
3.4.4.1. Perfusión.....	108
3.4.4.2. Tratamiento del tejido tras su extracción.....	108
3.4.4.3. Inmunodetección de Fos	108
3.4.4.4. Análisis de imagen	109
3.4.5. <i>Análisis estadístico</i>	110
3.4.5.1. Análisis estadístico del estudio de dolor	110
3.4.5.2. Análisis estadístico del estudio de depresión	111
3.4.5.2.1. Análisis estadístico del Forced Swimming Test.....	111
3.4.5.2.2. Análisis estadístico del Novelty-Suppressed Feeding Test	112
3.4.5.3. Análisis estadístico del estudio del sueño	114
3.4.5.4. Análisis estadístico del estudio de Fos	116

04. RESULTADOS	119
4.1. RESULTADOS DE LAS MEDIDAS DE UMBRALES DE DOLOR.....	121
4.1.1. <i>Electrovonfrey Test</i>	121
4.1.2. <i>Randall y Selitto Test</i>	128
4.2. RESULTADOS DE LAS MEDIDAS DE SÍNTOMAS DEPRESIVOS.....	135
4.2.1. <i>Forced Swimming Test</i>	135
4.2.1.1. Fase de pretest.....	135
4.2.1.2. Fase de test.....	141
4.2.2. <i>Novelty-Suppressed Feeding Test</i>	147
4.2.2.1. Estudio del consumo de comida.....	147
4.2.2.2. Estudio de conducta durante el test.....	151
4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL SUEÑO.....	156
4.3.1. <i>Resultados de los aspectos conductuales del sueño</i>	156
4.3.2. <i>Resultados de los aspectos electrofisiológicos del sueño</i>	161
4.3.2.1. Proporción REM-SWS y transición entre estados.....	161
4.3.2.2. Ventanas con quietud eb el EMG.....	162
4.3.2.3. Correlación entre la potencia relativa de la banda theta y la amplitud del EMG.....	163
4.3.2.4. Análisis espectral: potencia relativa.....	164
4.3.2.5. Análisis <i>wavelet</i>	169
4.4. RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN DE FOS.....	182
4.4.1. <i>Dorsal Rafe (DR)</i>	182
4.4.2. <i>Locus Coeruleus (LC)</i>	186
4.4.3. <i>Área Tegmental Ventral (VTA)</i>	190
05. DISCUSIÓN	195
5.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LOS UMBRALES DE DOLOR.....	198
5.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LA SINTOMATOLOGÍA DEPRESIVA.....	207
5.3. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL SUEÑO.....	216
5.4. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE FOS.....	227
5.5. CONSIDERACIONES FINALES.....	232
06. CONCLUSIONES	237
07. BIBLIOGRAFÍA	241
08. ANEXOS	269

01

INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN DEL SÍNDROME DE FIBROMIALGIA

El síndrome de fibromialgia (FMS) es una enfermedad que se caracteriza principalmente por dolor muscular crónico generalizado o multifocal, de origen desconocido. Esta definición ha ido ampliándose en las últimas 2 décadas para incluir otras manifestaciones clínicas que co-existen en el FMS 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). La cantidad de síntomas que se integran en el FMS, lo convierten en una patología severamente incapacitante, lo que acarrea un gran impacto tanto a nivel personal, familiar y socio-económico (Wu et al., 2012).

El dolor en el FMS es variable, de forma que su ubicación e intensidad cambian con el tiempo y el curso de la enfermedad. Es el hallazgo típico y se caracteriza por un aumento de sensibilidad a la palpación como resultado de un descenso generalizado de los umbrales de dolor, sin anormalidad tisular o daño periférico que justifique tal sintomatología (Meeus y Nijs, 2006).

En efecto, los pacientes con fibromialgia presentan una disminución de los umbrales de dolor manifestados en forma de hiperalgesia (aumento anómalo de la sensación dolorosa) y/o alodinia (percepción de dolor ante estímulos mecánicos o térmicos que en condiciones normales no son dolorosos). Actualmente, se piensa que este procesamiento anormal del dolor es principalmente debido a la existencia de mecanismos de sensibilización central. De hecho, cada vez más autores incluyen el FMS dentro del grupo de los llamados *Síndromes de Sensibilización Central*, que también

incluye a otros como el síndrome de fatiga crónica, la dispepsia funcional, el síndrome de la Guerra del Golfo, la cistitis intersticial, el síndrome del colon irritable, la disfunción de la articulación temporomandibular, el dolor miofascial, el trastorno de estrés post-traumático o el síndrome de piernas inquietas (Chinn et al., 2016).

El término FMS es el último de los distintos nombres que, desde el siglo XIX, se han venido empleando ante aquellos casos de dolor crónico generalizado de naturaleza musculoesquelética sin causa identificada. Entre ellos han destacado las denominaciones: Puntos Sensibles, Dolor Muscular, Myitis, Fibrositis, Fibromiositis Nodular, Reumatismo Psicógeno, etc...

Todas ellas, sin embargo, hoy en día en desuso desde que en los años 90 la ACR (American College of Rheumatology) estableció unos criterios de clasificación basados en la existencia de dolor crónico generalizado y determinados “puntos dolorosos”, caracterizando el término FMS. Con ello, la 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 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 de FMS, unido todo ello al hecho de que parte de los síntomas del FMS 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 (Ehrlich, 2003; Gordon, 2003; Morris, 2004).

De hecho, algunos estudios posteriores han cuestionado la especificidad diagnóstica de los puntos dolorosos en la FM y varios estudios han señalado que estos puntos dolorosos pueden variar con el grado de estrés psicológico (Harden et al., 2007).

En respuesta a todas estas cuestiones, la ACR ha vuelto recientemente a publicar unos Nuevos Criterios Diagnósticos Preliminares de FMS (Wolfe et al., 2010), que han sido validados poco después (Wolfe et al., 2011), en los que se abandona el recuento de los puntos dolorosos, sustituido por unos cuestionarios que hacen innecesaria la exploración clínica.

Pese a la controversia que ha acompañado y todavía acompaña al FMS, 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.

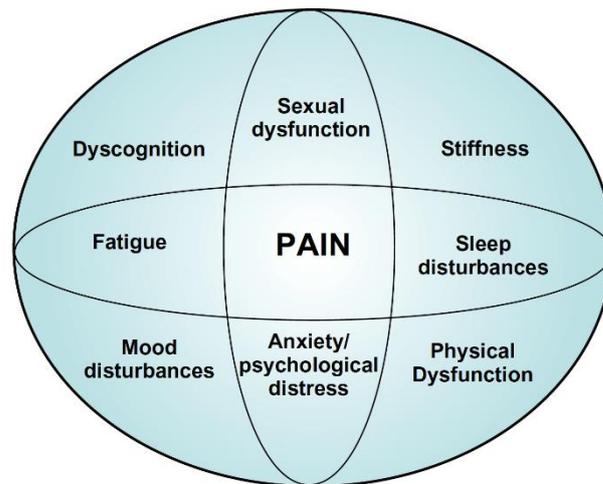


Figura 1.1.1. Principales alteraciones en el síndrome de fibromialgia. Tomado de Smith et al., 2010.

1.2. EPIDEMIOLOGÍA E IMPORTANCIA SOCIO-ECONÓMICA 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 (Smith et al., 2010; Wolfe et al., 2013).

Se calcula que en España existen unas 800.000 personas de la población adulta que padecen este síndrome (Cordero et al., 2010), lo que significa que afecta al 1-3% de la población mayor de 18 años. 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 (Branco et al., 2010; Carmona et al., 2001; Jones et al., 2015).

Aunque ésta ha sido descrita durante mucho tiempo mayor en mujeres, con un ratio aproximado de 13,9 mujeres por cada hombre según los criterios del ACR de 1990 (Branco et al., 2010; Harris y Clauw, 2008; Lindell et al., 2000), el desarrollo de criterios diagnósticos nuevos y más específicos para FMS 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 (Jones et al., 2015; Wolfe et al., 2013).

Este nuevo dato demuestra la importancia que la correcta definición y especificidad de los criterios diagnósticos tienen sobre los conocimientos de la patología y el porqué deben estar siempre en continua revisión atendiendo a las necesidades poblacionales y adaptándose a las realidades médicas.

Las personas con FMS, debido al dolor generalizado, la fatiga y otros síntomas que padecen, encuentran dificultades para realizar las tareas de la vida diaria. 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; Wu et al., 2012; Velasco et al., 2010; Oliveira y Costa, 2010; Liedberg et al., 2015; Russell, 2013).

A nivel socio-económico, las repercusiones son todavía mayores ya 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%, mucho mayor que en la población general que es de un 3,2%; los costes directos por FMS duplican a los generados por otras patologías; el 78,5% de los pacientes con FMS con trabajo remunerado, en algún momento habían 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, intervenciones quirúrgicas; por otro lado, los pacientes con FMS suelen ser tratados con varios 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: el estudio epidemiológico de FMS realizado en población canadiense, estima en el doble el consumo de fármacos y servicios de salud en pacientes con FMS respecto a controles sanos; el estudio de Wolfe et al. (1997) recoge en sus estudios 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 (Wu et al., 2012; Russell, 2013; Wolfe et al., 1997).

1.3. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Como ya hemos señalado, posiblemente uno de los principales factores que ha condicionado la aceptación del FMS como una entidad nosológica propia ha sido la falta de unos criterios diagnósticos claros y unánimemente aceptados.

El primer intento serio y relativamente exitoso se realizó en 1990: el American College of Rheumatology (ACR), basándose en un estudio multicéntrico realizado en EEUU y Canadá con 293 pacientes afectados de FMS y 265 controles con diferentes tipos de dolor crónico, 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 el dedo del explorador (Collado et al., 2002).

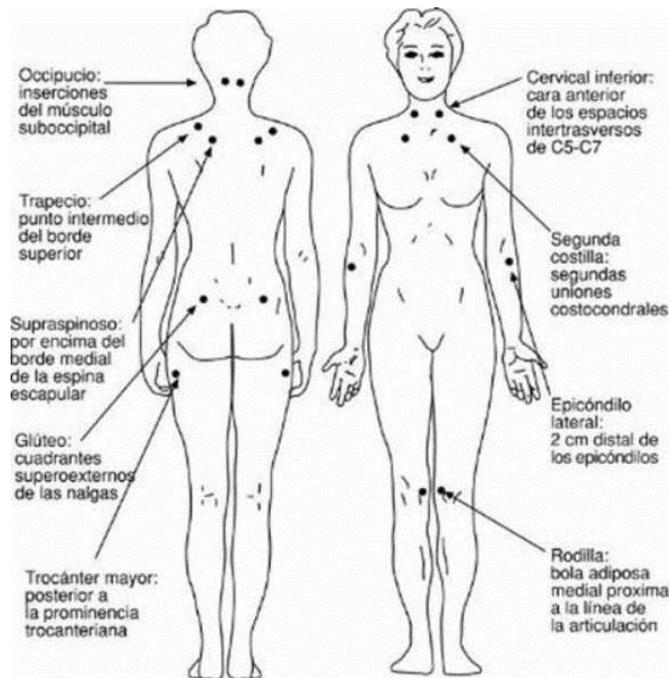


Figura 1.3.1. Mapa de puntos sensibles descritos en los criterios diagnósticos de la ACR en 1990. Tomado de Wolfe et al., 1990.

En 2010, sin embargo, 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 propio American College of Rheumatology (ACR) rediseñó sus criterios diagnósticos con el fin de hacer frente a determinadas realidades (Wolfe et al., 2010). En primer lugar, cada vez era más evidente que 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 ha sido normalmente basado en los síntomas. En segundo lugar, la importancia de los síntomas que no habían sido examinados ni considerados en los criterios de clasificación de 1990 de la ACR (fatiga, síntomas cognitivos, 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 definida 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 puntos sensibles, haciendo así posible el estudio del FMS en investigación clínica. Los nuevos criterios del ACR incluyen:

- 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. Este índice puede tener una puntuación de 0 a 19.
- Una escala de severidad de síntomas (*Symptom Severity Score, SS*), en el que el paciente debe indicar del 0 al 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. Además, 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.

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 de FMS establecidos por el ACR en 2010. Tomado de Wolfe et al., 2013.

Estos criterios diagnósticos de FMS se satisfacen si se cumplen las 3 condiciones de severidad de síntomas ($SS \geq 5$ (Tipo A) o el WPI es 3-6 y la $SS \geq 9$ (Tipo B), (2) los síntomas han estado presentes en una intensidad similar durante al menos 3 meses, y (3) el paciente no tiene un trastorno que pueda explicar el dolor (Wolfe et al., 2013).

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 permite una mayor exploración de las características y distribución de la sintomatología asociada (Wolfe et al., 2013).

1.4. DESCRIPCIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA

El dolor es el principal síntoma del FMS. Es un dolor crónico generalizado, de predominio musculoesquelético. Junto al dolor, el interés por el estudio de los síntomas comórbidos cobra cada vez más importancia 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). De entre estos síntomas, destacan las alteraciones en el estado de ánimo, principalmente síntomas depresivos, y las alteraciones del sueño, incluidas en los nuevos criterios diagnósticos como sueño no reparador (Chinn et al., 2016).

1.4.1. Síntoma principal: Alteraciones en el procesamiento del dolor

1.4.1.1. Bases anatómicas del procesamiento del dolor

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).

Los receptores encargados de recoger la información de naturaleza dolorosa o nociceptores fueron definidos por Sherrington, en 1906, 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).

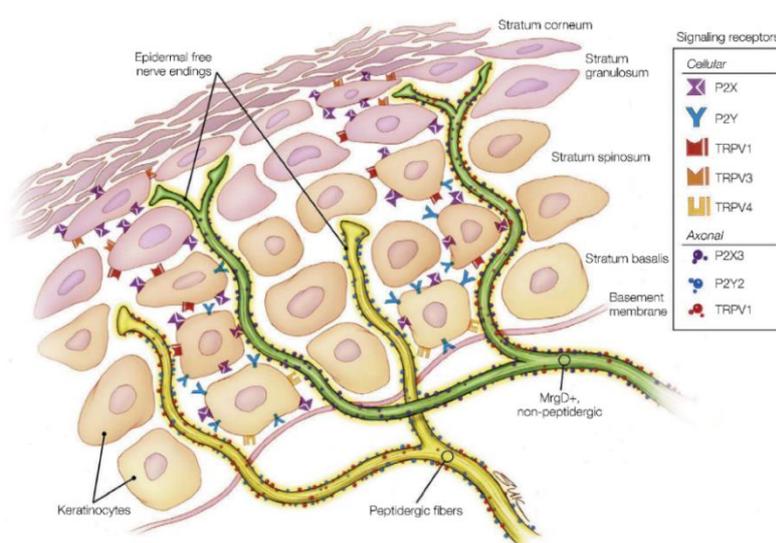


Figura 1.4.1.1.1. Terminaciones nerviosas libres. Tomado de Ringkamp et al., 2013.

Según el tipo de estímulo que los activan podemos distinguir tres clases de nociceptores: los *nociceptores mecánicos*, que responden ante estímulos táctiles muy intensos como un pinchazo o un aplastamiento, normalmente acompañados de mayor o menor lesión tisular; los *nociceptores térmicos*, que son excitados por temperaturas extremas, bien sean altas (por encima de 45°C) o bien sean bajas (por debajo de 5°C); y los *nociceptores polimodales*, que responden a diferentes estímulos mecánicos, térmicos y químicos nocivos (Basbaum y Jessell, 2013; Valverde et al., 2015).

Table 22-2 Receptor Types Active in Somatic Sensation

Receptor type	Fiber group	Fiber name	Modality
Cutaneous and subcutaneous mechanoreceptors			Touch
Meissner corpuscle	A α , β	RA1	Stroking, flutter
Merkel disk receptor	A α , β	SA1	Pressure, texture
Pacinian corpuscle	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			Temperature
Cool receptors	A δ	III	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			Pain
Mechanical	A δ	III	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			Limb proprioception
Muscle spindle primary	A α	Ia	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 1.4.1.1.2. Tipos de receptores somatosensoriales. Tomado de Ringkamp et al., 2013.

Estas tres clases de nociceptores pueden ser englobadas en dos grandes clases de receptores del dolor si atendemos al grado de mielinización de la fibra nerviosa aferente que termina en ellos: los *nociceptores A δ* (*A-delta*), inervados por fibras escasamente mielinizadas A δ (*A-delta*) y que son mayoritariamente nociceptores mecánicos o térmicos que producen un dolor descrito como afilado, punzante y preciso; y los *nociceptores C*, inervados por fibras amielínicas C y que se corresponden más

frecuentemente con nociceptores polimodales capaces de responder a estímulos mecánicos, térmicos y químicos, y que provocan un dolor sordo, quemante y poco preciso (Gardner y Johnson, 2013; Ringkamp et al., 2013).

Los nociceptores están ampliamente diseminados 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, 2014b).

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 μm de diámetro y una velocidad de conducción de 4-36 m/s.
- y fibras C, amielínicas, fibras aferentes del grupo IV, con un diámetro que varía entre las 0,2-1,5 μm y una velocidad de conducción de 0,4-2,0 m/s.

Un tercer tipo de fibras nerviosas, las fibras A β (A-beta), mielinizadas, fibras aferentes del grupo II, de entre 6-12 μm 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).

Table 22-1 Classification of Sensory Fibers in Peripheral Nerves¹

	Muscle nerve	Cutaneous nerve	Fiber diameter (μm)	Conduction velocity (m/s)
Myelinated				
Large diameter	I	A α	12–20	72–120
Medium diameter	II	A β	6–12	36–72
Small diameter	III	A δ	1–6	4–36
Unmyelinated	IV	C	0.2–1.5	0.4–2.0

¹Sensory fibers from muscle are classified according to their diameter, whereas those from the skin are classified by conduction velocity.

Figura 1.4.1.1.3. Tipos de fibras aferentes. Tomado de Gardner y Johnson, 2013.

Estas fibras nerviosas nociceptivas son los axones o prolongaciones periféricas de las neuronas nociceptivas primarias. La información nociceptiva procedente de cualquier parte del cuerpo, excepto de la cabeza, viaja por estas prolongaciones periféricas hasta el cuerpo o soma neuronal de las neuronas nociceptivas primarias, localizado en el ganglio espinal de la raíz dorsal correspondiente. Del ganglio parte la prolongación central de la neurona nociceptiva primaria que, tras terminar de recorrer el resto de la raíz posterior, alcanza el sistema nervioso central a nivel del asta posterior o dorsal de la médula espinal.

No obstante, hemos de señalar que algunas de estas prolongaciones centrales nociceptivas cambian de dirección en la raíz posterior y entran finalmente en la médula espinal por las raíces anteriores o ventrales. Estas fibras son conocidas como *fibras recurrentes*, y serían las responsables de la persistencia del dolor tras rizotomía posterior (Almeida et al., 2004; Naftel, 2014).

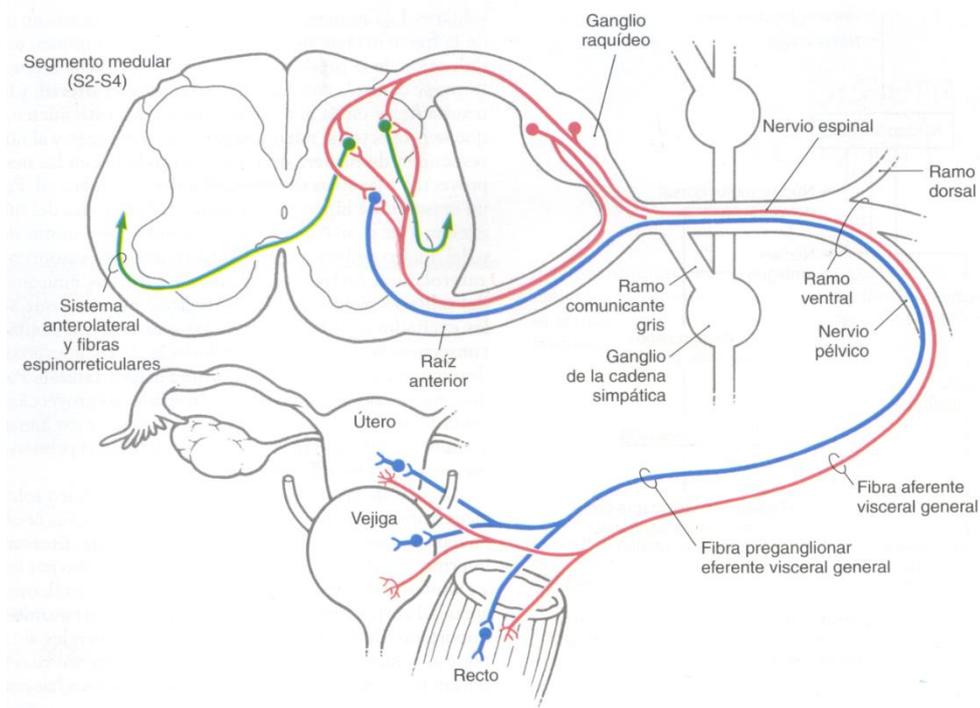


Figura 1.4.1.1.4. Fibra recurrente de origen visceral (la roja en la raíz anterior). Tomado de Naftel, 2014.

Las fibras que conducen la información nociceptiva, al alcanzar la superficie del asta posterior de la médula espinal, 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 en el interior del asta posterior 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).

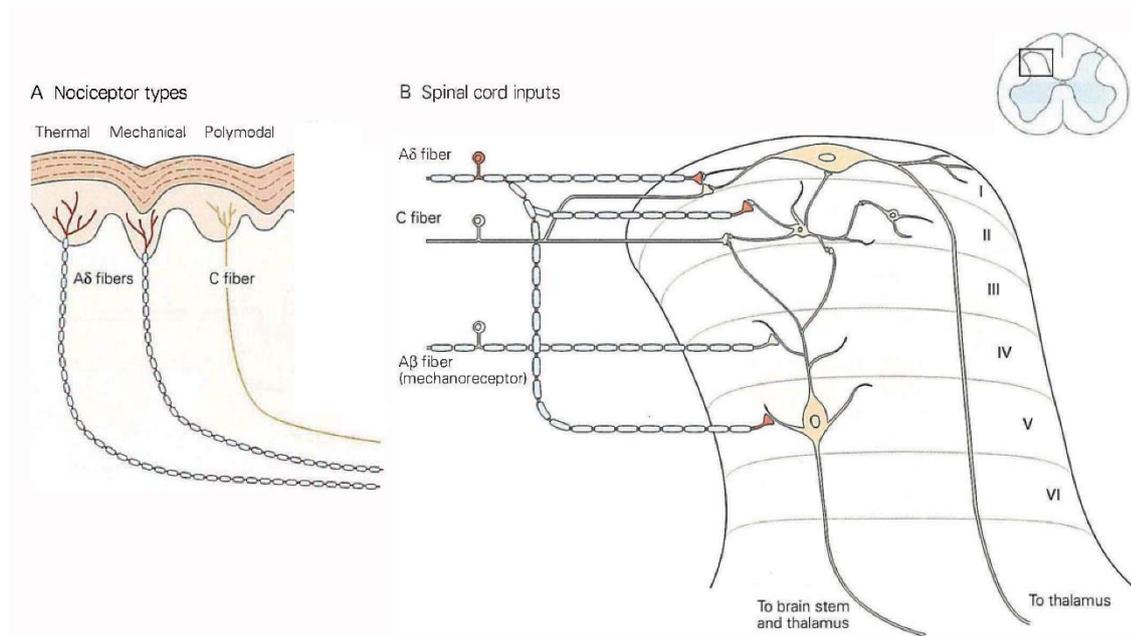


Figura 1.4.1.1.5. Terminación de las fibras nociceptivas sobre el asta posterior de la médula espinal. Tomado de Basbaum y Jessell, 2013.

Las neuronas de la *lámina I*, o 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*, o 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 Ile, 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.

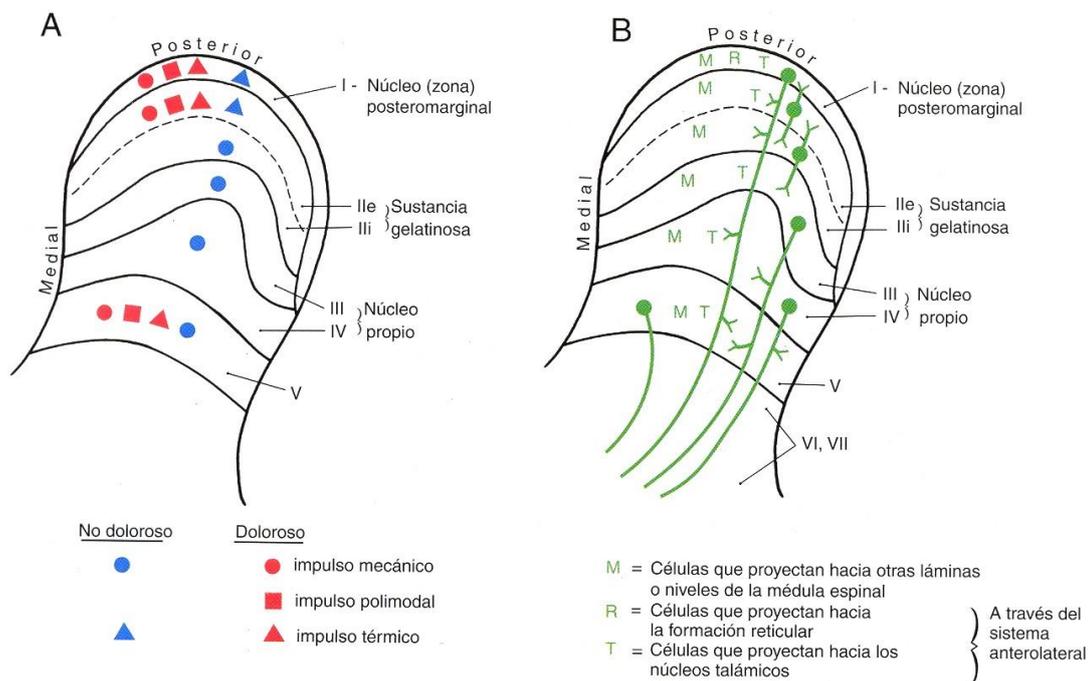


Figura 1.4.1.1.6. Láminas del asta posterior de la médula espinal, con sus principales entradas (A) y salidas (B). Tomado de Warren et al., 2014a.

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*. Fuera del SAL todavía encontramos algunas vías que también intervienen en la transmisión nociceptiva ascendente como el haz *espinocervical* y la vía postsináptica de la columna dorsal.

Clásicamente se pensaba que el *haz espinotalámico lateral* sólo transportaba información sobre el dolor y la temperatura, mientras que el *haz espinotalámico anterior* se ocupaba exclusivamente del tacto protopático. En la actualidad se piensa que todas las partes del SAL transportan todas las modalidades somatosensoriales mencionadas (dolor, temperatura y tacto protopático) (Warren et al., 2014b).

Las fibras espinotalámicas constituyen la principal vía nociceptiva ascendente desde la médula espinal. En ellas se incluyen los axones de las neuronas nociceptivas específicas y de amplio espectro dinámico (WDR) ubicadas, principalmente, en las láminas I y V medulares. Desde aquí, las fibras 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. En este momento las fibras se acodan en ángulo recto para hacerse ascendentes, recorriendo 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. Sería lo que algunos autores denominan la vía neoespinotalámica (Almeida et al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Dostrovsky y Craig, 2013; Warren et al, 2014b; Westlund y Willis, 2015; Valverde et al., 2015).

Las fibras algésicas del *haz espinorreticular* se dirigen principalmente hacia la formación reticular bulbo-pontina. De aquí la información puede continuar hasta el tálamo por fibras reticulotalámicas completando la vía indirecta al tálamo o vía paleoespinotalámica, o 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 tan 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).

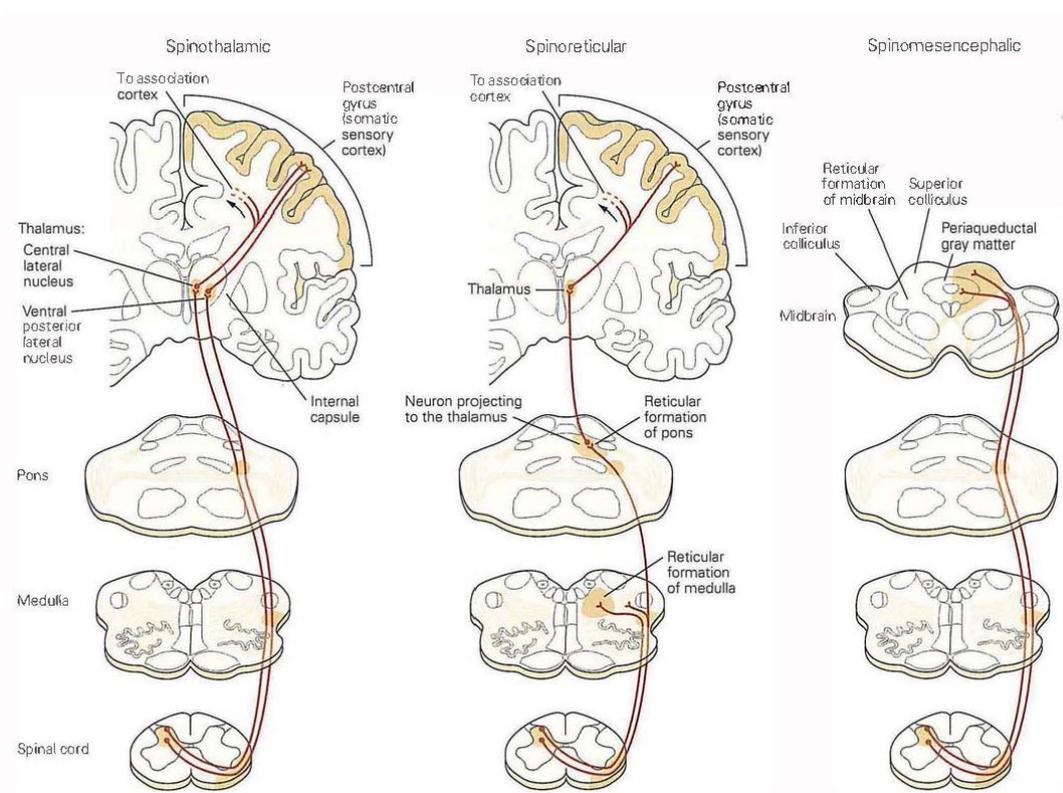


Figura 1.4.1.1.7. *Alguna de las principales vías ascendentes nociceptivas. Tomado de Basbaum y Jessell, 2013.*

Finalmente, recordar que dentro del SAL, la mayoría de autores diferencian unas fibras *espinohipotálamicas*, que bien de forma directa o a través de colaterales procedentes de los haces espinoreticular y espinomesencefálico, llevan información dolorosa 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).

Ya fuera del SAL, destacaremos la *vía postsináptica de la columna dorsal*, fundamental en la conducción del dolor visceral. Las vías de conducción del dolor visceral acompañan principalmente a las fibras vegetativas simpáticas y parasimpáticas. 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, parcialmente bilateral, en las láminas superficiales y profundas del asta dorsal (láminas I y V) y alrededor del canal central medular (lámina X). En las láminas I y V, principal origen del tracto espinotalámico, se produce convergencia cutánea y visceral que podría explicar el dolor referido, es decir, la proyección de un dolor de origen visceral a un territorio cutáneo determinado. Desde la lámina X la información dolorosa visceral asciende por la columna dorsal hasta alcanzar los núcleos grácil y cuneiforme y de ahí al tálamo, la amígdala, el hipotálamo, la PAG, etc... (Westlund y Willis, 2015).

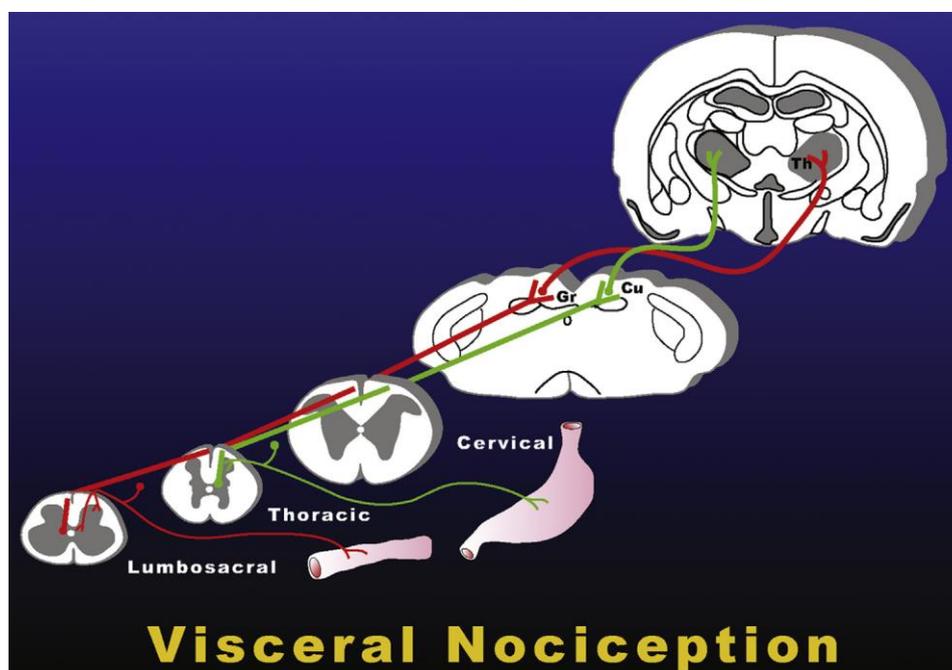


Figura 1.4.1.1.8. Esquema de la vía postsináptica de la columna dorsal para el dolor visceral. Tomado de Westlund y Willis, 2015.

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

El tálamo es la principal estructura de relevo de la información dolorosa destinada a la corteza cerebral, encargada de la recepción, la integración y la transmisión de la misma.

El *núcleo talámico ventral posterolateral* (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 recibe la mayoría de sus aferencias nociceptivas de fibras del SAL (principalmente de la vía directa del haz espinotalámico, la vía neoespinotalámica), aunque también recibe fibras de la vía postsináptica de la columna dorsal y del tracto espinocervicotalámico (Almeida et al., 2004; Basbaum y Jessell, 2013; Warren et al, 2014b).

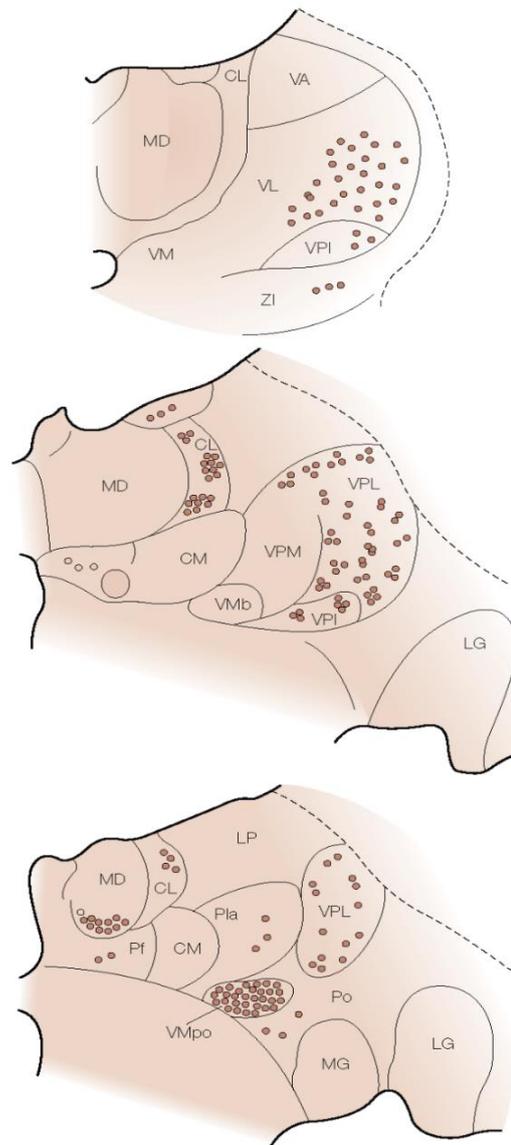


Figura 1.4.1.1.9. Proyecciones de las fibras espinotalámicas sobre los núcleos del tálamo de primate. Tomado de Dostrovsky y Craig, 2013.

Recientemente, se ha descrito en la parte más ventral, posterior y medial del VPL, una pequeña zona que sería el principal destino de las fibras espinotalámicas procedentes de la lámina I de la médula espinal (Dostrovsky y Craig, 2013): es 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). Destacan el centromediano (CM), el central lateral (CL) y el parafascicular (Pf). Reciben información espinotalámica indirecta a través de la vía paleoespinotalámica o espinoreticulotalámica (Basbaum y Jessell, 2013; Warren et al, 2014b).

Por último, 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).

Las señales dolorosas procedentes del tálamo (fibras talamocorticales) alcanzan la corteza cerebral pasando por el brazo posterior de la cápsula interna. 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 fibras directamente del tálamo, aunque la mayor parte de las señales las recibe del área SI.

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). Parece participar 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.

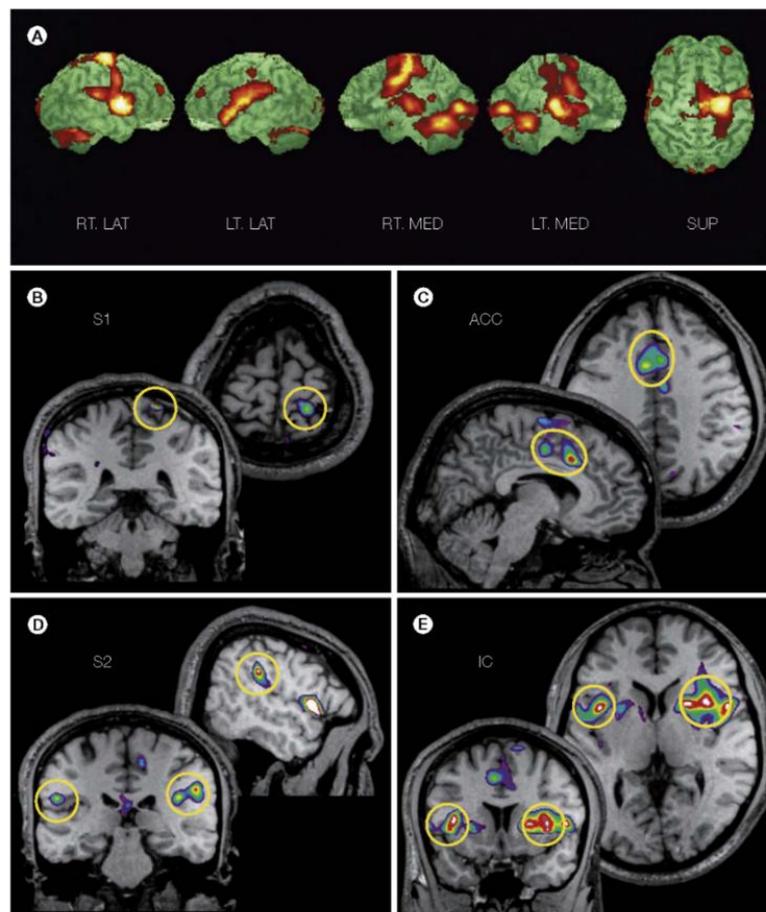


Figura 1.4.1.1.10. Principales regiones corticales activadas tras estímulo doloroso obtenidas mediante tomografía por emisión de positrones. Tomado de Apkarian et al., 2013.

1.4.1.2. Sistema de Control Endógeno de la Transmisión Nociceptiva

Uno de los descubrimientos más notables en la investigación en el campo de la transmisión nociceptiva, es la existencia de circuitos centrales capaces de regular la percepción del dolor. El dolor no es simplemente el resultado directo de la actividad de las fibras aferentes nociceptivas, sino que está regulado por la actividad de otras estructuras no implicadas directamente en la transmisión de la información dolorosa. 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 la existencia de 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*). Según Melzack y Wall, este sistema debería estar bajo el control de un sistema descendente de fibras, procedente del tronco del encéfalo que sería sensible a factores ambientales (Melzack y Wall, 1965; Heinricher y Fields, 2013).

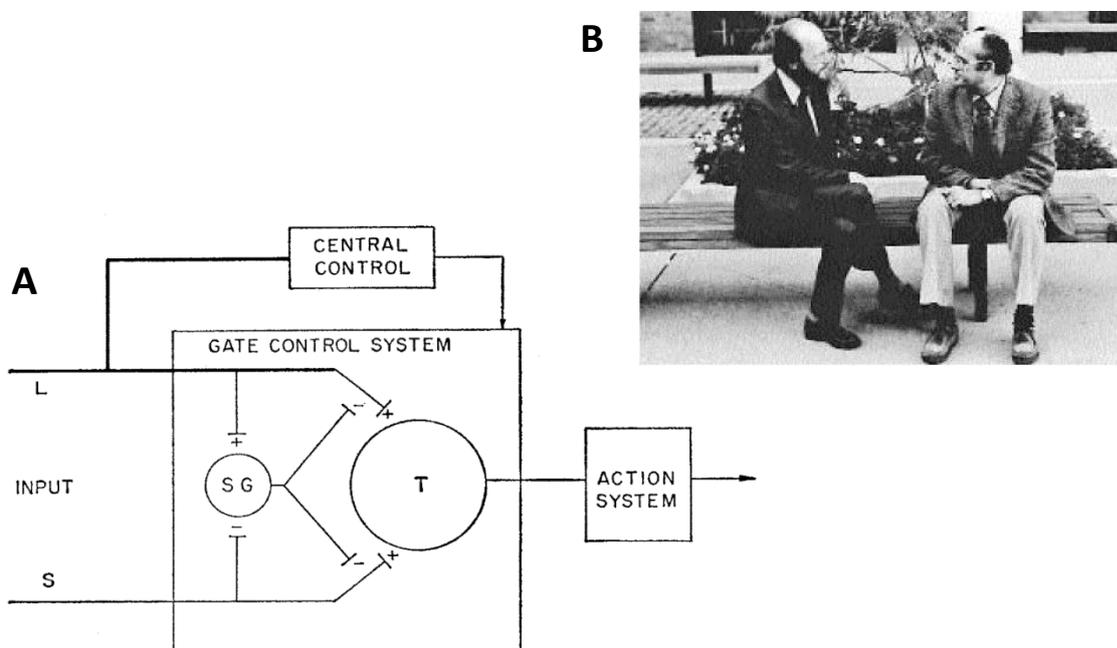


Figura 1.4.1.2.1. (A) Esquema original publicado por Melzack y Wall en la revista *Science* en 1965 para ilustrar su teoría de la puerta de control del dolor. Tomado de Melzack y Wall, 1965. (B) Patrick Melzack (izq) y Ronald Wall (der). Tomado del Prólogo del "Wall and Melzack's textbook of pain". 6ª ed., 2013.

Sin embargo, las pruebas de la existencia de este sistema de analgesia endógeno fueron presentadas por primera vez por Reynolds (1969), quien 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.

Posteriormente 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 nociceptivas.

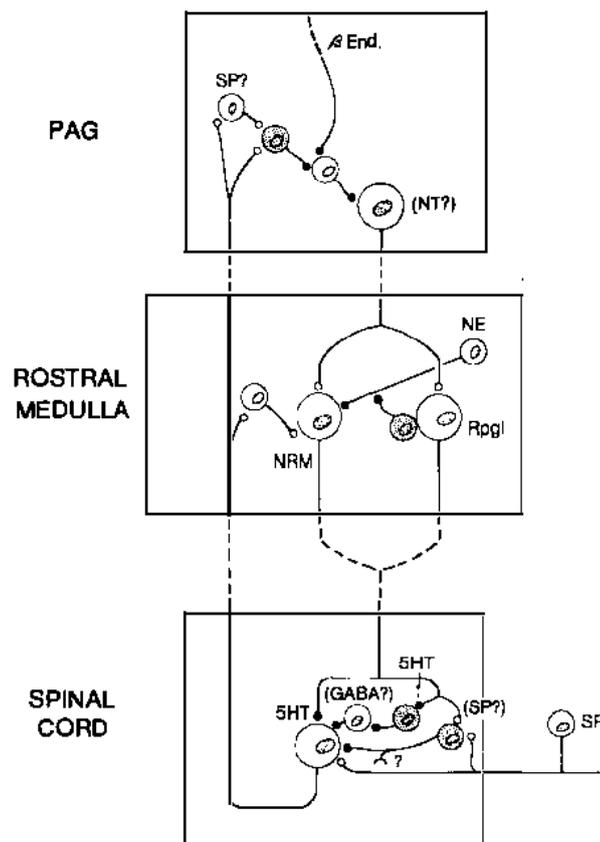


Figura 1.4.1.2.2. Esquema original publicado por Basbaum y Fields en 1984 en la revista Annual Review of Neuroscience para ilustrar su propuesta de circuito endógeno de control del dolor. Tomado de Basbaum y Fields, 1984.

El paso del tiempo y los numerosos estudios realizados a posteriori han confirmado el papel determinante de la PAG en el circuito endógeno de control del dolor. 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: 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. Del mismo modo, la estimulación de la RVM también produce analgesia (Heinricher y Fields, 2013).

Sin embargo, mientras que las proyecciones eferentes más numerosas de la PAG son sobre la RVM, las principales eferencias de la 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 la RVM (Westlund y Willis, 2015).

Este sistema PAG-RVM-asta posterior de la médula espinal es sensible a los opiáceos tanto endógenos como exógenos: su aplicación directa tanto en la PAG como en la RVM o en el asta posterior de la médula espinal produce analgesia. Si tenemos en cuenta que los opiáceos tienen un efecto inhibitor sobre las neuronas, estos 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 ya 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).

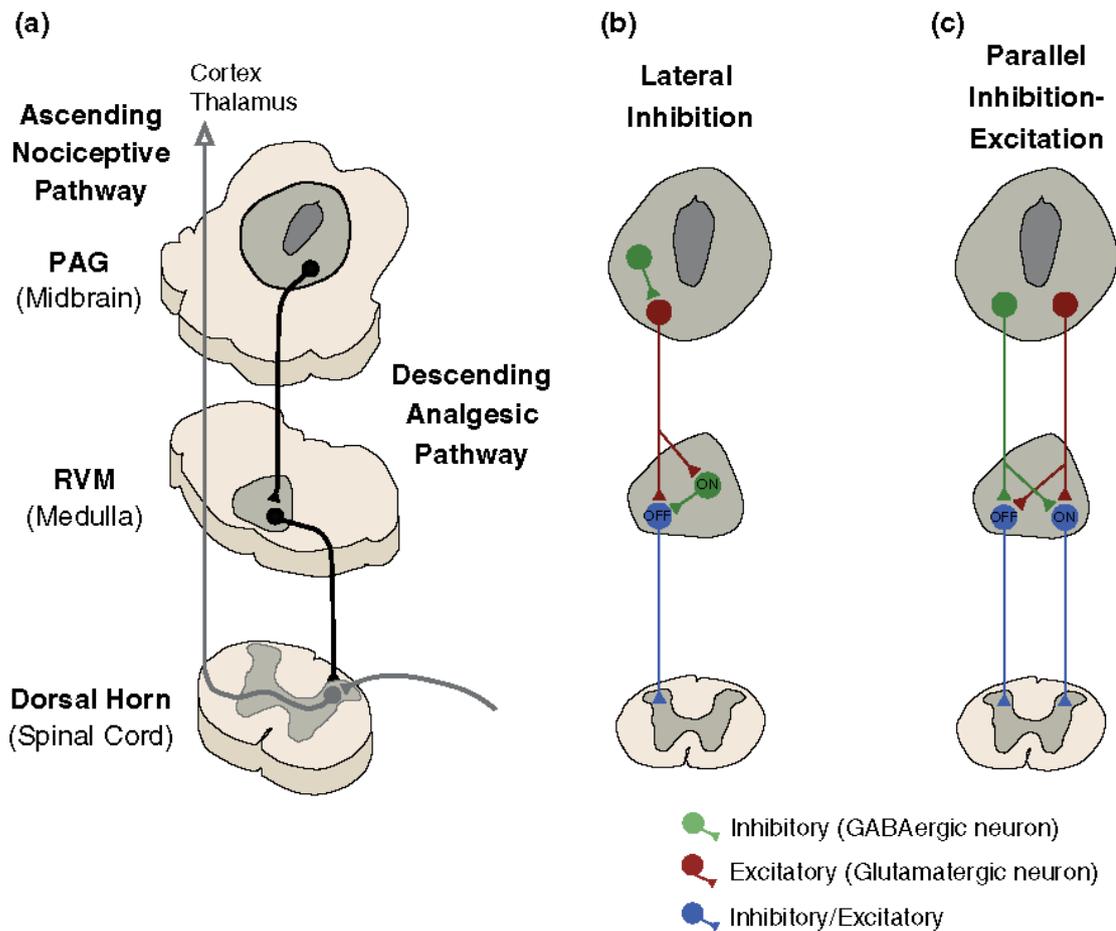


Figura 1.4.1.2.3. Esquema que ilustra la hipótesis de la analgesia por desinhibición gabaérgica. Tomado de Lau y Vaughan, 2014.

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) (Westlund y Willis, 2015).

Al igual que la serotonina, la noradrenalina también se ha demostrado que juega 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 α_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).

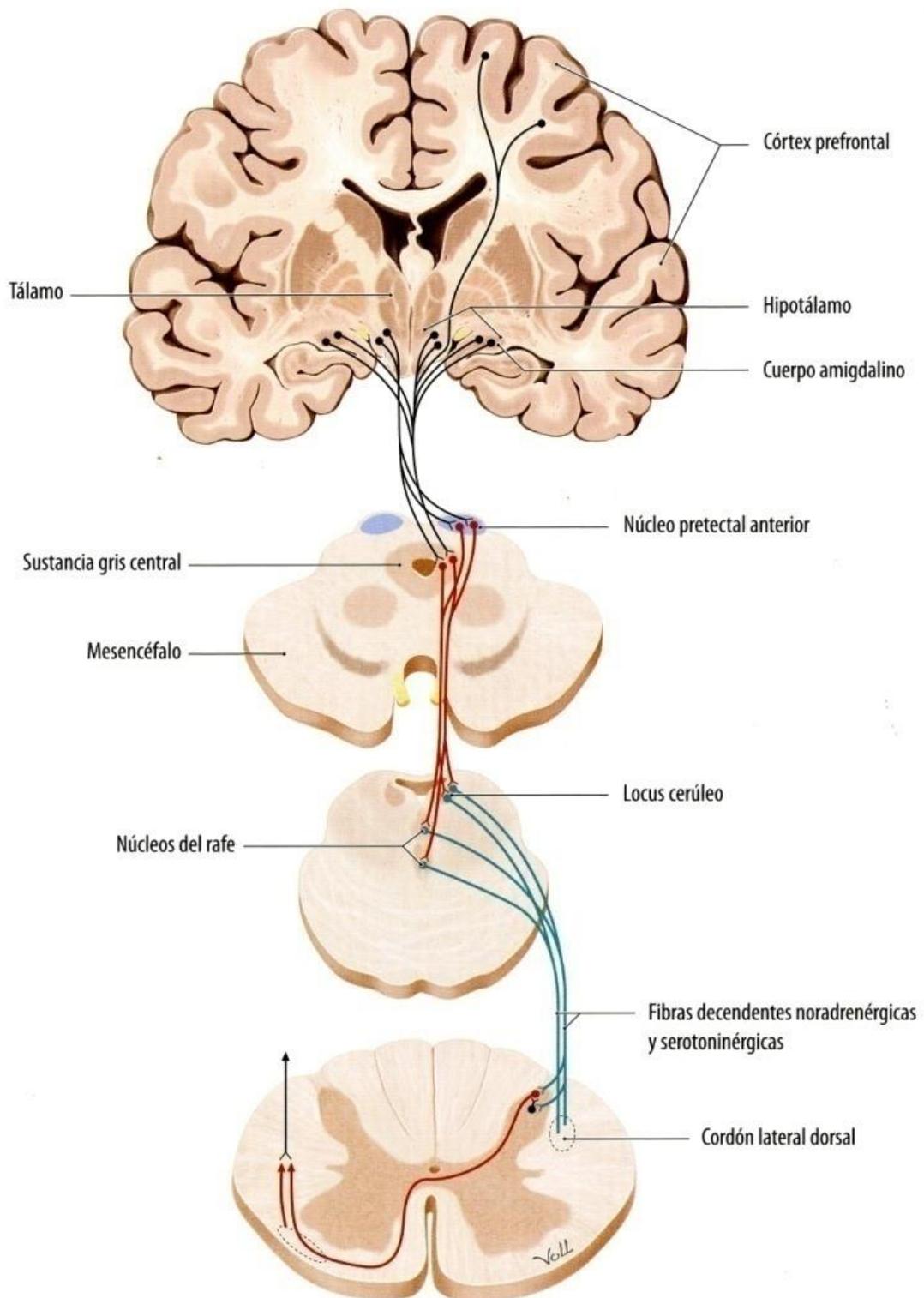


Figura 1.4.1.2.4. Esquema del circuito de control descendente del dolor, donde se puede observar como las principales aferencias a la médula espinal son monoaminérgicas (serotoninérgicas y noradrenérgicas). Tomado de Schünke et al., 2015.

4.1.1.3. Alteraciones del procesamiento del dolor en el síndrome de fibromialgia

El dolor crónico generalizado es la característica predominante del síndrome de fibromialgia (FMS). Durante años, las personas con dolor por FMS han sido cuestionadas, negada su condición de enfermos, cuando no criticadas, e incluso, objeto de burla. La principal razón de esta reacción de profesionales de la salud, familia y amigos ha sido que, en muchas ocasiones, 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, quejicas, adictas a los medicamentos, o buscadores de una ganancia secundaria”... Sin embargo, nadie puede *sentir* el dolor ajeno, de la misma forma 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, subjetivo. 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. No hay pruebas o signos/síntomas específicos o patognomónicos del FMS. De hecho, el FMS ha llegado 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 desde sus primeras descripciones a principios del s.XX, cuando se le llamó *fibrositis*, en un intento de reflejar en el nombre el papel significativo que entonces se pensaba debía tener la inflamación periférica en la patogénesis de este síndrome, que se describía como una especie de lumbago persistente. Ni el cambio definitivo del nombre por el de FMS, introducido por Hensch en 1976, ni el establecimiento, en 1990, por parte del American College of Rheumatology de unos criterios diagnósticos para su clasificación basados en amplios estudios clínicos multicéntricos, han evitado que la polémica sobre su reconocimiento como entidad

patológica persista hasta prácticamente nuestros días (Ehrlich, 2003; Gordon, 2003; Inanici y Yunus, 2004; White, 2004; Russell, 2013; Chinn et al., 2016).

Actualmente, sin embargo, tras un nuevo aval en 2010 del American College of Rheumatology a la revisión y 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 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.

En 2008, la Asociación Internacional para el Estudio de Dolor (IASP) publicó nuevas definiciones de diferentes términos técnicos, entre los que se encontraban la alodinia y la hiperalgesia (Sandkühler, 2009):

-La *alodinia* fue definida por la IASP como “Dolor en respuesta a un estímulo no-nociceptivo”. Es decir, un aumento de sensibilidad a estímulos que normalmente no son dolorosos en el paciente sano control, pero que en el paciente enfermo provoca que los perciba como dolorosos. El grupo de trabajo de la IASP añadió a este término el siguiente comentario: “Este término sólo se debe utilizar, cuando se sabe que el estímulo probado no es capaz de activar los nociceptores. Actualmente, los únicos estímulos aceptados

que provocan alodinia táctil dinámica son los que producen una ligera fricción, por ejemplo, el cepillado de la piel. Seguramente, las investigaciones futuras pueden presentar evidencias de otros tipos de alodinia, pero hasta entonces, siempre que no esté claro si el estímulo probado puede o no activar los nociceptores, el término preferido es el de hiperalgesia”.

-La *hiperalgesia*, por su parte, fue definida por la IASP como “Un aumento de la sensibilidad al dolor”. Es decir, un aumento anormalmente exagerado de la respuesta a un estímulo normalmente doloroso. El grupo de trabajo de la IASP también añadió en este término un comentario: “La hiperalgesia puede incluir tanto una disminución en el umbral a partir de cual aparece la respuesta, como un aumento en el umbral máximo (supraumbral) hasta el que todavía se obtiene respuesta. En muchos casos puede ser difícil de saber si el estímulo probado es capaz o no de activar los nociceptores. Por lo tanto, es útil tener un término genérico (hiperalgesia) para todos los aumentos de la sensibilidad al dolor”.

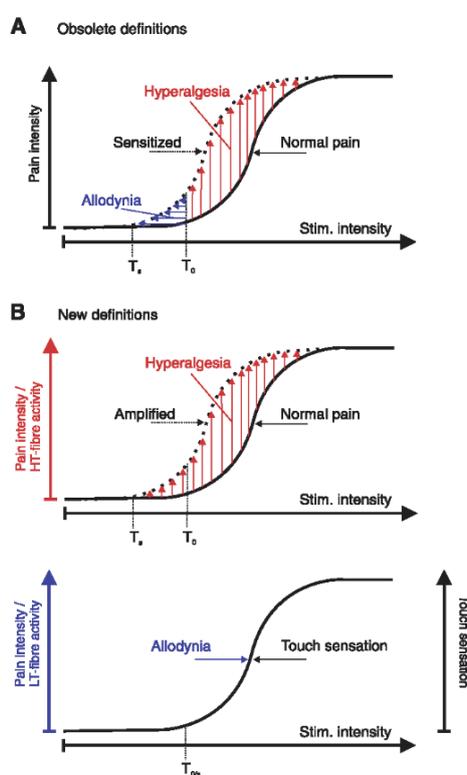


Figura 1.4.1.3.1. Representación gráfica de las nuevas definiciones de alodinia e hiperalgesia introducidas en 2008 por el grupo de trabajo de la IASP. Tomado de Sandküler, 2009.

En los últimos años ha crecido de forma exponencial el número de trabajos publicados que apoyan la teoría de que el proceso que subyace tras este procesamiento anormal del dolor del FMS es la *amplificación central* de la percepción del dolor (Petersel et al., 2011).

La amplificación central del dolor 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 la mayor parte de 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. Del mismo modo, estudios de neuroimagen demuestran 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 (Chinn et al., 2016; Clauw et al., 2011; Petersel et al., 2011).

Los pacientes con FM muestran cambios en los niveles de neurotransmisores y receptores asociados con un aumento de la señalización ascendente (pro-nociceptiva) y una disminución de las vías de señalización descendente (antinociceptiva) (Petersel et al., 2011).

En relación a la actividad de las vías ascendentes, el aumento de los niveles en el líquido cefalorraquídeo de neurotransmisores que generalmente actúan incrementando el impulso ascendente, indican una mayor señalización ascendente, pronociceptiva. Estos neurotransmisores pronociceptivos, entre los que se incluyen la sustancia P, el factor de crecimiento nervioso y el factor neurotrófico derivado del cerebro, se hallan en niveles más altos (hasta del 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).

Además, los niveles de glutamato y otros aminoácidos excitadores han demostrado ser elevados, tanto en el LCR como en el cerebro de personas con 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 una mayor hiperalgesia y alodinia (Clauw et al., 2011; Petersel et al., 2011; Yunus, 2007).

En los pacientes con FMS, la actividad de las vías descendentes antinociceptivas se reduce. 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). 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 niveles de los metabolitos de la serotonina y la noradrenalina disminuidos (Russell et al., 1992; Legangneux et al., 2001; Chinn et al., 2016; Clauw et al., 2011).

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.

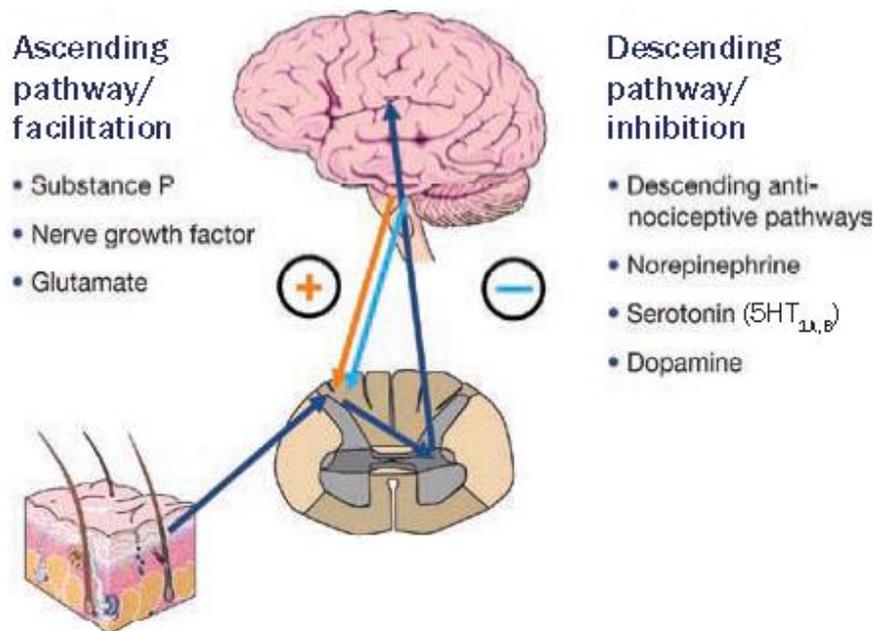


Figura 1.4.1.3.2. Esquema de las vías anatómicas afectadas en el FMS. Tomado de Clauw et al., 2011.

1.4.2. Principales síntomas comórbidos

Como ya hemos comentado anteriormente, el FMS es un síndrome que está caracterizado por la presencia de dolor generalizado e hipersensibilidad no motivada por alteraciones periféricas. Además de ello, el FMS se presenta con una serie de síntomas comórbidos que repercuten severamente en la calidad de vida de las personas y la convierten en una patología severamente incapacitante (Bellato et al., 2012; Wolfe et al., 2013; Russell, 2013). En la figura 1.4.2.1 se muestra una relación de los principales síntomas que suelen coexistir en el FMS y la frecuencia en la que suelen presentarse en los pacientes.

Table 48-2 Frequency of Common Clinical Manifestations of Fibromyalgia Syndrome	
CLINICAL FEATURES AND ASSOCIATED SYMPTOMS	PREVALENCE
Widespread pain	100%
Peripheral pain generators	70%
Sleep disorder	90%
Fatigue	80%
Depression: point prevalence	20–40%
Depression: lifetime prevalence	58–71%
Irritable bowel syndrome	30–50%
Irritable bladder syndrome	12%
Urinary urgency	60%
Headache: severe muscle contraction type	Often
Cold intolerance	Often
Cognitive deficits	Often
Palpitations, chest wall pain mimicking angina pectoris	Often
Morning stiffness	Often
Dizziness and lightheadedness	Occasional

Figura 1.4.2.1. Frecuencia de aparición de los principales síntomas comórbidos relacionados con el FMS. Tomado de Russell, 2013.

A continuación se describen algunos de los principales síntomas presentes en el FMS, las bases anatómicas y fisiológicas de los mismos que podrían explicar la elevada prevalencia en la que se presentan en el FMS y sus características e impacto sobre la calidad de vida de los pacientes.

1.4.2.1. Síntomas depresivos

La depresión se ha descrito por la humanidad durante varios milenios. El término *melancolía* (que significa *bilis negro* en griego) fue utilizado por primera vez por Hipócrates alrededor del 400 aC. La mayoría de los principales síntomas de la depresión observados hoy fueron reconocidos en la antigüedad, así como las contribuciones de las predisposiciones innatas y los factores externos que causan la enfermedad. De hecho, las similitudes entre las descripciones antiguas de la depresión y las de la era moderna son sorprendentes; sin embargo, 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).

1.4.2.1.1. Bases anatómicas de la depresión

Tradicionalmente se pensaba 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 (córtez 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).

Los estudios mediante tomografía por emisión de fotones únicos (SPECT) y por emisión de positrones (PET) han demostrado una disminución global del metabolismo cerebral, más marcado en las regiones frontales, especialmente en la corteza prefrontal medial y dorsolateral, los ganglios basales y la corteza cingulada. No obstante, el flujo sanguíneo y el metabolismo parecen estar aumentados en zonas de la corteza orbitofrontal y de la amígdala (Brendel et al., 2016; Huebl et al., 2016; Kim et al., 2016).

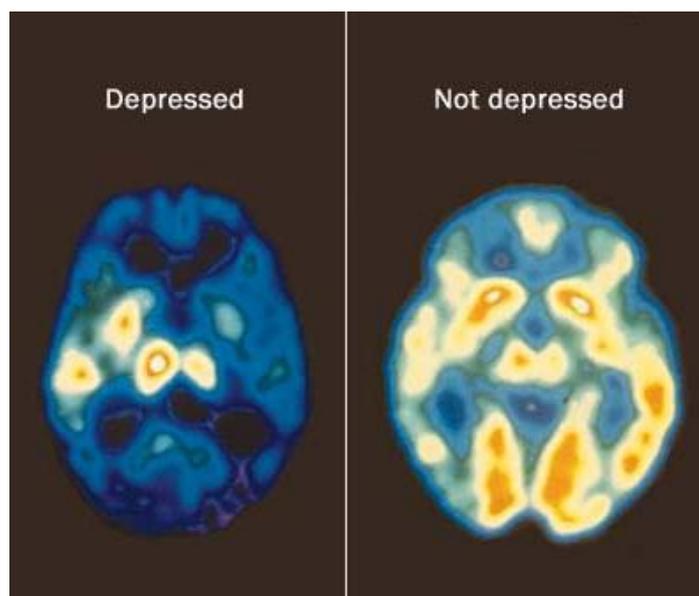


Figura 1.4.2.1.1.1. Tomografía por emisión de positrones en un paciente sano respecto a un paciente con depresión. Tomado de la web de la Clínica Mayo.

Desde distintas corrientes psicológicas se han desarrollado a lo largo de las últimas décadas diferentes teorías explicativas sobre la depresión, entre las que destacan la teoría conductista de la disminución del refuerzo positivo o las teorías cognitivas de la indefensión aprendida y la de Beck. 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).

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 monoamino oxidasa (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 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. 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).

En la figura 1.4.2.1.1.2 se puede observar la conectividad de las neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas a través de los circuitos neuronales descritos anteriormente. Las neuronas serotoninérgicas procedentes principalmente del núcleo del rafe dorsal proyectan al 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).

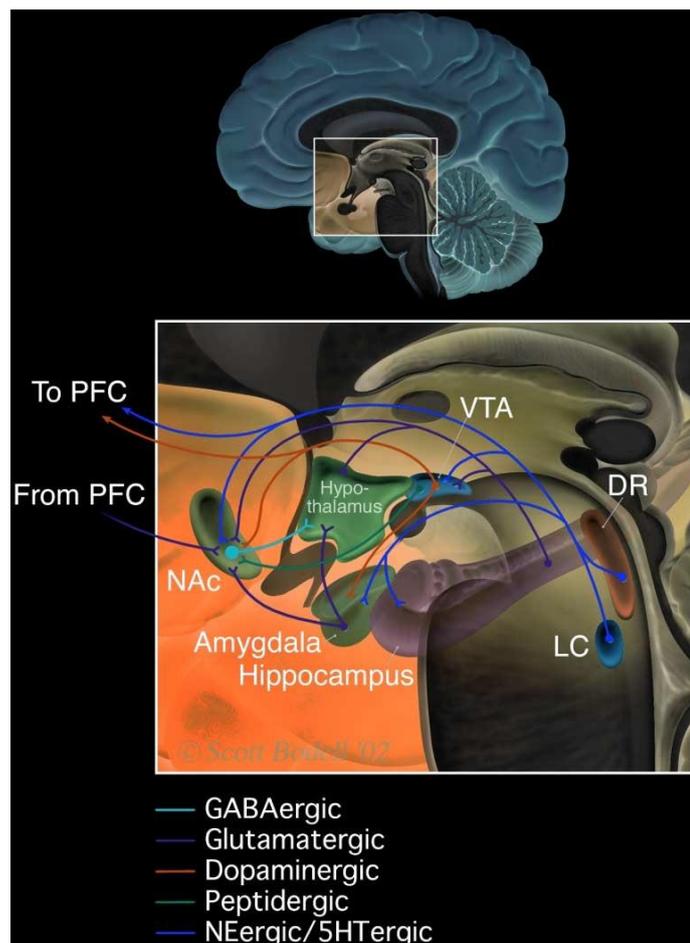


Figura 1.4.2.1.1.2. Principales centros implicados en la depresión. Tomado de Nestler et al., 2002.

1.4.2.1.2. 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%. Dentro de los pacientes con FMS que no han sido diagnosticados formalmente de depresión mayor, un 40% presenta síntomas depresivos, es decir, tienen ciertos síntomas característicos de la enfermedad pero no cumplen los criterios para su diagnóstico (Aguglia et al., 2011; Buskila y Cohen, 2007; Fietta et al., 2007; Russell, 2013).

El DSM-V (*Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 5ª edición), establece los siguientes criterios para el diagnóstico de la depresión mayor:

- A. Cinco (o más) de los siguientes síntomas han estado presentes durante el mismo período de 2 semanas, que representan un cambio respecto a la anterior, por lo menos uno de los síntomas debe ser (1) estado de ánimo depresivo o (2) pérdida de interés o placer. Nota: No incluir los síntomas que son claramente atribuibles a otra condición médica.
1. Estado de ánimo depresivo la mayor parte del día, casi cada día según lo indica el propio sujeto (por ejemplo, se siente triste, vacío, sin esperanza) o la observación realizada por otros (por ejemplo, parece lloroso). (Nota: En los niños y adolescentes, el estado de ánimo puede ser irritable).
 2. Marcada disminución del interés o placer en todas o casi todas las actividades, la mayor parte del día, casi cada día (según refiere el propio sujeto u observan).
 3. Pérdida de peso significativa sin hacer dieta o ganancia de peso (por ejemplo, un cambio de más del 5% del peso corporal en un mes), o disminución o aumento del apetito casi todos los días. (Nota: En niños hay que valorar el fracaso para hacer la ganancia de peso esperada).
 4. Insomnio o hipersomnia casi todos los días.
 5. Agitación o enlentecimiento psicomotores casi cada día (observable por los demás, no meras sensaciones de inquietud o de estar enlentecido).
 6. Fatiga o pérdida de energía casi todos los días.

7. Sentimientos de inutilidad o de culpa excesivos o inapropiados (que pueden ser delirantes) casi cada día (no sólo remordimiento o culpa por estar enfermo).
 8. Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse, o indecisión, casi cada día (ya sea una atribución subjetiva o una observación ajena).
 9. Pensamientos recurrentes de muerte (no sólo temor a la muerte), ideación suicida recurrente sin un plan específico o una tentativa de suicidio o un plan específico para suicidarse.
- B. Los síntomas provocan malestar clínicamente significativo o deterioro en las áreas sociales, ocupacionales, u otras importantes del funcionamiento.
- C. El episodio no es atribuible a los efectos fisiológicos de una sustancia o a otra enfermedad médica.
- D. La aparición del episodio depresivo mayor no se explica mejor por un trastorno esquizoafectivo, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno delirante, u otro del espectro esquizofrénico especificadas y no especificadas y otros trastornos psicóticos.
- E. Nunca ha habido un episodio maníaco o un episodio de hipomanía. Nota: Esta exclusión no es aplicable si todos los episodios maníacos o hipomanía son inducidos por sustancias o son atribuibles a los efectos fisiológicos de otra enfermedad médica.

Como se puede observar, la depresión mayor comparte con el FMS alguna sintomatología, como la presencia de fatiga o alteraciones del sueño, lo que por un lado dificulta el diagnóstico de depresión en los pacientes con FMS y hace necesario un buen diagnóstico diferencial (Veltri et al., 2012), y por otro lado, incita 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).

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; Dunne y Dunne, 2012; Ohayon, 2009).

Como ya hemos indicado, diversos estudios 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 el sistema nervioso central provocaría:

- por una parte, la supresión de las vías descendentes inhibitorias del dolor y el aumento de las vías facilitadoras ascendentes (fenómeno de sensibilización y amplificación central), 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, por la hipótesis monoaminérgica de la depresión se justificaría en estos pacientes la aparición de síntomas depresivos (Akiskal y McKinney, 1973; Elhwuegi, 2004; Hamon y Blier, 2013).

La interrelación entre el FMS y los estados de ánimo depresivos es en ciertos aspectos retroalimentativa. Las personas con FMS, debido a su dolor generalizado, la fatiga o los problemas de sueño tienen malestar permanente y dificultades para realizar las actividades de la vida diaria, lo que normalmente afecta a su calidad de vida y a sus relaciones sociales, y esto 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, diversos estudios muestran que las personas con FMS que tienen un estado de ánimo deprimido presentan una mayor atención hacia sus síntomas de dolor, pensamientos negativos hacia la enfermedad, estados de alerta y estrés mantenidos y actitud catastrofista hacia los eventos de la vida diaria, lo que a su vez, repercute en una disminución de los umbrales de dolor (Consoli et al., 2012; de Souza et al., 2014; Del Pozo-Cruz et al., 2015; Gota et al., 2015; Lange y Petermann, 2010; Uçar et al., 2015; Van Houdenhove y Luyten, 2006).

1.4.2.2. Alteraciones del sueño

1.4.2.2.1. Bases anatómicas del sueño y la vigilia

El sueño se define en el laboratorio, tanto en seres humanos como en animales, mediante el registro de la actividad del campo eléctrico de grandes grupos de neuronas corticales y células musculares. De este modo, los electrodos colocados en los músculos esqueléticos registran el EMG y los electrodos cerebrales profundos se utilizan para registrar la actividad de las áreas cerebrales individuales o neuronas individuales. Estos llamados registros polisomnográficos se utilizan para definir los estados del ciclo sueño-vigilia (Puertas et al., 2015).

La teoría de Borbély (Borbély, 2009) propone un modelo de regulación del proceso de sueño- vigilia que contempla la influencia del proceso homeostático (presión para dormir en función de la duración del periodo de vigilia previo) y del ritmo circadiano (control del ciclo sueño-vigilia desde el núcleo supraquiasmático, considerado el reloj biológico interno).

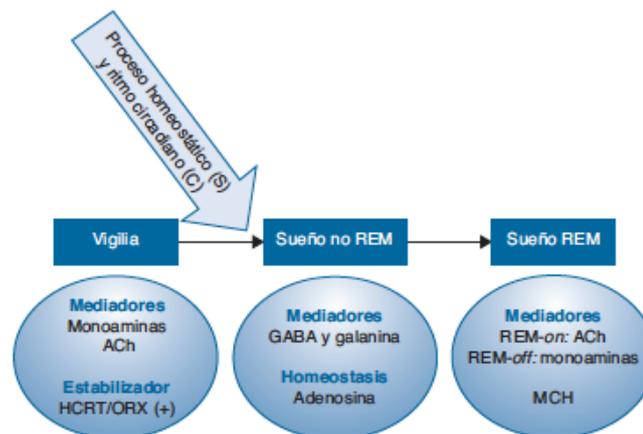


Figura 1.4.2.2.1.1. Esquema básico de los principales mediadores de la vigilia, el sueño no-REM y el sueño REM. Tomado de Puertas et al., 2015.

El sueño en mamíferos y aves puede dividirse en sueño REM y sueño no-REM, que a su vez se divide en tres fases: N1, N2 y N3 (Datta y MacLean, 2007; España y

Scammell, 2004; 2011). Estos tipos de sueño se caracterizan electrofisiológicamente de la siguiente manera:

- Sueño no-REM: oscilaciones lentas (originadas a nivel cortical), husos de sueño (originados en el núcleo reticular del tálamo) y ondas delta (características de la fase N3, se originan a partir de circuitos interconectados entre el tálamo y la corteza).
- Sueño REM: se caracteriza por abundante actividad cerebral de frecuencia mixta, representativa de la desincronización cortical originada a partir de actividad colinérgica. Esta fase también se caracteriza por atonía muscular y presencia de ondas theta.

El análisis del sueño en animales, principalmente gatos y ratas, ha permitido elaborar una clasificación de cuatro fases del sueño: el sueño no REM 1 (NREM-1), el sueño no REM 2 (NREM-2), la transición entre sueño NREM y sueño REM (TS-R), y el sueño REM (REM) (Datta y Hobson, 2000). Estas fases son comparables a las encontradas en humanos (Datta y MacLean, 2007; Puertas et al., 2015).

El sueño NREM se caracteriza porque durante esta etapa, la frecuencia del EEG cortical disminuye progresivamente y se produce un aumento de su amplitud. Sin embargo, la transición desde la vigilia al sueño no es inmediata, de manera fisiológica, sino que existe una transición de somnolencia. Por ello, en función de la base cortical del EEG, el NREM se puede subdividir en NREM-1 (sueño ligero) y NREM-2 (sueño profundo). El NREM-1 es el comienzo del NREM, y durante esta fase aparecen los husos típicos del sueño que se registran en el EEG frontal cortical. La cantidad de NREM-1 registrado es insignificante en comparación con NREM-2. Durante el NREM-2, los husos de sueño desaparecen en el EEG frontal cortical, y estas ondas son más lentas y de mayor amplitud en comparación con el NREM-1. El EEG cortical muestra en este estado una predominancia de ondas de muy baja frecuencia (ondas lentas) y lentas, de frecuencia delta (en conjunto, 0.3 a 3 Hz) y de gran amplitud (200-400 μ V), con ausencia de ondas P en el registro de campo (LPF) pontino (Datta y Hobson, 2000; Datta y MacLean, 2007).

El estado de transición entre el NREM y el sueño REM es una etapa muy corta de sueño al finalizar el NREM-2. Este estado siempre precede al inicio del sueño REM, pero no siempre este estado es seguido por el sueño REM. El EEG cortical en este momento del sueño, presenta una mezcla de ondas de baja amplitud (50-80 μ V) y alta frecuencia (15-25 Hz), y viceversa, de gran amplitud (200-300 μ V) y baja frecuencia (5-10 Hz). Las ondas de frecuencia theta comienzan a aparecer en el EEG del hipocampo. Y además, la amplitud del EEG pontino se incrementa en relación con la vigilia y el sueño de ondas lentas. Las ondas P espigadas comienzan a aparecer en el EEG pontino (Datta y Hobson, 2000; Datta y MacLean, 2007).

Finalmente, el sueño REM se caracteriza por un EEG cortical con ondas de alta frecuencia (20-40 Hz) y baja amplitud (50-80 μ V), similar a la vigilia activa, por lo que ha sido denominado también como sueño paradójico. En el EEG del hipocampo sólo se registran ondas de 5 a 7 Hz, es decir, ritmo theta. Las ondas P son más frecuentes en el EEG pontino con respecto al estado de transición (Datta y Hobson, 2000; Datta y MacLean, 2007).

1.4.2.2.1.1. Circuitos reguladores de la vigilia

La vigilia está mediada por sistemas monoaminérgicos y colinérgicos:

-EL circuito monoaminérgico encargado del control de la vigilia se denomina sistema reticular activador ascendente (SRAA) y comprende una serie de núcleos con proyecciones monoaminérgicas localizados en el bulbo raquídeo del tronco del encéfalo, el mesencéfalo y el hipotálamo posterior (Puertas et al., 2015). Los principales poblaciones neuronales que componen este sistema son las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (LC), las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe (DR), las neuronas dopaminérgicas de la sustancia gris periacueductal ventral (vPAG) y las neuronas histaminérgicas del núcleo tuberomamilar (TMN) (Fuller et al., 2011; Saper et al., 2005; Puertas et al., 2015). Las neuronas del SRAA activan la corteza cerebral, descargando a alta frecuencia durante la vigilia, lentificándose durante el sueño no-REM

y mostrando escasa actividad durante el sueño REM.

-Las poblaciones colinérgicas que junto al SRAA regulan la vigilia se encuentran en el área prefrontal basal, y en los núcleos pontinos tegmental laterodorsal (LDT) y pedunculopontino (PPT). Estas estructuras colinérgicas se encuentran muy activas durante la vigilia y también durante la fase de sueño REM, a diferencia del SRAA (Puertas et al., 2015).

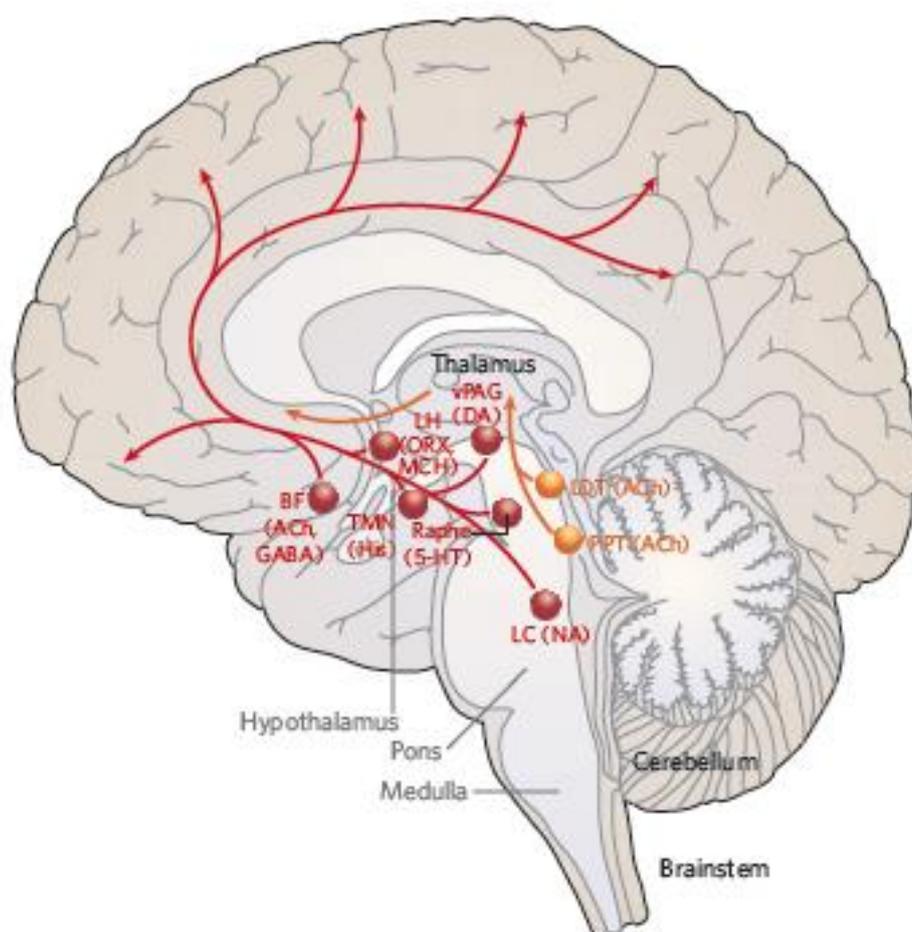


Figura 1.4.2.2.1.1.1. Esquema de los principales centros encargados de la vigilia. Tomado de Saper et al., 2005.

Estos dos circuitos están a su vez regulados por el sistema orexina/hipocretina, encargado de estabilizar la vigilia al ejercer una acción activadora sobre el SRAA (de Lecea et al., 1998; Mileykovskiy et al., 2005; Saper et al., 2005).

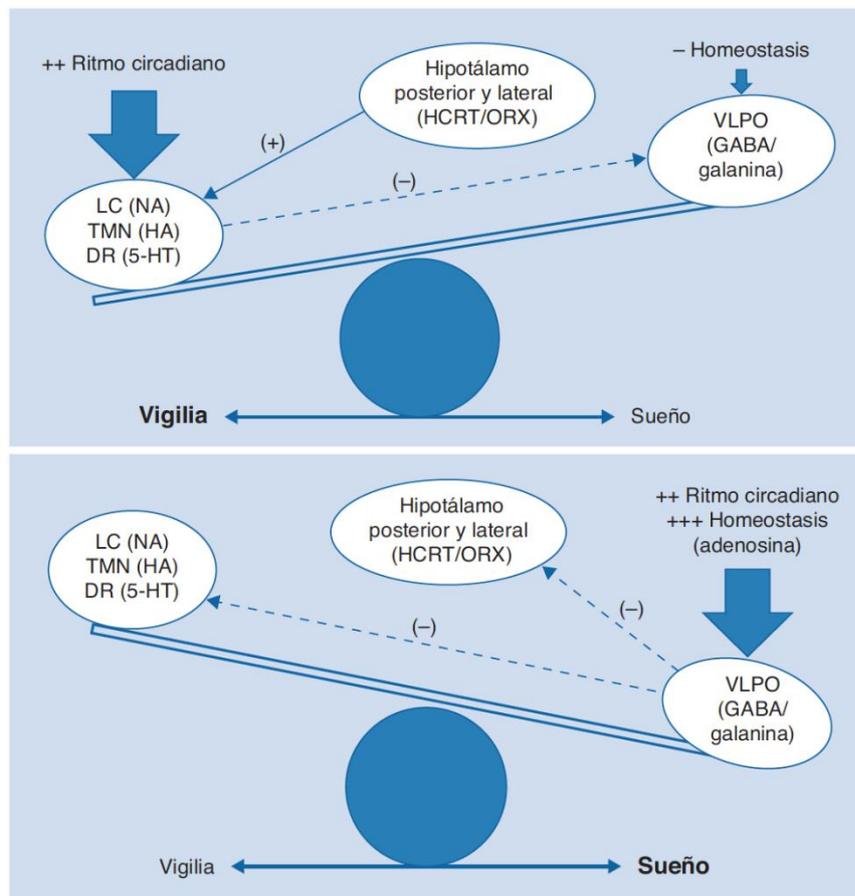


Figura 1.4.2.2.1.1.2. Esquema de los mediadores implicados en la alternancia entre sueño y vigilia, también denominado sistema <<flip-flop>>. Tomado de Puertas et al., 2015.

1.4.2.2.1.2. Circuitos reguladores del sueño no-REM

El área preóptica ventrolateral (VLPO) es el principal centro responsable del inicio del sueño. Esta área inhibe las estructuras implicadas con la vigilia mediante GABA y galanina durante el sueño, y se encuentra inhibida durante la vigilia por las estructuras monoaminérgicas implicadas en la misma (España y Scammell, 2004; Saper et al., 2005; Puertas et al., 2015).

El sueño no-REM se caracteriza electrofisiológicamente por ondas lentas y husos del sueño (*sleep spindles*). El tálamo actúa como un relevo de información hacia y desde la corteza cerebral, y posee características intrínsecas que le permiten generar algunos

de los ritmos propios del sueño NREM. El tálamo contiene neuronas de proyección productoras de glutamato que relevan aferencias hacia la corteza y neuronas gabaérgicas que inhiben a las glutamatérgicas de proyección, bloqueando de esta forma la recepción de información sensorial a nivel cortical. Estas neuronas gabaérgicas se encuentran hiperpolarizadas durante el sueño NREM y presentan un patrón de descarga espontáneo rítmico que electrofisiológicamente se traduce en husos de sueño (*sleep spindles*) (España y Scammell, 2011; Harrington y Lee-Chiong, 2012).

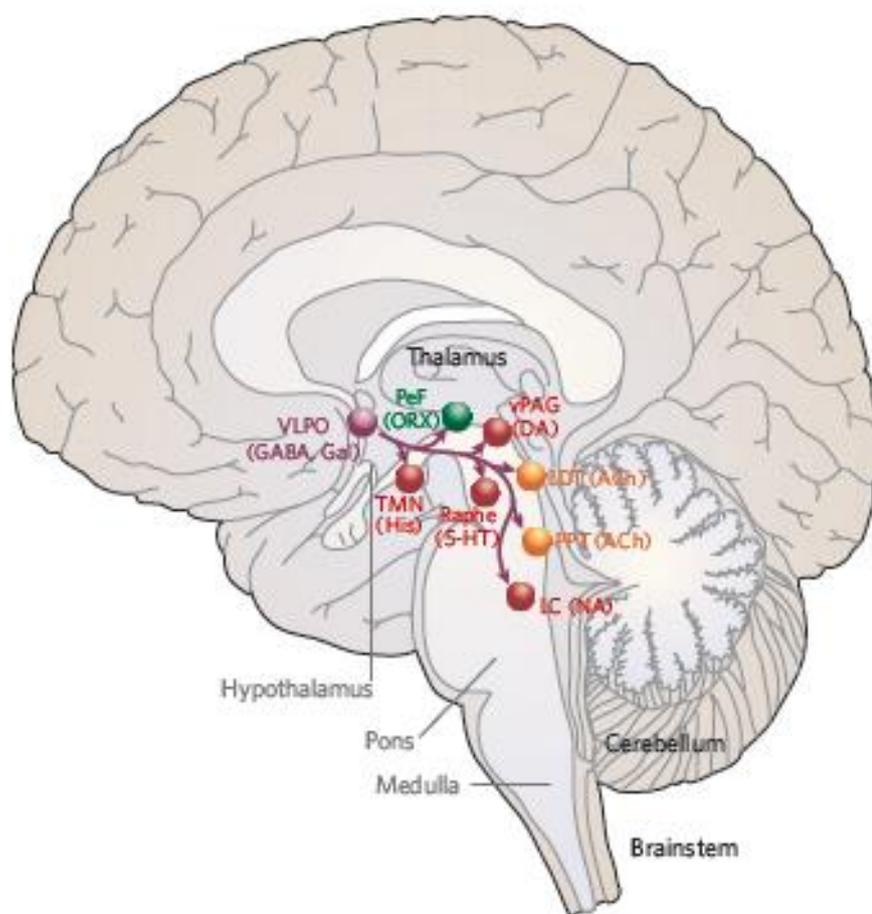


Figura 1.4.2.1.2.1. Principales centros reguladores del sueño no-REM. Tomado de Saper et al., 2005.

1.4.2.2.1.3. Circuitos reguladores del sueño REM

Las vías anatómicas implicadas en la regulación del sueño REM no están claramente establecidas y siguen siendo objeto de estudio en la actualidad, aunque existe consenso en afirmar que dependen de la interacción entre dos sistemas de núcleos pontinos denominados sistemas REM-on y REM-off (España y Scammell, 2011; Harrington y Lee-Chiong, 2012; Saper et al., 2005; Puertas et al., 2015).

El sueño REM comparte con la vigilia un aumento de la actividad colinérgica, aunque difiere de la misma en la escasa activación de los centros monoaminérgicos. Los sistemas REM-on se encuentran en las neuronas colinérgicas de LDT y PPT, encargadas de la desincronización cortical a través del tálamo. Este sistema se encuentra inhibido durante la vigilia por mediación de la actividad de los núcleos monoaminérgicos y del sistema orexina/hipocretina (España y Scammell, 2011; Harrington y Lee-Chiong, 2012; Saper et al., 2005; Puertas et al., 2015).

Por otro lado, el sistema REM-off está formado por los centros monoaminérgicos involucrados en la vigilia, que al activarse inhiben al sistema REM-on, deteniendo el sueño REM. Durante el sueño REM estos sistemas monoaminérgicos se encuentran inactivos (España y Scammell, 2011; Harrington y Lee-Chiong, 2012; Saper et al., 2005; Puertas et al., 2015).

La atonía muscular de la musculatura estriada (excepto diafragma y músculos motores oculares) se debe a la inhibición que el núcleo sublaterodorsal (SLD), que activarían las neuronas del núcleo magnocelular a través del tracto tegmentorreticular. Estas neuronas inhibirían mediante glicina las motoneuronas del asta anterior de la médula espinal, produciendo la atonía. Nuevos hallazgos sugieren que las neuronas secretoras de la hormona concentradora de melanina del hipotálamo lateral facilitarían la actividad de las neuronas REM-on glutamatérgicas del núcleo sublaterodorsal (España y Scammell, 2011; Harrington y Lee-Chiong, 2012; Luppi et al., 2013; Puertas et al., 2015).

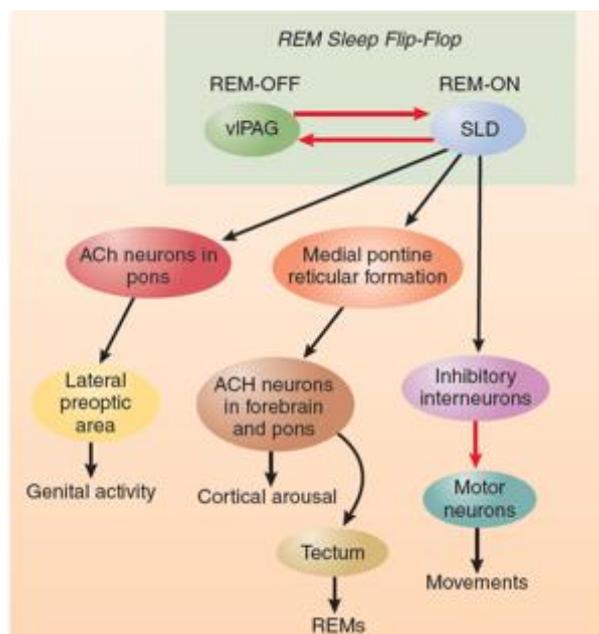


Figura 1.4.2.2.1.2.2. Principales centros implicados en el sueño REM. Elaborado a partir de los datos de Lu et al., 2006.

1.4.2.2.2. Alteraciones del sueño en pacientes con síndrome de fibromialgia

Más del 90% de los pacientes con FMS presentan alteraciones del sueño, entre las que se incluyen la dificultad tanto para conciliar como para mantener el sueño (Russell, 2013). Los pacientes con FMS normalmente perciben su sueño como no reparador y pasan el día en un estado de somnolencia permanente (Moldofsky, 2009; Roehrs et al., 2013). Esta elevada prevalencia ha promovido que en los nuevos criterios diagnósticos de la ACR se incluya el sueño no reparador como un síntoma a tener en cuenta en el diagnóstico (Wolfe et al., 2010).

Los pacientes con FMS sufren de una deficiente calidad del sueño. Independientemente de su duración, el sueño es percibido como inquieto y no reparador (Russell, 2013). Clínicamente, el sueño no reparador se correlaciona con la severidad del dolor. Específicamente en pacientes con FMS, las alteraciones del sueño están fuertemente relacionadas con los síntomas somáticos, como el dolor generalizado

y crónico (Branco et al., 1994; Diaz-Piedra et al., 2015; Roizenblatt et al., 2011; Roizenblatt et al., 2001; Rosenfeld et al., 2015; Roth et al., 2016).

Los estudios electroencefalográficos (EEG) de Moldofsky et al. muestran intrusiones de ondas alpha durante el sueño de ondas lentas, principalmente durante el estadio N2, en pacientes con FMS (Liedberg et al., 2015; Moldofsky, 2010; Roehrs et al., 2013). Esta alteración no es exclusiva de los pacientes con FMS, pero está presente en un 60% de los pacientes estudiados, frente al 25% de pacientes que lo presentan en otros tipos de insomnios (Russell, 2013). La duración del estadio N1 del sueño aumenta en estos pacientes, y tienen una actividad alpha aumentada durante los estadios N2 y N3 durante los primeros dos ciclos del sueño. Estos autores propusieron que la presencia de estas ondas típicas de la vigilia durante el sueño de ondas lentas está relacionada con el sueño no reparador, la mialgia difusa y los síntomas en el estado de ánimo (Branco et al., 1994; Diaz-Piedra et al., 2015; Moldofsky, 2008; Roizenblatt et al., 2001; Roizenblatt et al., 2011; Rosenfeld et al., 2015; Roth et al., 2016). El estudio de Affleck et al. sugiere que los cambios en las ondas lentas se corresponden con el periodo de liberación de la hormona del crecimiento, lo que podría influenciar a la intensidad del dolor percibida durante el día (Affleck et al.1996).

La presencia de ondas alpha en el sueño lento es la alteración más destacada en el sueño de los pacientes con FMS, pero también se han encontrado otras alteraciones, como un aumento del número de cambios de estadios del sueño y aumento de la percepción del dolor asociado a una menor duración de la fase N2 del sueño, y un mayor número de arousals durante el sueño (Branco et al., 1994; Diaz-Piedra et al., 2015; Roizenblatt et al., 2001; Roizenblatt et al., 2011; Rosenfeld et al., 2015; Roth et al., 2016).

Moldofsky et al. también demostraron una mayor prevalencia en los pacientes con FMS de interrupciones del sueño de ondas lentas, de alteraciones en la periodicidad del sueño, de la frecuencia de alternancia de los patrones cíclicos, de apneas y de movimientos periódicos de las extremidades. Además, estos pacientes tienen un sueño fragmentado como resultado de la presencia de arousals periódicos durante el sueño,

que se correlacionan con la severidad de sus síntomas clínicos (Moldofsky, 1982; 2008; 2010; Marvisi et al., 2013).

Esta fragmentación del sueño se debe principalmente a la presencia de las ondas alfa en el sueño de ondas lentas previamente descrito y a un aumento de la actividad motora durante el sueño (Roizenblatt et al., 2011). Ambas anormalidades producen microdespertares (breves interrupciones del sueño que duran 5-19 segundos) que aumentan el arousal durante el sueño y dificultan el descanso (Togo *et al.*, 2010). Además, en algunos pacientes con FMS se han descrito trastornos que provocan fragmentación del sueño como el Síndrome de Apnea del Sueño o los Movimientos Periódicos de los Miembros (Russell, 2013; Marvisi et al., 2015).

1.5. HIPÓTESIS SOBRE LA ETIOPATOGENIA DEL SÍNDROME DE FIBROMIALGIA

En la actualidad, la etiopatogenia del FMS sigue siendo desconocida (Branco et al., 2009; Bellato et al., 2012; Chinn et al., 2016), lo que dificulta en gran medida el establecimiento de tratamientos específicos satisfactorios. Uno de los principales problemas que se presenta en el estudio de etiopatogenia del FMS es la interrelación que existe entre algunos de sus principales síntomas (la privación de sueño no REM en personas sanas provoca clínica dolorosa similar al FMS, el dolor crónico puede provocar sintomatología ansiosa y depresiva, y a su vez estos pacientes suelen presentar somatizaciones sobre el aparato locomotor; la serotonina es un neurotransmisor implicado tanto en dolor como en depresión, etc). La interrelación de estos factores dificulta todavía más crear relaciones de causalidad entre ellos y establecer un origen (Villanueva y Valía, 2004).

A continuación se recogen algunas hipótesis que diversos estudios han planteado sobre la posible etiopatogenia del FMS.

1.5.1. Alteraciones periféricas

A pesar de que los recientes estudios localizan la patogénesis del FMS en el sistema nervioso central (Russell, 2013), en el inicio de la investigación sobre este síndrome diversas hipótesis que describen posibles etiologías periféricas de esta patología.

Salemi et al. (2003) realizaron biopsias de piel en 53 pacientes con FMS y encontraron células mononucleares y células similares a fibroblastos adyacentes a los nociceptores de la piel que se marcaron positivas para citoquinas inflamatorias, lo que sugiere el papel de la inflamación neurogénica en la etiología del FMS (Salemi et al., 2003). Otros autores han encontrado evidencia de cambios en la morfología de las células de Schwann en la piel (Kim et al., 2008) y una alteración del flujo sanguíneo en los músculos de los pacientes con FMS (Elvin et al., 2006; McIver et al., 2006).

También se han descrito cambios morfológicos a nivel muscular probablemente ligados al FMS denominados fibras “*ragged-red*”, “*rubber band*” y fibras apolilladas, que orientaban hacia una causa muscular del proceso (Lindh et al., 1995). Además se objetivaron cambios funcionales, sobre todo disminución de fuerza muscular y cambios tróficos. Un hallazgo frecuente es la dificultad de estos pacientes para relajar sus músculos, lo que puede ser motivo de fatiga y dolor muscular, aunque no se han demostrado cambios electrofisiológicos que lo corroboren (Staud, 2011). Otros factores que se han implicado son alteraciones a nivel de la microvascularización, con disminución de número de capilares por centímetro cuadrado y disminución de niveles de enzimas oxidativas (Lindh et al., 1995), y disminución de niveles de somatomedina C (Neeck, 2002), que darían lugar a problemas isquémicos musculares sintomáticos. Algunas investigaciones incluso relacionan traumatismos como factor desencadenante de su desarrollo (Buskila et al., 1997).

1.5.2. Alteraciones hormonales

Algunos estudios plantean 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 péptido de calcitonina, noradrenalina, endorfinas, dopamina, histamina y GABA, o elevados niveles de hormona de crecimiento (Giovengo et al., 1999). Algunas 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).

1.5.3. Alteraciones monoaminérgicas

En general, los expertos 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 encuentra una amplificación central del dolor de estos pacientes, con 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). Estos hallazgos podrían explicarse tanto por el 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 por la disminución de la mayor parte de metabolitos de la serotonina, la noradrenalina y la dopamina (Becker y Schweinhardt, 2012; Legangneux et al., 2001; Russell et al., 1992) observados en el líquido cefalorraquídeo de estos pacientes. En esta misma línea, estudios sobre polimorfismo genético en 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; Dadabhoy et al., 2008; Lee et al., 2012; Short et al., 2009; Xiao et al., 2012). Además, como hemos visto anteriormente, estos sistemas monoaminérgicos también están implicados en la regulación del estado de ánimo y del sueño, lo que en parte explicaría la elevada

frecuencia con que estos síntomas coexisten (Agüera-Ortiz et al., 2011; Arora et al., 2011; Dunne y Dunne, 2012; Ohayon, 2009; Paul-Savoie et al., 2012; Wood et al., 2009).

1.6. TRATAMIENTOS ACTUALES

Por todo lo mencionado hasta el momento el objetivo del tratamiento no es curativo sino paliativo y debería 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 del FMS, como en todos los síndromes de dolor crónico, posee componentes tanto sensitivos afectivos y cognitivos, 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). Se requieren múltiples intervenciones para el tratamiento efectivo del FMS, y pocos ensayos clínicos con agentes únicos han obtenido resultados positivos, la mayoría con efectos moderados y de duración relativamente corta. Los tratamientos del FMS con mayor evidencia científica podrían dividirse en 2 grandes grupos: tratamientos farmacológicos y tratamientos no farmacológicos.

1.6.1. Tratamientos farmacológicos

Actualmente no hay ningún fármaco aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios ni por la Agencia Europea de Medicamentos (AEM) con indicación específica para el FMS (para revisión ver el documento Fibromialgia del Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad, 2011). La *Food and Drugs Administration* (FDA) de Estados Unidos solo 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 ningún medicamento para esta patología a día de hoy (Chinn et al., 2016). En

la figura 1.6.1.1 se muestran los fármacos más empleados en la práctica clínica para el tratamiento del FMS:

Box 48-4 Medications Used for the Treatment of Fibromyalgia Syndrome

Simple Analgesics

- Non-steroidal anti-inflammatory drugs (ibuprofen, naproxen)
- Acetaminophen

Composite Analgesics

- Tramadol

Biogenic Amine Agonists and Antagonists

- Tricyclic antidepressants (amitriptyline, nortriptyline, doxepin, cyclobenzaprine)
- Selective serotonin reuptake inhibitors (fluoxetine, citalopram, sertraline, paroxetine)
- Balanced serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (duloxetine)
- Noradrenaline-enhanced and serotonin reuptake inhibitors (milnacipran)
- Serotonin receptor antagonists (tropisetron)
- α_2 -Adrenergic (tizanidine)
- 5-Hydroxytryptophan

Anticonvulsants

- Gabapentin, pregabalin

Hypnotics

- Antihistamines
- Zolpidem, zaleplon
- Sodium oxybate

Muscle Relaxants

- Benzodiazepines (clonazepam, alprazolam)
- Others (carisoprodol, methocarbamol, baclofen)

Local Anesthetics

- Lidocaine (lignocaine) or bupivacaine injections

Neurotransmitter Receptor Antagonists

- NMDA receptor antagonist (ketamine, dextromethorphan)
- NK1 receptor blockade antagonists

Figura 1.6.1.1. Principales fármacos empleados en el tratamiento del FMS. Tomado de Russell, 2013.

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:

1.6.1.1. Analgésicos

Aunque parezca evidente el tratamiento farmacológico con analgésicos para pacientes con FMS, su eficacia resulta muy limitada, y sólo resulta levemente efectiva en periodos en los que los pacientes tienen una sintomatología leve de dolor (Russell, 2013). El paracetamol ha sido ampliamente usado por pacientes con FMS, principalmente por el fácil acceso a este fármaco y su relativa seguridad, pero rara vez ha sido prescrito por facultativos y ha tenido una eficacia muy reducida. El uso de antiinflamatorios como los glucocorticoides o AINEs ha demostrado no ser efectivo para el tratamiento del FMS, y los expertos no recomiendan su utilización (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 de los derivados de su efecto psicotrópico. Existe controversia respecto al uso de opioides para el tratamiento del FMS debido a sus efectos adversos, como la afectación que producen en el sistema digestivo, la elevada tolerabilidad y la adicción que genera. En general, los expertos no recurren 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).

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

1.6.1.2. Antidepresivos

Diversos estudios que analizan la eficacia de los antidepresivos en el FMS los una de las alternativas terapéuticas más eficaces (Forte et al., 2015). En un metaanálisis realizado por Häuser et al., en 2009 en el que recogían los estudios que habían comparado la eficacia de los antidepresivos frente a placebos, concluyeron que existe una sólida evidencia de que los antidepresivos en la reducen del dolor, las alteraciones del sueño, la depresión y la calidad de vida de los pacientes con FMS (Häuser et al., 2009).

Tras analizar de forma independiente la eficacia de los antidepresivos más estudiados en el tratamiento del FMS, llegan a las siguientes conclusiones: (1) la amitriptilina tiene un gran efecto sobre la fatiga y las alteraciones del sueño (Moret y Briley, 2006); (2) los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina han mostrado ser menos efectivos para el síntoma de dolor (Arnold et al., 2002); (3) los inhibidores mixtos de la recaptación de serotonina y noradrenalina demostraron una eficacia leve en la reducción del dolor, las alteraciones del sueño y la depresión (Smith et al., 2010); (4) en los escasos ensayos clínicos realizados con inhibidores de la monoaminoxidasa, se mostró una reducción moderada de la sintomatología del dolor (Bellato et al., 2012; Forte et al., 2015). Algunos antidepresivos como el citalopram y la nortriptilina no demostraron tener una eficacia superior al placebo (Häuser et al., 2009).

La literatura ha encontrado que los inhibidores de la recaptación de serotonina, y en particular aquellos que poseen un componente noradrenérgico (duloxetina, venlafaxina, nefazodona, bupropion), parecen ser más eficaces en el alivio de los síntomas del FMS (Arnold, 2006; Lunn et al., 2014; Palmer et al., 2010).

1.6.1.3. Anticonvulsivantes

Los agentes antiepilépticos tales como la gabapentina, topiramato o pregabalina pueden reducir el dolor en el FMS (Bellato et al., 2012; Russell, 2013; Forte et al., 2015). Dentro de este grupo de fármacos, la pregabalina ha sido cada vez más utilizada en el tratamiento del FMS (Boomershine, 2010; Chinn et al., 2016; Forte et al., 2015). La potente unión de la pregabalina a la subunidad alfa₂-delta de los canales de calcio voltaje dependientes provoca una inhibición de la función de los canales de calcio presinápticos y, por consiguiente, de las corrientes de calcio. 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 pregabalina consigue producir un efecto antihiperálgico en pacientes con FMS (Bauer et al., 2009; Bauer et al., 2010). Estudios randomizados, a doble ciego y con grupo placebo han demostrado que la pregabalina a dosis de 450 mg/día es eficaz en el tratamiento del FMS reduciendo los síntomas del dolor, los trastornos del sueño y la fatiga asociada, comparado con grupo placebo (Boomershine et al., 2010; Forte et al., 2015).

1.6.2. Tratamientos no farmacológicos

Dentro de las terapias no farmacológicas para el tratamiento del FMS existen infinidad de procedimientos y técnicas que se han demostrado eficaces en la reducción de la sintomatología del FMS, aunque siempre como coadyuvantes a los tratamientos farmacológicos (Sumpton y Moulin, 2008). Estas técnicas se basan principalmente en terapias corporales o psicológicas que enseñan al paciente a convivir con el FMS y reducir las cogniciones negativas que los pacientes tienen sobre su enfermedad, ayudan a mejorar las condiciones físicas de los pacientes y proporcionan un entorno que favorece la socialización y la vida sana. Algunos estudios hacen sugerir que la estimulación transcraneal no invasiva produciría resultados positivos sobre el FMS (Short et al., 2009). De entre las prácticas más empleadas, destacan las tablas de

ejercicio físico, el yoga, el pilates, técnicas de relajación, terapia de grupo, dietas saludables, acupuntura, masajes....(Chinn et al., 2016; Lauche et al., 2015).

A continuación destacamos algunos de los abordajes no farmacológicos que han mostrado tener una mayor eficacia sobre la mejora de la sintomatología del FMS.

1.6.2.1. Ejercicio físico

El ejercicio físico, tanto en forma de ejercicio aeróbico, entrenamiento en resistencia o en flexibilidad ha demostrado ser beneficioso para paliar los síntomas del FMS (Bellato et al., 2012; Chinn et al., 2016). Diversos estudios han demostrado que el ejercicio aeróbico en pacientes con FMS reduce el dolor, la fatiga, la depresión y las limitaciones en la realización de las tareas de la vida diaria (Bellato et al., 2012; 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, produce liberación de endorfinas endógenas y tiene influencia sobre el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal (HHA), disminuyendo los niveles plasmáticos de cortisol (Russell, 2013; Kumar, 2015).

Además de estas implicaciones fisiológicas, la práctica regular de ejercicio evita el círculo vicioso entre el dolor, los trastornos psicológicos y la inactividad comunes en los pacientes con FMS. Mientras que la fatiga subyacente, el dolor o la depresión pueden contribuir a estilos de vida sedentarios y la baja aptitud física, varios estudios han demostrado que las personas con FMS son capaces de realizar ejercicio aeróbico de intensidad moderada, ejercicios de fortalecimiento y flexibilidad (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 tal que pueda derivar en efectos positivos del entrenamiento, pero no tan elevada como

para incrementar los síntomas. Conseguir que los pacientes con FMS inicien y mantengan un programa de ejercicio físico sigue siendo un reto (Sañudo et al., 2010; Russell, 2013).

1.6.2.2. La terapia de cognitivo-conductual (TCC) y los modelos psicoeducativos

Dentro de las terapias cognitivo-conductuales, son distintas las estrategias que 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 planificación de actividades placenteras, biofeedback o la utilización de técnicas de relajación y de control de estrés (Villanueva et al., 2004; Russell, 2013).

Desde la terapia cognitivo-conductual se pretende dotar a las personas con FMS de estrategias para que puedan ejercer control sobre sus vidas, manteniendo la mayor funcionalidad posible. Para ello, 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 educativa resulta sumamente importante porque sirve, entre otras cosas, para ajustar las expectativas del enfermo a su situación y posibilidades de acción, además de que resta ansiedad en el manejo del problema. En esta parte debe quedar claro cómo 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 et al., 2004; Russell, 2013).

1.6.2.3. Mindfulness

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" (Quintana y Rincón, 2011). 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. Concretamente, diversos autores han comprobado que tras la aplicación del MBSR 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 puesto de manifiesto que el entrenamiento mediante el MBSR de este tipo de pacientes, conseguía reducir significativamente diversas variables tales como la calidad de vida, el nivel de dolor percibido o las estrategias de afrontamiento del dolor empleadas, siguiendo un diseño cuasi-experimental con un grupo control de comparación (Grossman et al., 2007).

1.7. NECESIDAD DE AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DEL SÍNDROME DE FIBROMIALGIA

La falta de plena comprensión de la patogénesis de la fibromialgia dificulta tanto el manejo de estos pacientes como el avance en la investigación de nuevos tratamientos. Mejorar nuestros conocimientos sobre los mecanismos que subyacen al origen y mantenimiento de los síntomas expresados en la fibromialgia es fundamental para el desarrollo de estrategias terapéuticas más específicas y eficaces para este síndrome.

1.7.1. Importancia de modelos animales en investigación

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 al ser humano y a los propios animales. Pero 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).

Salvadas todas las cuestiones de carácter ético y moral, el principal inconveniente de la experimentación en animales es su incapacidad para comunicar verbalmente sus experiencias subjetivas. Los humanos, mediante el habla o la comunicación escrita pueden proporcionar en la investigación un acceso relativamente rápido y directo de sus percepciones, sensaciones y sentimientos, constructos que en animales deben ser inferidos a través del registro y análisis de su conducta observable. De la misma forma, los humanos son capaces de seguir instrucciones complejas de forma rápida y fácil, lo que facilita su exploración y la consecución de distintos procedimientos para los cuales los animales deben ser entrenados o anestesiados.

Tanto los trastornos de índole afectivo como los cuadros de dolores complejos en sujetos humanos van acompañados de contenido personal y autobiográfico que modulan la experiencia perceptiva de su dolencia. En animales no es posible captar este tipo de vivencias, pero por otro lado, 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 que 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).

En cualquier caso, los modelos animales ofrecen en la actualidad una caracterización neuroquímica, anatómica, fisiológica y electrofisiológica de las distintas condiciones patológicas humanas que no es posible alcanzar con las técnicas disponibles en la investigación con sujetos humanos.

1.7.2. Modelos animales de fibromialgia

Disponer de un modelo válido de FMS en animales de experimentación es, por tanto, fundamental para avanzar en el conocimiento de esta patología. 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 (DeSantana et al., 2013; Sluka, 2009).

Con este fin se han creado modelos animales de FMS que intentan reproducir el cuadro sintomatológico de los pacientes humanos, y de esta forma obtener datos anatómico- funcionales que en humanos no se pueden obtener por razones metodológicas y éticas.

La mayoría de los modelos animales de FMS descritos hasta el momento no son capaces de reproducir la sintomatología exacta del dolor del FMS (DeSantana et al., 2013). Éstos se basaban principalmente en generar un dolor muscular crónico mediante inyecciones intramusculares de sustancias como carreginina (Kehl et al., 2000), ácido salino (Sluka et al., 2001), factor de necrosis tumoral (Schäfers et al., 2003) o ácido clorhídrico (Furuta et al., 2012), o mediante la inducción de un estrés producido por natación forzada en ratas (Suarez-Roca et al., 2006) o por la exposición a sonidos estresantes impredecibles (Green et al., 2011).

La tabla 1.7.2.1 recoge una revisión de los modelos animales de FMS desarrollados en los últimos años por distintos autores:

Autores	Modelo	Metodología
Kehl et al., 2000	Hiperalgnesia muscular	Inyección de carragenina intramuscular en tríceps uni- o bilateral.
Sluka et al., 2001	Dolor musculoesquelético generalizado duradero	Dos dosis intramusculares de bajo pH o pH 4 de solución salina ácida en el músculo gastrocnemio.
Schäfers et al., 2003	Dolor Musculoesquelético	Inyección intramuscular de TNF α de forma bilateral en el músculo gastrocnemio o en el bíceps.
Nagakura et al., 2009	FMS	Inyección subcutánea de reserpina disuelta en ácido acético glacial. 1ml/kg durante 3 días consecutivos.
Furuta et al., 2011	FMS, SVI/CI	Inyección intramuscular de HCl pH 4 de forma bilateral en los músculos glúteos. Inyección de catéter intravesical de polietileno + solución salina+ lidocaína al 1%.
Khasar et al., 2009	DCG	Estrés mediante sonidos impredecibles.
Green et al., 2011	FMS, SVI, ansiedad, trastorno temporomandibular.	Estrés mediante sonidos impredecibles. Estrés por evitación de agua.
Quintero et al., 2011	Nocicepción	<i>Forced Swimming Test.</i>
Suarez-Roca et al., 2006	Síndrome de dolor muscular crónico.	<i>Forced Swimming Test.</i> Carragenina intramuscular.

Tabla 1.7.2.1. Revisión de los modelos animales de FMS y de síntomas relacionados. FMS: Síndrome de Fibromialgia; SVI/CI: Síndrome Vejiga Irritable/Cistitis Intersticial; DCG: Dolor Crónico Generalizado; SVI: Síndrome Vejiga Irritable

1.7.3. Modelo de fibromialgia inducido por reserpina

En 2009, el grupo de Nagakura *et al.* describió un modelo de FMS en ratas mediante la inyección subcutánea de reserpina, un fármaco que disminuye severamente en el organismo los niveles de las aminas biogénicas (noradrenalina, dopamina y serotonina) al impedir su traslado vesicular en la sinapsis por el bloqueo permanente de los receptores V-MAT de las vesículas de liberación sináptica. Las ratas mostraban después de la administración de reserpina hiperalgesia mecánica muscular, alodinia táctil y síntomas depresivos (Nagakura *et al.*, 2009; Oe *et al.*, 2010).

1.7.3.1. Efecto de la reserpina

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, cloruro de metileno y ácido acético glacial (National Toxicology Program, 2011).

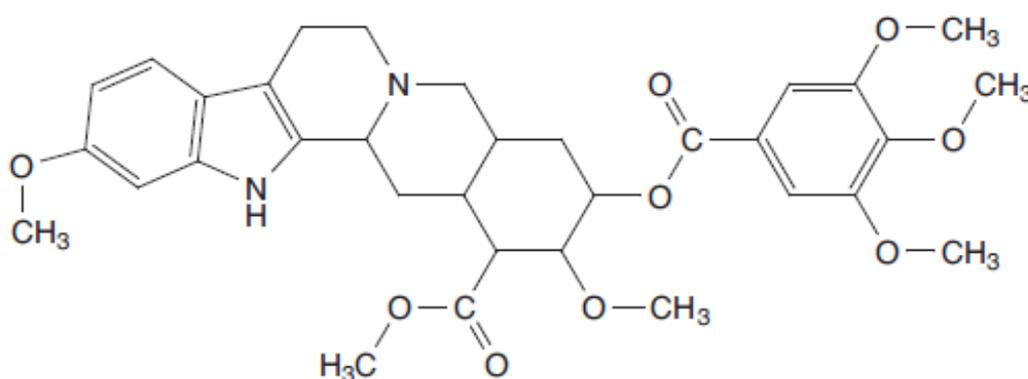


Figura 1.7.3.1.1. Estructura química de la reserpina. Tomado del National Toxicology Program, 2011.

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).

La inhibición de estos receptores genera la destrucción de las vesículas, de modo que los terminales no pueden concentrar o almacenar la serotonina, noradrenalina o la dopamina, y se produce una acumulación de aminas en el citosol y consecuentemente se inicia su degradación mediante enzimas tipo MAO (monoamina O₂ oxidoreductasa, EC 1.4.3.4) (Lee et al., 2015; Maldonado y Maeyama, 2015). El resultado de ello es una depleción de las reservas de monoaminas en el sistema nervioso central y en el sistema nervioso simpático (Antkiewicz et al. 2015; Lee et al., 2015).

Debido a su acción sobre las aminas biogénicas, la reserpina se emplea en la actualidad para crear modelos animales de enfermedades caracterizadas por déficits de monoaminas, así como para estudiar el efecto de fármacos destinados a modular sistemas de los que el sistema monoaminérgico es responsable (Arora et al., 2011; Kaneko et al., 2014; Leão et al., 2015; Maldonado y Maeyama, 2015; Nagakura et al., 2009; Wang et al., 2014).

Un ejemplo de ello es su uso como modelo farmacológico de la depresión (Antkiewicz et al., 2015; Antkiewicz et al., 2014; Jindal et al., 2012; Minor y Hanff, 2015). Dado el papel que las monoaminas juegan en la patofisiología de esta enfermedad (Elhwuegi, 2004; Hamon y Blier, 2013; Kalia, 2005), diversos estudios emplean la reserpina para generar un cuadro de síntomas depresivos en animales con el objetivo de profundizar en el mecanismo de acción de diversas terapias farmacológicas (Antkiewicz et al., 2014; 2015; Jindal et al., 2012; Minor y Hanff, 2015).

Por otro lado, debido al déficit que la reserpina produce sobre el sistema dopaminérgico, algunos estudios la han empleado para generar un cuadro de alteraciones motoras (temblor, rigidez, acinesia y alteraciones posturales y de la

marcha) similares a las observadas en pacientes con enfermedad de Parkinson (Calderón et al., 2011; Colpaert, 1987; Leão et al., 2015).

Recientemente, algunos estudios están empleando la reserpina para generar modelos animales de dolor generalizado (Kaneko et al., 2014; Nagakura et al., 2009; Ogino et al., 2013; Taguchi et al., 2015).

En gran medida, los mecanismos que subyacen a las patologías de dolor crónico siguen siendo desconocidos, y por ello, la efectividad de los tratamientos farmacológicos es limitada (Lee et al., 2011; Theoharides et al., 2015). En la modulación del procesamiento del dolor a nivel supramedular están directamente implicadas la serotonina, la noradrenalina y la dopamina (Kindler et al., 2011; Meeus y Nijs, 2006; Parent et al., 2015; Petersel et al., 2011; Phillips y Clauw, 2011; Yunus, 2007).

Es por ello que 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).

1.7.3.2. Características del modelo

Este modelo presenta validez aparente (similitud de síntomas entre el modelo y el trastorno: dolor muscular, alodinia, síntomas comórbidos como la depresión), validez de constructo (al igual que en el trastorno real, las ratas no muestran síntomas físicos aparentes y se observa una disminución a nivel central de las aminas biológicas) y validez predictiva (se observa una similitud en la respuesta al tratamiento: más eficacia de los antidepresivos que de los AINES) (Nagakura et al., 2009).

1.7.3.3. Críticas al modelo

En 2010, el doctor Gordon Munro realizó algunas críticas al modelo propuesto por Nagakura y sus compañeros en 2009 (Munro, 2010). Estas críticas hacían referencia a los siguientes aspectos:

- Las medidas de dolor realizadas en el músculo gastrocnemio y en la planta de la pata trasera derecha de las ratas resulta insuficiente para asegurar que los animales tienen dolor musculoesquelético generalizado, síntoma principal de los pacientes con FMS.
- La prevalencia del FMS en la población general ha sido clásicamente descrita mayor en mujeres que en hombres. A pesar de eso, en el estudio de Nagakura y sus colaboradores se emplean ratas macho. Aunque la medida de los umbrales de dolor se realiza tanto en las ratas macho como en las hembras y no se encuentran diferencias significativas en las variaciones de los umbrales entre los dos grupos, Munro opina que no se han tenido en cuenta en la medida las diferencias de peso entre las ratas hembras y machos de la misma edad.
- Los autores no estudian otros síntomas asociados con el FMS, tales como las alteraciones del sueño o la fatiga crónica.
- Asegurar que el aumento de la conducta de inmovilidad en el Forced Swimming Test en las ratas tratadas de reserpina respecto a las ratas control indica que los animales tienen depresión es demasiado especulativo. Además, determinar que los síntomas depresivos en las ratas con reserpina se deben a la disminución de los niveles de monoaminas es un argumento insuficiente, dado que en la actualidad, la teoría monoaminérgica de la depresión se considera simplista e incompleta.
- Los autores no encuentran diferencias significativas en la presión arterial ni en la temperatura intrarrectal entre las ratas reserpinizadas y las ratas control, y en pacientes con FMS se ha observado un aumento del tono simpático y una disminución en el parasimpático.

02

PLANTEAMIENTO DEL
PROBLEMA,
HIPÓTESIS DE TRABAJO
Y OBJETIVOS

2.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La fibromialgia es una enfermedad de etiología desconocida que se caracteriza por dolor crónico generalizado que el paciente localiza en el aparato locomotor. Además del dolor, otros síntomas como fatiga intensa, alteraciones del sueño, parestesias en extremidades, depresión, ansiedad, rigidez articular, cefaleas y sensación de tumefacción en manos, se encuentran entre las manifestaciones clínicas más comunes. Aunque en los últimos años se han hecho importantes avances en el manejo de los pacientes con fibromialgia, no se consigue alcanzar un grado de satisfacción similar al de otras patologías que igualmente repercuten de forma importante en la calidad de vida y la economía de nuestra sociedad. Es evidente que esto es así en la fibromialgia, en gran medida, porque sigue siendo un misterio su etiopatogenia.

Es muy 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.

Disponer, por tanto, de un modelo válido de fibromialgia en animales de experimentación es en estos momentos fundamental para profundizar en el origen de esta patología.

Tras la última revisión de los criterios diagnósticos de la fibromialgia del ACR, un modelo animal válido de fibromialgia debería reproducir no solo los síntomas de dolor generalizado, sino también los síntomas de comorbilidad más frecuentemente asociados con este síndrome, las alteraciones del sueño y los síntomas depresivos.

La gran mayoría de los modelos animales de fibromialgia descritos hasta el momento se basan exclusivamente en generar un dolor muscular crónico, o un cuadro de estrés crónico que afecte a los umbrales de dolor. Ninguno de estos modelos animales de fibromialgia reproduce, sin embargo, el resto de sintomatología que acompaña a la fibromialgia en humanos.

En 2009, Nagakura et al. describieron un modelo de fibromialgia en ratas mediante la inyección subcutánea de reserpina, un fármaco que disminuye severamente en el sistema nervioso central los niveles de las aminas biogénicas (noradrenalina, dopamina y serotonina) al impedir su traslado vesicular. Según los autores, las ratas reserpinizadas mostraban hiperalgesia mecánica muscular, alodinia táctil y síntomas depresivos.

Sin embargo, el modelo de Nagakura recibió severas críticas por aspectos metodológicos que cuestionan, precisamente, la supuesta reproducción de comorbilidad, concretamente la reproducción de síntomas depresivos (Munro, 2010). Asimismo, Munro también señaló que para validar el modelo era necesario comprobar si éste era capaz de reproducir otros síntomas comórbidos muy frecuentes en humanos con fibromialgia, como las alteraciones del sueño.

Nosotros creemos que el modelo puede ser válido y por ello proponemos analizarlo. Aunque no existen en la literatura estudios similares al presentado en este trabajo, existe suficientes indicios para que podamos sostener la hipótesis de que el modelo de fibromialgia inducida por reserpina reproducirá en la rata una sintomatología similar a la descrita en pacientes humanos con fibromialgia, al menos en lo referente al síntoma principal, el dolor musculoesquelético generalizado, y la

comorbilidad más frecuente, las alteraciones del sueño y los síntomas depresivos. Como ya se ha comentado anteriormente, el modelo animal de fibromialgia propuesto por el grupo de Nagakura basado en la administración de reserpina, provoca una depleción de las monoaminas (noradrenalina, serotonina y dopamina) en el sistema nervioso central de la rata. Las monoaminas juegan un papel fundamental en el control del dolor y en la regulación del sueño y de los estados de ánimo.

Por ello, es perfectamente asumible que una alteración en los niveles cerebrales de monoaminas, provoque desórdenes en los circuitos implicados en las mencionadas funciones.

2.2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis de trabajo sostiene que el modelo de fibromialgia inducido por reserpina en rata descrito por Nagakura *et al.* en 2009 es un modelo válido para reproducir en rata los síntomas predominantes de este síndrome en pacientes humanos.

Por tanto, si nuestra hipótesis resulta cierta, las ratas a las que administremos subcutáneamente 1mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos presentarán una disminución en los umbrales de dolor, sintomatología depresiva y alteraciones del sueño. Además, presentarán una modificación del patrón de activación de los principales centros monoaminérgicos encefálicos (Núcleo Dorsal Rafe, Locus Coeruleus y Área Tegmental Ventral) como resultado de la administración de reserpina, y que en parte explicarían las alteraciones conductuales halladas.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo General

El objetivo general de nuestro estudio es validar el modelo de fibromialgia inducido por reserpina en rata propuesto por Nagakura et al. en 2009, para lo que deberá reproducir en las ratas alteraciones en los umbrales de dolor, sintomatología depresiva y alteraciones del sueño. Además, esperamos hallar modificaciones en los patrones de activación neuronal de los principales centros monoaminérgicos que puedan explicar estas alteraciones.

2.3.2. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos se pueden concretar de la siguiente manera:

1. Estudiar alteraciones en los umbrales de dolor. Empleando el *Electrovonfrey Test* para alodinia táctil, y el *Randall and Selitto Test* para hiperalgesia mecánica, comprobar si la administración subcutánea de 1mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos produce una disminución de los umbrales de dolor en las ratas experimentales respecto a las ratas control.
2. Estudiar la sintomatología depresiva. Empleando el *Forced Swimming Test* y una adaptación del *Novelty-Suppressed Feeding Test*, comprobar si la administración subcutánea de 1mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos produce la aparición de síntomas depresivos dolor en las ratas experimentales respecto a las ratas control.
3. Estudiar alteraciones en los patrones de sueño. Mediante la implantación crónica de electrodos de campo y de electrodos de electromiograma, comprobar si la administración subcutánea de 1mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos produce una alteración en la arquitectura del sueño que pueda justificar la aparición de sueño no reparador.

4. Estudiar los patrones de activación de los principales centros monoaminérgicos. Mediante técnicas de inmunodetección del gen de expresión temprana c-fos, comprobar si la administración subcutánea de 1mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos produce modificaciones en el patrón de activación del núcleo dorsal rafe, locus coeruleus y área tegmental ventral, que puedan explicar la aparición de la sintomatología descrita anteriormente.

03

MATERIAL
Y MÉTODOS

3.1. ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

3.1.1. Condiciones ambientales y de estabulación

Se utilizaron un total de 111 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Janvier Labs, Saint Berthevin, France), 350 ± 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, Harlan).

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 Universidad de Valencia 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; A1385128209500; 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 pudieran 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 pudiera 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).

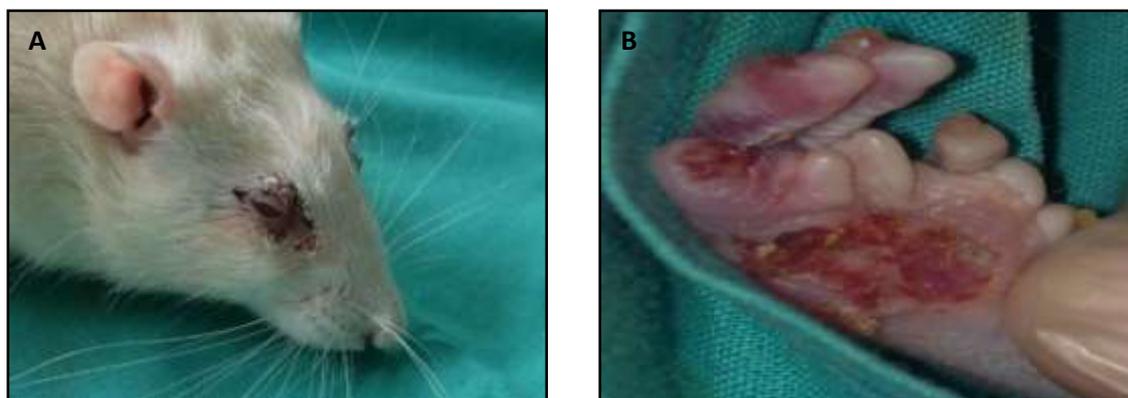


Figura 3.1.3.1. Signos de sufrimiento excesivo del animal que determinan criterios de punto final: (A) Secreción excesiva de porfirinas (cromodacriorrea), acumuladas por la disminución de la conducta de autoaseo; (B) Mutilación parcial de la pata trasera derecha tras la constricción del nervio ciático.

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
	Postura anormal	3
Comportamiento espontáneo (de 0 a 3)	Normal	0
	Pequeños cambios	1
	Inactividad	2
	Automutilación, vocalizaciones anormales, animales muy inquietos o inmóviles.	3
Comportamiento en respuesta a la manipulación (de 0 a 3)	Normal	0
	Cambios pequeños	1
	Cambios moderados	2
	Animal agresivo o comatoso	3
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

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 y 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

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 27 ratas, de las cuales 14 fueron tratadas con reserpina y 13 con vehículo. La administración de reserpina o vehículo se realizó mediante inoculación subcutánea de 1 mg/kg una vez al día durante tres días consecutivos.

Para el estudio de los umbrales de dolor mediante el *Randall and Selitto Test* se emplearon un total de 27 ratas, de las cuales 14 fueron tratadas con reserpina y 13 con vehículo. La administración de reserpina o vehículo se realizó mediante inoculación subcutánea de 1 mg/kg una vez al día durante tres días consecutivos.

3.1.4.1.2. *Animales para el estudio de las alteraciones del sueño*

Para el estudio de las alteraciones de los patrones de sueño mediante el implantación intracraneal de electrodos crónicos se emplearon un total de 5 ratas. En todas las ratas se realizaron registros control antes de la administración de reserpina y durante los 21 días posteriores a la administración de reserpina. De esta forma, el efecto de la reserpina sobre cada rata se comparaba con los periodos de sueño control registrados, disminuyendo así el número de animales empleados. La administración de reserpina se realizó mediante inoculación subcutánea de 1 mg/kg una vez al día durante tres días consecutivos.

3.1.4.1.3. *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 15 ratas, de las cuales 6 fueron tratadas con reserpina y 9 con vehículo. La administración de reserpina o vehículo se realizó mediante inoculación subcutánea de 1 mg/kg una vez al día durante tres días consecutivos.

Para el estudio de los síntomas depresivos mediante el *Novelty- Suppressed Feeding Test* se emplearon un total de 15 ratas, de las cuales 6 fueron tratadas con reserpina y 9 con vehículo. La administración de reserpina o vehículo se realizó mediante inoculación subcutánea de 1 mg/kg una vez al día durante tres días consecutivos.

3.1.4.1.4. Animales para el estudio de inmunodetección de Fos

Se crearon 3 grupos de estudio. Los animales del grupo control (N= 6 ratas) recibieron 1 mg/kg de vehículo sin reserpina en una única dosis subcutánea. De los grupos experimentales, a uno de los grupos (N= 6 ratas) se le administró una dosis de reserpina aguda de 1mg/kg mediante inyección subcutánea, mientras que a otro de los grupos (N= 6 ratas) la administración de reserpina se realizó mediante una inyección subcutánea de 1mg/kg una vez al día durante tres días consecutivos.

3.1.4.1.5. Resumen de la casuística del estudio

ESTUDIO	RESERPINA	VEHÍCULO	TOTAL
ELECTROVONFREY TEST	14	13	27
RANDALL AND SELITTO TEST	14	13	27
FORCED SWIMMING TEST	6	9	15
NOVELTY-SUPPRESSED FEEDING TEST	9	9	18
ESTUDIO DE SUEÑO	5	0	5
ESTUDIO DE FOS	12	6	18

Tabla 3.1.4.2.1. Resumen de la casuística del estudio

3.2. HABITUACIÓN 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.

Este periodo de habituación difiere en los distintos procedimientos, ya que para 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 es 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).

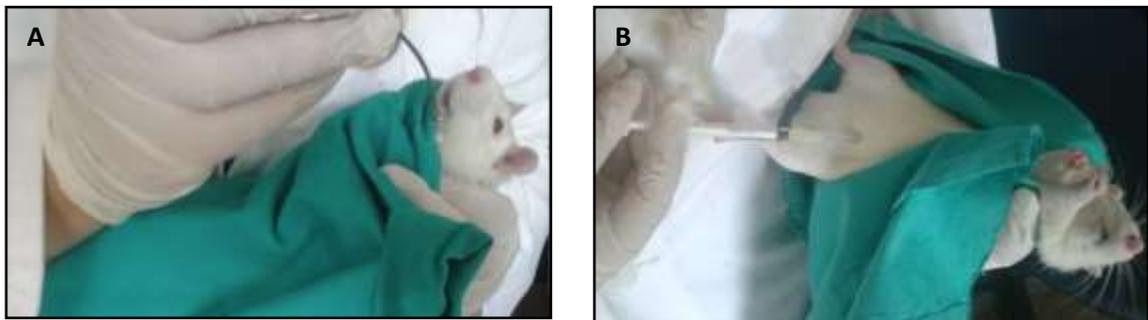


Figura 3.2.1. Habitación a las maniobras de inmovilización para la administración de fármacos, por vía oral (A) e intraperitoneal (B).

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 iba a ser medido con el *Electrovonfrey Test* 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 *Randall and Selitto Test* 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 3.2.1.2.1).



Figura 3.2.1.2.1. 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, así que la habituación se realizó a la manipulación por parte del investigador y a la inmovilización requerida para la administración de reserpina/vehículo, pero no se expuso al animal en ningún momento previo al test ni al campo abierto ni al cilindro con agua. El proceso total de habituación por día para cada animal fue de 20 minutos.

3.2.3. Habitación a las maniobras y aparatos en el estudio del sueño

El estudio de los patrones de sueño se inició con la cirugía de implantación de los electrodos crónicos. Tras la intervención, se dejó al animal un periodo de recuperación de dos días durante los cuales se supervisó su estado físico, controlando que el animal no tuviera secuelas neurológicas derivadas de la intervención, como alteraciones del movimiento o signos de inmovilidad o inapetencia. Durante este periodo el animal fue tratado con un AINE (meloxicam) para reducir el dolor de la cirugía y se le hicieron curas en la zona de implantación a diario hasta el inicio de los registros, incluyéndose las curas en el periodo de habituación. Tras el periodo de recuperación de la cirugía de implantación de los electrodos, las ratas fueron sometidas a un procedimiento de habituación de cinco días, antes de iniciar los registros electrofisiológicos.

La habituación consistió en aclimatar al animal a la sala de registro (30 minutos al día) y a la caja de registro (caja metálica de 50x50x50 cm, forrada por dentro de chapa de madera) y en una manipulación por parte del investigador en la que se acostumbró a la rata a la inmovilización requerida para la administración de reserpina, para la manipulación en la zona del pedestal de electrodos y para conectar y desconectar el cable de registro. El cable se les dejó colocado dos días antes del primer registro para que se acostumbraran al peso del cable sobre su cabeza, y esto no influyera en sus periodos de sueño durante los registros (Figura 3.2.3.1).



Figura 3.2.3.1. Habitación de la rata a la sala de registro, a la caja de registro y al peso del cable sobre la cabeza.

3.2.4. Habitación para el estudio de la inmunodetección de Fos

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

3.3. ADMINISTRACIÓN DE RESERPINA/ VEHÍCULO

Después del proceso de habituación, se administró una vez al día una inyección subcutánea de 1mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos (Nagakura et al., 2009) a los grupos experimentales (grupos tratados con reserpina). Los grupos control recibieron el mismo volumen de vehículo sin reserpina (grupos tratados con vehículo) durante los mismos tres días consecutivos.

3.3.1. Preparación de la reserpina/vehículo

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. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.4.1. 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 medida la administración de reserpina altera los umbrales de dolor en cada rata. Este dato es el resultado de calcular la media de dos medidas realizadas en las mismas condiciones en dos días consecutivos, los dos días posteriores al periodo de habituación. Hay que tener en cuenta que cada medida constó de la media de tres medidas, tomadas con un intervalo interestímulo de 30 segundos.

Tras la administración de reserpina, los umbrales de dolor se miden para ambos test los días 1, 3, 5, y 7 posteriores a la última administración de reserpina (Figuras 3.4.1.1.1 y 3.4.1.2.1).

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 c-fos.

3.4.1.1. Electrovonfrey Test

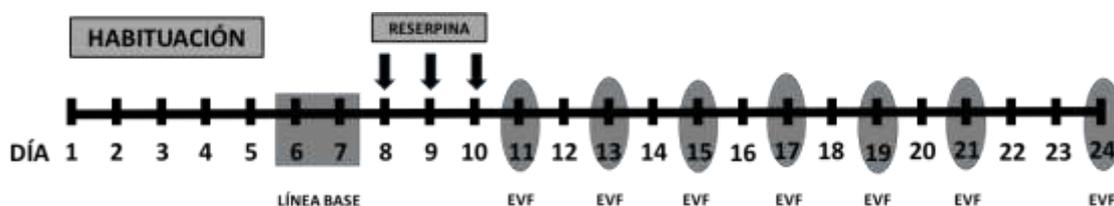


Figura 3.4.1.1.1. Cronograma del estudio de los umbrales de dolor mediante Electrovonfrey test.

Empleamos el *Electronic Von Frey Test* (EVF) para evaluar la alodinia táctil. El 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. Utilizando el aparato electrónico de Von Frey (Electrovonfrey, model nº: 2290, IITC Inc. Woodland Hills, CA), que consiste en un transductor de fuerza que tiene acoplado una punta rígida (*rigid tip*) 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 3.7). Se realizaron tres medidas en la pata en cada medición, con 30 segundos de intervalo interestímulo en cada medición.

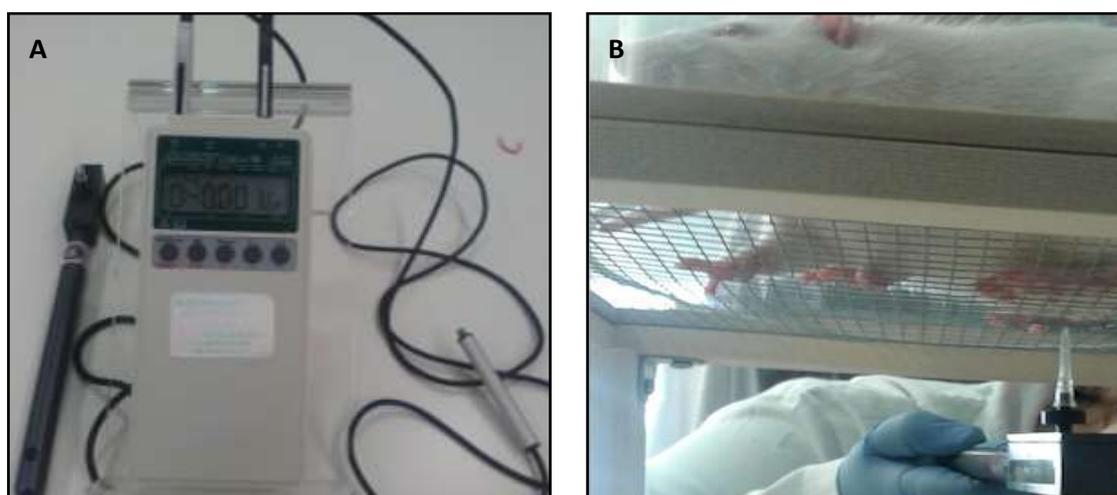


Figura 3.4.1.1.2. (A) Aparato Electronic Von Frey: consta de un transductor de fuerza, una unidad Almemo 2290-4 de registro de datos y un dispositivo de reinicio; (B) Rata sobre la rejilla elevada. La punta rígida unida al transductor de fuerza ejerce presión sobre la pata trasera derecha.

3.4.1.2. Randall and Selitto Test

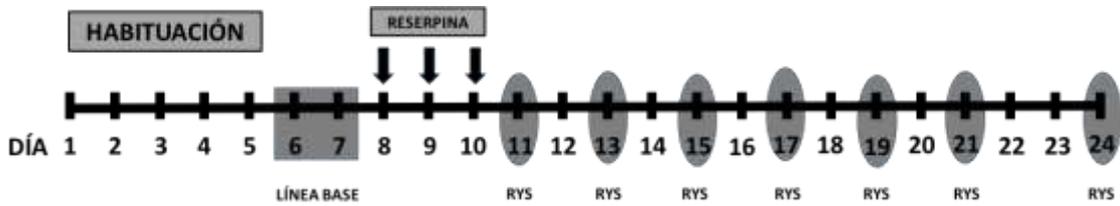


Figura 3.4.1.2.1. Cronograma del estudio de los umbrales de dolor mediante Randall and Selitto Test.

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 3.9). Se registraron tres medidas en cada medición, con 30 segundos de intervalo interestímulo en cada medición.

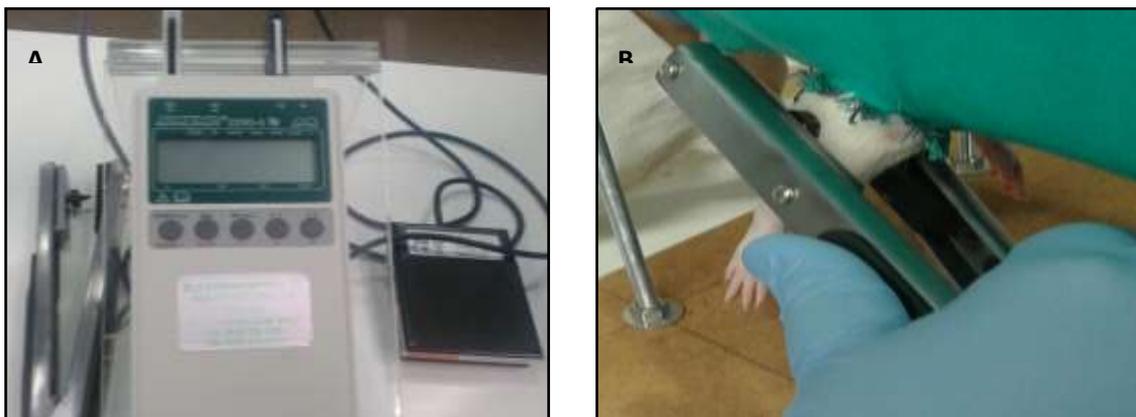


Figura 3.4.1.2.2. (A) Aparato Randall and Selitto adaptado: consta de un transductor de fuerza, una unidad Almemo 2290-4 de registro de datos y un dispositivo de reinicio; (B) Rata sobre el soporte de tela con las patas suspendidas. El transductor de fuerza unido a un aparato en forma de pinza ejerce presión sobre el músculo gastrocnemio la pata trasera derecha.

3.4.2. Estudio de síntomas depresivos

3.4.2.1. Forced Swimming Test

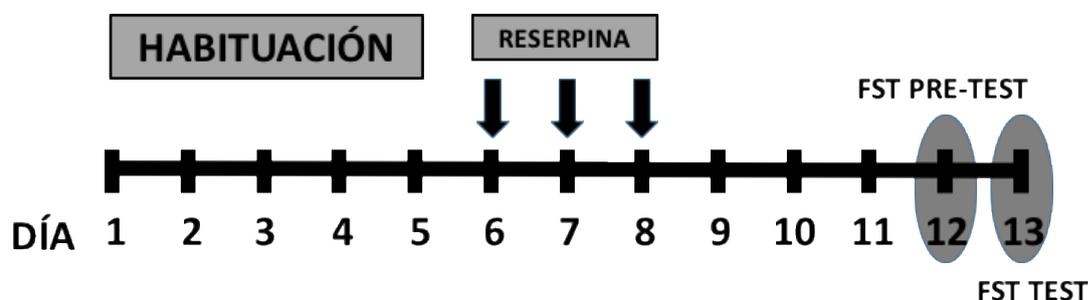


Figura 3.4.2.1.1. Cronograma del estudio de la sintomatología depresiva mediante Forced Swimming Test.

El Forced Swimming Test (FST) modificado se realizó siguiendo las indicaciones descritas por Slattery y Cryan (2012). En los días 4 y 5 posteriores a la última administración de reserpina, 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 25 °C durante 15 minutos. Veinticuatro horas después 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 25 °C para cada rata. Ambos procedimientos fueron grabados en vídeo desde una visión superior y otra lateral (Figura 3.4.2.1.2).

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%.



Figura 3.4.2.1.2. Visión lateral del Forced Swimming Test. De izquierda a derecha pueden verse representadas las conductas de inmovilidad, escalar y nadar.

3.4.2.2. Novelty Suppressed Feeding Test

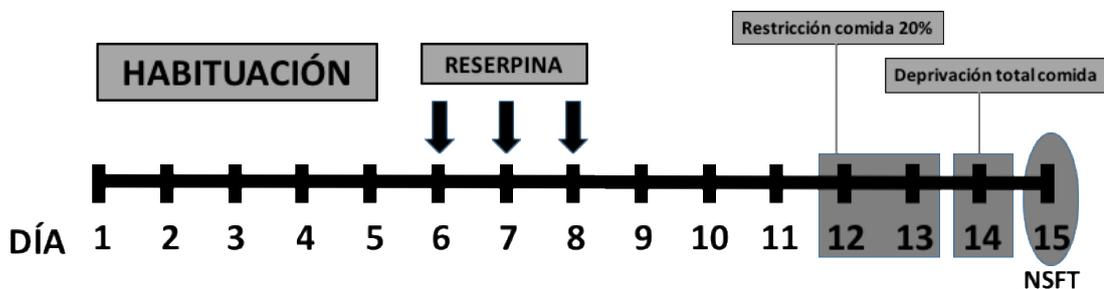


Figura 3.4.2.2.1. Cronograma del estudio de la sintomatología depresiva mediante Novelty-Suppressed Feeding Test.

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 et al., 2015).

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 4 y 5 posteriores a la última administración de reserpina) 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) se impuso una privación completa de comida (Blasco et al., 2015). 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 que fue renovado 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, y el resto de la sala estuvo a oscuras. Todo el procedimiento fue grabado en vídeo (Figura 3.4.2.2.2).

Las ratas fueron colocadas en una esquina del campo abierto y se grabó el tiempo que la rata tardó en acercarse al centro del campo y comer por primera vez. 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. Después del episodio de consumo de comida, o transcurridos los 10 minutos, los animales fueron devueltos a sus jaulas y llevados al

estabulario, donde inmediatamente se les proporcionó una ración controlada de comida. Para controlar que las diferencias en el tiempo transcurrido hasta el consumo de comida en el test entre grupo experimental y grupo control eran debidas a la presencia de síntomas depresivos y no a efectos directos de la reserpina sobre el apetito de las ratas, se registraron dos parámetros una vez los animales fueron devueltos a sus estabulaciones después del test: (1) el tiempo que tarda el animal en empezar a comer en su jaula, y (2) la cantidad de comida que el animal come durante 10 minutos posteriores al test (Blasco et al., 2015).

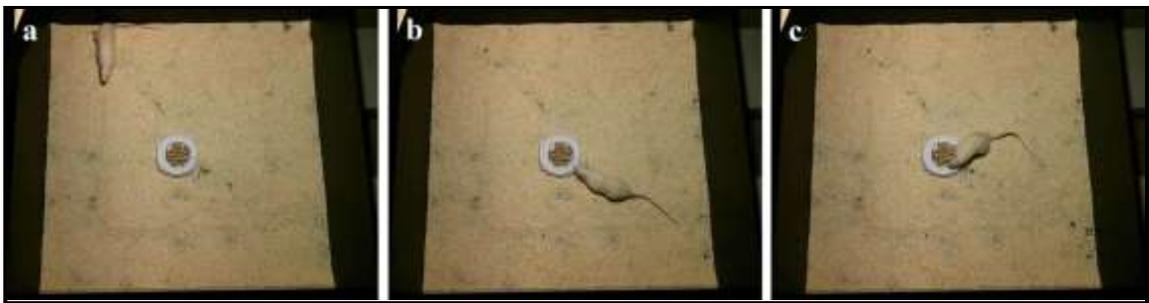


Figura 3.4.2.2.2. *Novelty- Suppressed Feeding Test.* La rata se colocó en una esquina del campo abierto (a) al inicio del test. La rata se acercó a la plataforma central (b) y olió y tocó la comida (c) durante el test. La prueba finalizó cuando comieron del centro por primera vez, o pasados 10 minutos si el animal no come.

3.4.3. Estudio del sueño

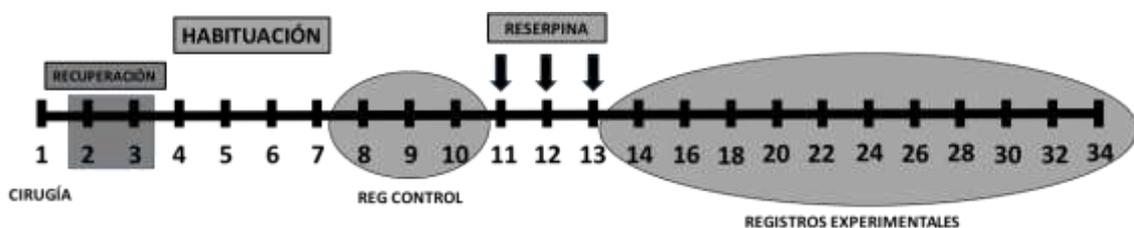


Figura 3.4.3.1. *Cronograma del estudio del sueño.*

El estudio del sueño se realizó teniendo en cuenta tanto parámetros conductuales derivados de la observación de la actividad motora durante los periodos de sueño, como parámetros analizados a partir de registros electrofisiológicos obtenidos mediante la implantación de electrodos crónicos en hipocampo y electrodos de electromiograma (EMG) en los músculos de la nuca.

3.4.3.1. Procedimiento quirúrgico

Como analgesia preoperatoria fue administrada una dosis subcutánea de 0,1 ml, de una dilución de 0,1 ml de meloxicam (Metacam®, 1,5 mg/ml, Boehringer Ingelheim) y 0,9 ml de suero salino. Los animales fueron anestesiados con una combinación de ketamina 75 mg/kg i.p. (Ketolar®, Pfizer) y medetomidina 0,5 mg/kg i.p. (Dorbene® Vet, Pfizer). Durante todo el procedimiento se mantuvo la temperatura corporal de la rata en 37 °C utilizando una almohadilla isotérmica. Como complemento a la anestesia general, se inyectó 1 ml de lidocaína en la cabeza (B. Braun, 5%), para la anestesia local de las fibras sensitivas de la piel, periostio y oídos del animal, que son las zonas más afectadas por la cirugía estereotáxica.

Tras la pérdida de reflejo ocular y de retirada de la pata, se colocó al animal en un cuadro estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, USA). Durante todo el procedimiento se mantuvo la temperatura corporal de la rata en 37 °C utilizando una almohadilla isotérmica y se inyectó periódicamente solución salina fisiológica para mantener su hidratación.

Después de desinfectar la zona con povidona iodada, se realizó una incisión longitudinal medial en la cabeza, la piel fue retraída y el cráneo expuesto. El cráneo se trepanó de acuerdo a las coordenadas estereotáxicas del atlas de Paxinos y Watson (2013). Para aumentar la precisión, aplicamos las correcciones proporcionales a las coordenadas de referencia adecuadas al tamaño del cráneo del animal (Teruel-Martí et al., 2008).

La duramadre fue expuesta y se insertaron electrodos de acero inoxidable recubiertos de poliamida (Plastics One, Roanoke, Virginia, EE.UU), en CA1 del hipocampo (HPC) (Figura 3.15). Se insertaron electrodos de EMG (Plastics One) en los músculos dorsales del cuello (Figura 3.15). También se incrustó un electrodo de referencia (Plastic One), que se fijó al cráneo con cemento dental, como referencia para el registro y como toma de tierra.

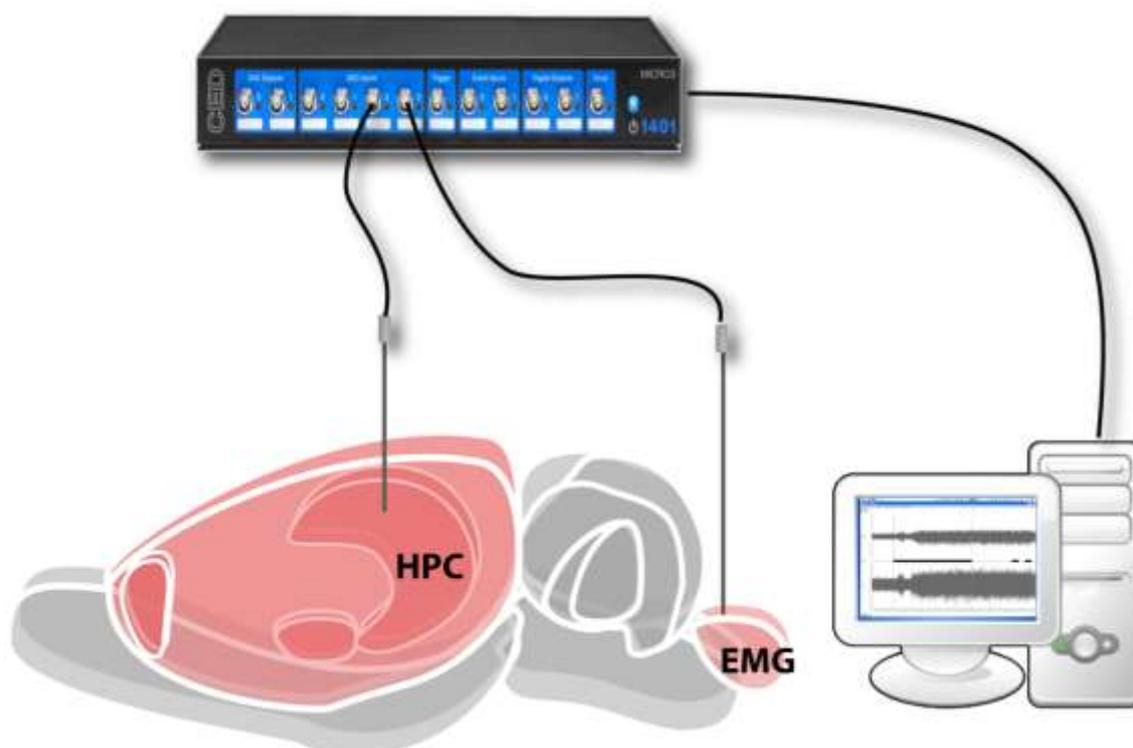


Figura 3.4.3.1.1. Esquema del lugar de implantación de los electrodos crónicos.

Adicionalmente, se insertaron tres tornillos de hueso quirúrgicos (Plastics One, Roanoke, Virginia, EE.UU), sobre los que se aplicó cemento dental cubriendo el cráneo, y de esta forma se aseguraron firmemente los electrodos. Todos los electrodos se concentraron en un pedestal de plástico multicanal (Plastics One, Roanoke, Virginia, EE.UU) para su posterior conexión al sistema de registro. Cuando el cemento estuvo seco, se suturó la piel periférica alrededor del pedestal y se desinfectó la zona.

Después de la cirugía, los animales tuvieron un periodo de recuperación de cinco días. La herida fue tratada con oxitetraciclina tópica (Terramicina[®], Farmasierra Laboratorios, España), y se administró un AINE (meloxicam) s.c. durante tres días (Metacam[®]).

3.4.3.2. Sistema de registro y adquisición

La señal de cada par de electrodos fue amplificada y filtrada en primer lugar por un preamplificador (P55, Grass Technologies) y después por un amplificador de cuatro canales (Cibertec), ambos con acoplamiento de corriente alterna. Las señales de campo registradas se filtraron en la banda 0.3-300 Hz y las de EMG fueron filtradas entre 10-1000 Hz y ambas, amplificadas 1000 veces. Para la adquisición de datos de estas señales, a una frecuencia de muestreo de 250 Hz el LFP de hipocampo y 2000 Hz la señal de EMG, se empleó una unidad de adquisición micro 1401 (Cambridge Electronic Design, UK) unida mediante conexión USB al PC, que permite la conversión de la señal analógica a una señal digital, y la transfiere al programa Spike2. Este *software* permite visualizar los registros *online*. La información adquirida de estos registros se almacenaba en un ordenador para su posterior procesado *offline*.

El sistema de registro utilizado incluye un conmutador que permite el movimiento libre del animal por su jaula. Por ello, de forma adicional, se conectó al sistema de una cámara de vídeo infrarroja que permitía contemplar el comportamiento del animal. Los videos también fueron adquiridos con el software propio de Cambridge Electronics Design (s2video) que permite sincronizar la grabación de video al inicio de cada registro (Figuras 3.4.3.2.1 y 3.4.3.2.2).

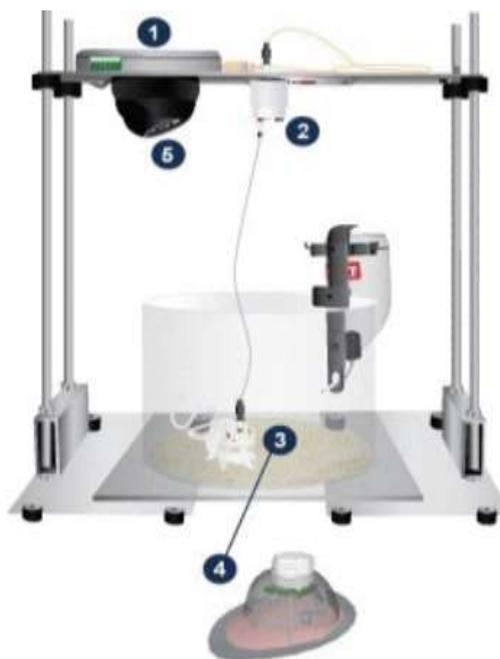


Figura 3.4.3.2.1. Sistema de registro crónico con cámara de vídeo. (1) conmutador; (2) rotor; (3) electrodos; (4) pedestal; (5) cámara.

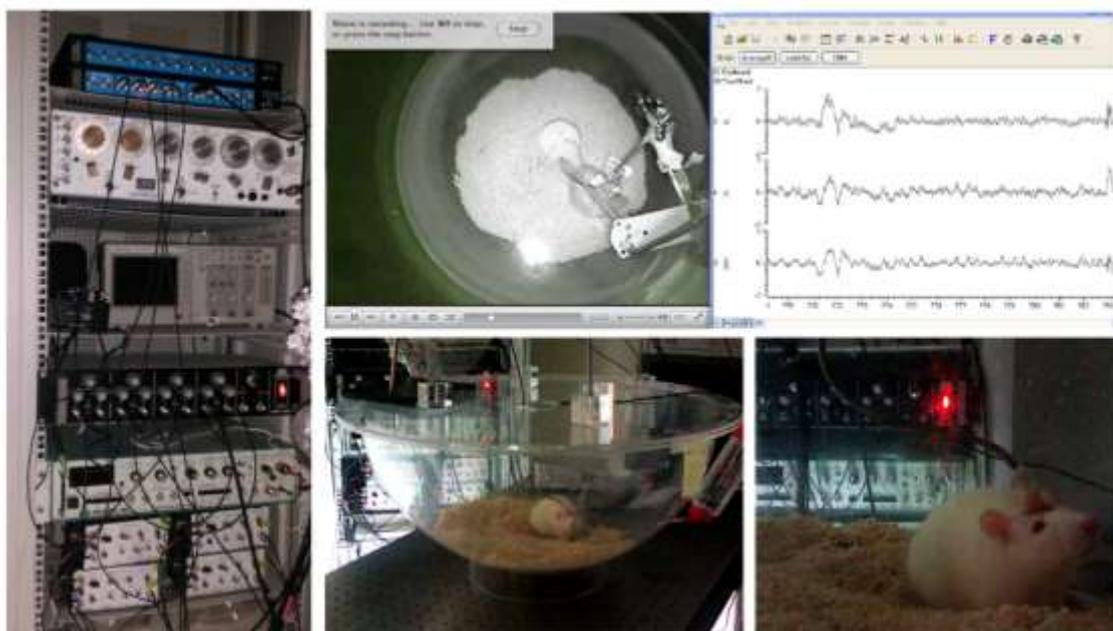


Figura 3.4.3.2.2. Esquema del proceso y los aparatos de registro necesarios para el estudio del sueño. Pueden observarse los distintos sistemas de amplificación, la sala de registro, y el programa Spike durante la codificación de las señales.

3.4.3.3. Procedimiento experimental

Las ratas fueron registradas en una caja metálica forrada de madera para reducir el ruido eléctrico y permitir el movimiento libre del animal, y equipada con una cámara con luz infrarroja. Durante los registros, el animal permaneció aislado en una habitación con condiciones de luz/oscuridad y comida/agua estándar controladas.

Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo los cinco días previos a la administración de reserpina (registros control), y los días del 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 después de la última administración de reserpina. Cada registro duró 4 horas en fase de luz, y se grabaron con una cámara de infrarrojos.

Con estos registros se pretendía caracterizar la actividad oscilatoria en CA1 de hipocampo y la actividad muscular en los distintos periodos tras la administración de reserpina y evaluar su posible alteración respecto de los registros control, durante las fases de sueño del animal.

3.4.3.4. Análisis del comportamiento durante el sueño

Los parámetros obtenidos mediante la visualización de los vídeos captados por la cámara durante las 4 horas de cada registro fueron los siguientes:

- Tiempo de sueño por hora: Periodos en los que el animal permaneció dormido. Se consideró que empezaba un periodo de sueño si se alcanzaban 30 segundos de inmovilidad del animal.
- Medidas de fraccionamiento del sueño: duración de cada periodo de sueño (segundos) y número de despertares entre cada periodo de sueño.
- Actividad motora durante el sueño: número de temblores, sacudidas y cambios de postura durante los periodos de sueño en cada hora de registro. Si estos movimientos duraban más de 10 segundos se consideraba que se había interrumpido el periodo de sueño y se había producido un despertar.

Con estos parámetros se pretendió, por un lado, delimitar los periodos de sueño para su posterior análisis mediante los registros electrofisiológicos, y por otro lado, obtener información del fraccionamiento y la calidad del sueño, para establecer anomalías que pudiesen evaluar un sueño no reparador.

3.4.3.5. Análisis de señales

Los registros de campo se examinaron con algoritmos de procesamiento de series temporales, utilizando scripts propios en el programa Matlab R2012b (The MathWorks, Natick, MA, USA).

De los 5 ejemplares empleados para el estudio se analizó la actividad del hipocampo izquierdo y de los datos obtenidos de EMG de 4 horas diarias de registro en fase de luz.

Se detectaron, en base al video, los periodos de sueño. Estos periodos se dividieron para el análisis en ventanas de 10 segundos, con un total de 112.604 ventanas.

Se caracterizó la actividad oscilatoria en los registros control, registros en días de administración y en días post-reserpina. Para las comparaciones estadísticas, se calculó el promedio de todas las ventanas para cada ejemplar, agrupando los días de registro en: control, administración, 1ª semana (1-7 PR), 2ª semana (9-13 PR) y 3ª semana (15-21 PR).

Los parámetros obtenidos mediante el análisis de las señales obtenidas de los registros electrofisiológicos son los siguientes:

- Potencia relativa de cada banda mediante análisis espectral
- Análisis wavelet para la caracterización en el dominio tiempo-frecuencia de las bandas de interés
- Amplitud del EMG: Para cada ventana se calculó media y desviación estándar del RMS normalizado 0-1.

- Clasificación en estados de sueño: REM, SWS o NC (No clasificado) y transiciones.

3.4.3.5.1. Análisis espectral (Transformada rápida de Fourier y espectro de potencia)

La señal que origina cada onda del EEG es, en realidad, una serie temporal compuesta por señales de diferentes frecuencias que se dan simultáneamente, con una mayor o menor potencia. El análisis del EEG mediante la transformada rápida de Fourier (Fast Fourier Transform, FFT) es el método más habitual empleado para descomponer la señal en sus diferentes componentes de frecuencia y representarlo como un espectro de potencias, permitiendo así cuantificar las componentes de distintas frecuencias de la oscilación global. La FFT transforma una señal del dominio de tiempo en el dominio de la frecuencia, permitiendo obtener, para un tiempo dado, las frecuencias presentes a sus respectivas potencias.

El espectro de potencia o densidad espectral de potencia de una onda, es la representación gráfica que se obtiene a partir de los componentes de los coeficientes de Fourier. Habitualmente, se representa como el módulo al cuadrado del voltaje asignado a cada banda de frecuencia.

En nuestro estudio, con el objetivo de conocer cómo afecta la administración de reserpina a las oscilaciones hipocámpicas, calculamos la FFT en las ventanas de 10 s y obtuvimos la potencia relativa de las bandas de interés, calculada como la ratio entre el potencia de cada banda y la potencia total en el rango 0.3-120 Hz (siendo la frecuencia máxima de análisis 125 Hz, determinada por la Frecuencia de Nyquist con la frecuencia de muestreo de 250 Hz que empleamos en nuestros registros).

Se calcularon de esta manera las siguientes bandas de frecuencia: ondas lentas (0.3-1.5 Hz); delta (1.5-4 Hz); theta (4-10 Hz); spindles (10-16 Hz); beta (16-30 Hz); gamma bajo (30-60 Hz, eliminando las frecuencias de 50 Hz \pm 0.5 Hz para evitar el

ruido eléctrico provocado por la luz); gamma alto (60-90 Hz) y epsilon (90-120 Hz). En la Figura 3.4.3.5.1.1 se muestra un ejemplo de espectro de potencia, con los límites de las bandas de interés.

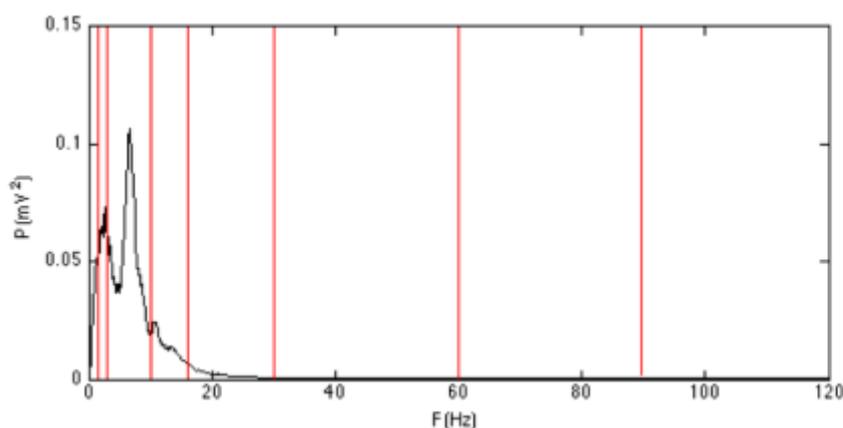


Figura 3.4.3.5.1.1. Ejemplo de espectro de potencias. Las líneas rojas representan los límites de las bandas de frecuencia estudiadas.

La proporción de banda theta, junto con la actividad del EMG, fue utilizada para la clasificación de ventanas de REM, mientras que el sumatorio de las bandas de ondas lentas y delta se empleó como parámetro de clasificación para el sueño de ondas lentas (*slow wave sleep*, SWS).

3.4.3.5.2. Análisis de tiempo-frecuencia (Análisis Wavelet)

El análisis espectral no proporciona información en el dominio del tiempo, dado que se descompone la señal para un tiempo fijo. Con el objetivo de caracterizar mejor las oscilaciones hipocámpicas en las bandas que ofrecieron mayores diferencias en el análisis espectral, se recurrió al análisis de *wavelets*. La transformada *wavelet* proporciona de manera simultánea información sobre el tiempo y la frecuencia, por lo que es posible, mediante estos análisis, evaluar la evolución temporal de la actividad oscilatoria a distintas frecuencias (Torrence & Compo 1998).

Para nuestro estudio, recurrimos al cálculo de espectrogramas *wavelet*, que

permiten representar la evolución temporal del registro para sus distintas componentes de frecuencia. El espectrograma *wavelet* permite obtener y visualizar la energía, a lo largo del tiempo, de las distintas frecuencias analizadas. La representación plasma la energía, en una escala colorimétrica, para cada frecuencia, en su evolución temporal,. Colores cálidos indicarían la presencia de mayor potencia o energía en un tiempo dado (ejemplo mostrado en la Figura 3.4.3.5.2.1).

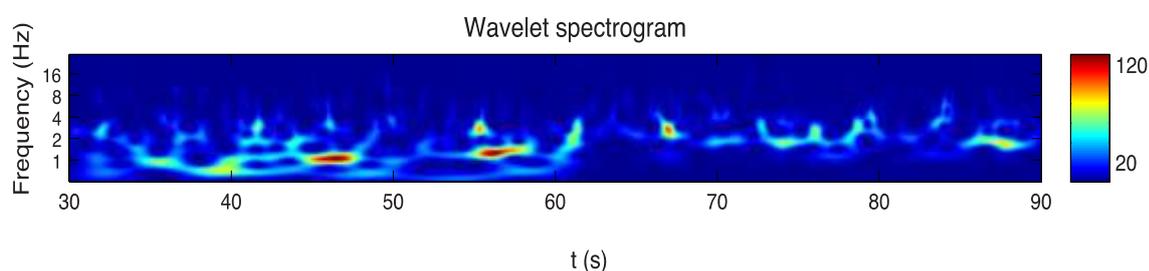


Figura 3.4.3.5.2.1. Ejemplo de espectrograma wavelet. El eje vertical muestra las frecuencias representadas y el eje horizontal la evolución en el tiempo; la escala colorimétrica indica la energía de las oscilaciones. En el ejemplo, entre los tiempos 30-60, la actividad oscilatoria presenta frecuencias comprendidas en un rango de ondas lentas y delta y entre 60-90, la actividad se concentra en un estrecho margen de frecuencias alrededor de los 3 Hz.

A partir de los espectrogramas de las ventanas de 10 s en la banda 0-30 Hz (por ser las frecuencias que presentaron resultados más consistentes en el análisis espectral), se obtuvieron diferentes parámetros para caracterizar las oscilaciones en su evolución temporal:

- **Power máxima:** detección de puntos de máxima potencia dentro de los rangos 0.3-10 Hz (ondas lentas, delta y theta) y más concretamente para la banda theta (3-10 Hz) y spindles (10-16 Hz). A partir de la detección de estos puntos se calculó su frecuencia media y desviación estándar, para evaluar la distribución en frecuencias dentro de estos rangos. La frecuencia media permite acotar en qué frecuencia trabaja preferentemente la oscilación dentro de la banda de estudio, mientras que la desviación estándar proporciona evidencia de las diferencias en el grado de concentración o dispersión alrededor de la frecuencia media.
- Segmentos en los que las bandas de interés superaban el 50 %, calculado para las bandas de ondas lentas y theta, por ser las que presentaban mayores variaciones

según los parámetros anteriores. En estos segmentos se evaluó su frecuencia media y desviación estándar, para observar la dispersión en la banda y parámetros de distribución temporal: ratio temporal ocupado por la banda en la ventana de 10 s, número de segmentos, duración de segmentos y, a partir de estos parámetros, se calculó un índice de fragmentación a partir de la ratio temporal y la duración de los segmentos.

3.4.3.5.3. *Análisis de la actividad muscular: EMG-RMS*

La actividad muscular fue analizada mediante la media cuadrática (*root mean square*, RMS) del EMG (EMG-RMS; raíz cuadrada de la media aritmética de los valores de amplitud al cuadrado). Esta transformación permite obtener valores siempre positivos. Los valores fueron normalizados posteriormente además entre 0 y 1, para poder fijar así un umbral de amplitud por debajo del cual se pudo considerar que había quietud o atonía. Este valor fue determinado en 0.03 tomando como referencia los periodos con potencia relativa de theta superior al 50 % en los animales en el periodo control, identificado como sueño REM.

3.4.3.5.4. *Clasificación de las ventanas en los distintos estados de sueño y determinación de transiciones*

Para la clasificación de los distintos estados se emplearon los valores de potencia relativa (calculada por análisis espectral) y del EMG-RMS. Se consideró ventanas de sueño de ondas lentas o SWS aquellas ventanas con predominio de las frecuencias más bajas, tomando como criterio que el sumatorio de la potencia relativa de ondas lentas y delta superase el 50 %. Para la consideración de ventanas de REM, el criterio fue que la potencia relativa de theta superase el 50 % y que el EMG-RMS fuese inferior a 0.03. Las ventanas que no cumplieron ninguna de estas características, por presentar predominio de theta pero con EMG-RMS superior al umbral, se consideraron no clasificadas. En aquellos casos que dos ventanas contiguas presentaban distinto estado, se consideró que había una transición.

3.4.4. Estudio inmunohistoquímico

3.4.4.1. Perfusión

A los 150 minutos de la administración de la última dosis de duloxetina (tercer día de tratamiento), los animales recibieron 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).

3.4.4.2. 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 hasta el día siguiente. 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 -40°C hasta su utilización.

3.4.4.3. Inmunodetección de Fos.

Tras tres lavados con tampón para eliminar la sacarosa, se procedió a la detección inmunocitoquímica de la proteína codificada por el proto-oncogén objeto de nuestro estudio, c-fos, por el método del ABC (Hsu, 1981). Los cortes pasaron por

sucesivas soluciones (Valverde-Navarro et al., 1996): reducción/inhibición de peroxidasas endógenas; incubación en anticuerpo primario policlonal rabbit anti-Fos a 1:10000 (Santa Cruz); incubación en anticuerpo secundario horse anti-Rabbit a 1:200 (Jackson Immunoresearch); incubación en solución ABC (Vector); revelado con diaminobencidina (DAB) (Sigma) intensificada con alumbre de cromo y níquel al 5%.

3.4.4.4. 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 troncoencefálicos *Dorsal Rafe* (DR), *Locus Coeruleus* (LC) y de las láminas I, II y V del asta posterior de la médula espinal, las cuales fueron tomadas con ayuda de un microscopio *Axioscope A1* de *Carl Zeis* 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 c-fos se realizó mediante el programa *ImageJ*. Para ello, se fusionaron empleando el programa *Photoshop CS5* las plantillas de los núcleos a estudiar extraídas del atlas de estereotaxia usado anteriormente y las fotografías de los cortes seleccionados.

Es importante señalar que no todos los elementos inmunorreactivos mostraron la misma intensidad de marcaje, pudiendo encontrar en una misma sección desde células fuertemente inmunopositivas (puntos de coloración negra opaca y homogénea) hasta células débilmente marcadas (puntos de coloración grisácea translúcida e irregular). 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.

3.4.5. Análisis estadístico

3.4.5.1. Análisis estadístico del estudio de dolor

Para el análisis estadístico y la representación gráfica de los datos se utilizó SPSS v.21 (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/vehículo.

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 media recortada al 5%, la mediana, la varianza, la desviación típica, la amplitud intercuartil, 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.

Las comparaciones de los umbrales de dolor entre los grupos tratados con reserpina respecto a los grupos tratados con vehículo se realizaron por separado para

los días de registro 1, 3, 5, y 7 posteriores a la última administración de reserpina/vehículo. Para la comparativa se empleó el estadístico *t de student* 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.

En los casos en los que la muestra no presentó normalidad, se realizó la prueba no paramétrica *U de Mann-Whitney*, equivalente a la *t de student* para muestras independientes. En ambos casos 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 los cuatro días de medida.

3.4.5.2. Análisis estadístico del estudio de depresión

3.4.5.2.1. Análisis estadístico del Forced Swimming Test

Para el análisis estadístico y la representación gráfica se utilizó SPSS v.21 (IBM). Se analizaron por separado los datos obtenidos en la fase de pretest y 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 (Test) o 180 (Pretest).

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 media recortada al 5%, la mediana, la varianza, la desviación típica, la amplitud intercuartil, 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 el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en las conductas de nadar, escalar e inmovilidad por separado, tanto en la fase de Pretest como en la fase de Test. Para la comparativa se empleó el estadístico *t de student* 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.

En los casos en los que la muestra no presentó normalidad, se realizó la prueba no paramétrica *U de Mann-Whitney*, equivalente a la *t de student* para muestras independientes. En ambos casos 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 las tres conductas.

3.4.5.2.2. *Análisis estadístico del Novelty-suppressed feeding test*

Para el análisis estadístico y la representación gráfica se utilizó SPSS v.21 (IBM). Los parámetros analizados en el NSFT fueron los siguientes:

- Tiempo en el que come por primera vez en el NSFT
- 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
- 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 media recortada al 5%, la mediana, la varianza, la desviación típica, la amplitud intercuartil, 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.

Se realizaron comparaciones entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en cada uno de los parámetros anteriormente mencionados. Para la comparativa se empleó el estadístico *t de student* 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.

En los casos en los que la muestra no presentó normalidad, se realizó la prueba no paramétrica *U de Mann-Whitney*, equivalente a la *t de student* para muestras independientes. En ambos casos 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.

Para analizar la evolución del consumo de comida de los animales en el NSFT y comprobar que no hubiesen alteraciones del apetito antes del inicio de la restricción de comida, se comparó el consumo de comida del 4º día de posterior a la última dosis de reserpina con la media de consumo diario de comida durante el periodo de

habitación, utilizando una prueba *t de Student* para muestras relacionadas para cada grupo. Con el mismo fin se comparó el consumo de comida entre el grupo tratado con reserpina y el grupo control el cuarto día posterior a la última administración de reserpina/vehículo mediante una prueba *t de student* para muestras independientes.

3.4.5.3. Análisis estadístico del estudio de sueño

El programa empleado para realizar el análisis estadístico del estudio del sueño, tanto a nivel conductual como electrofisiológico, fue el SPSS (IBM SPSS Statistics 21).

Se agruparon los días de registro en: control, administración, 1ª semana (1-7 PR), 2ª semana (9-13 PR) y 3ª semana (15-21 PR).

En primer lugar, para el estudio conductual del sueño, los parámetros utilizados han sido:

- Sueño total/hora (Sueño/hora)
- Sacudidas/hora (Sacudidas/hora)
- Segmentos de sueño/hora (Segmentos/hora)
- Promedio de duración de segmentos

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 comprobó la normalidad de la muestra con los test Shapiro-Wilk, así como la homogeneidad de varianzas, mediante el test de Levène para determinar el test estadístico más apropiado para el estudio de comparaciones entre los grupos. Las pruebas de normalidad evidenciaron una distribución no normal de los datos, por lo que se realizaron pruebas no paramétricas para el estudio estadístico.

Se empleó el test de Friedman para comparaciones múltiples entre muestras apareadas, para la caracterización de los distintos parámetros cuantitativos en los periodos control, administración y en las semanas post-reserpina, y el test de Wilcoxon para comparaciones dos a dos entre muestras apareadas de los distintos parámetros cuantitativos entre los periodos control y los de administración y semanas post-reserpina. 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/puntos para exponer y facilitar los datos gráficamente.

Para el análisis estadístico de los datos electrofisiológicos se emplearon los valores promedio de todas las ventanas para cada estado del sueño en cada animal (5 animales, 3 posibles estados: SWS, REM o NC). Los valores de los distintos días de registro se agruparon para el estudio estadístico en control, administración, semana 1 post-reserpina, semana 2 post-reserpina y semana 3 post-reserpina.

Las variables cualitativas o categóricas (estado del sueño, transiciones, y EMG por encima o debajo del umbral de atonía) fueron comparadas entre los diferentes periodos mediante la prueba de Chi-cuadrado, con posteriores comparaciones de cada periodo con el control.

Determinada la no normalidad de la muestra por el test de Kolmogorov-Smirnov, se emplearon métodos no paramétricos para las comparaciones de las variables cuantitativas entre los diferentes estados. Para las comparaciones múltiples entre muestras apareadas se empleó el test de Friedman. Para las comparaciones post-hoc se empleó el test de Wilcoxon para comparaciones dos a dos entre muestras apareadas de los distintos parámetros cuantitativos entre los periodos control y los de administración y semanas post-reserpina.

Dado que los periodos REM se caracterizan por presentar elevada proporción de actividad theta y atonía muscular, se analizó la correlación entre la potencia relativa de la oscilación theta y el EMG-RMS mediante el análisis de correlación bivariada de Spearman para muestras no paramétricas, para los distintos periodos.

Se consideró significación estadística cuando se alcanzó el nivel de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) ó $p < 0.001$ (***)).

3.4.5.4. Análisis estadístico del estudio de Fos

Para el análisis se utilizó SPSS v.21 (IBM). Se compararon entre sí los datos obtenidos del conteo de Fos de los tres grupos experimentales: ratas del grupo control sacrificadas a las dos horas y media de una única dosis de vehículo vs ratas sacrificadas a las dos horas y media de una única dosis de reserpina en dosis aguda vs ratas sacrificadas a las 6 horas de la tercera dosis de reserpina.

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 *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.

A continuación, 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 en la variación de respuesta entre las diferentes condiciones experimentales y se pudo analizar entre qué condiciones esas diferencias eran más significativas.

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.

04

RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LAS MEDIDAS DE UMBRALES DE 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 mediante *Electrovnofrey test*. Un estudio más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo I.

Estadísticos descriptivos								
	N	Media		Desv. tip.	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
REC1NORMAL	24	,7517	,07027	,34425	,098	,472	-1,696	,918
REC3NORMAL	24	,6940	,05735	,28095	,171	,472	-1,765	,918
REC5NORMAL	24	,7190	,04601	,22539	-,138	,472	-1,551	,918
REC7NORMAL	24	,7483	,06008	,29435	,697	,472	-,578	,918
N válido (según lista)	24							

Tabla 4.1.1.1. Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de los umbrales de dolor obtenidas los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la última administración de reserpina. Se han obtenido recuento de casos, media, error típico de la media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad *Shapiro-Wilk* para muestras inferiores a 30 casos muestra normalidad tanto en los grupos tratados con reserpina como en los grupos control, en los días de registro de umbrales de dolor 1 (AAG: $W= 0,894$; RES: $W= 0,900$, $p>0,05$), 3 (AAG: $W= 0,873$; RES: $W= 0,863$, $p>0,05$), y 5 (AAG: $W= 0,910$; RES: $W= 0,960$, $p>0,05$) posteriores a la última administración de reserpina. En cuanto a los datos obtenidos el día 7 posterior a la última administración de reserpina, presentan normalidad en el

grupo de ratas tratado con vehículo ($W= 0,898$, $p>0,05$), pero no en el grupo tratado con reserpina ($W= 0,856$, $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.2).

	Group	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
REC1NORMAL	AAG	,210	12	,150	,894	12	,131
	RES	,235	12	,066	,900	12	,159
REC3NORMAL	AAG	,275	12	,013	,873	12	,072
	RES	,249	12	,039	,863	12	,053
REC5NORMAL	AAG	,192	12	,200 [*]	,910	12	,216
	RES	,145	12	,200 [*]	,960	12	,778
REC7NORMAL	AAG	,166	12	,200 [*]	,898	12	,149
	RES	,241	12	,052	,856	12	,044

Tabla 4.1.1.2. Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en el registro de umbrales de dolor los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la última administración de reserpina, tanto en los grupos tratados con reserpina (RES) como con vehículo (AAG). El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p>0,05$.

El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas, medida con el estadístico de Levene, en los registros de umbrales de dolor medidos los días 1 ($F= 2,222$, $p>0,05$), 3 ($F= 1,658$, $p>0,05$), y 5 ($F= 1,512$, $p>0,05$) posteriores a la última administración de reserpina. Sin embargo, no podemos asumir varianzas homogéneas en las medidas del día 7 posterior a la última administración de reserpina ($F= 12,404$, $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.3).

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
REC1NORMAL	Basándose en la media	2,222	1	22	,150
REC3NORMAL	Basándose en la media	1,658	1	22	,211
REC5NORMAL	Basándose en la media	1,512	1	22	,232
REC7NORMAL	Basándose en la media	12,404	1	22	,002

Tabla 4.1.1.3. Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en el registro de umbrales de dolor los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la última administración de reserpina. El estadístico empleado es Levene. Significación $p>0,05$.

En cuanto al análisis inferencial, se realiza una prueba T de *Student* para muestras independientes para la comparación del grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo el primer día de registro tras la implantación del modelo. El test evidencia diferencias estadísticamente significativas ($t= 12,560$, $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.4).

		Prueba de muestras independientes								
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
REC1	Se han asumido varianzas iguales	2,222	,150	12,560	22	,000	,63141	,05027	Inferior	Superior
	No se han asumido varianzas iguales			12,560	20,691	,000	,63141	,05027	,52677	,73605

Tabla 4.1.1.4. Prueba t de Student para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 1 tras la última administración de reserpina o vehículo. $T=12,560$; $p<0,05$

El gráfico muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el día 1 tras la última administración de reserpina/vehículo ($T=12,560$; $p<0,05$) (Figura 4.1.1.1).

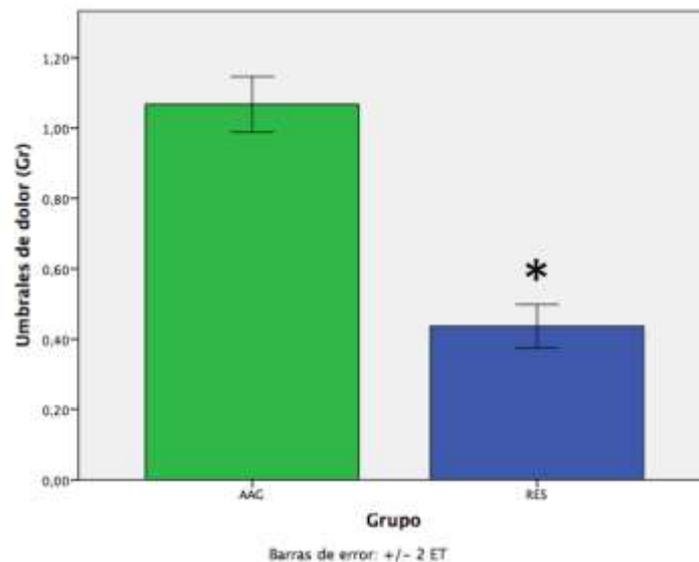


Figura 4.1.1.1. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en el día 1 posterior a la última administración de reserpina. Significación $p<0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

La comparación entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo el día 3 tras la implantación del modelo muestra diferencias significativas, medidas con el estadístico T de *Student* para muestras independientes ($t= 10,750$, $p<0,05$) (Tabla 4.1.1.5).

		Prueba de muestras independientes									
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
										Inferior	Superior
REC3	Se han asumido varianzas iguales	1,658	,211	10,750	22	,000	,50418	,04690	,40691	,60144	
	No se han asumido varianzas iguales			10,750	17,810	,000	,50418	,04690	,40557	,60278	

Tabla 4.1.1.5. Prueba t de Student para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 3 tras la última administración de reserpina o vehículo. $T= 10,750$, $p<0,05$

El gráfico muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el día 3 tras la última administración de reserpina/vehículo (Figura 4.1.1.2).

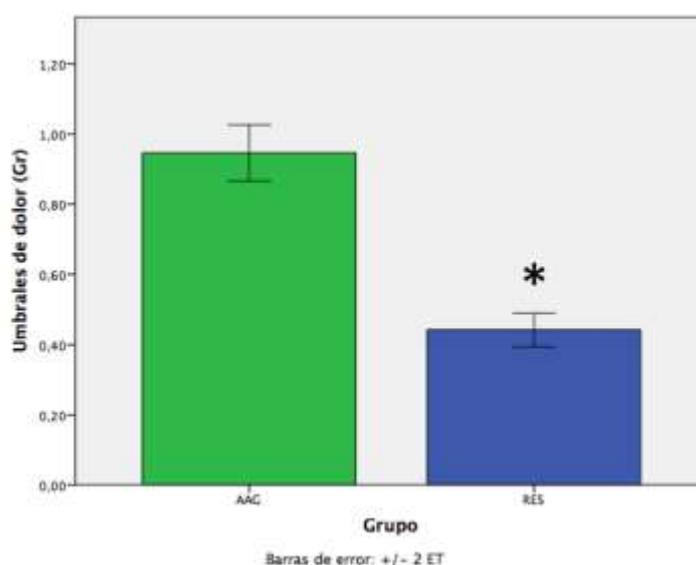


Figura 4.1.1.2. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en el día 3 posterior a la última administración de reserpina. Significación $p<0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

La comparación entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo el día 5 de registro tras la implantación del modelo muestran diferencias significativas, medidas con el estadístico T de *Student* para muestras independientes ($t= 10,109, p<0,05$) (Tabla 4.1.1.6).

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
										Inferior	Superior
REC5	Se han asumido varianzas iguales	1,512	,232	10,109	22	,000	,40030	,03960	,31817	,48242	
	No se han asumido varianzas iguales			10,109	20,082	,000	,40030	,03960	,31772	,48288	

Tabla 4.1.1.6. Prueba t de Student para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 5 tras la última administración de reserpina o vehículo. $t= 10,109, p<0,05$.

El gráfico muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el día 5 tras la última administración de reserpina (Figura 4.1.1.3).

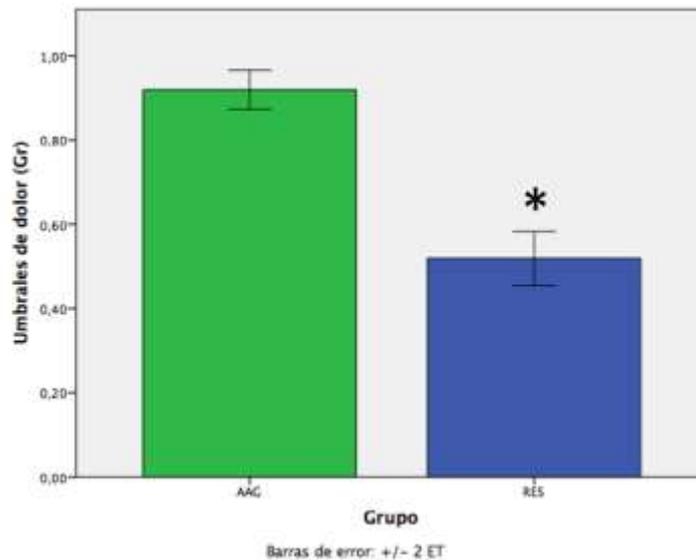


Figura 4.1.1.3. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en el día 5 posterior a la última administración de reserpina. Significación $p<0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

En el caso del análisis inferencial comparativo entre los grupos tratados con reserpina y los grupos tratados con vehículo para los datos de los umbrales de dolor obtenidos el día 7 tras la última administración de reserpina, al no poder asumir homogeneidad de varianzas ni normalidad de la muestra en el grupo de animales tratados con reserpina, se emplea una prueba no paramétrica, la prueba U de Mann-Whitney. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p < 0,05$).

El gráfico muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el día 7 tras la última administración de reserpina (Figura 4.1.1.4).

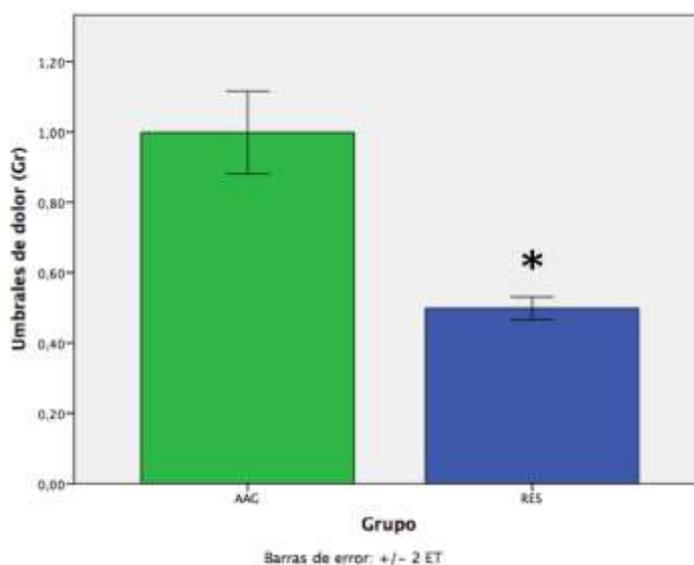


Figura 4.1.1.4. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en el día 7 posterior a la última administración de reserpina. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

La Figura 4.1.1.5 muestra las variaciones halladas entre los grupos tratados con reserpina respecto de los grupos control a lo largo de los cuatro días de registro (días 1, 3, 5 y 7 tras la última administración de reserpina/vehículo).

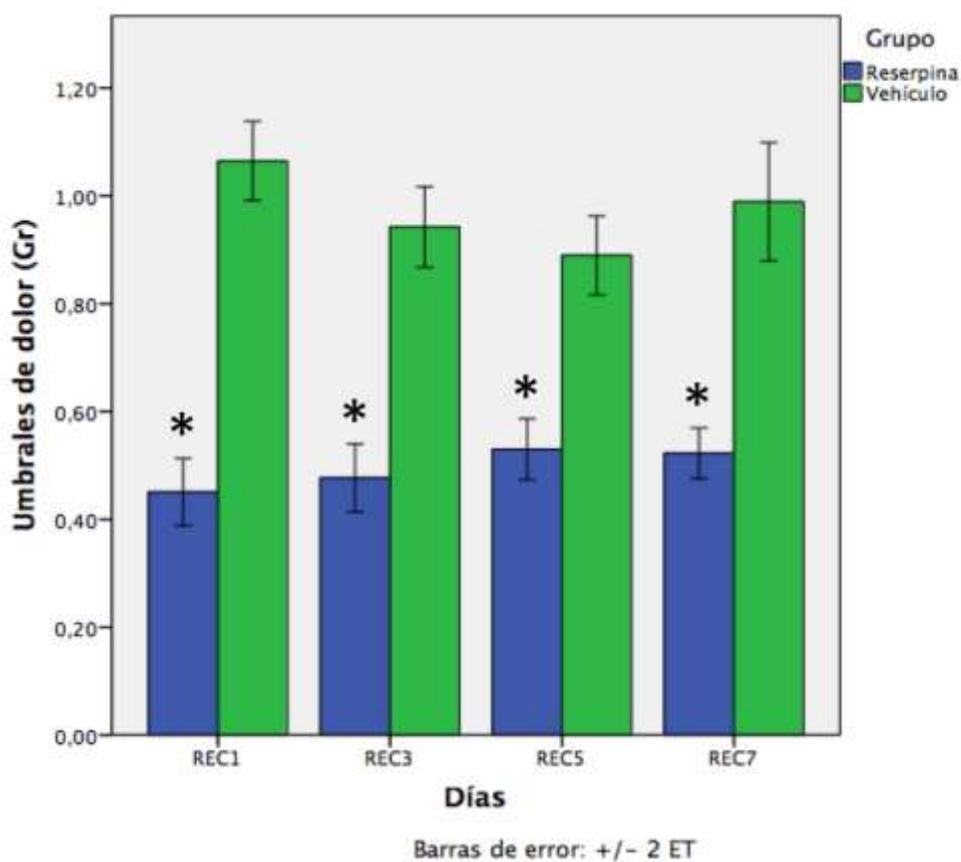


Figura 4.1.1.5. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la última administración de reserpina. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

4.1.2. Randall and Selitto Test

En la tabla 4.1.2.1 se muestran los estadísticos descriptivos de los datos obtenidos en el estudio mediante *Randall and Selitto Test*. Un estudio más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo II.

	N	Media		Desv. tip.	Asimetría		Curtosis	
		Estadístico	Error típico		Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
REC1NORMAL	24	,8303	,07502	,36750	,251	,472	-1,212	,918
REC3NORMAL	24	,7457	,06391	,31310	,075	,472	-1,630	,918
REC5NORMAL	24	,7264	,06198	,30366	,158	,472	-1,416	,918
REC7NORMAL	24	,7141	,07376	,36132	,260	,472	-1,190	,918
N válido (según lista)	24							

Tabla 4.1.2.1. Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de los umbrales de dolor obtenidas los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la última administración de reserpina. Se han obtenido recuento de casos, media, error típico de la media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El estadístico de normalidad *Shapiro-Wilk* indicado para muestras menores a 30 casos revela normalidad de la muestra en los grupos tratados con reserpina únicamente en el día 7 posterior a la última administración de reserpina (RES: $W= 0,934$, $p>0,05$), y en los grupos tratados con vehículo los días 3 (AAG: $W= 0,854$, $p>0,05$) 5 (AAG: $W= 0,967$, $p>0,05$), y 7 (AAG: $W= 0,875$, $p>0,05$) posteriores a la última administración. Por otro lado, no revela normalidad de la muestra en los grupos tratados con reserpina el día 1 ($W= 0,853$, $p<0,05$), 3 ($W= 0,854$), y 5 ($W= 0,803$, $p<0,05$) posteriores a la última administración de reserpina, y en los grupos tratados con vehículo el día 1 ($W= 0,772$, $p<0,05$) tras la última administración del vehículo (Tabla 4.1.2.2).

Group	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
REC1NORMAL AAG	,243	12	,049	,772	12	,005
REC1NORMAL RES	,243	12	,049	,853	12	,040
REC3NORMAL AAG	,227	12	,087	,883	12	,097
REC3NORMAL RES	,235	12	,065	,854	12	,041
REC5NORMAL AAG	,139	12	,200 [*]	,967	12	,881
REC5NORMAL RES	,228	12	,086	,803	12	,010
REC7NORMAL AAG	,256	12	,028	,875	12	,075
REC7NORMAL RES	,190	12	,200 [*]	,934	12	,422

Tabla 4.1.2.2. Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en el registro de umbrales de dolor los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la última administración de reserpina, tanto en los grupos tratados con reserpina (RES) como con vehículo (AAG). El estadístico empleado es Shapiro-Wilk. Significación $p>0,05$.

El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas, medida con el estadístico de Levene, en todos los registros de umbrales de dolor medidos, los días 1 ($F= 0,539$, $p>0,05$), 3 ($F= 0,932$, $p>0,05$), 5 ($F= 0,638$, $p>0,05$), y 7 ($F= 2,583$, $p>0,05$) posteriores a la última administración de reserpina (Tabla 4.1.2.3).

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
REC1NORMAL Basándose en la media	,539	1	22	,471
REC3NORMAL Basándose en la media	,932	1	22	,345
REC5NORMAL Basándose en la media	,638	1	22	,433
REC7NORMAL Basándose en la media	2,583	1	22	,122

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 y 7 posteriores a la última administración de reserpina. El estadístico empleado es Levene, basándonos en la media. Significación $p>0,05$.

Como se observa en los análisis anteriores, a pesar de que todos los grupos presentan homogeneidad de varianzas, solo podemos asumir la normalidad de la muestra en los dos grupos (grupo reserpina/grupo ácido acético glacial) para cada día de registro de los umbrales de dolor el día 7 posterior a la última administración de reserpina/vehículo. Es por ello que para realizar la comparativa entre ambos grupos los días 1, 3 y 5 tras la última administración de reserpina realizaremos la prueba no paramétrica paralela a la prueba T de Student para muestras independientes: el Test U de Mann-Whitney.

En el día 1 posterior a la última administración de reserpina/vehículo, las medidas de los umbrales de dolor obtenidas muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina respecto al grupo control ($p<0,05$), medido con el estadístico U de Mann-Whitney.

El gráfico muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el día 1 tras la última administración de reserpina (Figura 4.1.2.1).

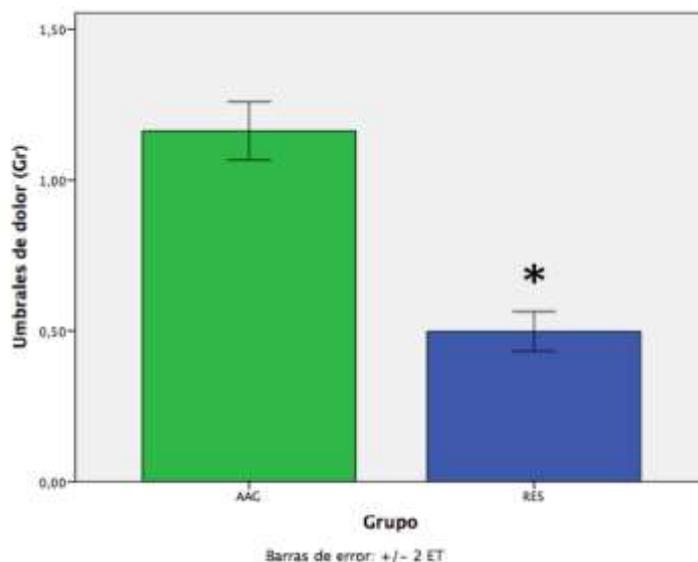


Figura 4.1.2.1. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en el día 1 posterior a la última administración de reserpina. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

En el día 3 posterior a la última administración de reserpina/vehículo, las medidas de los umbrales de dolor obtenidas muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina respecto al grupo control ($p < 0,05$), medido con el estadístico U de Mann-Whitney.

El gráfico muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el día 3 tras la última administración de reserpina (Figura 4.1.2.2).

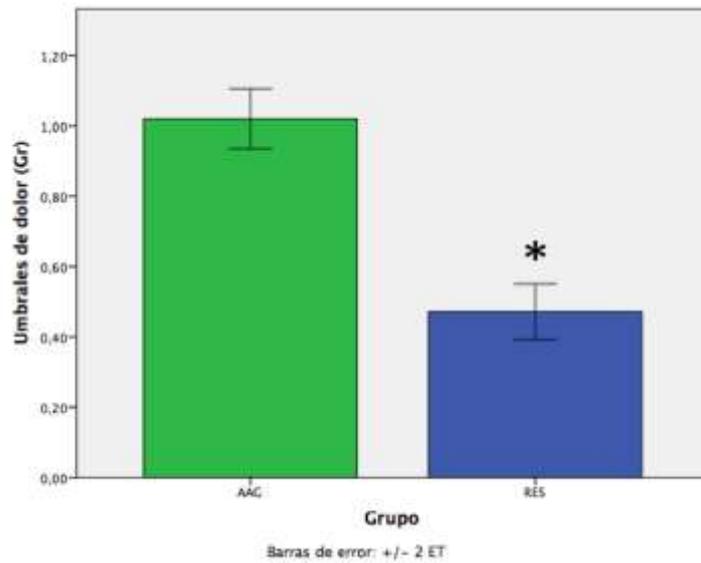


Figura 4.1.2.2. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en el día 3 posterior a la última administración de reserpina. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

En el día 5 posterior a la última administración de reserpina/vehículo, las medidas de los umbrales de dolor obtenidas muestran diferencias estadísticamente significativas en el grupo tratado con reserpina respecto al grupo control ($p < 0,05$), medido con el estadístico U de Mann-Whitney.

El gráfico muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el día 5 tras la última administración de reserpina (Figura 4.1.2.3).

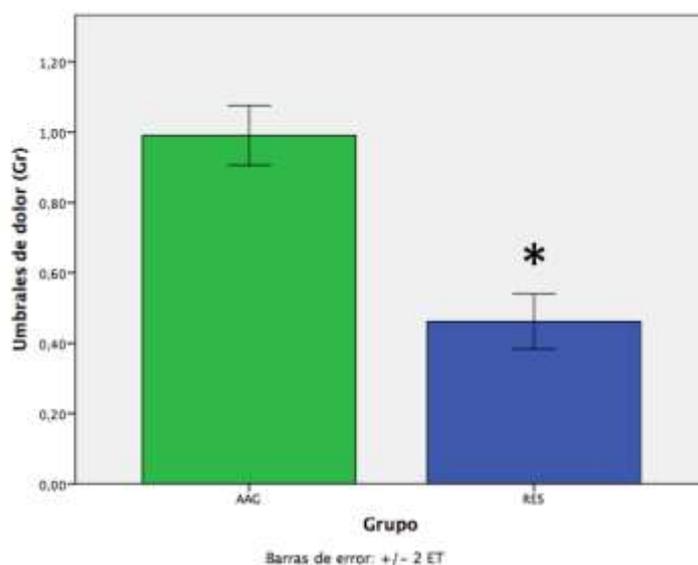


Figura 4.1.2.3. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en el día 5 posterior a la última administración de reserpina. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

La comparación entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en el día 7 tras la última administración de reserpina/ vehículo muestra diferencias significativas entre ambos grupos, medidas con el estadístico T de *Student* para muestras independientes ($t = 9,809$, $p < 0,05$) (Tabla 4.1.2.4).

		Prueba de muestras independientes								
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
REC7	Se han asumido varianzas iguales	2,583	,122	9,809	22	,000	,63823	,06506	,50329	,77316
	No se han asumido varianzas iguales			9,809	19,426	,000	,63823	,06506	,50225	,77420

Tabla 4.1.2.4. Prueba t de Student para muestras independientes en el registro de umbrales de dolor del día 7 tras la última administración de reserpina o vehículo. $t = 9,809$, $p < 0,05$.

El gráfico muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el día 7 tras la última administración de reserpina (Figura 4.1.2.4).

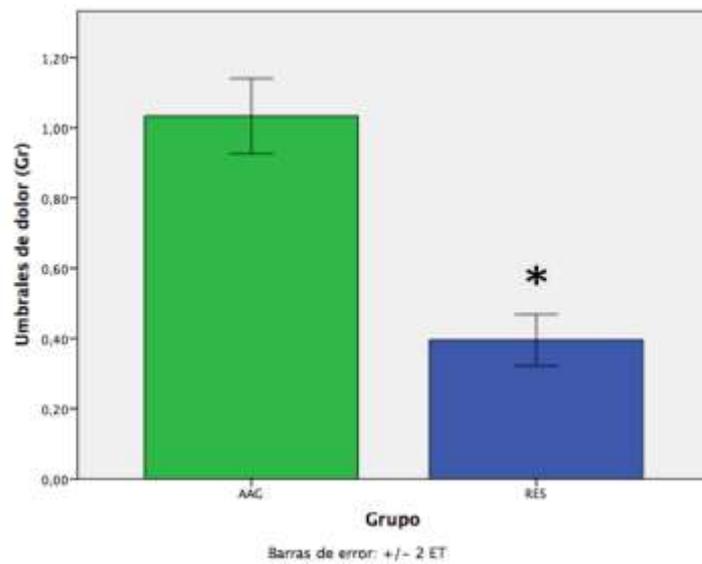


Figura 4.1.2.4. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en el día 7 posterior a la última administración de reserpina. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

La Figura 4.1.2.5 muestra las variaciones halladas entre los grupos tratados con reserpina respecto de los grupos control a lo largo de los cuatro días de registro (días 1, 3, 5, y 7 tras la última administración de reserpina/vehículo).

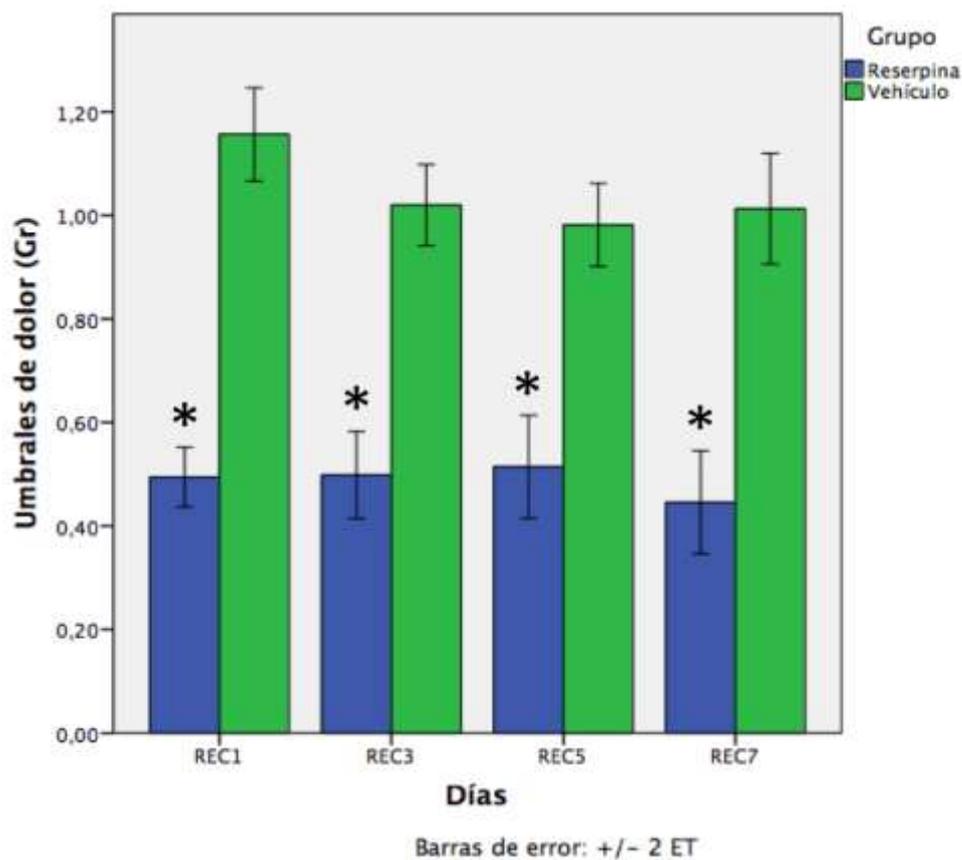


Figura 4.1.2.5. En el gráfico se muestra una disminución significativa de los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG) en los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la última administración de reserpina. Significación $p < 0,05$. Las barras 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

En la Tabla 4.2.1.1.1 se muestran los estadísticos descriptivos de los datos de síntomas depresivos obtenidos en el estudio mediante *Forced Swimming Test* en la fase de pretest. Un estudio más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el anexo III.

	N	Media		Desv. tip.	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
NADAR	15	22,47	1,383	5,357	,625	,580	-1,111	1,121
ESCALAR	15	6,33	,898	3,478	1,593	,580	3,293	1,121
INMOVILIDAD	15	151,20	1,662	6,439	-,221	,580	-1,801	1,121
N válido (según lista)	15							

Tabla 4.2.1.1.1. Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de nadar, escalar e inmovilidad de la fase de pretest de *Forced Swimming Test*. Se han obtenido recuento de casos, media, error típico de la media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad *Shapiro-Wilk* para muestras inferiores a 30 casos presenta normalidad en el grupo tratado con ácido acético glacial (control) tanto en la conducta de nadar ($W=0,881$, $p>0,05$), de escalar ($W=0,173$, $p>0,05$) y de inmovilidad ($W=0,271$, $p>0,05$). El grupo tratado con reserpina presenta normalidad para la conducta de escalar ($W=0,452$, $p>0,05$), pero no en las conductas de nadar ($W=0,003$, $p<0,05$) ni de inmovilidad ($W=0,004$, $p<0,05$) (Tabla 4.2.1.1.2).

CONEXP		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
NADAR	CONTROL	,201	9	,200	,881	9	,161
	RESERPINA	,400	6	,003	,675	6	,003
ESCALAR	CONTROL	,193	9	,200	,884	9	,173
	RESERPINA	,226	6	,200	,912	6	,452
INMOVILIDAD	CONTROL	,185	9	,200	,903	9	,271
	RESERPINA	,412	6	,002	,684	6	,004

Tabla 4.2.1.1.2. Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en la fase pretest para las medidas de nadar, escalar e inmovilidad obtenidos en el *Forced Swimming Test*, tanto en los grupos tratados con reserpina (RES) como con vehículo (AAG). El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p>0,05$.

El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas, medida con el estadístico de Levene, tanto en la conducta de nadar ($F=0,004$, $p>0,05$), escalar ($F=1,668$, $p>0,05$) e inmovilidad ($F=0,279$, $p>0,05$) en la fase de pretest (Tabla 4.2.1.1.3).

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
NADAR	Basándose en la media	,004	1	13	,949
ESCALAR	Basándose en la media	1,668	1	13	,219
INMOVILIDAD	Basándose en la media	,279	1	13	,606

Tabla 4.2.1.1.3. Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en la fase pretest en las conductas de nadar, escalar e inmovilidad. El estadístico empleado es Levene. Significación $p>0,05$.

Una vez realizados los análisis descriptivos sobre los datos y comprobada su normalidad y la homogeneidad de varianzas, comparamos las conductas de nadar, escalar e inmovilidad para cada grupo.

En cuanto a la conducta de nadar, los datos obtenidos en el grupo de reserpina no presentan normalidad ($W=0,003$, $p<0,05$) y, por tanto, realizamos para el análisis inferencial una prueba no paramétrica equivalente a la T de *Student*, la U de Mann Whitney. Empleando este estadístico no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados con reserpina y los grupos control ($p>0,05$).

El gráfico muestra una disminución no significativa ($p > 0,05$) de la conducta de escalada en la fase de pretest del *Forced Swimming Test* en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo (Figura 4.2.1.1.1).

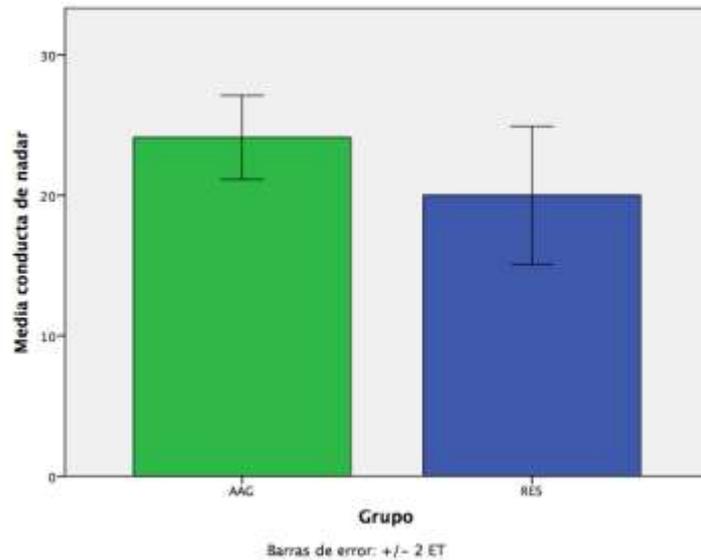


Figura 4.2.1.1.1. En el gráfico se muestra una ligera disminución de la conducta de nadar del grupo tratado con reserpina (RES) respecto al grupo tratado con vehículo (AAG), pero esta diferencia no es estadísticamente significativa. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

La comparación entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en la conducta de escalada en la fase de pretest no muestra diferencias significativas, medidas con el estadístico t de *Student* para muestras independientes ($t = 1,066$, $p > 0,05$) (Tabla 4.2.1.1.4).

		Prueba de muestras independientes								
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior	
ESCALAR	Se han asumido varianzas iguales	1,668	,219	1,066	13	,306	1,944	1,824	-1,996	5,885
	No se han asumido varianzas iguales			1,223	12,053	,245	1,944	1,590	-1,519	5,408

Tabla 4.2.1.1.4. Prueba t de Student para muestras independientes en la conducta de escalada durante la fase pretest, comparando los grupos tratados con reserpina respecto al grupo control. Significación $p < 0,05$.

El gráfico muestra una disminución no significativa ($t=1,066$, $p>0,05$) de la conducta de escalada en la fase de pretest del *forced swimming test* en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo (Figura 4.2.1.1.2).

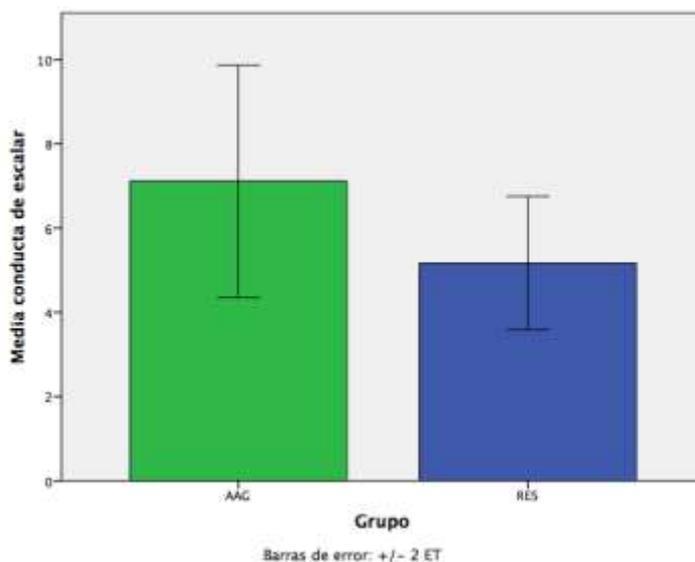


Figura 4.2.1.1.2. En el gráfico se muestra una disminución no significativa de la conducta de escalada en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG). Significación $p<0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

La comparación entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en la conducta de inmovilidad en la fase de pretest no muestra diferencias significativas, medidas con el estadístico U de Mann-Whitney para muestras independientes por no poder asumir la normalidad de la muestra ($p>0,05$).

El gráfico muestra un aumento no significativo ($p > 0,05$) en la conducta de inmovilidad en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en la fase de pretest del *forced swimming test* (Figura 4.2.1.1.3).

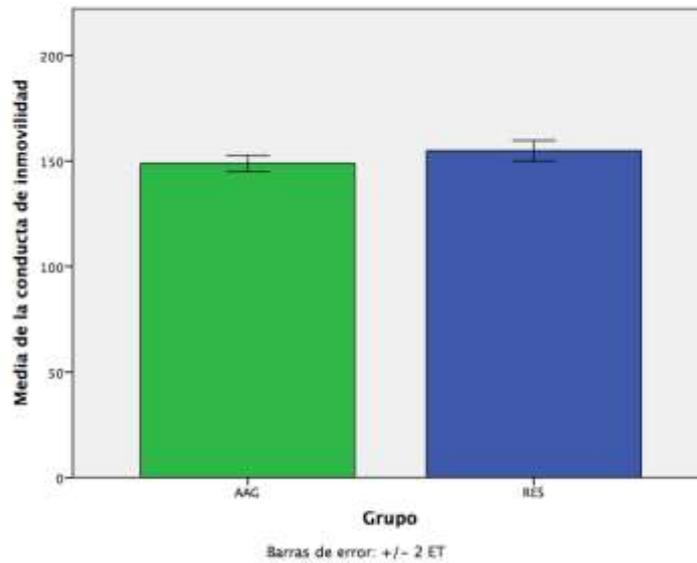


Figura 4.2.1.1.3. En el gráfico se muestra un aumento en la conducta de inmovilidad en la fase de pretest del *forced swimming test* en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG), pero este aumento no es estadísticamente significativo. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

La figura 4.2.1.1.4 muestra un gráfico en el que pueden observarse las diferencias entre las conductas de nadar, escalar e inmovilidad en la fase de pretest del *forced swimming test* entre los grupos tratados con reserpina respecto a los grupos control. En ningún caso se hallan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

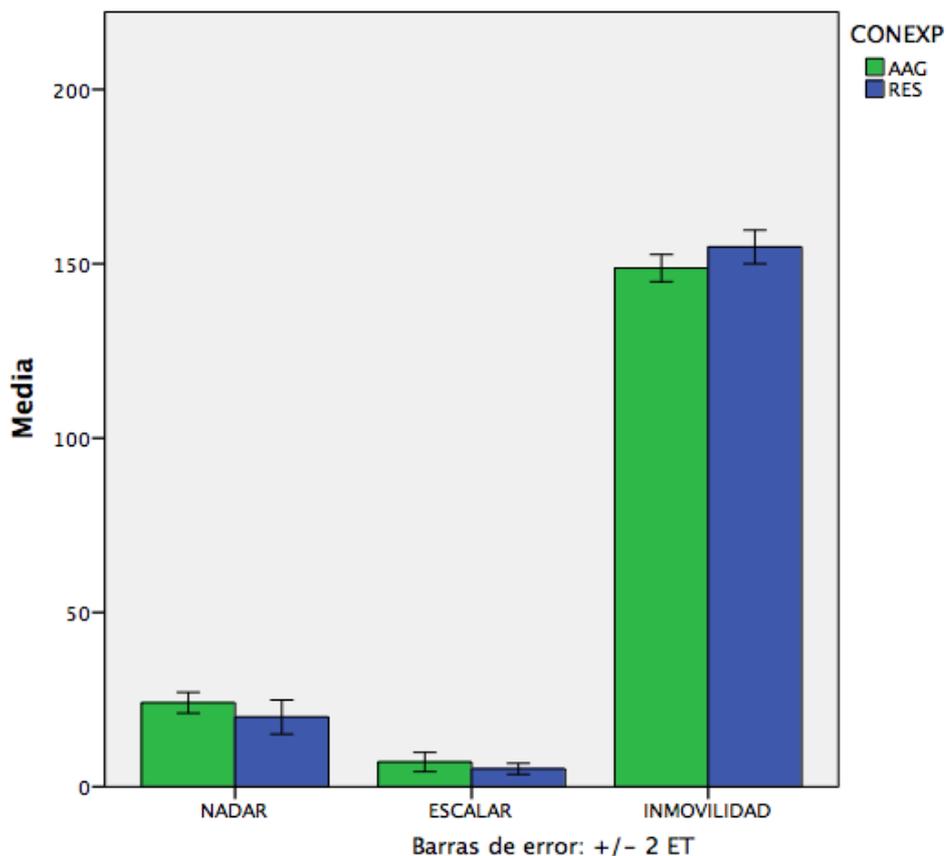


Figura 4.2.1.1.4. En el gráfico se muestra una ligera disminución de las conductas de nadar y escalar en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas control (AAG), y un aumento de la conducta de inmovilidad en las ratas tratadas con reserpina respecto a las ratas control. En ninguna de las tres conductas las diferencias entre los grupos son estadísticamente significativas. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

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 *Forced swimming test* de síntomas depresivos en la fase de test. Un estudio más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo IV.

	N	Media		Desv. tip.	Asimetría		Curtosis	
		Estadístico	Error típico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
NADAR	18	9,44	1,334	5,659	,642	,536	-,539	1,038
ESCALAR	18	2,56	,805	3,417	2,519	,536	7,328	1,038
INMOVILIDAD	18	48,00	1,629	6,911	-,462	,536	-1,331	1,038
N válido (según lista)	18							

Tabla 4.2.1.2.1. Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de nadar, escalar e inmovilidad de la fase de test de forced swimming test. Se han obtenido recuento de casos, media, error típico de la media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad *Shapiro-Wilk* para muestras inferiores a 30 casos muestra normalidad en el grupo tratado con reserpina tanto en la conducta de nadar ($W=0,951$, $p>0,05$), de escalar ($W=0,903$, $p>0,05$) y de inmovilidad ($W=0,920$, $p>0,05$). El grupo tratado con ácido acético glacial (control) presenta normalidad para la conducta de nadar ($W=0,900$, $p>0,05$) y de inmovilidad ($W=0,968$, $p>0,05$), pero no para la conducta de escalar ($W=0,831$, $p<0,05$) (Tabla 4.2.1.2.2).

CONEXP		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
NADAR	CONTROL	,178	9	,200 [*]	,900	9	,255
	RESERPINA	,125	9	,200 [*]	,951	9	,696
ESCALAR	CONTROL	,220	9	,200 [*]	,831	9	,046
	RESERPINA	,257	9	,088	,903	9	,273
INMOVILIDAD	CONTROL	,147	9	,200 [*]	,968	9	,880
	RESERPINA	,220	9	,200 [*]	,920	9	,396

Tabla 4.2.1.2.2. Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en la fase de test para las medidas de nadar, escalar e inmovilidad obtenidos en el forced swimming test, tanto en los grupos tratados con reserpina (RES) como con vehículo (AAG). El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p>0,05$.

El conjunto de datos no presenta homogeneidad de varianzas, medida con el estadístico de Levene, en la conducta de nadar ($F=6,467$, $p<0,05$), de escalar ($F=6,382$, $p<0,05$) ni de inmovilidad ($F=6,723$, $p<0,05$) en esta fase (Tabla 4.2.1.2.3).

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
NADAR	Basándose en la media	6,467	1	16	,022
ESCALAR	Basándose en la media	6,382	1	16	,022
INMOVILIDAD	Basándose en la media	6,723	1	16	,020

Tabla 4.2.1.2.3. Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en la fase pretest en las conductas de nadar, escalar e inmovilidad. El estadístico empleado es Levene. Significación $p>0,05$.

Los datos obtenidos en la conducta de nadar en la fase de test presentan normalidad según el estadístico *Shapiro-Wilk* tanto en el grupo tratado con reserpina ($W=0,951$, $p>0,05$) como en el grupo tratado con vehículo ($W=0,900$, $p>0,05$), aunque no se puede asumir homogeneidad de varianzas en la muestra ($F=6,467$, $p<0,05$). Dado que el estadístico *t* de *Student* es robusto para los datos que no cumplan homogeneidad de varianzas, realizamos este análisis diferencial para comparar los resultados obtenidos en esta conducta entre los dos grupos experimentales. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en la conducta de nadar en la fase del test del *forced swimming test* ($t=6,414$, $p<0,05$) (Tabla 4.2.1.2.4).

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error ttp. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	6,467	,022	6,414	16	,000	9,333	1,455	6,249	12,418
No se han asumido varianzas iguales			6,414	10,830	,000	9,333	1,455	6,125	12,542

Tabla 4.2.1.2.4. Prueba *t* de *Student* para muestras independientes en la conducta de nadar durante la fase de test, comparando los grupos tratados con reserpina respecto al grupo control. Significación $p<0,05$.

El gráfico muestra una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la conducta de nadar en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en la fase de test del *forced swimming test* (Figura 4.2.1.2.1).

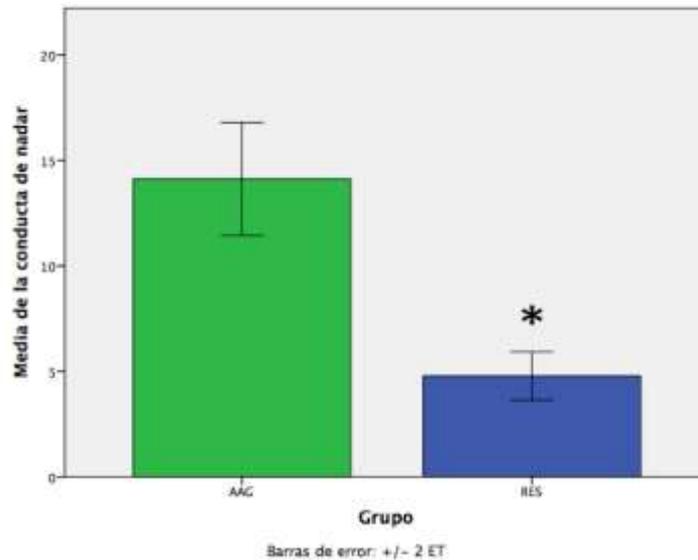


Figura 4.2.1.2.1. En el gráfico se muestra una disminución estadísticamente significativa en la conducta de nadar en la fase de test del *forced swimming test* en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG). Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

En el caso de los datos obtenidos en la conducta de escalar en la fase de test, la muestra obtenida no presenta normalidad según el estadístico *Shapiro-Wilk* para el grupo tratado con ácido acético glacial ($W=0,831$, $p < 0,05$). Es por ello que procedemos a realizar la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para el análisis comparativo entre los dos grupos experimentales para esta conducta. Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en la conducta de escalar en la fase del test del *forced swimming test* ($p > 0,05$).

El gráfico muestra un aumento de conducta de escalada en la fase de test del *forced swimming test* en las ratas tratadas con vehículo respecto a las tratadas con reserpina, pero este aumento no es estadísticamente significativo ($p > 0,05$) (Figura 4.2.1.2.2).

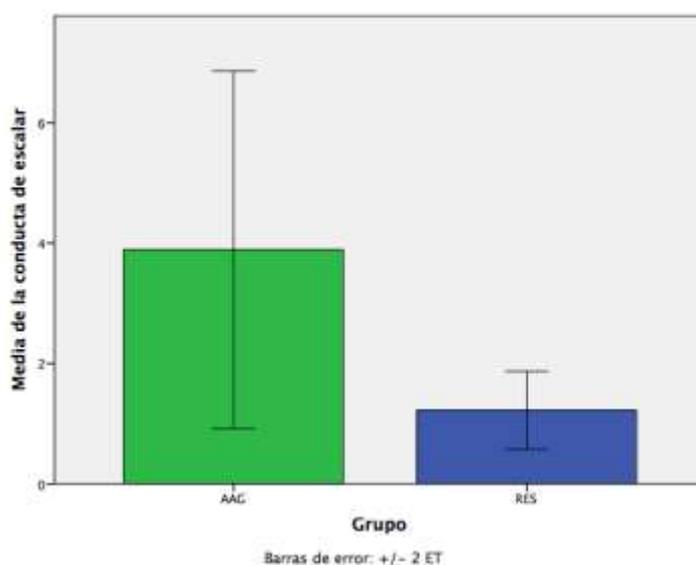


Figura 4.2.1.2.2. En el gráfico se muestra un aumento en la conducta de escalar en la fase de test del *forced swimming test* en las ratas tratadas con vehículo (AAG) respecto a las ratas tratadas con reserpina (RES), pero este aumento no es estadísticamente significativo. Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

Los datos obtenidos en la conducta de inmovilidad en la fase de test presentan normalidad según el estadístico *Shapiro-Wilk* tanto en el grupo tratado con reserpina ($W=0,920$, $p > 0,05$) como en el grupo tratado con vehículo ($W=0,968$, $p > 0,05$), aunque no se puede asumir homogeneidad de varianzas en la muestra ($F=6,723$, $p < 0,05$). Dado que el estadístico *t* de *Student* es robusto pese al no cumplimiento de la homogeneidad de varianzas, realizamos este análisis diferencial para comparar los resultados obtenidos en esta conducta entre los dos grupos experimentales. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en la conducta de inmovilidad en la fase del test del *forced swimming test* ($t=-7,951$, $p < 0,05$) (Tabla 4.2.1.2.5).

Prueba de muestras independientes										
	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
								Inferior	Superior	
INMOVILIDAD	Se han asumido varianzas iguales	6,723	,020	-7,951	16	,000	-12,000	1,509	-15,199	-8,801
	No se han asumido varianzas iguales			-7,951	9,480	,000	-12,000	1,509	-15,388	-8,612

Tabla 4.2.1.2.5. Prueba t de Student para muestras independientes en la conducta de inmovilidad durante la fase de test, comparando los grupos tratados con reserpina respecto al grupo control. Significación $p < 0,05$.

El gráfico muestra un aumento estadísticamente significativo en la conducta de inmovilidad en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en la fase de test del *forced swimming test* (Figura 4.2.1.2.3).

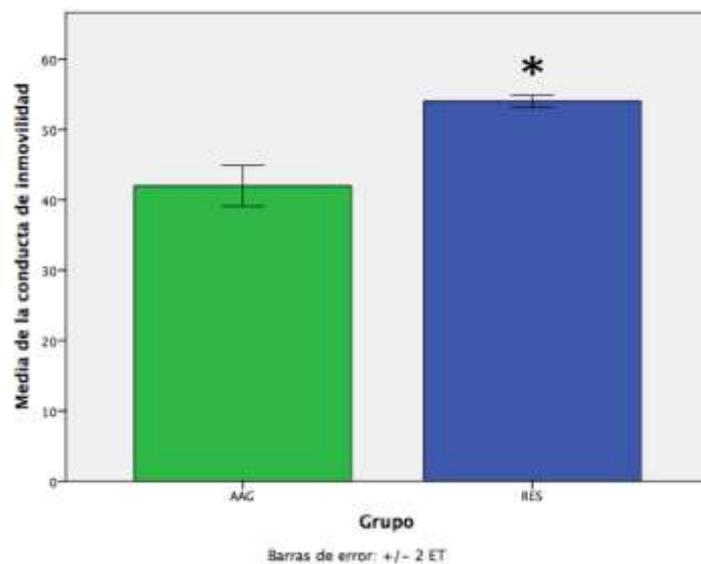


Figura 4.2.1.2.3. El gráfico muestra un aumento estadísticamente significativo en la conducta de inmovilidad en la fase de test del *forced swimming test* en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG). Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran 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 *forced swimming test* entre los grupos tratados con reserpina respecto a los grupos control. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo en las conductas de nadar y de inmovilidad, pero no en la conducta de escalada.

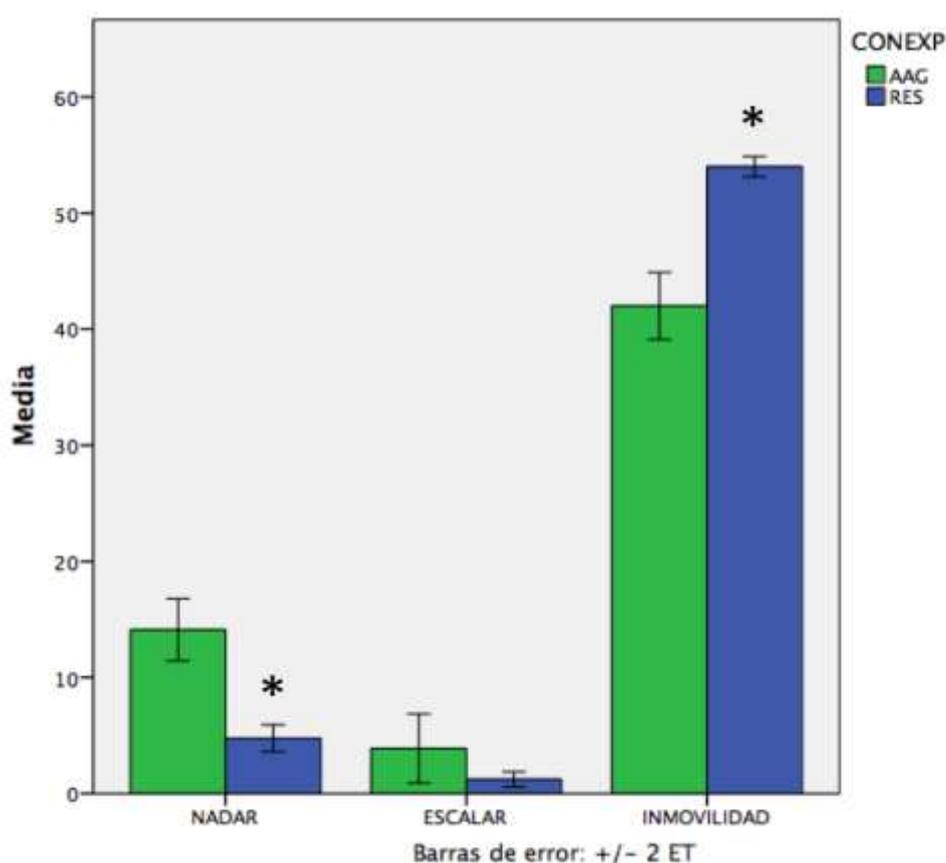


Figura 4.2.1.2.4. En el gráfico se muestra una disminución de la conducta de nadar y un aumento en la conducta de inmovilidad estadísticamente significativos en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas control (AAG). En cambio no existen diferencias estadísticamente significativas en la conducta de escalar entre los dos grupos. Significación $p < 0,05$. 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

La reserpina produce una marcada anorexia en la fase aguda de su efecto, desde la primera dosis hasta el cuarto día posterior a la última administración de reserpina. Este efecto adverso solo se observa en los animales tratados con reserpina, y su severidad disminuye progresivamente tras la última dosis.

Una comparación detallada del consumo de comida entre los grupos tratados con reserpina y los grupos tratados con vehículo muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos en la ingesta de comida durante los cinco días de habituación ($t=-0,623$, $p>0,05$) (Tabla 4.2.2.1.1).

Prueba de muestras independientes										
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error ttp. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
MEDIAS	Se han asumido varianzas iguales	4,387	,052	-,623	17	,542	-1,72844	2,77570	-7,58466	4,12777
	No se han asumido varianzas iguales			-,634	16,149	,535	-1,72844	2,72433	-7,49944	4,04255

Tabla 4.2.2.1.1. Prueba T de Student para muestras independientes que no muestra diferencias estadísticamente significativas ($t=-0,623$, $p>0,05$) de ingesta en los días de habituación entre los grupos control (AAG) y reserpinizados (RES). El nivel de significación es $p<0,05$.

Durante la fase de implantación del modelo (administración de reserpina/vehículo 1mg/kg durante tres días consecutivos), no se muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo control tras la primera administración ($t=-0,275$, $p>0,05$), pero sí tras la segunda ($t=7,273$, $p<0,05$) y tercera administración ($t=16,892$, $p<0,05$) (Tabla 4.2.2.1.2).

Prueba de muestras independientes										
	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error ttp. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
								Inferior	Superior	
RE01	Se han asumido varianzas iguales	,616	,443	-.275	17	,786	-1,0478	3,8053	-9,0762	6,9807
	No se han asumido varianzas iguales			-.280	16,563	,783	-1,0478	3,7484	-8,9722	6,8766
RE02	Se han asumido varianzas iguales	1,517	,235	7,263	17	,000	16,5300	2,2758	11,7285	21,3315
	No se han asumido varianzas iguales			7,134	14,369	,000	16,5300	2,3170	11,5724	21,4876
RE03	Se han asumido varianzas iguales	6,402	,022	17,485	17	,000	19,0378	1,0888	16,7406	21,3349
	No se han asumido varianzas iguales			16,892	11,309	,000	19,0378	1,1270	16,5655	21,5101

Tabla 4.2.2.1.2. Tabla T de Student para muestras independientes donde no se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos reserpina (RES) y control (AAG) en la ingesta de comida tras la primera administración de reserpina ($t=-0,275$, $p>0,05$), pero sí tras la segunda ($t=7,273$, $p<0,05$) y tercera ($t=16,892$, $p<0,05$). El nivel de significación es $p<0,05$.

Tras finalizar el periodo de reserpización, las diferencias en el consumo de comida entre ambos grupos persisten durante el día 1 ($t=14,259$, $p<0,05$), 2 ($t=7,231$, $p<0,05$), y 3 ($t=3,293$, $p<0,05$) tras la última administración de reserpina, pero el cuarto día ya no se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($t=0,549$, $p>0,05$) (Tabla 4.2.2.1.3).

Prueba de muestras independientes										
	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia		
								Inferior	Superior	
REC1	Se han asumido varianzas iguales	32,888	,000	15,058	17	,000	20,7867	1,3795	17,8761	23,6973
	No se han asumido varianzas iguales			14,259	8,108	,000	20,7867	1,4577	17,4329	24,1405
REC2	Se han asumido varianzas iguales	9,852	,006	7,542	17	,000	18,4489	2,4463	13,2877	23,5101
	No se han asumido varianzas iguales			7,231	10,014	,000	18,4489	2,5514	12,7650	24,1328
REC3	Se han asumido varianzas iguales	,002	,966	3,293	17	,004	9,6667	2,9353	3,4737	15,8596
	No se han asumido varianzas iguales			3,304	16,957	,004	9,6667	2,9253	3,4936	15,8397
REC4	Se han asumido varianzas iguales	,790	,386	,549	17	,590	1,6300	2,9681	-4,6322	7,8922
	No se han asumido varianzas iguales			,565	14,593	,581	1,6300	2,8859	-4,5362	7,7962

Tabla 4.2.2.1.3. Prueba T de Student para muestras independientes realizada para la comparación de la ingesta de comida entre los grupos control (AAG) y reserpina (RES) tras el periodo de reserpización. Se encuentran diferencias significativas en el día 1 ($t=14,259$, $p<0,05$), día 2 ($t=7,231$, $p<0,05$) y día 3 ($t=3,293$, $p<0,05$) tras la última administración de reserpina, pero no el cuarto día ($t=0,549$, $p>0,05$). El nivel de significación es $p<0,05$.

Además, el cuarto día después de la última dosis de reserpina los valores de ingesta son similares a la media del consumo de comida observados en el periodo de habituación ($t=1,582$, $p>0,05$) (Tabla 4.2.2.1.4).

Prueba de muestras relacionadas								
	Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)	
	Media	Desviación tip.	Error tip. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior				Superior
Par 1 MEDIAHAB - REC4	2,86316	7,89072	1,81025	-,94005	6,66636	1,582	,131	

Tabla 4.2.2.1.4. Prueba T de muestras relacionadas que compara la media de los días de habituación con el cuarto día tras la reserpización. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($t=1,582$, $p>0,05$). El nivel de significación es $p<0,05$.

El siguiente gráfico muestra la evolución del consumo de comida de los dos grupos desde el inicio de la habituación hasta el cuarto día posterior a la última administración de reserpina/vehículo, día a partir del cual se inicia la restricción de comida previa al test (Figura 4.2.2.1.1).

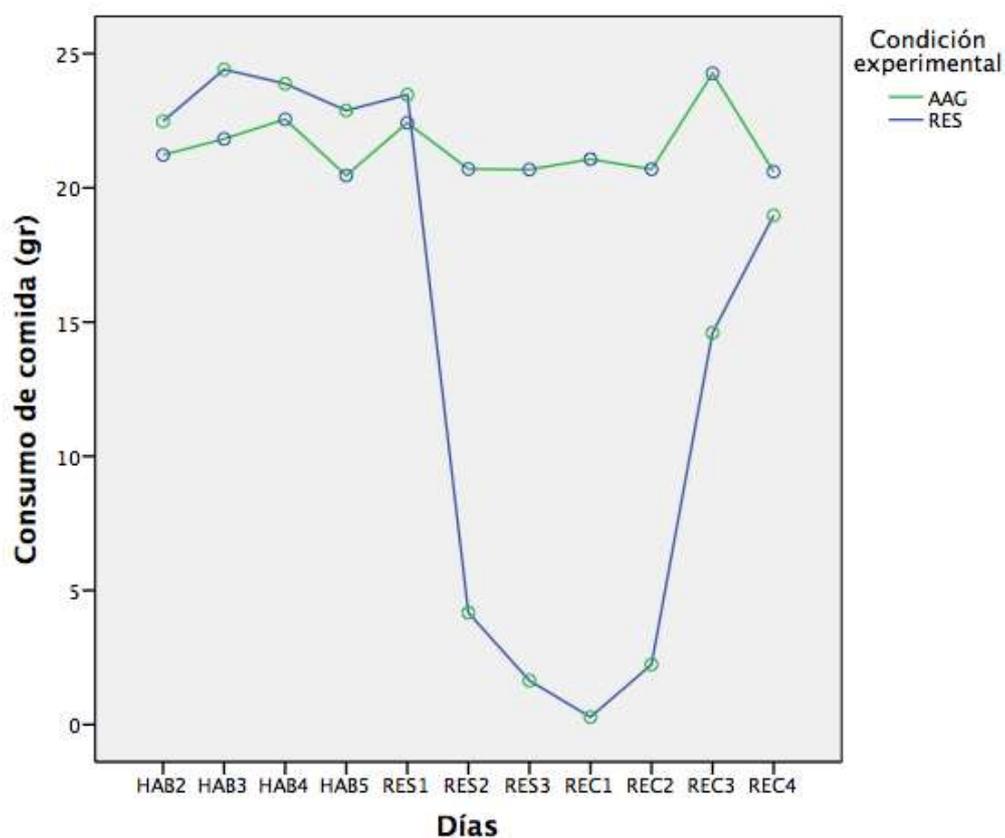


Figura 4.2.2.1.1. Registro de la ingesta diaria de comida durante el periodo de habituación, de tratamiento y de recuperación. Nivel de significación $p < 0,05$.

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 de síntomas depresivos obtenidos en el estudio mediante *Novelty suppressed feeding test*. Un estudio más detallado de los descriptivos de esta muestra puede encontrarse en el Anexo V.

	N	Media		Desv. tip.	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
TIEMPOCOMER	18	4,1750	,51961	2,20451	1,106	,536	1,577	1,038
AACERCARSEMIN	18	1,2764	,23017	,97654	,665	,536	-,739	1,038
TOCAROLERMIN	18	,9127	,16523	,70101	,962	,536	,024	1,038
N válido (según lista)	18							

Tabla 4.2.2.2.1. Tabla resumen de los estadísticos descriptivos para las medidas de tiempo en comer, veces acercarse por minuto y veces tocar y oler por minuto en el *Novelty suppressed feeding test*. Se han obtenido recuento de casos, media, error típico de la media, desviación típica, asimetría y curtosis.

El test de normalidad Shapiro-Wilk para muestras inferiores a 30 casos presenta normalidad para todos los grupos en todas las variables ($p > 0,05$), tal como se muestra en la Tabla 4.2.2.2.2.

GRUPO		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
TIEMPOCOMER	RES	,176	9	,200 [*]	,906	9	,287
	AAG	,284	9	,035	,887	9	,184
AACERCARSEMIN	RES	,166	9	,200 [*]	,966	9	,856
	AAG	,179	9	,200 [*]	,967	9	,871
TOCAROLERMIN	RES	,231	9	,181	,904	9	,279
	AAG	,107	9	,200 [*]	,971	9	,902

Tabla 4.2.2.2.2. Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en el *Novelty suppressed feeding test*, tanto en los grupos tratados con reserpina (RES) como con vehículo (AAG). El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p > 0,05$.

El conjunto de datos presenta homogeneidad de varianzas en todos los casos, medida con el estadístico de Levene, tanto en el tiempo en comer ($F=01,026$, $p>0,05$), en las veces que el animal se acerca al centro (donde está la comida) ($F=3,967$, $p>0,05$), y en las veces que el animal toca y huele la comida por minuto ($F=4,480$, $p>0,05$) (Tabla 4.2.2.2.3).

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
TIEMPOCOMER	Basándose en la media	1,026	1	16	,326
AACERCARSEMIN	Basándose en la media	3,967	1	16	,064
TOCAROLERMIN	Basándose en la media	4,480	1	16	,050

Tabla 4.2.2.2.3. Pruebas de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en Novelty suppressed feeding test. El estadístico empleado es Levene. Significación $p>0,05$.

Realizamos una prueba T de Student para muestras independientes para la comparación de los grupos reserpina (RES) y vehículo (AAG) en la variable veces que el animal se acerca al centro (donde está la comida) por minuto. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo ($t=-1,39014$, $p<0,05$) (Tabla 4.2.2.2.4).

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
Se han asumido varianzas iguales	3,967	,064	-4,303	16	,001	-1,39014	,32309	-2,07505	-,70523
MIN No se han asumido varianzas iguales			-4,303	10,027	,002	-1,39014	,32309	-2,10976	-,67052

Tabla 4.2.2.2.4. Prueba T de muestras independientes para la variable Veces acercarse por minuto. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo ($t=-1,39014$, $p<0,05$). Nivel de significación $p<0,05$.

El gráfico expuesto a continuación muestra una disminución estadísticamente significativa en las veces que el animal se acerca al centro (donde está la comida) por minuto en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el *Novelty Suppressed Feeding Test* (Figura 4.2.2.2.1).

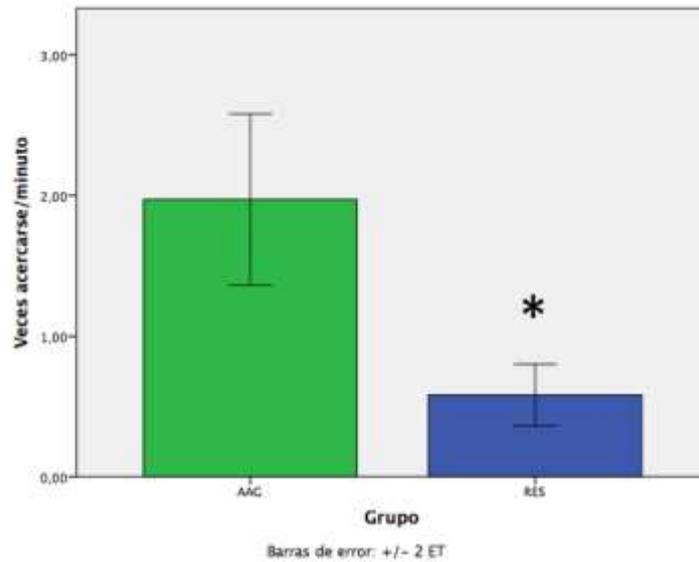


Figura 4.2.2.2.1. El gráfico muestra un descenso estadísticamente significativo en las veces que el animal se acerca a la comida por minuto en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG). Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

En segundo lugar, también realizamos una prueba T de Student para muestras independientes para la comparación de los grupos reserpina (RES) y vehículo (AAG) en la variable veces que el animal huele y toca la comida del centro. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo ($t = -2,960$, $p < 0,05$) (Tabla 4.2.2.2.5).

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior		Superior
TOCAROLERIM	Se han asumido varianzas iguales	4,480	,050	-2,960	18	,009	-,81396	,27316	-1,36006	-,23490
	No se han asumido varianzas iguales			-2,960	10,897	,013	-,81396	,27316	-1,41730	-,21067

Tabla 4.2.2.2.5. Prueba T de muestras independientes para la variable veces que el animal toca y huele la comida por minuto. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo ($t = -2,960$, $p < 0,05$). Nivel de significación $p < 0,05$.

El siguiente gráfico muestra una disminución estadísticamente significativa en las veces que el animal se hule y toca la comida por minuto en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el Novelty suppressed feeding test (Figura 4.2.2.2.2).

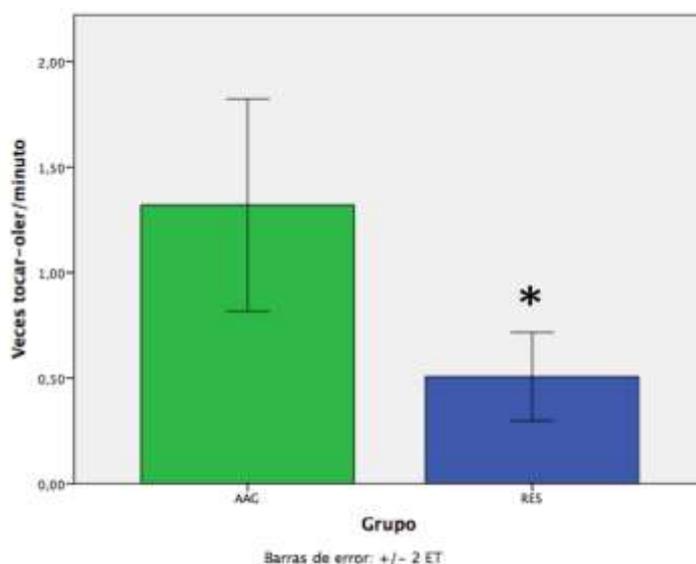


Figura 4.2.2.2.2. El gráfico muestra un descenso estadísticamente significativo en las veces que el animal toca y huele la comida por minuto en las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG). Significación $p < 0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

En último lugar, realizamos una prueba T de Student para muestras independientes para la comparación de los grupos reserpina (RES) y vehículo (AAG) en la variable tiempo en comer. Los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo ($t=3,085$, $p < 0,05$) (Tabla 4.2.2.2.6).

		Prueba de muestras independientes								
		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error tip. de la diferencia	95% intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior	
TIEMPOCOM ER	Se han asumido varianzas iguales	1,026	,326	3,085	16	,007	2,61667	,64825	,81845	4,41485
	No se han asumido varianzas iguales			3,085	13,296	,009	2,61667	,64825	,78826	4,44508

Tabla 4.2.2.2.6. Prueba T de muestras independientes para la variable tiempo en comer. Existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con reserpina y el grupo tratado con vehículo ($t=3,085$, $p<0,05$). Nivel de significación $p<0,05$.

El siguiente gráfico muestra un aumento estadísticamente significativo en el tiempo que el animal tarda en comer en las ratas tratadas con reserpina respecto a las tratadas con vehículo en el *Novelty suppressed feeding test* (Figura 4.2.2.2.3).

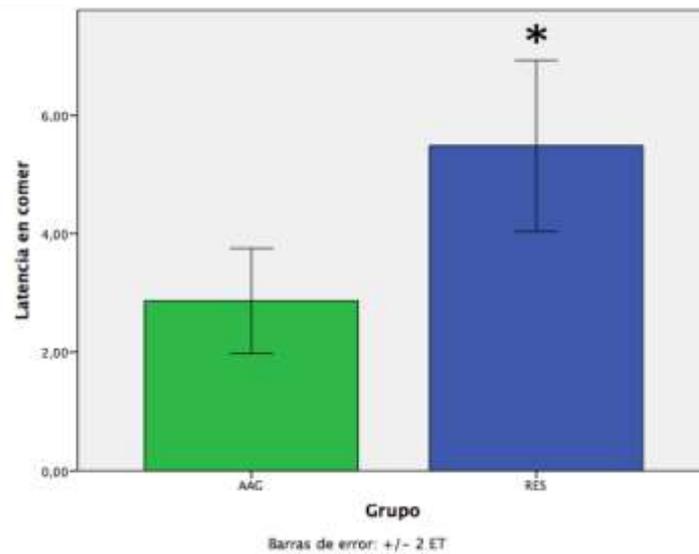


Figura 4.2.2.2.3. El gráfico muestra un aumento estadísticamente significativo en el tiempo que el animal tarda en comer entre las ratas tratadas con reserpina (RES) respecto a las ratas tratadas con vehículo (AAG). Significación $p<0,05$. Las barras de error muestran el error típico de la media ± 2 .

4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE SUEÑO

4.3.1. Resultados de los aspectos conductuales del sueño

En la Tabla 4.3.1.1 se observan los estadísticos descriptivos de los parámetros conductuales estudiados mediante el análisis de los vídeos de los registros: tiempo de sueño por hora, segmentos de sueño por hora, sacudidas por hora de sueño, y duración promedio de los segmentos de sueño; agrupados según la fase del estudio: fase control, fase de administración, y 1ª, 2ª y 3ª semana posteriores a la última administración de reserpina.

Estadísticos descriptivos

	N	Media		Desv. típ.
	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico
SUEÑOHO_CONTROL	5	,7023	,04366	,09763
SUEÑOHO_ADM	5	,7500	,07202	,16105
SUEÑOHO_1A.PR	5	,6753	,04074	,09109
SUEÑOHO_2A.PR	4	,7625	,02862	,05724
SUEÑOHO_3A.PR	4	,7231	,04735	,09470
SEGMENTOSH_CONTROL	5	5,3683	,52762	1,17978
SEGMENTOSH_ADM	5	6,3750	,77156	1,72527
SEGMENTOSH_1A.PR	5	4,6208	,75727	1,69330
SEGMENTOSH_2A.PR	4	3,9583	,21109	,42219
SEGMENTOSH_3A.PR	4	4,9531	,59093	1,18187
SACUDIDADH_CONTROL	5	24,2867	1,75110	3,91557
SACUDIDADH_ADM	5	66,6750	13,30623	29,75362
SACUDIDADH_1A.PR	5	41,8292	6,97524	15,59710
SACUDIDADH_2A.PR	4	40,7500	11,13111	22,26222
SACUDIDADH_3A.PR	4	34,4063	4,82402	9,64804
DURACIONSEGM_CONTROL	5	643,1973	77,11551	172,43552
DURACIONSEGM_ADM	5	598,3200	66,69533	149,13529
DURACIONSEGM_1A.PR	5	759,0633	117,57242	262,89992
DURACIONSEGM_2A.PR	4	853,9583	4,23846	8,47691
DURACIONSEGM_3A.PR	4	684,9000	50,82611	101,65222
N válido (según lista)	4			

Tabla 4.3.1.1. Resumen de los descriptivos de los parámetros sueño por hora, segmentos por hora, sacudidas por hora y duración promedio de los segmentos, agrupados los valores por periodos del estudio: control, administración y 1ª, 2ª y 3ª semana post- reserpina.

Las pruebas de normalidad, empleando el estadístico *Shapiro-Wilk* para muestras inferiores a 30 casos, muestran que los datos no se distribuyen de forma normal (Tabla 4.3.1.2).

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
SUEÑO control	,829	4	,166
SUEÑO adm	,857	4	,248
SUEÑO_1A.PR	,878	4	,330
SUEÑO_2A.PR	,824	4	,153
SUEÑO_3A.PR	,767	4	,055
SEGMENTOS control	,827	4	,159
SEGMENTOS adm	,984	4	,922
SEGMENTOS_1A.PR	,867	4	,284
SEGMENTOS_2A.PR	,775	4	,065
SEGMENTOS_3A.PR	,981	4	,910
SACUDIDASH control	,900	4	,432
SACUDIDASH adm	,908	4	,474
SACUDIDASH_1A.PR	,818	4	,139
SACUDIDASH_2A.PR	,910	4	,482
SACUDIDASH_3A.PR	,837	4	,186
DURACIONSEGM control	,880	4	,337
DURACIONSEGM adm	,972	4	,856
DURACIONSEGM_1A.PR	,990	4	,960
DURACIONSEGM_2A.PR	,946	4	,693
DURACIONSEGM_3A.PR	,865	4	,279

Tabla 4.3.1.2. Resumen de las pruebas de normalidad mediante el estadístico *Shapiro-Wilk*. Nivel de significación $p < 0,05$.

Al tratarse de una muestra no normal con un número reducido de ejemplares, empleamos el estadístico de contraste no paramétrico de Friedman para comparaciones múltiples de medidas relacionadas. En la tabla X se muestra un resumen de la significación obtenida mediante el test de Friedman, en el que se observa que únicamente existen diferencias estadísticamente significativas en el parámetro de sacudidas por hora (sign. 0,031; $p < 0,05$) (Tabla 4.3.1.3).

PARÁMETRO SUEÑO	N	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA
SUEÑO/H	4	0,699
SEGMENTOS/H	4	0,110
SACUDIDAS/H	4	0,031
DURACIÓN SEGMENTOS	4	0,231

Tabla 4.3.1.3. Resumen del análisis mediante prueba no paramétrica Friedman de los distintos parámetros sueño por hora, segmentos por hora, sacudidas por hora y duración promedio de los segmentos. Estadístico de contraste chi-cuadrado. Nivel de significación $p < 0,05$.

Un análisis pormenorizado de comparación por pares empleando el estadístico no paramétrico de Wilcoxon en el que se comparan las distintas fases temporales de cada parámetro respecto al periodo control, muestra que las diferencias significativas en la variable de sacudidas por hora se observan entre el periodo control y la fase de administración ($Z = -2,023$; $p < 0,05$) y entre el periodo control y la 1ª semana tras la última administración de reserpina ($Z = -2,023$; $p < 0,05$) (Tabla 4.3.1.4).

PARÁMETROS CONTRASTADOS	ESTADÍSTICO (Z) WILCOXON	SIGNIFICACIÓN ASINTÓTICA (BILATERAL)
SUEÑO/H_CONTROL- SUEÑO/H_ADMIN	0,944	0,345
SUEÑO/H_CONTROL- SUEÑO/H_1ª SEMANA	0,674	0,500
SUEÑO/H_CONTROL- SUEÑO/H_2ª SEMANA	-1,095	0,273
SUEÑO/H_CONTROL- SUEÑO/H_3ª SEMANA	0,000	1,000
SEGMENTOS/H_CONTROL- SEGMENTOS/H_ADMIN	-1,214	0,225
SEGMENTOS/H_CONTROL- SEGMENTOS/H_1ª SEMANA	-1,214	0,225
SEGMENTOS/H_CONTROL- SEGMENTOS/H_2ª SEMANA	-1,826	0,068
SEGMENTOS/H_CONTROL- SEGMENTOS/H_3ª SEMANA	0,000	1,000
SACUDIDAS/H_CONTROL- SACUDIDAS/H_ADMIN	-2,023	0,43
SACUDIDAS/H_CONTROL- SACUDIDAS/H_1ª SEMANA	-2,023	0,43
SACUDIDAS/H_CONTROL- SACUDIDAS/H_2ª SEMANA	-1,461	0,144
SACUDIDAS/H_CONTROL- SACUDIDAS/H_3ª SEMANA	-1,461	0,144
DURACIÓN SEGM_CONTROL- DURACIÓN SEGM_ADMIN	-0,405	0,686
DURACIÓN SEGM_CONTROL- DURACIÓN SEGM_1ª SEMANA	-0,944	0,345
DURACIÓN SEGM_CONTROL- DURACIÓN SEGM_2ª SEMANA	-1,826	0,068
DURACIÓN SEGM_CONTROL- DURACIÓN SEGM_3ª SEMANA	0,000	1,000

Tabla 4.3.1.4. Resumen de la comparación por pares mediante el test no paramétrico de Wilcoxon. Cada periodo del estudio (administración y 1ª, 2ª y 3ª semana post- reserpina) se ha comparado con el periodo control. Nivel de significación $p < 0,05$.

A continuación se muestra una representación gráfica de cada parámetro para los distintos periodos temporales: control, administración, 1^a, 2^a y 3^a semana post-reserpina (Figura 4.3.1.1). Observando las gráficas, podemos ver que el tiempo total de sueño apenas varía a lo largo del estudio. En cambio, la segmentación del sueño aumenta durante el periodo de administración y disminuye en el periodo post-reserpina, aunque los valores no son estadísticamente significativos. En cuanto a las sacudidas por hora, observamos un aumento significativo respecto al periodo control en las fases de administración y 1^a semana post-reserpina. Este aumento del número de sacudidas se mantiene respecto al control en la 2^a y 3^a semana post-reserpina, aunque los datos muestran que las diferencias no son estadísticamente significativas, probablemente por la elevada variabilidad que se observa. Respecto a la duración promedio de los periodos de sueño, disminuye durante la fase de administración y aumenta en las semanas post-reserpina respecto al periodo control, pero las diferencias no resultan estadísticamente significativas.

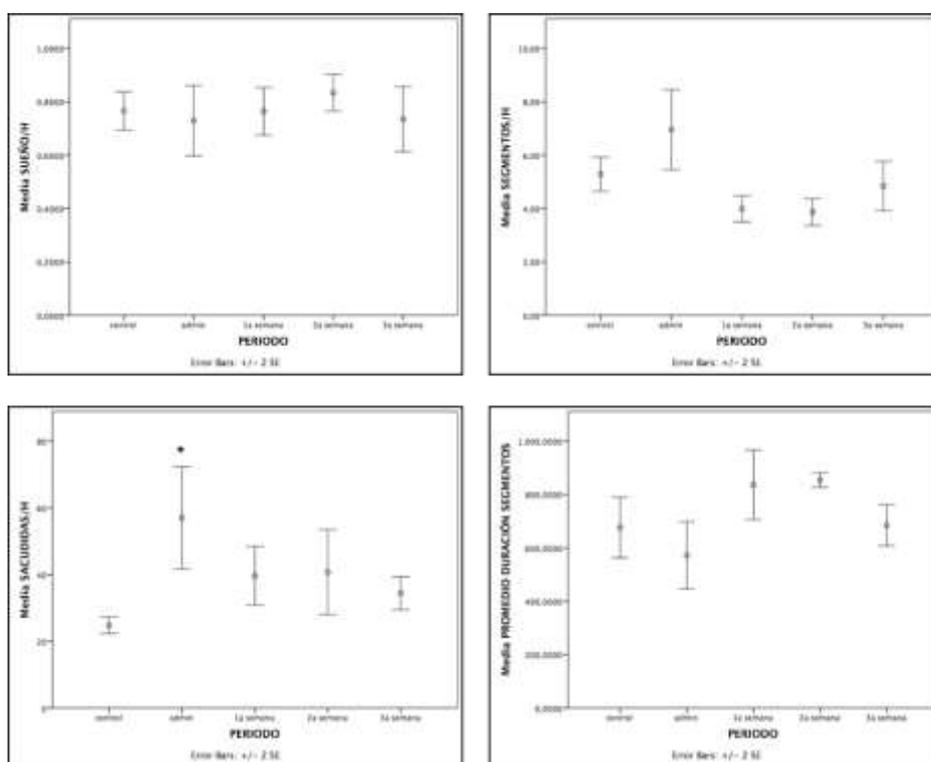


Figura 4.3.1.1. Representación gráfica de los parámetros sueño por hora, segmentos por hora, sacudidas por hora y duración promedio de los segmentos, agrupados los valores por periodos del estudio: control, administración y 1^a, 2^a y 3^a semana post- reserpina.

4.3.2. Resultados de los aspectos electrofisiológicos del sueño

4.3.2.1. Proporción REM-SWS y transición entre estados

Se observaron cambios significativos en la proporción de periodos REM-SWS (de entre las ventanas que cumplieron las características, $n = 22613$; test de Chi-cuadrado, $p < 0.001$). En control, menos periodos de REM que SWS (41.2 % frente a 58.8 % respectivamente). Los días de administración la proporción de REM aumenta (79.2 %). En las tres semanas post-reserpina, la proporción de casos identificados como REM va disminuyendo (1ª semana: 35.2 %; 2ª semana: 31.7 %; 3ª semana: 21.1 %), y los casos identificados como SWS van aumentando inversamente. Todas las comparaciones post-hoc entre cada periodo con el control resultaron significativas (Chi-cuadrado, $p < 0.001$) (Figura 4.3.2.1.1).

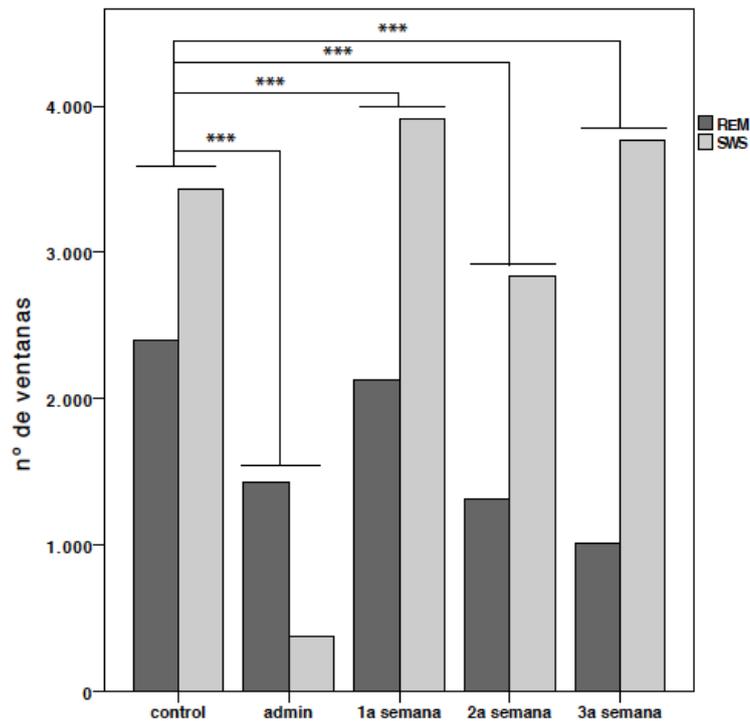


Figura 4.3.2.1.1. Distribución de las ventanas de 10 s analizadas según su clasificación como REM (potencia relativa theta > 50 % y EMG-RMS < 0.03) o SWS (potencia de delta y ondas lentas > 50 %). En control, hay una menor proporción REM:SWS. La administración de reserpina hace que aumente esta proporción temporalmente y en las semanas post-reserpina, disminuye la proporción REM:SWS.

Se analizó el número de ventanas en las que se daba una transición entre estados REM, SWS o no clasificado ($n=76464$). El test de Chi-cuadrado indicó diferencias significativas ($p < 0.001$), con comparaciones posteriores dos a dos: en el control, hubo un 18.4 % de ventanas de transición; los días de administración de reserpina, las transiciones disminuyeron significativamente respecto del control (16.6 %; $p < 0.001$); en la primera semana post-reserpina no se obtuvieron diferencias significativas (18.2 %; $p = 0.638$), pero en las semanas 2ª (20.7 %; $p < 0.001$) y 3ª (19.9 %; $p < 0.001$) hubo un aumento de ventanas de transición (Figura 4.3.2.1.2).

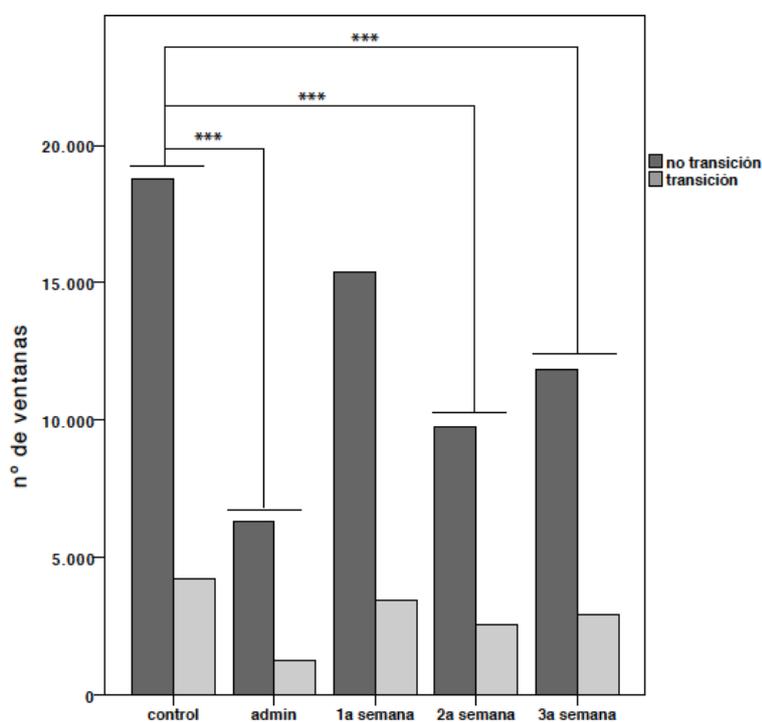


Figura 4.3.2.1.2. Distribución de las ventanas de 10 s analizadas según su clasificación como Transición o No transición. La reserpina reduce la proporción de transiciones en los días de administración, pero una mayor proporción respecto del control en las semanas 2ª y 3ª post-reserpina.

4.3.2.2. Ventanas con quietud en el EMG

En los días previos a la administración de la reserpina, un 68.5 % de las ventanas de sueño analizadas presentaron actividad en el EMG identificada como de quietud (RMS normalizado inferior a 0.03). En los días de administración de reserpina,

un 93.5 % de los periodos de sueño analizados cumplieron esta condición. En cambio, la proporción disminuyó progresivamente en las tres semanas post-reserpina (1ª semana: 53 %; 2ª semana: 50.8 %; 3ª semana: 49.3 %). Tanto las comparaciones globales como las comparaciones dos a dos con el control revelaron diferencias significativas en todos los casos (Chi-cuadrado, $p < 0.001$) (Figura 4.3.2.2.1).

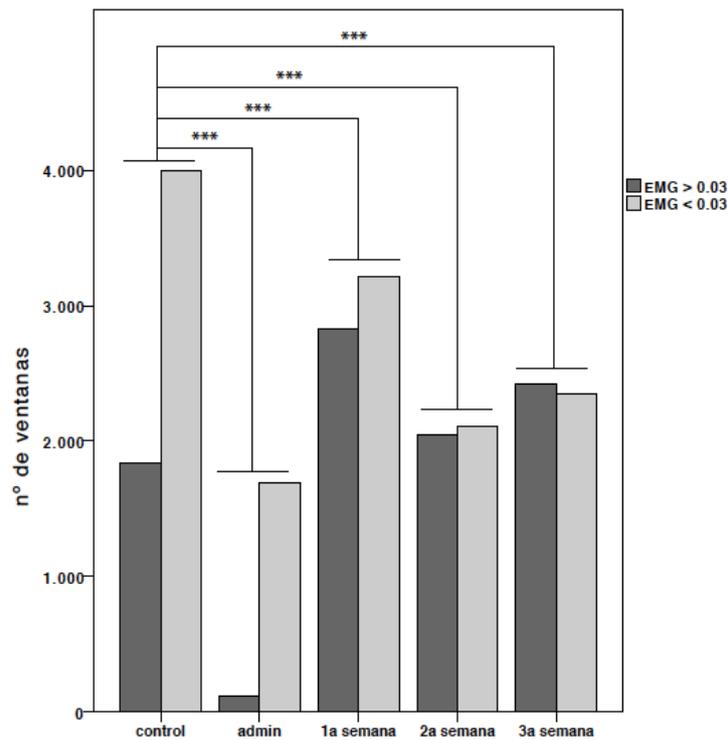


Figura 4.3.2.2.1. Distribución de las ventanas de 10 s analizadas según su clasificación de atonía ($EMG-RMS < 0.03$). En el sueño control, hay mayoría de periodos con quietud en el EMG (atonía). La administración de reserpina provoca una mayor atonía temporalmente y en las semanas siguientes aumenta la actividad muscular y disminuye la proporción de periodos de atonía.

4.3.2.3. Correlación entre la potencia relativa de la banda theta y la amplitud del EMG

Dado que los periodos de sueño REM se caracterizan por una elevada actividad en el rango theta y una baja amplitud en el EMG, se analizó la correlación de Spearman, para muestras no normales, entre la potencia relativa de theta y la actividad muscular, medidas como media y desviación estándar del RMS-EMG en los periodos no identificados como sueño SWS.

En el periodo control se encontró una correlación negativa significativa entre la potencia relativa de theta y la actividad muscular. En el periodo de administración la correlación se mantuvo, tanto con la media del RMS-EMG como con su desviación estándar. En los periodos post-reserpina, la correlación entre la actividad EMG y la oscilación theta se perdió durante la segunda semana. Los valores de correlación y significación se recogen en la Tabla 4.3.2.3.1.

	media del RMS-EMG		desv. est. del RMS-EMG	
	rho de Spearman	Sign. (2 colas)	rho de Spearman	Sign. (2 colas)
control	-0,028153	0,000081***	-0,026779	0,000178***
administración	-0,167564	0,000000***	-0,152106	0,000000***
1ª semana	-0,022038	0,00709***	-0,164328	0,000000***
2ª semana	0,000869	0,932768	0,003615	0,725518
3ª semana	-0,044471	0,000003***	-0,079093	0,000000***

Tabla 4.3.2.3.1. Correlación (Spearman) entre la actividad muscular (media y desv. est. del EMG-RMS) y la potencia relativa de la actividad theta. Durante el sueño control, existe una correlación negativa entre la actividad muscular y la potencia de la banda theta, debido a que los periodos de REM se caracterizan por una elevada actividad theta con atonía muscular. Esta correlación se pierde durante la segunda semana post-reserpinización.

4.3.2.4. Análisis espectral: potencia relativa

Para la caracterización de la actividad oscilatoria se analizó en primer lugar la composición espectral, en el rango 0.3-100 Hz, para cada ventana de sueño. Los valores encontrados para cada periodo se pueden encontrar en las Tablas 4.3.2.4.1 y 4.3.2.4.2 Las gráficas de la evolución mostradas en la Figura 4.3.2.4.1 muestran cambios en las potencias relativas (porcentaje de potencia de cada banda respecto del total en el rango 0.3-100 Hz), calculadas a partir del total de ventanas analizadas (n=76465).

Las comparaciones múltiples (Friedman) y las correspondientes comparaciones dos a dos respecto del control (Wilcoxon) se realizaron a partir del promedio de las ventanas para cada animal (n=5), por lo que el aumento en la variabilidad enmascara algunos de los cambios apreciables en las gráficas.

En los animales control, como corresponde al sueño fisiológico, las frecuencias lentas (< 10 Hz) fueron predominantes, con periodos de ondas lentas y delta (en general, considerados SWS), alternos con ventanas de claro predominio en la banda theta, propio del sueño REM, además de ventanas no clasificadas como SWS ni REM, de transición entre ambos estados o hacia la vigilia.

Entre las frecuencias bajas (Tabla 4.3.2.4.1), las ondas lentas (0.3-1.5 Hz) presentaron incrementos estadísticamente significativos a partir de la segunda semana, mayores durante la tercera semana post-reserpina. La banda delta (1.5-4 Hz) no se vio afectada por la administración de reserpina ni en los días posteriores a su administración. Tampoco se pudieron detectar cambios estadísticamente significativos en la potencia relativa de la oscilación theta (4-10 Hz). Las *spindles* (10-16 Hz) sí disminuyeron significativamente durante la tercera semana post-reserpina.

De entre las oscilaciones de frecuencias más rápidas (Tabla 4.3.2.3) únicamente beta (16-30 Hz) y gamma alto (60-90 Hz) presentaron disminuciones estadísticamente significativas en los días de administración. No obstante, las oscilaciones rápidas presentaron una mayor variabilidad interindividuo, por lo que el estudio detallado se centró únicamente en las frecuencias lentas.

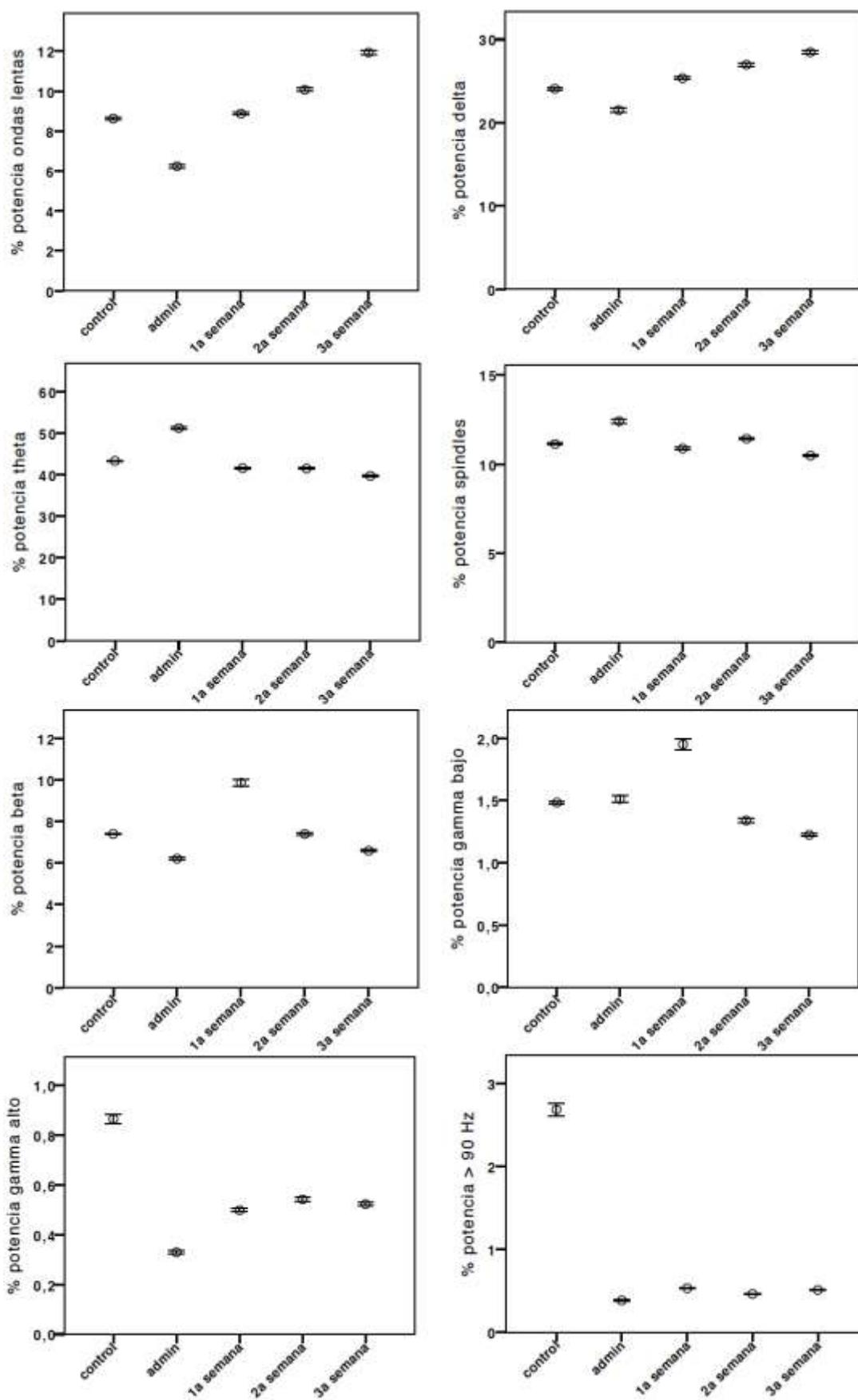


Figura 4.3.2.4.1. Evolución temporal de los ratios de potencia relativa para cada banda (media \pm error estándar), analizados en el total de ventanas de 10 s ($n=76465$) mediante análisis espectral.

		potencia relativa (%)	Sign. (2 colas)
Ondas lentas (0.3-1.5 Hz)	control	8,98 ± 1,09	-
	administración	8,76 ± 1,20	0,1024
	1ª semana	10,65 ± 1,67	0,2772
	2ª semana	11,77 ± 2,14	0,0470*
	3ª semana	12,96 ± 2,17	< 0,001 ***
Friedman p=0,001**			
Delta (1.5-4 Hz)	control	23,75 ± 2,69	-
	administración	28,70 ± 2,53	0,0615
	1ª semana	24,18 ± 2,31	0,9039
	2ª semana	24,37 ± 2,89	0,1398
	3ª semana	23,60 ± 3,12	0,3635
Friedman p=0,535			
Theta (1.5-10 Hz)	control	46,66 ± 2,95	-
	administración	45,04 ± 2,48	0,4631
	1ª semana	44,86 ± 2,90	0,2598
	2ª semana	43,97 ± 3,28	0,2330
	3ª semana	43,59 ± 3,19	0,0609
Friedman p=0,264			
Spindles (10-16 Hz)	control	10,86 ± 0,64	-
	administración	10,27 ± 0,84	0,5540
	1ª semana	10,60 ± 0,68	0,1365
	2ª semana	10,50 ± 0,64	0,2560
	3ª semana	10,05 ± 0,80	0,0356*
Friedman p=0,018*			

Tabla 4.3.2.4.1. Resultados estadísticos de las potencias relativas de las bandas de baja frecuencia, calculadas a partir del promedio para cada animal (n=5). Comparaciones múltiples para muestras apareadas (Friedman) y significación en comparaciones dos a dos (Wilcoxon). * p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001

En la tercera semana post-reserpina, aumentan las ondas lentas y disminuyen las spindles, con una tendencia a la reducción de la banda theta.

		potencia relativa	Sign. (2 colas)
Beta (16-30 Hz) Friedman $p=0,033^*$	control	6,67 ± 0,62	-
	administración	5,21 ± 0,62	0,0129*
	1ª semana	6,87 ± 0,90	0,1075
	2ª semana	6,69 ± 0,57	0,2805
	3ª semana	6,64 ± 0,65	0,2805
Gamma bajo (30-60 Hz) Friedman $p=0,077$	control	1,14 ± 0,15	-
	administración	1,16 ± 0,24	0,9811
	1ª semana	1,34 ± 0,23	0,3547
	2ª semana	1,23 ± 0,15	0,3635
	3ª semana	1,35 ± 0,20	0,5320
Gamma alto (60-90 Hz) Friedman $p=0,002^{**}$	control	0,44 ± 0,10	-
	administración	0,26 ± 0,06	0,0029**
	1ª semana	0,38 ± 0,07	0,4688
	2ª semana	0,44 ± 0,06	0,1914
	3ª semana	0,50 ± 0,08	0,9096
Epsilon (90-100 Hz) Friedman $p=0,138$	control	1,02 ± 0,40	-
	administración	0,25 ± 0,06	0,0929
	1ª semana	0,35 ± 0,07	0,8563
	2ª semana	0,39 ± 0,04	0,1728
	3ª semana	0,44 ± 0,07	0,4265

Tabla 4.3.2.4.2. Resultados estadísticos de las potencias relativas de las bandas de alta frecuencia, calculadas a partir del promedio para cada animal ($n=5$). Comparaciones múltiples para muestras apareadas (Friedman) y significación en comparaciones dos a dos (Wilcoxon). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos a estas frecuencias en el periodo post-reserpina.

La Figura 4.3.2.4.2 muestra los espectros de potencia de ventanas de 10 s de sueño de ondas lentas y de REM en periodos control, administración y tercera semana post-reserpina. Puede observarse la intrusión de ondas a diferentes frecuencias durante el sueño REM y la aparición de un pico de 7-8 Hz durante el sueño de ondas lentas en el periodo de post-reserpina.

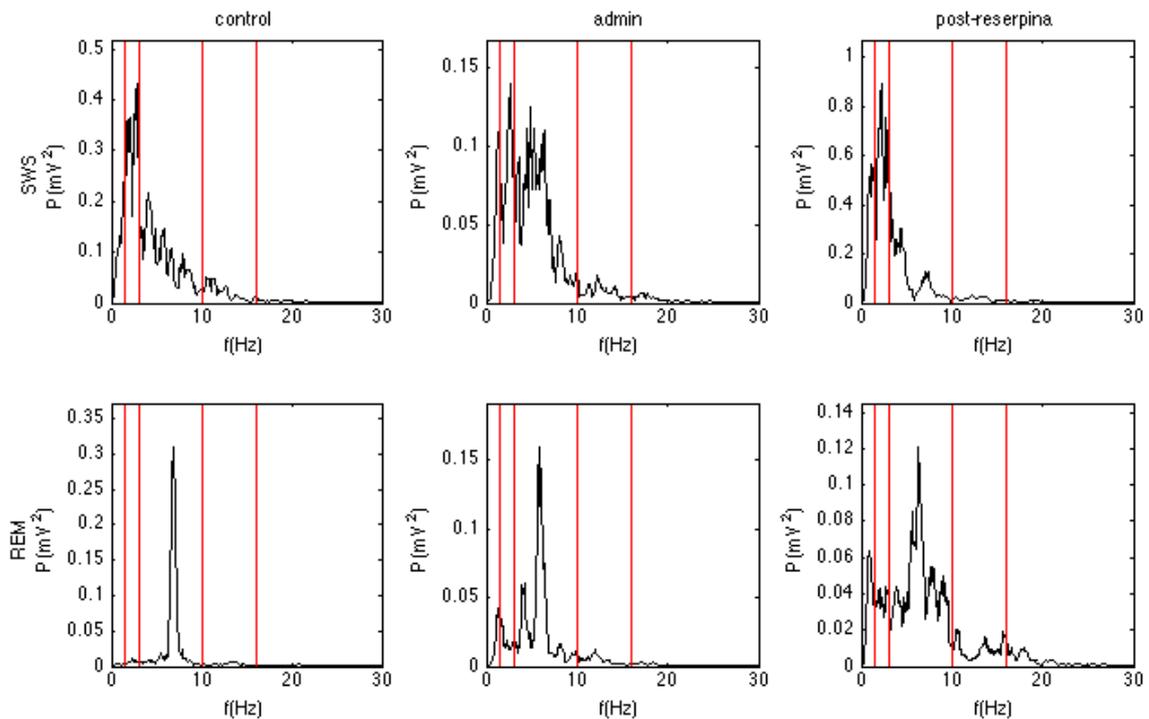


Figura 4.3.2.4.2. Espectros de potencias de ventanas de 10 s de control, administración y tercera semana post-reserpina correspondientes a sueño de ondas lentas (SWS, arriba) y a REM (abajo). En los periodos de SWS puede observarse un aumento de actividad theta en el periodo de administración y una traslación hacia frecuencias más bajas en el periodo de post-reserpina, con un pico de actividad alrededor de 7-8 Hz. En la ventana de REM en control, la actividad theta es prácticamente exclusiva; en la administración, puede observarse como el pico de actividad theta coexiste con actividad a otras frecuencias, más evidente en el periodo de post-reserpina.

4.3.2.5. Análisis *wavelet*

Con el objetivo de caracterizar la actividad oscilatoria con una mejor resolución temporal, se empleó el análisis *wavelet* de las oscilaciones de bajas frecuencias, que habían presentado una mayor homogeneidad en la respuesta interindividual en el análisis espectral.

Para cada ventana, se detectaron los puntos de potencia máxima en el rango 0.5-12 Hz y se calculó su frecuencia media. Se observó una tendencia estadística (Friedman $p = 0.065$) a la disminución de la frecuencia. Concretando la detección de máximos a la banda theta, se obtuvieron resultados significativos para todos los periodos desde la administración de la reserpina, con una reducción de la frecuencia. Las spindles no mostraron cambios significativos en su frecuencia. Los resultados estadísticos se reflejan en la Tabla 4.3.2.5.1.

		frecuencia máximos	Sign. (2 colas)
rango 0.3-12 Hz Friedman $p=0,065$	control	6,080526 \pm 0,231200	-
	administración	5,640500 \pm 0,199155	0,031249*
	1ª semana	6,060150 \pm 0,202163	0,0990
	2ª semana	5,798312 \pm 0,239206	0,002162**
	3ª semana	6,098438 \pm 0,227046	0,1252
theta Friedman $p=0,002**$	control	6,793263 \pm 0,069747	-
	administración	6,283444 \pm 0,073614	0,000846***
	1ª semana	6,248000 \pm 0,225573	0,011236*
	2ª semana	6,651760 \pm 0,067215	0,003143**
	3ª semana	6,077000 \pm 0,279544	0,004924**
spindles Friedman $p=0,117$	control	12,507684 \pm 0,052831	-
	administración	12,363278 \pm 0,130890	0,0759
	1ª semana	11,347600 \pm 0,542609	0,0766
	2ª semana	12,461677 \pm 0,051463	0,6496
	3ª semana	11,092250 \pm 0,674297	0,9547

Tabla 4.3.2.5.1. Resultados estadísticos de las características de los puntos de máxima potencia en las bandas 0.3-12 Hz, en la banda theta y spindles, calculadas a partir del promedio para cada animal ($n=5$). Comparaciones múltiples para muestras apareadas (Friedman) y significación en comparaciones dos a dos (Wilcoxon). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. La administración de reserpina provocó una disminución de las frecuencias en el rango 0.3-12 Hz, con resultados significativos en los días de administración y segunda semana post-reserpina. La frecuencia dentro de la banda theta también disminuyó significativamente en todos los periodos. La banda de spindles no presentó diferencias significativas en las frecuencias de los máximos, salvo una tendencia a la reducción en la administración y primera semana post-reserpina.

Para caracterizar mejor las oscilaciones presentes en los periodos de sueño, y puesto que las principales alteraciones se habían encontrado en las bandas de ondas lentas y theta, se detectaron también las regiones temporales de predominio de ambas bandas. En estas regiones, se calculó la frecuencia media dentro de la banda y su desviación estándar, que da una medida de concentración o de dispersión dentro de la banda, y variables de dispersión temporal: ratio temporal (proporción de tiempo de la ventana de 10-s con predominio en esa banda), número de regiones, duración media de las regiones y fraccionamiento de la banda (calculado teniendo en cuenta el tiempo en la banda y el número de regiones). Los resultados estadísticos de la comparación de los promedios para cada animal (n=5) para las ondas lentas pueden observarse en la Tabla 4.3.2.5.2. Su evolución temporal en el total de ventanas (n=76465) en la Figura 4.3.2.5.1. Y los resultados correspondientes a las oscilaciones theta, en la Tabla 4.3.2.5.3 y en la Figura 4.3.2.5.2.

En las ondas lentas, la administración de reserpina provocó un aumento progresivo de la cantidad de tiempo ocupado por la banda, que resultó significativo en las comparaciones múltiples y en la tercera semana post-reserpina. Este aumento en la proporción temporal de onda lenta se correspondió con un progresivo incremento en el número de regiones observado en las semanas post-reserpina, significativamente mayor al control durante la tercera semana. Durante los días de administración, sin embargo, disminuyeron las regiones de onda lenta. Además, la duración media de estas regiones también fue aumentando, con diferencias significativas respecto del control en la última semana de registro. De este comportamiento se deriva, por tanto, que el índice de fragmentación fue disminuyendo inversamente (excepto en los días de administración). En cuanto a la distribución en frecuencias de la actividad en ondas lentas, se observó un aumento durante los días de administración y una progresiva disminución en la frecuencia, ligera pero significativa, en los días post-reserpina, así como una mayor dispersión dentro del rango de frecuencias.

		Ondas lentas	Sign. (2 colas)
Ratio temporal Friedman p=0,000183***	control	0,059158 ± 0,009855	-
	administración	0,057500 ± 0,014312	0,064790
	1ª semana	0,06925 ± 0,015423	0,519276
	2ª semana	0,077492 ± 0,016041	0,069144
	3ª semana	0,090074 ± 0,020732	0,006406**
Nº de regiones Friedman p=0,000045***	control	0,768579 ± 0,130820	-
	administración	0,552111 ± 0,130766	0,039474*
	1ª semana	0,855450 ± 0,177397	0,6580
	2ª semana	1,229758 ± 0,314372	0,0609
	3ª semana	1,436416 ± 0,342099	0,003143**
Duración media Friedman p=0,000975***	control	0,285632 ± 0,031273	.
	administración	0,282647 ± 0,043280	0,215
	1ª semana	0,316150 ± 0,051423	0,573169
	2ª semana	0,317545 ± 0,036222	0,172848
	3ª semana	0,329659 ± 0,035865	0,010594*
Fragmentación Friedman p=0,000217***	control	0,714842 ± 0,024850	-
	administración	0,739294 ± 0,036180	0,029873*
	1ª semana	0,68005 0, ± 031288	0,6009
	2ª semana	0,665777 ± 0,039338	0,0995
	3ª semana	0,647466 ± 0,039512	0,010594*
Frecuencia media Friedman p=0,002173**	control	1,231316 ± 0,017137	-
	administración	1,301294 ± 0,026161	0,004823**
	1ª semana	1,24865 ± 0,026050	0,2514
	2ª semana	1,197083 ± 0,038757	0,4955
	3ª semana	1,163116 ± 0,034016	0,046826*
Desv. est frecuencia Friedman p=0,000043***	control	0,078368 ± 0,005631	-
	administración	0,077059 ± 0,007863	0,083076
	1ª semana	0,086350 ± 0,009078	0,8880
	2ª semana	0,095097 ± 0,011621	0,026757**
	3ª semana	0,101655 ± 0,009544	0,001206**

Tabla 4.3.2.5.2. Resultados estadísticos de las características de las regiones de predominancia de ondas lentas (0.3-1.5 Hz), calculadas a partir del promedio para cada animal (n=5). Comparaciones múltiples para muestras apareadas (Friedman) y significación en comparaciones dos a dos (Wilcoxon). * p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001.

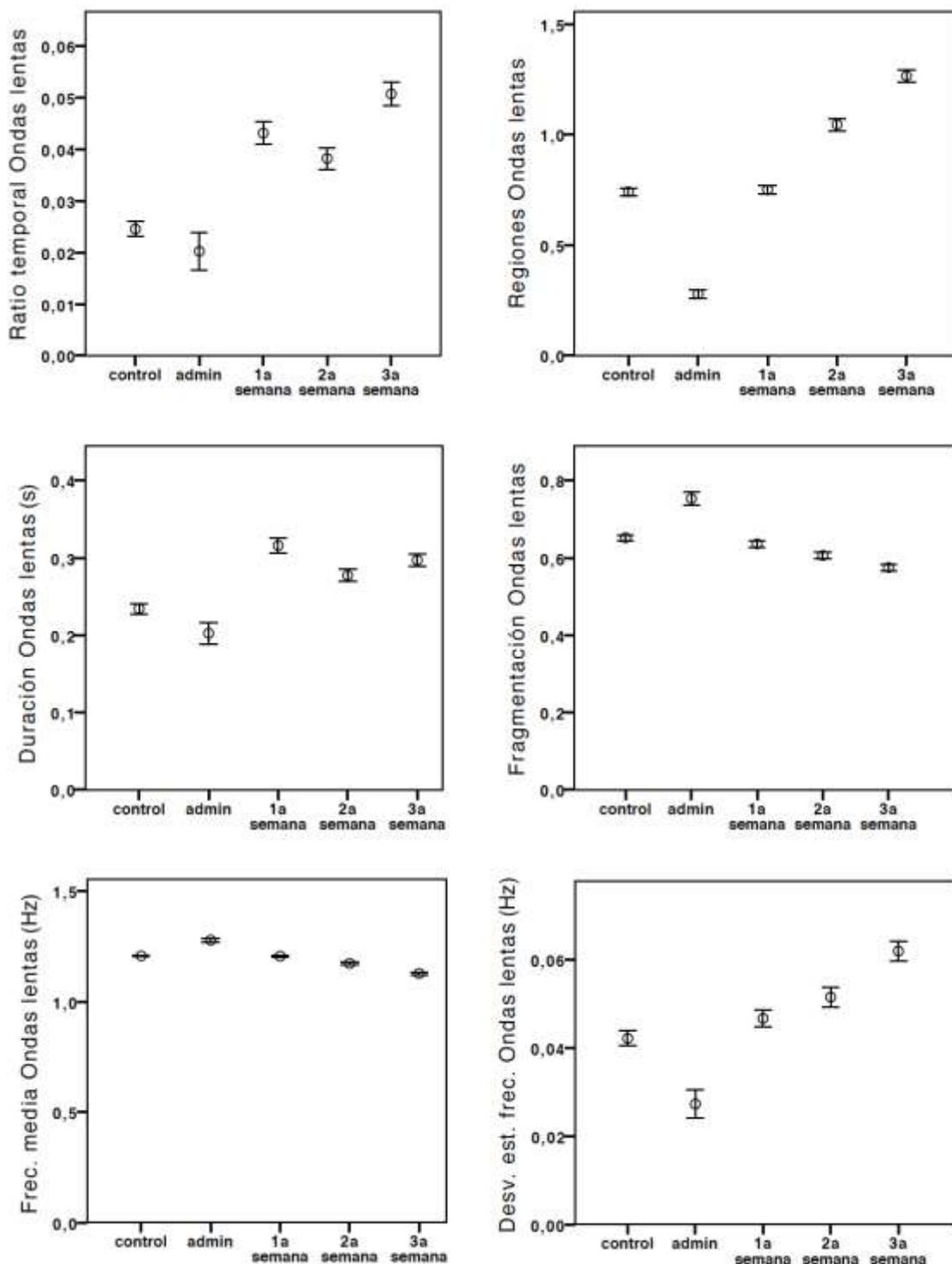


Figura 4.3.2.5.1. Evolución temporal de los las características de las regiones de ondas lentas (media \pm error estándar), analizados en el total de ventanas de 10 s ($n=76465$) mediante análisis wavelet.

Las regiones de predominancia de ondas lentas aumentaron progresivamente tras la administración de reserpina, adquiriendo significación en la tercera semana post-reserpina, tanto en cuanto al ratio temporal en las ventanas de 10 s, el número de regiones, y su duración. La fragmentación de la onda se redujo progresivamente. La frecuencia media de las regiones disminuyó ligeramente, siendo significativo en la tercera semana, además de aumentar la desviación estándar, correspondiendo con una desorganización de la banda.

En la banda theta, no se observaron diferencias significativas ni en el ratio temporal ocupado por la banda theta ni en la duración de las regiones detectadas, pero sí en el número de regiones (Friedman $p < 0.05$), con aumentos en los días post-reserpina, aunque este resultado no ofreció diferencias significativas en las comparaciones dos a dos. Durante los días de administración de la reserpina, sí se encontraron diferencias significativas en el grado de fragmentación de la oscilación, que disminuyó, sin alteración en los días post-reserpina. Donde sí se encontraron diferencias significativas en las semanas posteriores fue en la distribución en frecuencias, con pequeñas pero significativas reducciones en todos los periodos respecto del control y con una mayor concentración en torno a la frecuencia media en la última semana registrada.

		Theta	Sign. (2 colas)
Ratio temporal Friedman p=0,397742	control	0,668053 ± 0,045164	-
	administración	0,6845 ± 0,040540	0,084017
	1ª semana	0,662000 ± 0,044212	0,983945
	2ª semana	0,638014 ± 0,049507	0,460302
	3ª semana	0,640608 ± 0,050754	0,495521
Nº de regiones Friedman p=0,016030*	control	8,941053 ± 0,495116	-
	administración	9,113333 ± 0,437589	0,9058
	1ª semana	8,702350 ± 0,362381	0,2432
	2ª semana	9,753946 ± 0,628576	0,1914
	3ª semana	9,009047 ± 0,551621	0,7333
Duración media Friedman p=0,176719	control	1,569842 ± 0,245472	-
	administración	0,988333 ± 0,094930	0,075868
	1ª semana	1,312250 ± 0,151398	0,156906
	2ª semana	1,298822 ± 0,253304	0,155635
	3ª semana	1,299388 ± 0,235295	0,191446
Fragmentación Friedman p=0,002799**	control	0,173632 ± 0,014462	-
	administración	0,135000 ± 0,007034	0,049405*
	1ª semana	0,161300 ± 0,007922	0,5280
	2ª semana	0,155541 ± 0,016088	0,191446
	3ª semana	0,16447 ± 0,014973	0,8647
Frecuencia media Friedman p=0,002173**	control	6,906632 ± 0,047482	-
	administración	6,516389 ± 0,084350	0,002263**
	1ª semana	6,800000 ± 0,043237	0,007013**
	2ª semana	6,752763 ± 0,045152	0,003765**
	3ª semana	6,82014 ± 0,067010	0,040888*
Desv. est frecuencia Friedman p=0,141690	control	1,396684 ± 0,041417	-
	administración	1,378000 ± 0,060365	0,586174
	1ª semana	1,389150 ± 0,040891	0,375980
	2ª semana	1,392777 ± 0,043084	0,733271
	3ª semana	1,358468 ± 0,040461	0,035601*

Tabla 4.3.2.5.3. Resultados estadísticos de las características de las regiones de predominancia de theta (4-10 Hz), calculadas a partir del promedio para cada animal (n=5). Comparaciones múltiples para muestras apareadas (Friedman) y significación en comparaciones dos a dos (Wilcoxon). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. La banda theta no presentó alteración significativa de su presencia, ni en cuanto al ratio, al número de regiones ni a su duración (sí presentó una tendencia al aumento del ratio temporal durante la administración). Sin embargo, sí varió su frecuencia media, que se redujo ya en los días de administración y, aunque fue recuperándose progresivamente, no alcanzó los valores que presentaban en el periodo control.

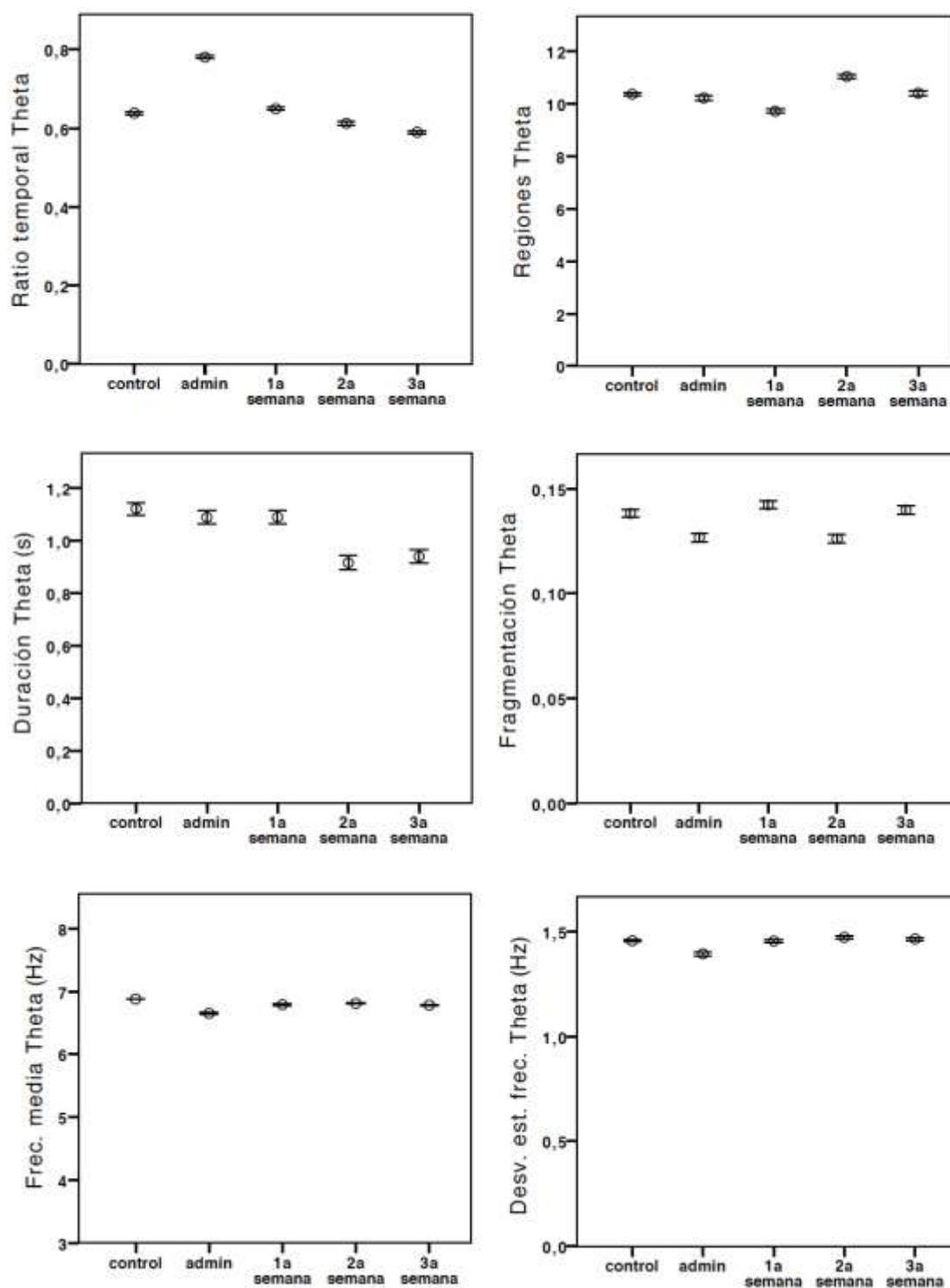


Figura 4.3.2.5.2. Evolución temporal de los las características de las regiones de theta (media \pm error estándar), analizados en el total de ventanas de 10 s ($n=76465$) mediante análisis wavelet.

En las Figuras 4.3.2.5.3., 4.3.2.5.4., y 4.3.2.5.5. se muestran ejemplos representativos de registros control, administración, y 3ª semana post-reserpina, respectivamente.

En el registro control (Figura 4.3.2.5.3) puede observarse la arquitectura normal del sueño, con alternancia entre periodos no-REM, con actividad predominante en delta y ondas lentas (regiones indicadas en negro), con gran amplitud, y periodos de REM progresivamente más largos y caracterizados por actividad theta aislada de otras frecuencias. En ambos casos, la actividad EMG es baja, mostrando atonía durante los periodos de REM.

En la Figura 4.3.2.5.4, se muestra el efecto inmediato de la administración de reserpina, caracterizado por un aumento en la proporción de theta no aislado de otras frecuencias, con menor proporción de ondas lentas y un EMG más activo.

La Figura 4.3.2.5.5 muestra un registro de LFP de hipocampo y EMG a los 19 días post-reserpina. A pesar de que la alternancia entre periodos de ondas lentas y REM se ha recuperado parcialmente, las ondas lentas muestran una frecuencia algo menor y mayor desorganización. Además, los periodos de predominancia clara de la banda theta presentan actividad también a otras frecuencias. El EMG muestra todavía picos de actividad, correspondientes a espasmos musculares.

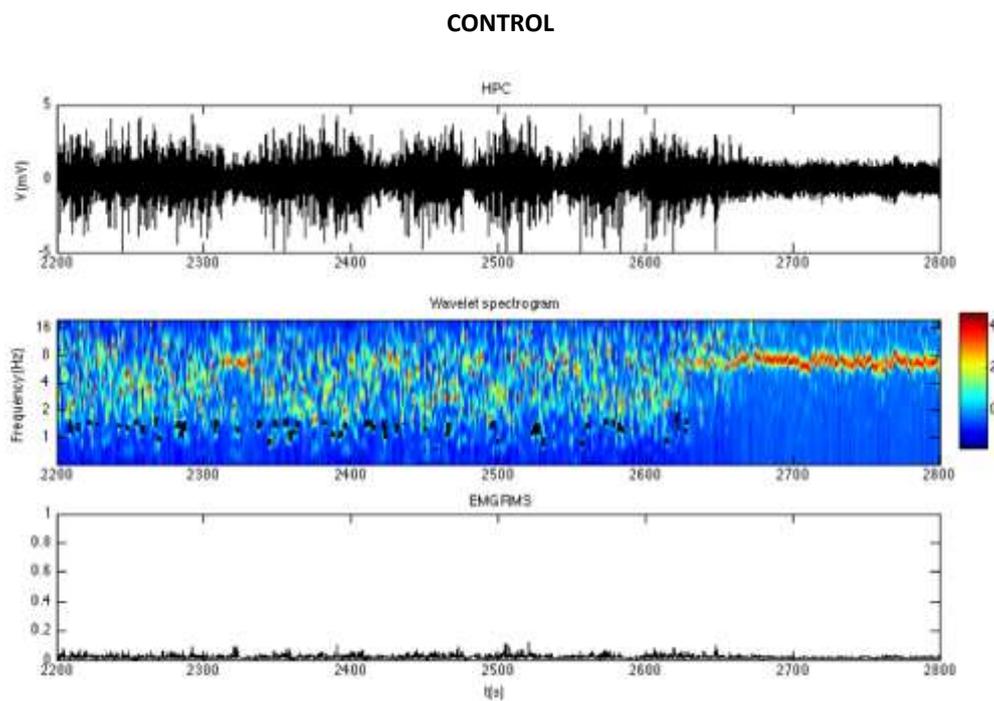


Figura 4.3.2.5.3. Caso representativo en control. Panel superior: registro crudo del LFP de hipocampo. Panel central: espectrograma wavelet de hipocampo. Panel inferior: representación de la actividad muscular mediante EMG-RMS. Puede observarse la alternancia entre sueño de ondas lentas y periodos REM caracterizados por presentar casi exclusivamente ritmo theta. La actividad muscular es de quietud, llegando a la atonía durante el sueño REM. Las ondas lentas (marcadas en negro) presentan una distribución uniforme en frecuencias.

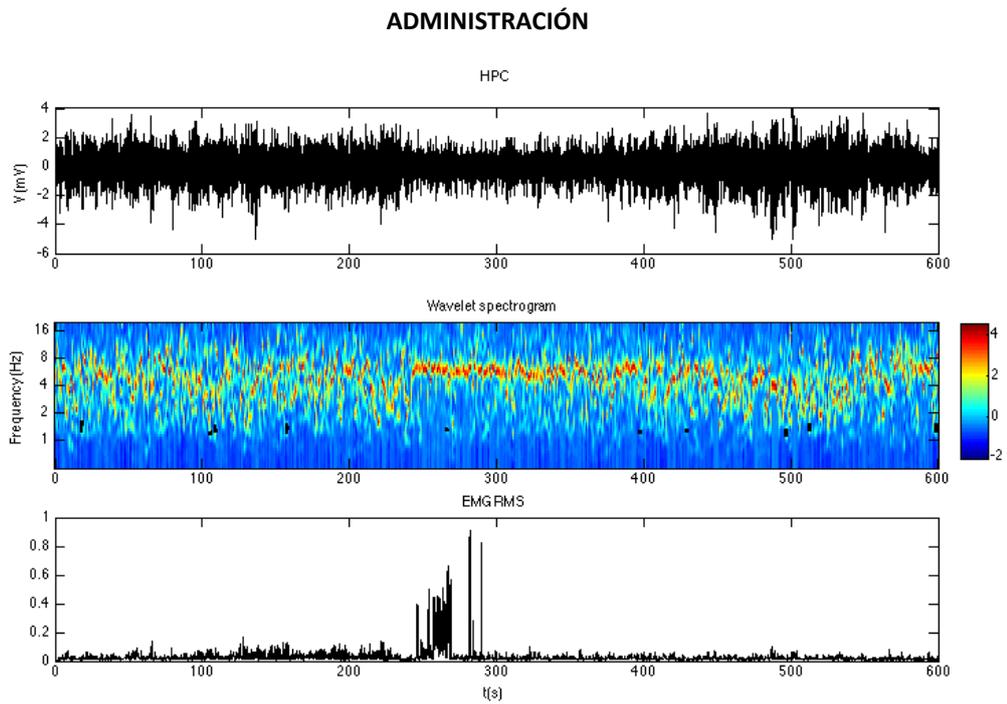


Figura 4.3.2.5.4. Caso representativo en administración. Panel superior: registro crudo del LFP de hipocampo. Panel central: espectrograma wavelet de hipocampo. Panel inferior: representación de la actividad muscular mediante EMG-RMS. La administración de reserpina provoca un aumento de actividad theta no aislada de otras frecuencias, con una reducción de ondas lentas. La actividad muscular es mayor que en el control, con picos relacionados con los espasmos musculares.

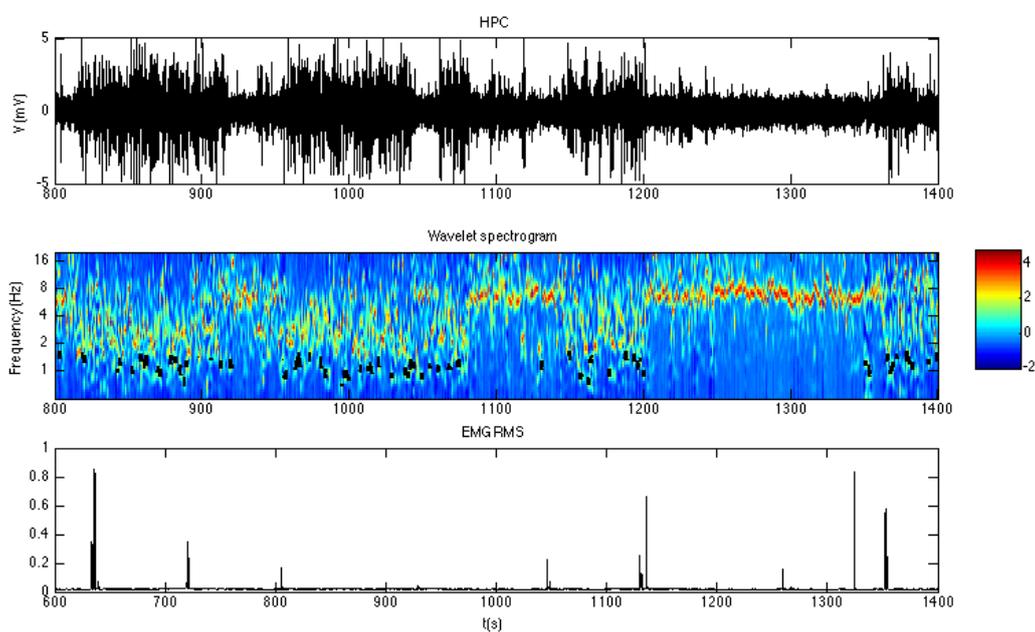
3ª SEMANA POST-RESERPINA

Figura 4.3.2.5.5. Caso representativo en tercera semana post-reserpina. Panel superior: registro crudo del LFP de hipocampo. Panel central: espectrograma wavelet de hipocampo. Panel inferior: representación de la actividad muscular mediante EMG-RMS. Puede observarse una tendencia a recuperar la arquitectura normal del sueño, con alternancias entre REM y no REM. Las ondas lentas (marcadas en negro) presentan una distribución más desorganizada en frecuencias que en el control. A diferencia del REM fisiológico, la actividad theta coexiste con otras frecuencias. En el EMG-RMS pueden observarse picos de actividad muscular, relacionados con los espasmos musculares.

La Figura 4.3.2.5.6 muestra el detalle de ventanas de 10 s de control, administración y 3ª semana post-reserpina, en el que puede observarse el aumento de actividad por debajo de 1.5 Hz y la disminución de frecuencias como efecto tardío de la reserpinización, así como la coexistencia de la oscilación theta, de una frecuencia algo menor, junto con actividad a frecuencias mayores y menores.

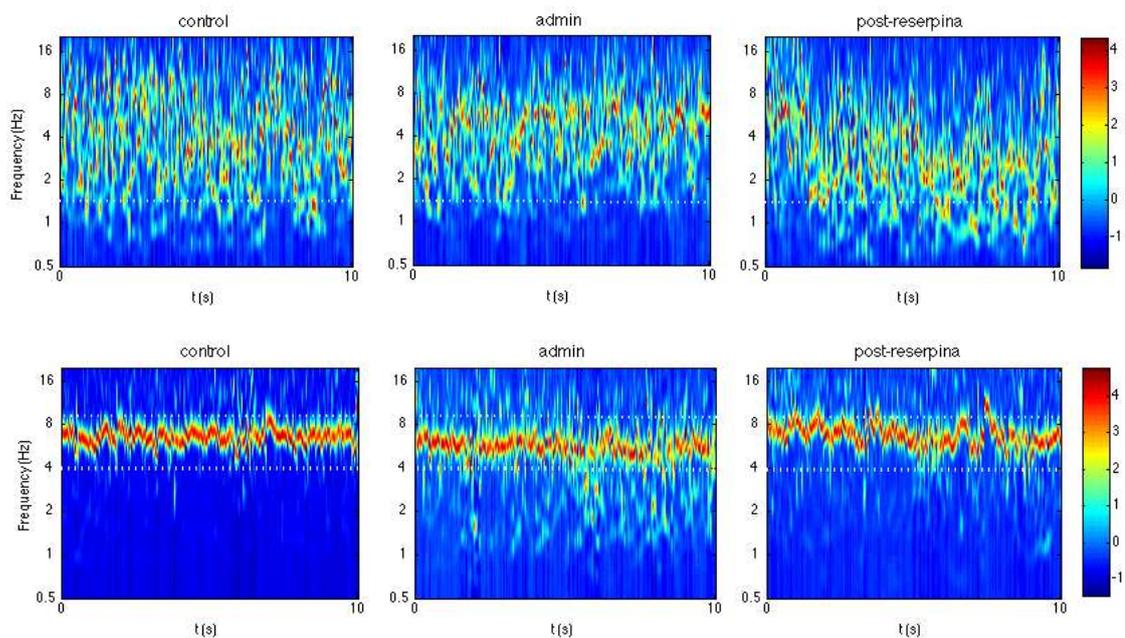


Figura 4.3.2.5.6. Detalle del espectrograma wavelet de hipocampo en 10 s de sueño de ondas lentas (arriba) y de REM (abajo) en control, administración y tercera semana post-reserpina. En control, en el sueño de ondas lentas, hay actividad desorganizada con predominio de delta (1.5 - 4Hz) y ondas lentas (0.3 - 1.5 Hz, indicado el límite por una línea blanca discontinua), y en REM se observan casi exclusivamente oscilaciones theta. Durante los días de administración, las ondas lentas disminuyen y la theta disminuye de frecuencia y se mezcla con actividad a frecuencias mayores y menores. En la tercera semana post-reserpina, aumentan las ondas lentas, por debajo de la línea discontinua, en un rango de frecuencias amplio, y la actividad theta todavía coexiste con otras oscilaciones.

4.4. RESULTADOS DE LA INMUNODETECCIÓN DE FOS

4.4.1. Núcleo del Rafe Dorsal (DR)

La tabla 4.4.1.1 muestra los principales estadísticos descriptivos que definen los datos obtenidos al contar las células Fos-positivas del Núcleo del Rafe Dorsal (DR), principal productor de serotonina del sistema nervioso central. Un análisis más detallado de los descriptivos puede verse en el Anexo VI.

	N	Media		Dev. tip.	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
Fos	50	52,88	5,198	36,757	,925	,337	,306	,662
N válido (según lista)	50							

Tabla 4.4.1.1. Estadísticos descriptivos de la muestra obtenida del conteo de Fos en el núcleo dorsal rafe. Se muestra el número de casos, la media con su error típico, la desviación típica, asimetría y curtosis.

La muestra analizada de DR presenta normalidad, medida con el estadístico *Shapiro- Wilk*, tanto para el grupo tratado con vehículo (AAG; $W=0,965$, $p>0,05$), como para el grupo tratado con una dosis aguda de reserpina de 1mg/kg (RES_AG; $W=0,893$, $p>0,05$), y el grupo tratado con 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante tres días consecutivos y perfundido a las seis horas de la tercera administración ($W= 0,925$, $p>0,05$) (Tabla 4.4.1.2).

Condición	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
AAG	,120	18	,200 [*]	,965	18	,710
Fos RES_AG	,173	15	,200 [*]	,893	15	,074
RES_6H	,164	17	,200 [*]	,925	17	,177

Tabla 4.4.1.2. Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en DR tanto en el grupo tratado con reserpina (RES) como con vehículo (AAG). El estadístico empleado es *Shapiro-Wilk* (*W*), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p>0,05$. Se halla normalidad en todos los casos. Significación $p>0,05$.

La muestra analizada no presenta homogeneidad de varianzas. Se ha utilizado el estadístico de Levene ($F= 7,880$; $p< 0,05$) (Tabla 4.4.1.3).

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Fos Basándose en la media	7,880	2	47	,001

Tabla 4.4.1.3. Prueba de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en DR. El estadístico empleado es Levene. Significación $p>0,05$.

Una vez realizado el análisis descriptivo correspondiente, y dado que contamos con tres condiciones experimentales distintas entre ellas, procedemos a realizar un análisis ANOVA de un factor. El estudio estadístico de la expresión de c-Fos mostró diferencias significativas entre los tres grupos comparados ($F= 85,331$; $p< 0.0001$) (Tabla 4.4.1.4).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	51906,940	2	25953,470	85,331	,000
Intra-grupos	14295,080	47	304,151		
Total	66202,020	49			

Tabla 4.4.1.4. Análisis ANOVA de un factor de Dorsal Rafe. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($F=85,331$; $p<0,05$). Nivel de significación $p<0,05$.

Un análisis más detallado de estos datos, empleando las pruebas *post hoc* del test, muestra que las diferencias se encuentran tanto entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con dosis aguda de reserpina de 1 mg/kg (AAG-RES_AG; $p<0,5$), entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con tres dosis de reserpina de 1 mg/kg durante tres días consecutivos (AAG-RES_6H; $p<0,05$), como en el grupo tratado con dosis aguda de reserpina respecto al tratado con tres dosis en días consecutivos (RES_AG-RES_6H; $p<0,05$). Dado que la muestra no presenta

homogeneidad de varianzas (*Levene* 7,880; $p < 0,05$), empleamos el estadístico de *Games-Howell* para las comparaciones múltiples (Tabla 4.4.1.5).

Games-Howell		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
(I) Condicion	(J) Condicion				Limite inferior	Limite superior
AAG	RES_AG	-53,356*	7,558	,000	-72,31	-34,40
	RES_6H	26,248*	4,179	,000	15,84	36,66
RES_AG	AAG	53,356*	7,558	,000	34,40	72,31
	RES_6H	79,604*	6,836	,000	61,99	97,21
RES_6H	AAG	-26,248*	4,179	,000	-36,66	-15,84
	RES_AG	-79,604*	6,836	,000	-97,21	-61,99

Tabla 4.4.1.5. Análisis Post Hoc del ANOVA de un factor para los datos obtenidos en DR. Se emplea el estadístico Games-Howell. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p < 0,05$). El nivel de significación establecido es $p < 0,05$.

A continuación se expone la representación gráfica de los datos descritos anteriormente (Figura 4.4.1.1).

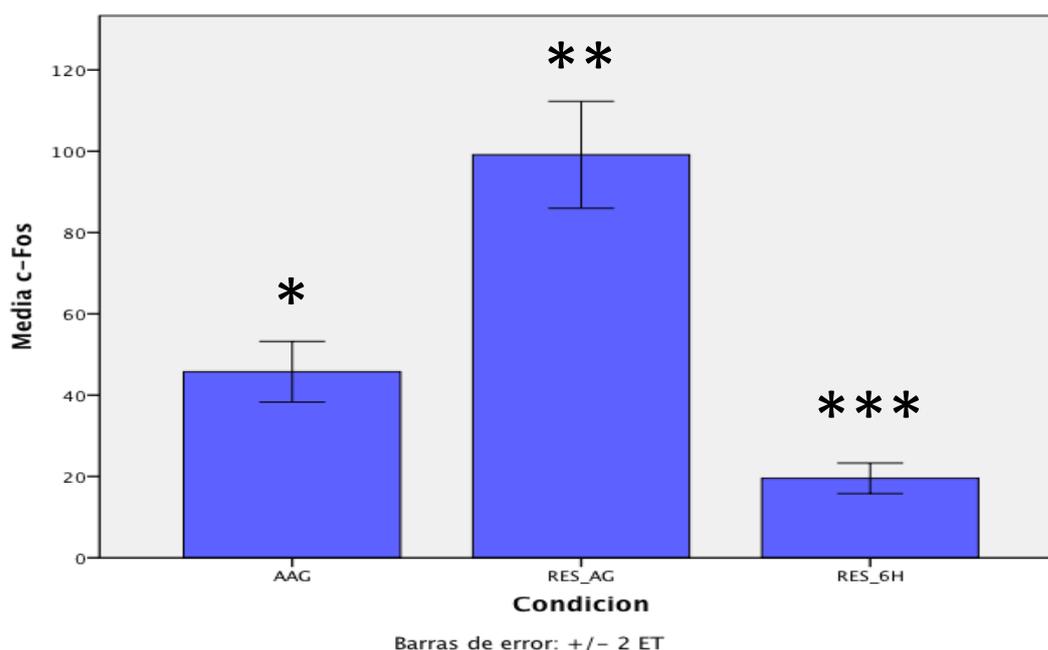


Figura 4.4.1.1. Representación gráfica de la media de células inmunopositivas c-fos en dorsal rafe. (*) La condición AAG (control) presenta una cantidad significativamente mayor de células Fos positivas en comparación con la condición RES_6H, sin embargo presenta significativamente un menor número de células en comparación con la condición RES_AG. (**) La condición RES_AG presenta una cantidad significativamente mayor de células inmunopositivas c-fos en comparación con las condiciones AAG y RES_6H. (***) La condición RES_6H presenta un número significativamente menor de células c-fos positivas que la condición AAG y que la condición RES_AG. Nivel de significación $p < 0,05$. Las barras de error representan el error típico de la media (ET) ± 2 .

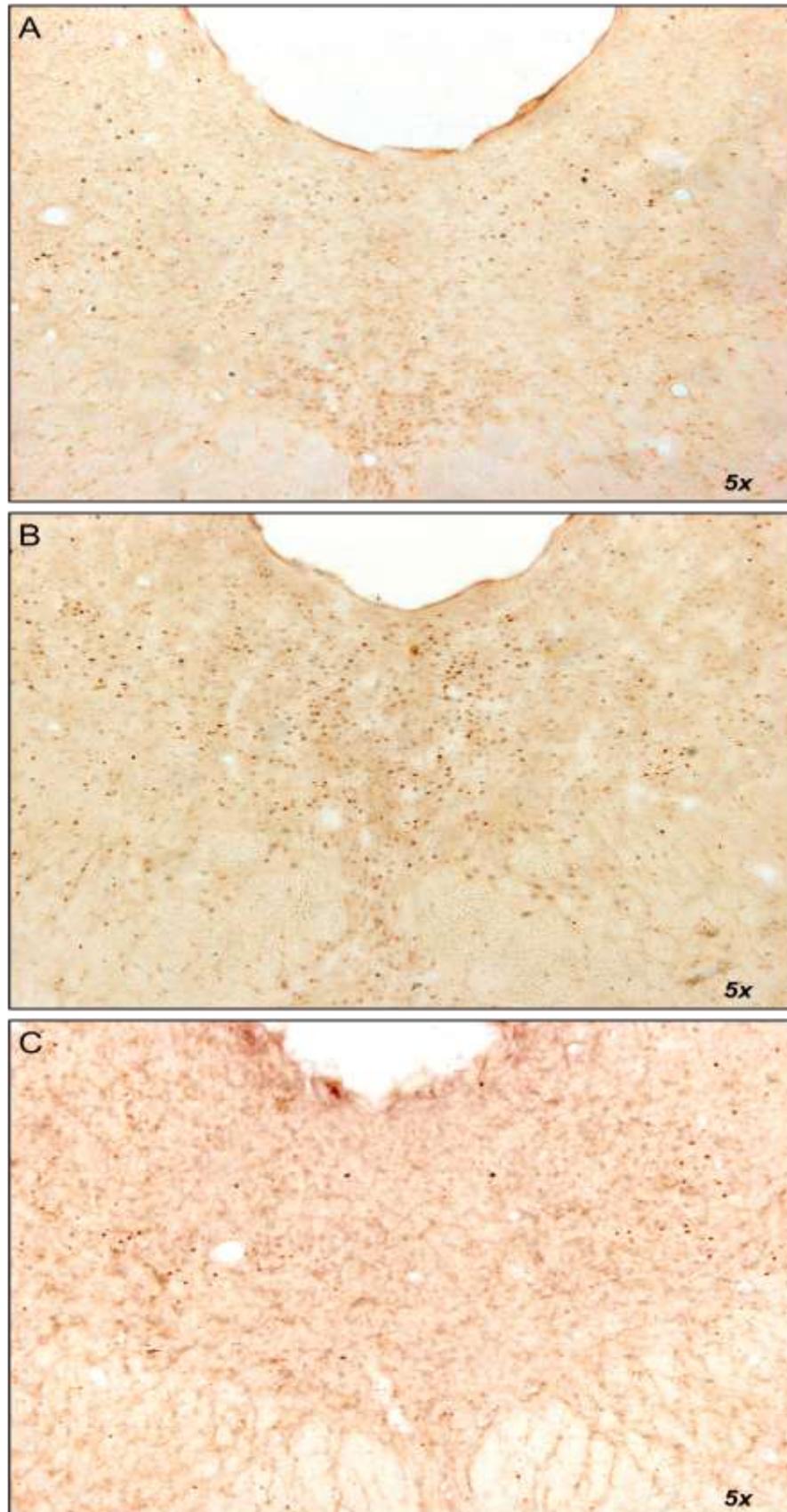


Figura 4.4.1.2. Imágenes del estudio inmunohistoquímico con marcaje de Fos en Rafe Dorsal en las distintas condiciones experimentales. (A) AAG; (B) RES_AG; (C) RES_6H.

4.4.2. Locus Coeruleus (LC)

La tabla 4.4.2.1 muestra los principales estadísticos descriptivos que definen los datos obtenidos al contar las células Fos-positivas del Locus Coeruleus (LC), principal centro productor de noradrenalina del sistema nervioso central. Un análisis más detallado de los descriptivos puede verse en el Anexo VII.

	N	Media		Desv. tip.	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
Fos	63	63,49	3,893	30,903	,558	,302	-,260	,595
N válido (según lista)	63							

Tabla 4.4.2.1. Estadísticos descriptivos de la muestra obtenida del contaje de Fos en el núcleo Locus Coeruleus. Se muestra el número de casos, la media con su error típico, la desviación típica, asimetría y curtosis.

La muestra analizada de LC presenta normalidad, medida con el estadístico *Shapiro-Wilk*, tanto para el grupo tratado con vehículo (AAG; $W=0,930$, $p>0,05$), como para el grupo tratado con una dosis aguda de reserpina de 1mg/kg (RES_AG; $W=0,926$, $p>0,05$), y el grupo tratado con 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante tres días consecutivos y perfundido a las seis horas de la tercera administración ($W= 0,965$, $p>0,05$) (Tabla 4.4.2.2).

Condicion	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Fos AAG	,153	18	,200*	,930	18	,197
RES_AG	,187	25	,024	,926	25	,069
RES_6H	,104	20	,200*	,965	20	,654

Tabla 4.4.2.2. Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en LC tanto en el grupo tratado con reserpina (RES) como con vehículo (AAG). El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p>0,05$. Se halla normalidad en todos los casos. Significación $p>0,05$.

La muestra analizada presenta homogeneidad de varianzas medida con el estadístico de Levene ($F= 2,132$; $p> 0,05$) (Tabla 4.4.2.3).

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Fos Basándose en la media	2,132	2	60	,128

Tabla 4.4.2.3. Prueba de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en DR. El estadístico empleado es Levene. Significación $p>0,05$.

Una vez realizado el análisis descriptivo correspondiente, y dado que contamos con tres condiciones experimentales distintas entre ellas, procedemos a realizar un análisis ANOVA de un factor. El estudio estadístico de la expresión de c-Fos mostró diferencias significativas entre los tres grupos comparados ($F= 34,911$; $p< 0,05$) (Tabla 4.4.2.4).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	31844,492	2	15922,246	34,911	,000
Intra-grupos	27365,254	60	456,088		
Total	59209,746	62			

Tabla 4.4.2.4. Análisis ANOVA de un factor de Locus Coeruleus. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($F=85,331$; $p<0,05$). Nivel de significación $p<0,05$.

Un análisis pormenorizado de estos datos, empleando las pruebas *post hoc* del test, muestra que las diferencias se encuentran tanto entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con dosis aguda de reserpina de 1 mg/kg (AAG-RES_AG; $p<0,5$), entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con tres dosis de reserpina de 1 mg/kg durante tres días consecutivos (AAG-RES_6H; $p<0,05$), como en el grupo tratado con dosis aguda de reserpina respecto al tratado con tres dosis en días consecutivos (RES_AG-RES_6H; $p<0,05$). Dado que la muestra presenta

homogeneidad de varianzas (*Levene* 2,132; $p > 0,05$), empleamos la corrección de *Bonferroni* para las comparaciones múltiples (Tabla 4.4.2.5).

Bonferroni		Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
(I) Condición	(J) Condición				Límite inferior	Límite superior
AAG	RES_AG	-21,104 [*]	6,602	,007	-37,36	-4,84
	RES_6H	-56,894 [*]	6,938	,000	-73,98	-39,81
RES_AG	AAG	21,104 [*]	6,602	,007	4,84	37,36
	RES_6H	-35,790 [*]	6,407	,000	-51,57	-20,01
RES_6H	AAG	56,894 [*]	6,938	,000	39,81	73,98
	RES_AG	35,790 [*]	6,407	,000	20,01	51,57

Tabla 4.4.2.5. Análisis Post Hoc del ANOVA de un factor para los datos obtenidos en LC. Se emplea el estadístico Games-Howell. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p < 0,05$). El nivel de significación establecido es $p < 0,05$.

A continuación se expone la representación gráfica de los datos descritos anteriormente (Figura 4.4.2.1).

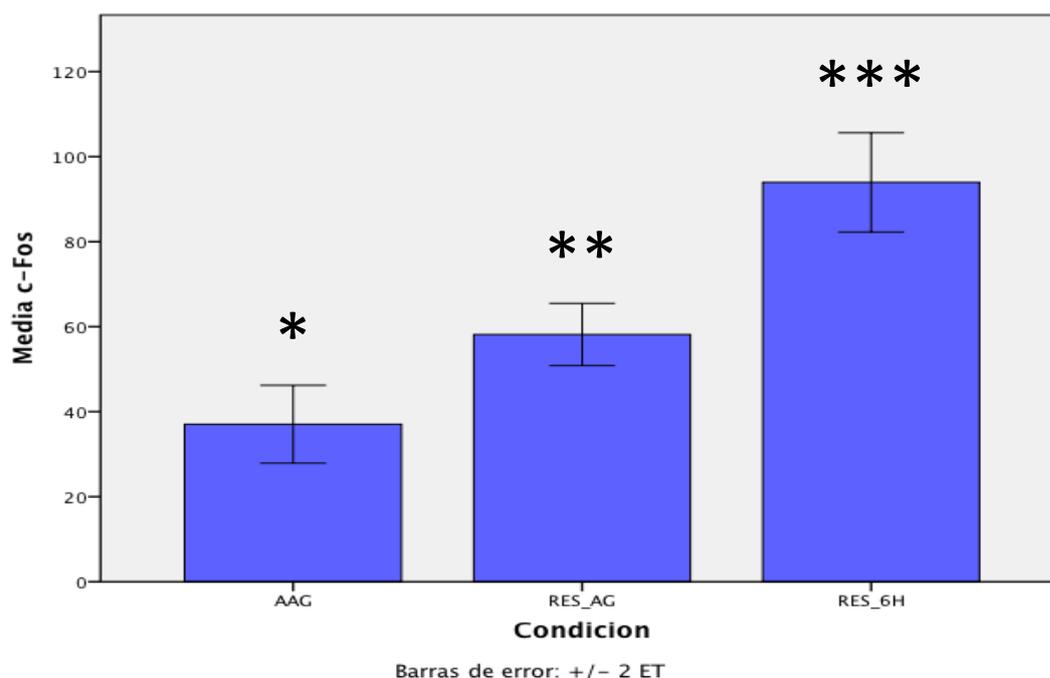


Figura 4.4.2.1. Representación gráfica de la media de células inmunopositivas c-fos en locus coeruleus. (*) La condición AAG presenta un número significativamente menor de células Fos-positivas en comparación con el resto de condiciones (RES_AG y RES_6H). (**) En la condición RES-AG, el número de células positivas es significativamente mayor que en la condición AAG pero menor que en la condición RES_6H. (***) La condición RES_6H presenta un número significativamente mayor de células c-fos positivas que la condición RES_AG y que en la condición AAG. Nivel de significación $p < 0,05$. Las barras de error representan el error típico de la media (ET) ± 2 .

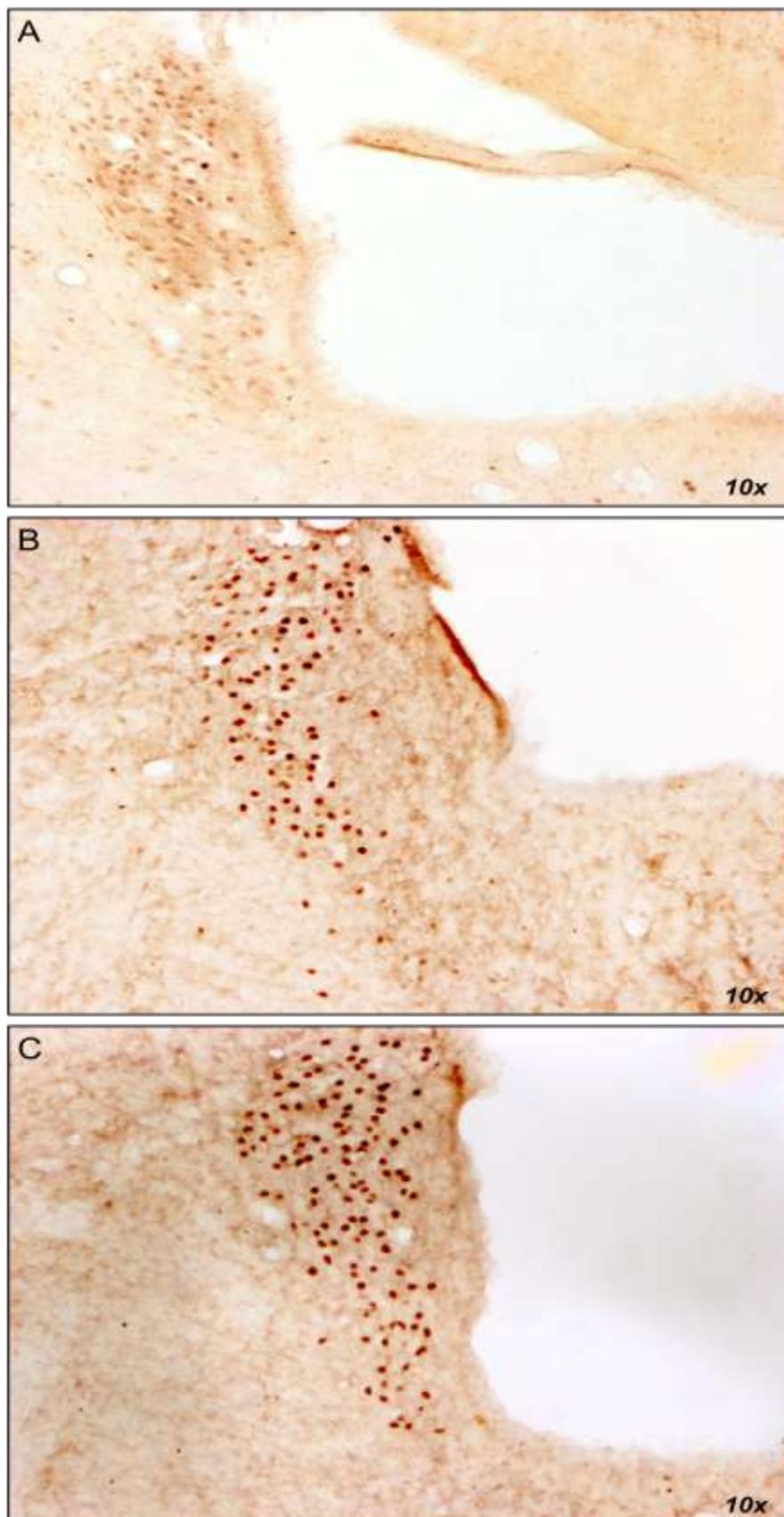


Figura 4.4.2.2. Imágenes del estudio inmunohistoquímico con marcaje de Fos en Locus Coeruleus en las distintas condiciones experimentales. (A) AAG; (B) RES_AG; (C) RES.

4.4.3. Área Tegmental Ventral (VTA)

La tabla 4.4.3.1 muestra los principales estadísticos descriptivos que definen los datos obtenidos al contar las células Fos-positivas del Área Tegmental Ventral (VTA), principal centro productor de dopamina del sistema nervioso central. Un análisis más detallado de los descriptivos puede verse en el Anexo VIII.

	N	Media		Desv. tip.	Asimetría		Curtosis	
	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Estadístico	Error típico	Estadístico	Error típico
Fos	32	76,69	11,973	67,728	,980	,414	-,796	,809
N válido (según lista)	32							

Tabla 4.4.3.1. Estadísticos descriptivos de la muestra obtenida del contaje de Fos en el Área tegmental ventral. Se muestra el número de casos, la media con su error típico, la desviación típica, asimetría y curtosis.

La muestra analizada de VTA presenta normalidad, medida con el estadístico *Shapiro- Wilk*, tanto para el grupo tratado con vehículo (AAG; $W=0,928$, $p>0,05$), como para el grupo tratado con una dosis aguda de reserpina de 1mg/kg (RES_AG; $W=0,891$, $p>0,05$), y el grupo tratado con 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante tres días consecutivos y perfundido a las seis horas de la tercera administración ($W= 0,949$, $p>0,05$) (Tabla 4.4.3.2).

Condicion	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
AAG	,185	12	,200 [*]	,928	12	,356
Fos RES_AG	,216	9	,200 [*]	,891	9	,204
RES_6H	,223	11	,134	,949	11	,630

Tabla 4.4.3.2. Pruebas de normalidad de los datos obtenidos en VTA tanto en el grupo tratado con reserpina (RES) como con vehículo (AAG). El estadístico empleado es Shapiro-Wilk (W), indicado para muestras menores de 30 casos. Significación $p>0,05$. Se halla normalidad en todos los casos. Significación $p>0,05$.

La muestra analizada no presenta homogeneidad de varianzas medida con el estadístico de Levene ($F= 5,529$; $p< 0,05$) (Tabla 4.4.3.3).

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Fos Basándose en la media	5,529	2	29	,009

Tabla 4.4.3.3. Prueba de homogeneidad de varianzas de los datos obtenidos en VTA. El estadístico empleado es Levene. Significación $p>0,05$.

Una vez realizado el análisis descriptivo correspondiente, y dado que contamos con tres condiciones experimentales distintas entre ellas, procedemos a realizar un análisis ANOVA de un factor. El estudio estadístico de la expresión de c-Fos mostró diferencias significativas entre los tres grupos comparados ($F= 220,629$; $p< 0,05$) (Tabla 4.4.3.4).

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	133429,716	2	66714,858	220,629	,000
Intra-grupos	8769,159	29	302,385		
Total	142198,875	31			

Tabla 4.4.3.4. Análisis ANOVA de un factor de VTA. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas ($F=220,629$; $p<0,05$). Nivel de significación $p<0,05$.

Un análisis pormenorizado de estos datos, empleando las pruebas *post hoc* del test, muestra que las diferencias se encuentran tanto entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con dosis aguda de reserpina de 1 mg/kg (AAG-RES_AG; $p<0,05$), entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con tres dosis de reserpina de 1 mg/kg durante tres días consecutivos (AAG-RES_6H; $p<0,05$), como en el grupo tratado con dosis aguda de reserpina respecto al tratado con tres dosis en días consecutivos (RES_AG-RES_6H; $p<0,05$). Dado que la muestra no presenta

homogeneidad de varianzas (*Levene* 5,529; $p < 005$), empleamos el estadístico de *Games- Howell* para las comparaciones múltiples (Tabla 4.4.3.5).

(I) Condicion	(J) Condicion	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
AAG	RES_AG	-135,083*	9,451	,000	-159,65	-110,52
	RES_6H	16,159*	5,853	,036	,97	31,35
RES_AG	AAG	135,083*	9,451	,000	110,52	159,65
	RES_6H	151,242*	8,148	,000	128,71	173,77
RES_6H	AAG	-16,159*	5,853	,036	-31,35	-,97
	RES_AG	-151,242*	8,148	,000	-173,77	-128,71

Tabla 4.4.3.5. Análisis Post Hoc del ANOVA de un factor para los datos obtenidos en VTA. Se emplea el estadístico Games- Howell. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p < 0,05$). El nivel de significación establecido es $p < 0,05$.

A continuación se expone la representación gráfica de los datos descritos anteriormente (Figura 4.4.3.1).

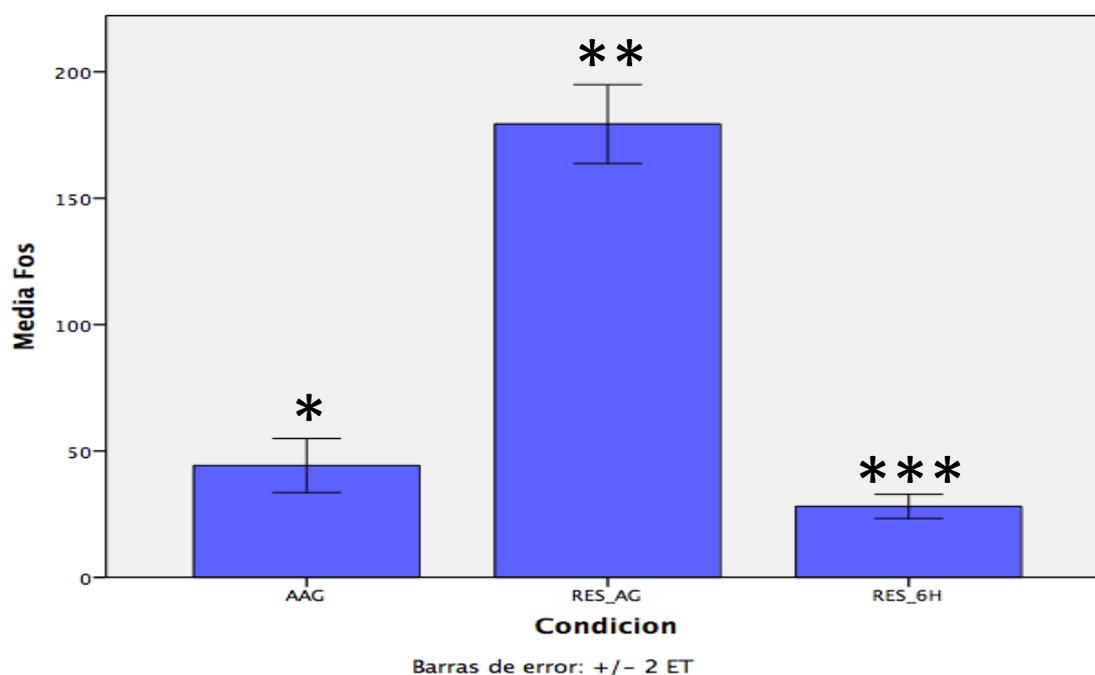


Figura 4.4.3.1. Representación gráfica de la media de células inmunopositivas *c-fos* en el área tegmental ventral. (*) La condición AAG (control) presenta una cantidad significativamente mayor de células *Fos* positivas en comparación con la condición RES_6H, sin embargo presenta significativamente un menor número de células en comparación con la condición RES_AG. (**) La condición RES_AG presenta una cantidad significativamente mayor de células inmunopositivas *c-fos* en comparación con las condiciones AAG y RES_6H. (***) La condición RES_6H presenta un número significativamente menor de células *c-fos* positivas que la condición AAG y que la condición RES_AG. Nivel de significación $p < 0,05$. Las barras de error representan el error típico de la media (ET) ± 2 .

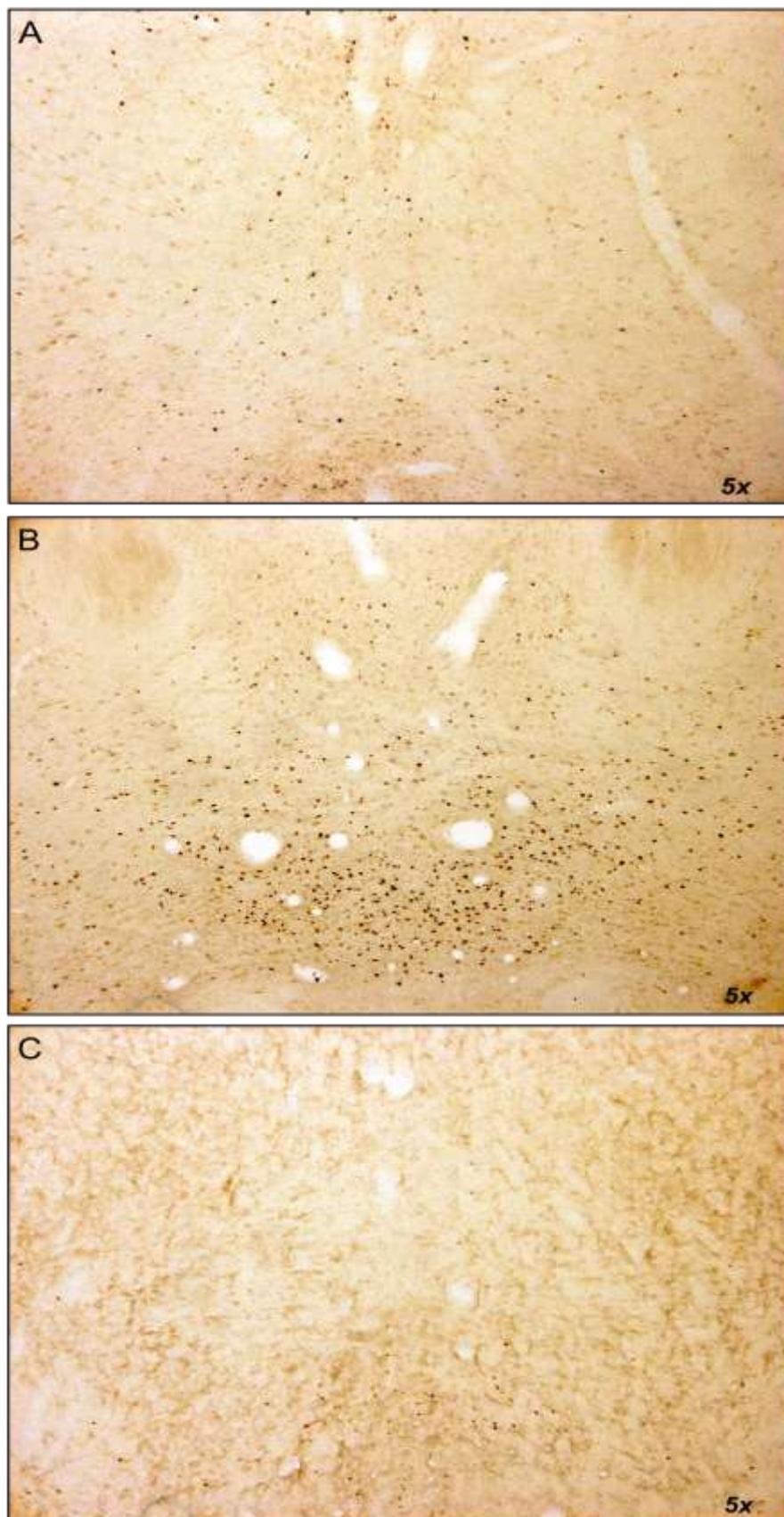


Figura 4.4.3.2. Imágenes del estudio inmunohistoquímico con marcaje de Fos en Área Tegmental Ventral en las distintas condiciones experimentales. (A) AAG; (B) RES_AG; (C) RES_6H.

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 las alteraciones del sueño y los trastornos depresivos. Afecta gravemente a la calidad de vida de los pacientes y tiene una prevalencia relativamente importante en nuestra sociedad lo que determina que tenga un elevado impacto socio-económico. El desconocimiento de la causa que la genera y los recientes cambios en los criterios diagnósticos contribuyen a que, a pesar de los avances, actualmente el tratamiento del FMS no consiga alcanzar un grado de eficacia suficientemente satisfactorio. Es necesario el establecimiento de un modelo animal que sea capaz de reproducir no sólo la sintomatología de dolor, sino también los principales síntomas comórbidos, para poder profundizar en los mecanismos subyacentes a esta patología y poder avanzar en la investigación de terapias más efectivas.

El objetivo del presente trabajo es aportar evidencias sobre la validez del modelo de FMS inducido por reserpina en rata propuesto por Nagakura et al. en 2009. Para ello, hemos analizado en este modelo la presencia de alteraciones en el procesamiento del dolor mediante pruebas conductuales de alodinia e hiperalgesia (mediante el *Electrovonfrey test* y el *Randall and Selitto test*, respectivamente), la presencia de sintomatología depresiva (mediante *Forced Swimming test* y *Novelty-Suppressed Feeding test*), y la presencia de alteraciones en la arquitectura del sueño que puedan justificar un sueño no reparador en las ratas (mediante estudios electrofisiológicos con implantación de electrodos crónicos). Asimismo, hemos analizado las modificaciones de los patrones de activación de los principales centros monoaminérgicos mediante técnicas de inmunodetección de la proteína Fos.

Los resultados obtenidos muestran que las ratas sometidas a la administración subcutánea de una dosis diaria de 1 mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos siguiendo el procedimiento de Nagakura et al. (2009), presentan, tras la implantación del modelo, hiperalgesia y alodinia, sintomatología depresiva y alteraciones del sueño. Asimismo, nuestros resultados también revelan que tras la administración aguda de una dosis única de 1 mg/kg de reserpina se produce un incremento de actividad neuronal en el Locus Coeruleus (LC), el Núcleo del Rafe Dorsal (DR) y el Área Tegmental Ventral (VTA). En cambio, la administración durante tres días consecutivos de una dosis diaria de 1 mg/kg de reserpina produce un aumento de la actividad en el LC, pero una drástica disminución de la actividad en DR y VTA. Estos resultados inmunohistoquímicos evidencian el efecto de la reserpina sobre el sistema monoaminérgico, pero se requieren más pruebas para extraer de ellos resultados concluyentes.

5.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LOS UMBRALES DE DOLOR

Nuestros resultados muestran una disminución de los umbrales de dolor tras la administración subcutánea de una dosis diaria de 1 mg/kg de reserpina durante tres días consecutivos, que se mantiene durante los siete días posteriores a la última dosis (Blasco et al., 2015).

Para el estudio de los umbrales de dolor en las ratas sometidas al modelo de FMS inducido por reserpina hemos empleado el *Electrovonfrey Test* y el *Randall and Selitto Test*, para medir 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 tanto a la manipulación del animal por parte del investigador como a los aparatos y procedimientos requeridos para las mediciones y al entorno de experimentación, 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 administración de reserpina.

Para realizar este estudio empleamos un total de 54 ratas macho, 27 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. Posteriormente al establecimiento de la línea base, administramos a las ratas 1 mg/kg de reserpina o vehículo una vez al día durante tres días consecutivos (Nagakura et al., 2009). Las medidas de dolor tras la resepinización se realizaron los días 1, 3, 5 y 7 tras la última administración de reserpina.

Nuestros resultados son congruentes con los obtenidos por el grupo de Nagakura en 2009, cuando describieron el modelo de FMS inducida por reserpina en rata. Estos autores realizaron las mediciones los días 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 tras una dosis diaria de 0.1, 0.3 ó 1 mg/kg de reserpina subcutánea, durante 3 días consecutivos, tanto en ratas macho como en ratas hembra. Sus resultados con la dosis de 1 mg/kg mostraban una disminución de los umbrales de dolor hasta el día 14 tras la última administración de reserpina en hembras y hasta el día 21 en machos, medida con el test clásico de Von Frey. En las medidas de hiperalgesia muscular, medida con el *Randay and Selitto test* sobre el músculo gastrocnemio de las ratas, la disminución de los umbrales de dolor para la dosis de 1 mg/kg se mantenía hasta el día 7 en las ratas hembra y hasta el día 10 en las ratas macho (Nagakura et al., 2009 y 2012; Oe et al., 2010).

Son numerosos los estudios que en las últimas décadas han revelado el papel de los circuitos monoaminérgicos en la modulación del dolor, tanto en el proceso de convertir un estímulo nociceptivo en una percepción consciente, como en el control

endógeno del dolor a través de sistemas descendentes inhibitorios (Almeida et al., 2004; Basbaum y Fields, 1984; Lee et al., 2011; Ohayon, 2009; Pertovaara, 2006 y 2013; Tamano et al., 2016; Todd, 2010). Tanto desde la investigación básica como desde la clínica, se han descrito los circuitos centrales involucrados en el procesamiento del dolor, lo que ha evidenciado el papel preferente de estos centros monoaminérgicos (Lee et al., 2011; Ohayon, 2009; Pertovaara, 2006 y 2013; Tamano et al., 2016; Todd, 2010).

De la misma forma, se han encontrado evidencias de la implicación de disfunciones de los sistemas monoaminérgicos en la base y mantenimiento de los síndromes de dolor crónico (Bradley, 2009; DeSantana y Sluka, 2012; Lee et al., 2011; Petersel et al., 2011; Sarzi-Puttini et al., 2011; Staud, 2011). Basados en estos hallazgos, distintos autores han creado modelos animales de disfunción de monoaminas para estudiar los mecanismos subyacentes de estos cuadros de dolor crónico (Nagakura et al., 2009; Ogino et al., 2013; Taguchi et al., 2015; Tamano 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. Al administrar la reserpina a nivel de la médula, disminuyeron sus efectos supramedulares y, de esta forma, evitaron que las ratas desarrollaran síntomas depresivos en el *Forced Swimming Test*. La dosis intratecal de reserpina de 30 nmol produjo una disminución de los niveles de serotonina y noradrenalina a nivel medular, con hiperalgesia mecánica medida con el *Electrovonfrey test* similar a la producida por la administración subcutánea de reserpina descrita por Nagakura et al en 2009. 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.

Estos autores concluyeron 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).

En 2013, Ogino y sus colaboradores, partiendo de las evidencias acumuladas hasta la actualidad acerca del papel que la disfunción del control descendente del dolor mediado por serotonina juega en la fisiopatología del FMS, emplearon el modelo de FMS inducido por reserpina en rata de Nagakura et al. (2009) para estudiar el efecto potencial de los agonistas de los receptores 5-HT_{2C} como futuro tratamiento del FMS. Estos agonistas (*lorcaserin*, *bavicaserín* y *YM348*) ya se empleaban en patologías como la obesidad o la esquizofrenia. Los autores comprobaron mediante microdiálisis bilateral del asta dorsal de la médula espinal a nivel de L1 que el día 5 posterior a la administración de la tercera dosis de reserpina los niveles de monoaminas estaban disminuidos, y obtuvieron hiperalgesia mecánica medida con el *Randall and Selitto Test* sobre el músculo gastrocnemio de las ratas en ese mismo día. Además, la administración de los agonistas de los receptores 5-HT_{2C} el día 5 post-reserpina disminuyó los síntomas de hiperalgesia mecánica, de forma dosis-dependiente. Con todo ello, los autores concluyeron que la correlación temporal entre la disminución de los niveles de monoaminas en el sistema nervioso central y los síntomas de hiperalgesia mecánica sugiere que entre los mecanismos subyacentes del dolor crónico en las ratas tratadas con reserpina se encuentra la disfunción del control descendente del dolor mediada por monoaminas. La disminución de la hiperalgesia tras la administración de los agonistas de los receptores 5-HT_{2C} sugiere que estos receptores median en el sistema central de control inhibitorio del dolor mediado por serotonina y que, por tanto, estos fármacos podrían mejorar la clínica dolorosa de los pacientes con FMS (Ogino et al., 2013).

En 2015, el grupo de Taguchi estudió el efecto que la administración subcutánea de reserpina, siguiendo el protocolo descrito por Nagakura et al. en 2009 tenía sobre el sistema nervioso periférico (SNP). Para ello examinaron los siguientes parámetros: (1) la expresión de algunos canales iónicos responsables del dolor, de la mecanotransducción, y de la generación/propagación de potenciales de acción en los ganglios de las raíces dorsales de los nervios espinales (DRG); (2) la actividad de las aferencias nociceptivas periféricas; y (3) las alteraciones en las células microgliales de la médula. Asimismo, estudiaron los umbrales de dolor en las ratas tratadas con reserpina mediante el *Electrovonfrey test*, obteniendo hiperalgesia mecánica en el tercer día posterior a la última administración de reserpina. Estos autores encontraron una disminución de la proporción de nociceptores C mecanoresponsivos, pero paradójicamente, encuentran que la magnitud de respuesta mecánica de los que quedan se encuentra aumentada. Este patrón de alteración ha sido descrito previamente en pacientes con neuropatía diabética, FMS y síndrome de piernas inquietas. La disminución de nociceptores C parece estar relacionada con la disminución de los factores neurotróficos en las neuronas sensitivas primarias. En el modelo de FMS inducido por reserpina, el descenso de estos nociceptores podría explicarse por una denervación química de los vasos sanguíneos periféricos derivada de la administración de reserpina, que alteraría el entorno trófico de los nociceptores de la piel. Además, la desaferenciación de los *inputs* nociceptivos (disminución de los nociceptores C) podría inducir una disfunción o desinhibición en el sistema de control descendente del dolor que conduciría a un aumento de la activación de las neuronas del SNC, que expresarían más dolor si la respuesta mecánica de los nociceptores C aumentara, como ocurre en este modelo (Taguchi et al., 2015). Por otro lado, observaron un incremento significativo de la expresión de mRNA de los canales iónicos ASIC-3 en DRG, que se han relacionado con la hiperalgesia mecánica en condiciones de dolor inflamatorio, no-inflamatorio y neuropático, aunque la relación causal no está clara. La administración de un antagonista de los canales iónicos ASIC-3, el *APETx2*, aumentó temporalmente los umbrales de dolor disminuidos por la reserpina, lo que sugiere que estos canales están relacionados con la hiperalgesia observada en este modelo (Taguchi et al., 2015). Por último, estos autores observaron un incremento de

activación de la microglía medular de un 54% en las ratas tratadas con reserpina respecto a las ratas control. La microglía espinal se ha demostrado que juega un papel crucial en las condiciones de dolor crónico de tipo inflamatorio o neuropático. La administración de *minociclina*, un inhibidor de la activación de la microglía medular, suprimió la hiperalgesia mecánica observada en el modelo de dolor inducido por reserpina, lo que sugiere la implicación de la activación de estas células en la hiperalgesia producida en este modelo (Taguchi et al., 2015).

Los autores concluyen que todos los cambios en el sistema nervioso periférico observados en el modelo de FMS inducido por reserpina conducen a una escalada de dolor o sensibilización. El dolor, además, puede estar amplificado por la disfunción del sistema de control descendente debido a la disminución de los inputs periféricos (desafereenciación de los nociceptores C) observados en este modelo. Estos mecanismos podrían explicar el dolor crónico generalizado de los pacientes con FMS (Taguchi et al., 2015).

Numerosos estudios realizados en las últimas décadas muestran que los pacientes con FMS presentan una alteración en el procesamiento del dolor a nivel del sistema nervioso central, lo que les causa la sintomatología de dolor generalizado, hiperalgesia y alodinia (Bradley, 2009; Ceko et al., 2012; DeSantana y Sluka, 2012; Kindler et al., 2011; Lautenbacher y Rollman, 1997; Lee et al., 2011; Meeus y Nijs, 2006; Petersel et al., 2011; Sarzi-Puttini et al., 2011; Yunus, 2007). Estas alteraciones consisten en disfunciones de las vías descendentes inhibitoras y facilitadoras del dolor, y en un fenómeno de sensibilización central (Lee et al., 2011; Petersel et al., 2011). Las vías descendentes del dolor descienden desde el tronco del encéfalo, hipotálamo y estructuras corticales, y modulan el *input* sensorial procedente de las neuronas sensitivas a nivel del asta posterior de la médula espinal (Lee et al., 2011; Pertovaara, 2013). Las vías descendentes inhibitoras realizan una función de analgesia endógena mediante la liberación de serotonina, noradrenalina y opioides, que inhiben la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato (Millan, 2002; Pertovaara, 2013). Las vías descendentes facilitadoras están menos descritas, pero en

general aumentan la sensibilidad sensorial (Lee et al., 2011; Petersel et al., 2011; Vanegas y Schaible, 2004). Por último, la sensibilización central conduce a un aumento de la excitabilidad de las neuronas del sistema nervioso central, con lo que aumenta la transmisión de las señales dolorosas. Este fenómeno de sensibilización ocurre como resultado del aumento de glutamato y sustancia P en la medula espinal, que en última instancia modula la plasticidad del sistema nervioso central produciendo los síntomas de hiperalgesia y alodinia (Lee et al., 2011; Petersel et al., 2011).

Descending Inhibitory and Facilitatory Pathways

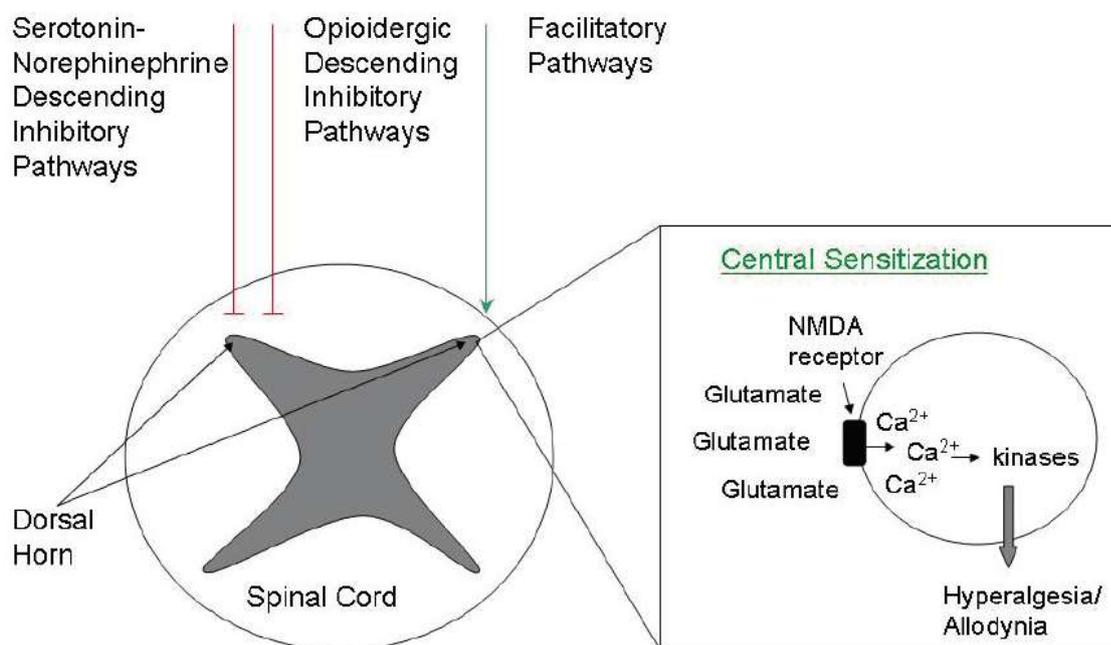


Figura 5.1.1. Esquema de los mecanismos involucrados en los sistemas descendentes inhibidores y facilitadores del dolor y en el fenómeno de sensibilización central. Tomado de Lee et al., 2011.

En pacientes con FMS se han estudiado las deficiencias en los sistemas descendentes inhibitorios del dolor mediante pruebas de modulación condicionada del dolor. En estos estudios, la aplicación de un estímulo doloroso en una parte del cuerpo (como calor, dolor por torniquete isquémico o frío) aumentó los umbrales de dolor para otros estímulos dolorosos aplicados posteriormente en otra parte del cuerpo en los sujetos control, pero no en los pacientes con FMS (Julien et al., 2005; Kosek y Hansson, 1997; Staud et al., 2001). Estos resultados evidencian un déficit en las vías descendentes de control del dolor en pacientes con FMS. Este déficit podría explicarse

por una disfunción en los sistemas serotoninérgicos y noradrenérgicos descendentes. En pacientes con FMS se ha hallado una disminución de los niveles de serotonina y de su precursor, l-triptófano, así como de su principal metabolito ácido 5-hidroxiindoleacético en líquido cefalorraquídeo. También se ha encontrado una disminución de los niveles de 3-metoxi-4-hidroxifen-etileno, el principal metabolito de la noradrenalina en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con FMS respecto a sujetos control (Legangneux et al., 2001; Parent et al., 2015; Russell et al., 1992).

Por otro lado, los hallazgos en estudios bioquímicos y de neuroimagen en pacientes con FMS sugieren que estos pacientes tienen una hiperactividad en el sistema de opioides endógenos, pero que a su vez presentan un descenso del potencial de unión de los receptores mu-opioides en el córtex cingulado, la amígdala y el núcleo accumbens, lo cual es consistente con la ineficacia de los tratamientos con opioides en estos pacientes (Baraniuk et al., 2004; Harris et al., 2007; Peng et al., 2015).

La presencia de sensibilización central en pacientes con FMS se ha estudiado principalmente mediante experimentos que comparan el fenómeno de sumación temporal de estímulos dolorosos en pacientes con FMS respecto a pacientes sanos. La sumación temporal o “segundo dolor” se basa en la evidencia de que la estimulación repetida de las fibras C tiene un efecto de sumación de los estímulos a nivel del asta posterior de la médula espinal (“windup”), por lo que el segundo estímulo se percibe más intenso aunque no haya variado la magnitud del mismo (Maletic y Raison, 2009). Este fenómeno ocurre en todos los sujetos experimentales, pero en los pacientes con FMS la magnitud del segundo estímulo es percibida mucho más intensa que en los controles (Price et al., 2002; Staud et al., 2001 y 2003). Algunos autores mantienen que este fenómeno de “windup” es el sustrato básico para la sensibilización central generalizada de los pacientes con FMS (Staud et al., 2012). Además, en los pacientes con FMS respecto a los sujetos control, se han observado elevados niveles de glutamato en la ínsula posterior, relacionada con el procesamiento del dolor, que se correlacionan con un aumento de la sensibilidad al dolor (Harris et al., 2009 y 2008).

Los estudios genéticos también aportan evidencias de la relación entre déficits en el control descendente del dolor mediado por serotonina y noradrenalina y la FMS. Se han encontrado polimorfismos en genes implicados en el metabolismo y el transporte de monoaminas, como los que expresan la catecolamina-O-metiltransferasa, el receptor de serotonina 5-hidroxitriptamina tipo 2_a, y los transportadores de serotonina, que están asociados con el diagnóstico o la severidad del FMS (Ablin y Buskila, 2015; Arnold et al., 2004; Buskila y Sarzi-Puttini, 2006; Buskila et al., 2007).

En estudios de neuroimagen, la aplicación de un dolor experimental de presión ha mostrado un aumento en la activación de la corteza somatosensorial primaria contralateral, el lóbulo parietal inferior, la ínsula, el córtex cingulado anterior y posterior, la corteza somatosensorial secundaria ipsilateral, el giro temporal superior bilateral y el cerebelo en pacientes con FMS respecto a sujetos control, lo que proporciona evidencias de un aumento en la sensibilidad al dolor a nivel central en pacientes con FMS (Gracely y Ambrose, 2011; Gracely et al., 2002; Walitt et al., 2016).

Otros estudios de neuroimagen han mostrado que los pacientes con FMS no muestran una activación de la sustancia gris periacueductal ante un estímulo experimental doloroso de calor, mientras que los sujetos sanos sí que muestran una activación de este centro tras el mismo estímulo. Dado el papel que la sustancia gris periacueductal tiene en la modulación descendente del dolor, estos resultados aportan nuevas evidencias de una disfunción de este sistema en pacientes con FMS (Cook et al., 2004; Jensen et al., 2009; Walitt et al., 2016).

Todas estas evidencias parecen indicar que los pacientes con FMS no conjugan de forma normal los sistemas inhibitorios descendentes del dolor; además, sufren un aumento de las vías descendentes de facilitación y sumación temporal ("*windup*"), lo que conduce a un aumento de la percepción del dolor a nivel del sistema nervioso central (Lee et al., 2011; Meeus y Nijs, 2006; Petersel et al., 2011; Yunus, 2007).

Las evidencias acumuladas respecto a la sintomatología de dolor en pacientes con FMS parecen indicar una fuerte relación entre los déficits de los sistemas monoaminérgicos y las alteraciones que presentan en el procesamiento del dolor a nivel del sistema nervioso central. El modelo propuesto por Nagakura *et al.*, produce una disminución de las monoaminas centrales similares a las halladas en pacientes con FMS que se traducen en signos de hiperalgesia y alodinia en las ratas tratadas con reserpina (Nagakura et al., 2009). Además, las evidencias encontradas por Taguchi et al. (2015) en este modelo muestran alteraciones en el funcionamiento de los receptores C de dolor, en los canales iónicos ASIC3 y en la microglía medular, también encontrados en pacientes con FMS o síndromes de dolor crónico generalizado, y que explican en parte el fenómeno de sensibilización central (Taguchi et al., 2015). Por otro lado, los estudios de Tamano et al. (2016) muestran la disfunción de los sistemas de analgesia endógena descendentes como consecuencia de la disminución de monoaminas producida por la administración de reserpina (Tamano et al., 2016). Asimismo, se ha encontrado que los fármacos empleados en la actualidad en la clínica de la FMS, principalmente la *pregabalina* y la *duloxetina*, son efectivos en reducir los signos de alodinia e hiperalgesia en el modelo de FMS inducido por reserpina en rata (Nagakura et al., 2009; Ogino et al., 2013).

Por todo ello, consideramos que este modelo es válido para avanzar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a las alteraciones descritas en el procesamiento del dolor en el síndrome de FMS.

5.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LA SINTOMATOLOGÍA DEPRESIVA

Nuestros resultados muestran evidencias de que las ratas sometidas al modelo de FMS inducida por reserpina presentan sintomatología depresiva tanto en el *Forced Swimming Test* como en el *Novelty-Suppressed Feeding Test*.

En el estudio mediante *Forced Swimming Test* se emplearon 15 ratas macho *Sprague-Dawley*, de las cuales 6 fueron tratadas con reserpina y 9 con vehículo. Los animales tratados con reserpina mostraron un descenso en la conducta de natación y un incremento en el tiempo que pasaron flotando inmóviles en la fase de test comparado con las ratas control. Esto apoya la teoría que defiende que la reserpina desarrolla síntomas depresivos en este modelo animal de FMS, y que además estos animales dejan de intentar escapar del cilindro de test (Antkiewicz-Michaluk et al., 2014; Arora et al., 2011; Hanff et al., 2010; Minor y Hanff, 2015; Minor et al., 2003; Nagakura et al., 2009; Wang et al., 2014). Asimismo, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en las conductas de inmovilidad y natación en la fase de pretest demuestra que el aumento de tiempo de inmovilidad observado en la fase de test fue causado por los síntomas depresivos inducidos específicamente por la reserpina, y no por la inducción de hipocinesia (Antkiewicz-Michaluk et al., 2014; Minor et al., 2003; Nagakura et al., 2009).

En nuestros experimentos con la adaptación del *Novelty-Suppressed Feeding Test* empleamos un total de 18 ratas macho *Sprague-Dawley*, de las cuales 9 fueron tratadas con reserpina y 9 con vehículo. Los animales a los que se les administró reserpina mostraron un número menor de incursiones al centro del campo abierto y tocaron y olieron un menor número de veces la comida. El periodo de latencia hasta que comieron del centro del campo por primera vez fue mayor en las ratas con condición experimental que en las ratas control. Los resultados de este estudio sugieren firmemente la presencia de síntomas depresivos cuando las ratas han sido tratadas con dosis subcutáneas continuadas de reserpina: los animales mostraron un aumento del miedo a los espacios abiertos y bien iluminados, incluso cuando su necesidad de alimentarse era exacerbada debido al período de deprivación alimentaria al que fueron sometidos antes del test (Blasco et al., 2015).

En el estudio original de Nagakura et al. de 2009, en el que describieron por primera vez la propuesta de un modelo de FMS inducida por reserpina en rata, los autores concluyeron que las ratas a las que se les había administrado durante tres días

consecutivos una dosis subcutánea diaria de reserpina de 1mg/kg mostraban sintomatología depresiva medida con el *Forced Swimming Test* (Nagakura et al., 2009). Para realizar el test, los autores colocaron en las patas delanteras de las ratas unos imanes, y fijaron una cinta metálica en el borde superior del cilindro de natación, para que los animales se sujetaran durante la conducta de inmovilidad, modificando así en cierta medida el test clásico de natación forzada. Además, para establecer la aparición de conductas depresivas tras la administración de reserpina, únicamente tuvieron en cuenta el tiempo total que los animales permanecían inmóviles durante el test, por lo que sus conclusiones respecto a que el modelo producía síntomas depresivos fueron cuestionadas (Munro, 2010).

Es por ello que en nuestro estudio hemos reforzado la robustez de las medidas de síntomas depresivos de dos formas. En primer lugar, hemos empleado el *Forced Swimming Test* adaptado por Lucki (Lucki, 1997), siguiendo rigurosamente las indicaciones publicadas por Slattery y Cryan en la revista *Nature Protocols* en 2012 (Slattery y Cryan, 2012). Por otro lado, hemos añadido el *Novelty-Suppressed Feeding Test* para corroborar las evidencias de síntomas depresivos desde otro paradigma ampliamente validado por la comunidad científica para el estudio de la sintomatología depresiva y la eficacia de tratamientos con antidepresivos crónicos (Dulawa y Hen, 2005; Iijima et al., 2012; Nam et al., 2014; Rex et al., 1998; Stedenfeld et al., 2011).

En el *Forced Swimming Test* las ratas son expuestas a una natación forzada en un cilindro lleno de agua sin posibilidad de escapar (Porsolt et al., 1977 y 1978). Este test se basa en la observación de que cuando las ratas son expuestas al agua, después de una intensa actividad de conductas de huida como nadar o escalar, muestran una conducta de inmovilidad. Esta conducta de inmovilidad se considera que refleja o bien una falta de persistencia en el comportamiento de escape después del estrés (es decir, la desesperación conductual) o el desarrollo de un comportamiento pasivo que aleja al animal de formas activas de afrontamiento del estrés (Cryan y Slattery, 2014; Cryan et al., 2005; 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 (Cryan y Slattery, 2014; Cryan et al., 2002; Lucki, 1997; Slattery y Cryan, 2012). Es por ello que Lucky et al. en 1997 modificaron 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 entre estas tres conductas: (1) 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; (2) Natación descrito como los movimientos horizontales que el animal realiza en el cilindro; y (3) Escalada, que se refiere a los movimientos verticales que el animal realiza con las patas delanteras contra la pared del cilindro (Lucki, 1997). 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). Las evidencias acumuladas a este respecto muestran que los antidepresivos catecolaminérgicos aumentan selectivamente el comportamiento de escalada, mientras que los agentes serotoninérgicos aumentan selectivamente el comportamiento natatorio (Cryan et al., 2005). Esta prueba ha demostrado ser sensible al efecto agudo de los tratamientos antidepresivos, así como a los estados depresivos inducidos por varios factores (Cryan y Slattery, 2014).

El *Novelty-Suppressed Feeding Test* (NSFT) se basa en el fenómeno de la hiponeofagia, es decir, la inhibición de la alimentación 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. Con respecto a este último punto, en este 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 período de privación de alimentos (Stedenfeld et al., 2011); y 2) se enriqueció la comida habitual de los animales (*pellets* estándar) 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 descartar animales del experimento. 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 que influyera en los resultados del NSFT.

El NSFT fue descrito inicialmente para el estudio de conductas relacionadas con la ansiedad y para evaluar los efectos de fármacos ansiolíticos, y se ha demostrado como un paradigma eficaz para el estudio de tratamientos antidepresivos crónicos en diferentes modelos de depresión en roedores (Nestler y Hyman, 2010). Por otra parte, se ha utilizado para medir los efectos de los síntomas depresivos inducidos por estrés en diversos modelos animales, tales como el tratamiento crónico con corticosterona (David et al., 2009) o el estrés leve crónico impredecible (UCMS) (Stedenfeld et al., 2011; Surget et al., 2008).

La depleción de monoaminas inducida por reserpina afecta a varias funciones que pueden sesgar los resultados obtenidos en las pruebas conductuales de depresión, a través de signos y síntomas tales como la desregulación de temperatura corporal, hipocinesia con temblores y rigidez muscular, y desregulación en la ingesta de

alimentos (Colpaert, 1987; Dulawa y Hen, 2005; Nammi et al., 2005). Estudios anteriores han demostrado que la hipotermia y la hipocinesia no están presentes el día 5 tras la administración de reserpina, ya sea administrada como una única dosis de 3 mg/kg o como tres dosis consecutivas de 1 mg/kg diario (Nagakura et al., 2009; Oe et al., 2010). Los animales, al final de la fase de recuperación, el día 5 después de la última administración de reserpina, no mostraron hipocinesia, temblor o rigidez, lo cual fue evidenciado mediante una observación directa diaria y un control del estado físico de los animales mediante el protocolo de supervisión de Morton y Griffiths (1985). Los experimentos que tuvieron lugar en nuestro laboratorio no mostraron diferencias significativas en la temperatura rectal a la hora del pretest del FST en comparación a la temperatura mostrada en el inicio del período de habituación (*resultados no mostrados*). En cuanto al NSFT, no se encontraron diferencias entre los dos grupos en referencia a la latencia en comer en la jaula, ni en la cantidad de alimentos ingeridos durante los primeros 10 minutos después del test. Esto indica que el hecho de no comer del centro del campo abierto no fue causado por una reducción del apetito, sino por el desarrollo de anhedonia y un miedo mayor a espacios novedosos y muy iluminados (Dulawa y Hen, 2005).

Todas estas observaciones, en conjunto, descartan la posible influencia de la reserpina en el apetito de la rata o en su movilidad, hechos que podrían sesgar los resultados del NSFT.

Numerosos estudios han empleado la administración de reserpina en ratas o ratones para estudiar los mecanismos neurales subyacentes a la depresión o para probar la eficacia de fármacos antidepresivos.

Los estudios del grupo de Minor emplearon dosis de 6mg/kg de reserpina intraperitoneal para estudiar la implicación de la adenosina y las citoquinas interleuquinas 1 β en el efecto depresivo de la reserpina (Minor et al., 2003; Minor y Hanff, 2015). Estos autores concluyeron que la adenosina y las interleuquinas 1 β juegan un importante papel en el desarrollo y el mantenimiento de los síntomas

depresivos inducidos por reserpina, y que los antagonistas de los receptores de adenosina A_{2A} podrían presentarse como una buena estrategia terapéutica para la depresión, especialmente para los pacientes que presentan depresión con fatiga o con disminución psicomotora (Hanff et al., 2010; Minor y Hanff, 2015).

Otros estudios han empleado el modelo de depresión inducida por reserpina en rata o en ratón para estudiar el efecto de distintas sustancias antidepresivas como el catalpol (Wang et al., 2014), la tetrahidroisoquinolina (Antkiewicz-Michaluk et al., 2014), el etazolato (Jindal et al., 2012) o la curcumina (Arora et al., 2011). En estos estudios, la administración aguda de estos fármacos antidepresivos redujo el tiempo de inmovilidad en el *Forced Swimming Test* (Antkiewicz-Michaluk et al., 2014; Arora et al., 2011; Jindal et al., 2012; Wang et al., 2014) y en el *Tail Suspension Test* (Jindal et al., 2012; Wang et al., 2014).

En 2003, Baumeister et al. publicaron un artículo que cuestionaba los efectos depresivos de la reserpina y la teoría monoaminérgica de la depresión argumentando que las evidencias que dieron origen a este “mito” resultan insuficientes (Baumeister et al., 2003). Estos autores sostenían que esta teoría era mantenida por la comunidad científica y farmacéutica porque proporcionaba un punto de partida para la investigación y desarrollo de fármacos antidepresivos sin el cual no tendrían un marco conceptual en el que basar sus investigaciones. A pesar de la rotundidad con que estos autores negaban la implicación de las monoaminas en la patogénesis de la depresión, el trabajo no ha tenido especial impacto en la investigación de esta patología, y tan solo ha sido citado 10 veces desde que fue publicado. La reserpina continúa empleándose como modelo de depresión en animales, y la teoría monoaminérgica de la depresión sigue siendo aceptada por la comunidad científica y ampliada con las nuevas evidencias en la implicación de la plasticidad sináptica producida por el déficit de monoaminas en el sistema nervioso central en la patogénesis de la depresión (Antkiewicz-Michaluk et al., 2015; Elhwuegi, 2004; Hamon y Blier, 2013; Hanff et al., 2010; Maletic y Raison, 2009; Wang et al., 2014).

La depresión es la comorbilidad psiquiátrica más frecuente en pacientes con FMS, con tasas de prevalencia que van desde 20% a 80% (Aguglia et al., 2011; Buskila y Cohen, 2007; Fietta et al., 2007; Russell, 2013). Un reciente estudio publicado por Soriano-Maldonado et al. (2015) muestra una prevalencia del 41% de síntomas de depresión severa y un 71% de síntomas de depresión moderada en mujeres con FMS en el sur de España (Soriano-Maldonado et al., 2015). Además, en este estudio se muestra que los pacientes con signos severos de depresión tenían un perfil más negativo en la calidad del sueño, la fatiga y el componente mental de la calidad de vida medido con el test *Health-Related Quality of Life (HRQoL)*.

La concurrencia entre el dolor y los síntomas depresivos es un fenómeno muy frecuente. Diversos estudios clínicos demuestran que un 30-60% de los pacientes deprimidos también sufren de una condición dolorosa, y por lo menos un porcentaje igual de las personas con dolor crónico cumplen también los criterios para un diagnóstico de trastorno del estado de ánimo (Agüera-Ortiz et al., 2011; Bair et al., 2008; Demyttenaere et al., 2007; Maletic y Raison, 2009; Torta et al., 2014).

Desde un punto de vista biopsicosocial, la interrelación entre los estados de dolor y las alteraciones en el estado de ánimo podrían explicarse por una relación de círculo vicioso (Meloni, 2015; Maletic y Raison, 2009; Torta et al., 2014). El dolor crónico afecta a la calidad del sueño y produce fatiga e incapacidad para realizar las tareas de la vida diaria, lo que desencadena ansiedad y estados de ánimo deprimidos. Asimismo, las personas con FMS suelen tener dificultades para identificar y describir sus sentimientos (alexitimia), lo que aumenta la catastrofización y el miedo al dolor, produciendo estados de ansiedad generalizada y depresión (Meloni, 2015). Por otro lado, un estado de ánimo deprimido disminuye los umbrales de dolor y amplifica la percepción del dolor, tanto a nivel emocional como cognitivo, lo que empeora la sintomatología dolorosa (Torta et al., 2014).

Además de la evidente relación biopsicosocial entre el dolor crónico y la depresión, existen evidencias neurofisiológicas que relacionan las vías patogénicas de

estas dos patologías y que explican la elevada prevalencia en que estos dos síntomas coexisten. Desde una perspectiva evolutiva, es evidente que tanto las emociones negativas como el dolor físico tienen un elevado valor de supervivencia, dado que ambos proporcionan una clara señal de que las condiciones actuales son una amenaza para la supervivencia de un organismo. Por lo tanto, no es sorprendente que las vías periféricas y centrales de la depresión y el dolor se superpongan, ni que participen en la modulación de la respuesta inmune (Maletic y Raison, 2009).

En los últimos años, numerosos estudios electrofisiológicos, genéticos, bioquímicos y de neuroimagen han acumulado evidencias de un elevado solapamiento entre los sistemas patogénicos implicados en las alteraciones del estado de ánimo y en el dolor crónico (para revisión ver Maletic y Raison, 2009).

Los estudios de neuroimagen muestran alteraciones comunes entre la depresión y el FMS en la corteza prefrontal medial, dorsolateral y lateral orbital, la ínsula, la corteza cingulada anterior, el hipocampo, el tálamo, el núcleo accumbens y la sustancia gris periacueductal (Bernik et al., 2013; Ceko et al., 2012; Del Pozo-Cruz et al., 2015; Gracely y Ambrose, 2011; Kim et al., 2016; Maletic y Raison, 2009; Walitt et al., 2016). Los estudios genéticos también apuntan a alteraciones genéticas compartidas entre estos dos trastornos, especialmente en los genes implicados en la regulación monoaminérgica, en la transmisión de péptidos, en la respuesta inflamatoria, en el ritmo circadiano y en la señalización neurotrófica, como por ejemplo polimorfismos en genes que regulan el locus promotor de transporte de la serotonina (5HTTPR), el receptor de serotonina 5HT2A, la catecol-O-metil transferasa (COMT), la monoamino oxidasa (MAO), el factor neurotrófico cerebral (BDNF), y la síntesis o actividad de CRF y glutamato (Ablin y Buskila, 2015; Arnold et al., 2004; Buskila y Cohen, 2007; Buskila y Sarzi-Puttini, 2006; Hen et al., 2006; Maletic y Raison, 2009; Park et al., 2015). Tanto en la depresión como en los trastornos de dolor crónico como el FMS se han encontrado alteraciones en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) y en el sistema nervioso simpático, derivadas de las condiciones de estrés mantenido que implican estas patologías (Becker y Schweinhardt, 2012; Maletic y

Raison, 2009). De hecho, algunos estudios consideran que la etiología del FMS deriva de alteraciones en los sistemas reguladores del estrés (Becker y Schweinhardt, 2012; Neeck, 2002), e incluso han sugerido que el FMS no es una entidad clínica propia, sino el resultado de una activación mantenida de los sistemas encargados de restablecer la homeostasis en los organismos, es decir, en los sistemas reguladores del estrés (Lyon et al., 2011). Las evidencias acumuladas sugieren que la alteración de estos sistemas está probablemente relacionada con alteraciones de las aminas biógenas en el sistema nervioso central de los pacientes con depresión y dolor crónico (Becker y Schweinhardt, 2012; Di Franco et al., 2010).

La disfunción de los sistemas monoaminérgicos es una de las evidencias más destacadas de la fisiopatología que comparten el FMS y la depresión. Tanto en pacientes con FMS como en pacientes con depresión existen alteraciones neurofisiológicas en los sistemas reguladores de dopamina, noradrenalina y serotonina, encontrándose disminuidos los niveles de estos neurotransmisores tanto en sangre como en líquido cefalorraquídeo (Becker y Schweinhardt, 2012; Chinn et al., 2016; Elhwuegi, 2004; Legangneux et al., 2001; Maletic y Raison, 2009; Nestler et al., 2002; Parent et al., 2015; Russell et al., 1992).

En vista del papel clave que tiene la disfunción de los sistemas monoaminérgicos en la patogénesis del FMS y dado que la reserpina se emplea ampliamente en la investigación básica de la depresión, consideramos que el modelo de FMS inducido por reserpina en rata (Nagakura et al., 2009) es un buen modelo para la exploración básica de los síntomas depresivos en el FMS.

5.3. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL SUEÑO

Los resultados obtenidos en el análisis del sueño de las ratas a las que se les ha administrado reserpina, siguiendo el modelo descrito por Nagakura et al. (2009), muestran alteraciones electrofisiológicas en su arquitectura y una mayor actividad

motora durante los periodos de sueño tras la administración de reserpina.

Esta parte del estudio tenía dos objetivos fundamentales: por un lado, analizar si en el modelo empleado se producían alteraciones del sueño, como ocurre en pacientes de FMS; y por otro, caracterizar la actividad electrofisiológica presente en este modelo experimental.

La búsqueda de biomarcadores en enfermedades neuropsiquiátricas resulta de gran interés en la actualidad, con el objetivo de mejorar la evaluación del grado de severidad (Neumann et al, 2014; Sun et al., 2015; Clark et al., 2016) y la predicción de la respuesta al tratamiento (Iosifescu et al., 2009). En la depresión mayor, así como en el trastorno bipolar, el estrés crónico y muchas otras alteraciones neuropsiquiátricas, la afectación cognitiva y de procesamiento emocional se relacionan con alteraciones en las oscilaciones neuronales (para revisión, Leuchter et al., 2015).

Para este estudio, se realizó una implantación crónica de electrodos de campo para el registro de la actividad oscilatoria del hipocampo y de electrodos de electromiograma (EMG) implantados en la nuca para medir la actividad motora. Las ratas fueron grabadas mientras se realizaban los registros durante cuatro horas diarias, tanto en los días previos a la administración de reserpina, durante los días de administración y en días alternos, hasta 21 días tras la administración de reserpina.

El análisis de los vídeos fue empleado para determinar los periodos de sueño y evaluar el comportamiento con medidas de actividad motora y de fragmentación. Este análisis reveló diferencias estadísticamente significativas respecto al número de sacudidas por hora, que aumentó significativamente durante el periodo de administración y durante la primera semana tras la reserpización. Este resultado indica un aumento de actividad motora durante el sueño producido por la reserpina, que influiría en la calidad del sueño (Diaz-Piedra et al., 2015; Rosenfeld et al., 2015).

Respecto al resto de parámetros, se observan tendencias a un aumento del

tiempo de sueño por hora, menos periodos de sueño y mayor duración de los mismos durante las tres semanas posteriores a la última administración de reserpina. Es probable que la ausencia de significación en estos parámetros se deba a la elevada variabilidad conductual entre los sujetos tras la reserpinización y a los pocos ejemplares analizados. Sería recomendable aumentar el número de casos para comprobar si las tendencias se confirman estadísticamente.

En los datos obtenidos mediante el análisis electrofisiológico se observa una alteración de la arquitectura del sueño tras la administración de reserpina en base a numerosas evidencias.

Por un lado, en el sueño control, como corresponde al sueño fisiológico, los animales presentaban un predominio de fases de ondas lentas (SWS) respecto a las fases identificadas como sueño REM. Durante el periodo de administración este patrón se invirtió, mostrándose un significativo predominio de fases REM respecto a SWS. En las tres semanas posteriores a la administración, la proporción de SWS se elevó de forma progresiva, superando de forma significativa los periodos de SWS observados en los registros control. Este aumento del sueño de ondas lentas podría explicarse por un mecanismo compensatorio. Por una parte, en el que el organismo necesitaría más tiempo de descanso en SWS para compensar las perturbaciones en el descanso producidas por el aumento de la actividad motora y por el estrés derivado de la reserpina, que produce un cuadro de dolor, como hemos observado en nuestro estudio; por otra, para compensar la disminución de SWS durante los días de administración. Este efecto rebote en la cantidad de sueño SWS tras la deprivación ha sido descrito como mecanismo homeostático (Ferrara et al., 1999).

El análisis también permitió observar un aumento en el número de transiciones de fase de sueño en la segunda y tercera semana tras la administración de reserpina respecto al periodo control. Esta alteración resulta relevante para nuestro estudio, dado que este fenómeno también se ha observado en pacientes con FMS (Burns et al., 2008).

La electromiografía mostró una disminución significativa en la proporción de tiempo de sueño con atonía muscular respecto a la observada en los registros control en las tres semanas posteriores a la administración de reserpina. Esto implica un aumento significativo de la actividad motora durante el sueño y que correlaciona con las medidas conductuales de sacudidas durante el sueño descritas en el estudio conductual. Este aumento de la actividad motora influye también en la detección de ventanas clasificadas como sueño REM, ya que la atonía fue uno de los criterios empleados para la clasificación dado que es una característica de este estado de sueño paradójico, junto con la predominancia de ritmo theta hipocámpico (Jouvet, 1962; Winson, 1974; Chase y Morales, 1990). Además, mientras que en el periodo control aparecía una correlación negativa entre la potencia relativa de theta y la actividad del EMG, como era esperable en casos de sueño REM fisiológico, esta correlación se perdió en la segunda semana tras la administración de la reserpina.

La pérdida de atonía durante el sueño REM se da en diferentes patologías. Estudios clínicos que hay una elevada comorbilidad entre la depresión y el síndrome de piernas inquietas en pacientes con depresión (para revisión, Picchetti y Winkelman, 2005). Este síndrome es una alteración que implica deterioro de la calidad del sueño, fatiga durante el día, una pérdida de calidad de vida y déficits atencionales, y se relaciona con una hipofunción del sistema dopaminérgico. También existe una mayor incidencia de síntomas depresivos en otras patologías del sueño, como la narcolepsia o la apnea del sueño. La pérdida de atonía durante el sueño REM también ocurre en el Parkinson (Gagnon et al., 2002), e incluso se ha considerado un indicador precoz de enfermedades neurodegenerativas (McCarter et al., 2012).

En nuestro estudio, además, en las semanas posteriores a la administración de reserpina, se observó un incremento progresivo y significativo de las ondas lentas, tanto en su potencia relativa como en el número de regiones y su duración, mientras que la potencia relativa de las *spindles* disminuyó. Éste es un hallazgo relevante, dado que la reducción de *spindles* durante el sueño NREM también ocurre en mujeres con FMS, asociada a la reducción del umbral de dolor (Landis et al., 2004).

Las ondas lentas son el principal patrón oscilatorio presente durante el sueño no REM. Durante el sueño, el cerebro no permanece silente sino que presenta fluctuaciones de su actividad eléctrica, que resultan determinantes para el procesamiento de información (Steriade et al., 1993; Mölle y Born 2011). Las ondas lentas, de frecuencias menores a 1.5 Hz, suponen la sincronización de la actividad eléctrica de grandes poblaciones de neuronas. Mediante esta coordinación, se produce la alternancia entre fases de elevada hiperpolarización o “*down states*”, con silencio neuronal, y fases de despolarización o “*up states*”, en las que se produce la reactivación de circuitos talamocorticales que han sido activados durante la vigilia, así como la interacción entre el hipocampo y el neocórtex. Estos procesos son fundamentales para la consolidación de memoria (Mednick et al., 2013) e implican, como uno de sus correlatos electrofisiológicos, la concurrencia de *spindles* con las ondas lentas (Cox et al., 2012).

El hecho de que la aparición de las ondas lentas tras la administración de reserpina no se corresponda con un incremento en las *spindles* hipocámpicas sugiere que no se están favoreciendo procesos de consolidación de memoria en el SWS, sino que principalmente están proporcionando periodos de reposo neuronal (Steriade et al., 1993; VanSomeren et al., 2011).

Vyazovskiy y Harris (2013) propusieron que el papel de las ondas lentas sobre las neuronas individuales, a través de los estados de hiperpolarización, es permitir el descanso neuronal y su recuperación a través de una reducción de inputs sinápticos que se corresponde con el cese de estímulos sensoriales y con inmovilidad. En el caso de las ratas reserpinizadas, en las que el sueño, tanto REM como SWS, presenta una actividad muscular mayor a la fisiológica, cabe pensar que el predominio de ondas lentas con predominio de fases hiperpolarizantes debe aumentar con un objetivo de compensar el exceso de actividad y favorecer el descanso neuronal. La verificación de esta hipótesis requeriría, en el futuro, de un análisis más detallado de las ondas lentas, en términos de predominio de *up* y *down states* y de sincronización con oscilaciones de mayor frecuencia, como *spindles* y *ripples*, así como de actividad neuronal unitaria.

Una de las alteraciones más destacables del análisis espectral del SWS es la presencia de incursiones de ondas rápidas (7-8 Hz) durante los periodos de sueño de ondas lentas. Este hallazgo se correlaciona parcialmente con las incursiones de ondas alpha en el sueño de ondas lentas observadas en los estudios polisomnográficos de pacientes con FMS. Estas incursiones de ondas rápidas en el sueño de ondas lentas representan la característica más destacable de las alteraciones del sueño en estos pacientes con FMS (Moldofsky, 2008; Roizemblatt et al., 2001; Rosenfeld et al., 2015; Vijayan et al., 2015).

Esta alteración parece interferir en la capacidad de recuperación que permite el sueño de ondas lentas. De acuerdo con el trabajo de Moldofsky (2008), además, los umbrales de dolor por presión disminuyeron de forma correlacionada con la intrusión de actividad alpha. Sin embargo, cabe señalar que esta coexistencia de alpha con ondas lentas no resulta exclusiva del FMS, sino que ha sido descrita en otras alteraciones, como es el caso de la depresión mayor, en los que se relaciona con una mayor somnolencia durante el día (Jaimchariyatam et al., 2011).

Respecto a las ondas theta, características del sueño REM, no se observaron diferencias en su potencia relativa respecto a los registros control tras la administración de reserpina, salvo tendencias estadísticas al aumento en el ratio temporal y a la duración de las regiones, con un descenso en la potencia en la tercera semana. Cabe pensar que estos resultados se deben a la elevada variabilidad, producida por el reducido número de ejemplares, y que una muestra mayor probablemente ofrecería una reducción significativa en la banda. Sí se observó una mayor continuidad, expresada como una reducción de la fragmentación, en la banda theta durante los días de administración, sin diferencias significativas en las semanas posteriores.

Los efectos observados en los días de administración sobre el ritmo theta bien pueden deberse a la depleción de serotonina en el núcleo del rafe mediano, principal inhibidor de la oscilación (Assaf y Miller, 1978). Este núcleo proyecta sobre estructuras

clave en el circuito de generación y modulación del ritmo theta, incluyendo al septum medial /banda diagonal de Broca y el propio hipocampo (Acsady et al., 1996; Vertes et al., 1999) y su lesión o inhibición origina la aparición de theta persistente (Maru et al., 1979; Kinney et al., 1995). Por su parte, la disminución de onda lenta en esos días puede deberse a la depleción en el rafe dorsal, cuya actividad es necesaria para que la corteza prefrontal genere esta oscilación (para revisión, Puig y Gullledge, 2011). La reversión de estos efectos en las semanas posteriores puede ser debida a la recuperación progresiva de las monoaminas y a mecanismos homeostáticos que compensen la deprivación de sueño NREM.

En la banda theta, además, se produjo una disminución significativa de la frecuencia de esta banda desde los días de administración. La frecuencia comenzó durante los días de administración, sin llegar a normalizarse por completo en las semanas posteriores. Esta reducción de frecuencias podría explicarse por la disminución de monoaminas causada por la reserpina, ya que está descrito que el theta de frecuencias más altas está regulado por el sistema monoaminérgico, mientras que el theta de frecuencias más bajas se encuentra bajo el control de la acetilcolina (Ach) (Garzón et al., 1998; Reinoso-Suárez et al., 2011).

Las alteraciones del sueño y las condiciones de dolor persistente coexisten con una elevada prevalencia. De hecho, las evidencias indican una relación recíproca entre estos dos fenómenos (Finan y Smith, 2013; Frange et al., 2014). Las condiciones de dolor alteran los patrones normales de sueño, hasta el punto de que un 88% de pacientes con dolor crónico presentan alteraciones del sueño (Smith y Haythornthwaite, 2004). Por otro lado, las alteraciones del sueño aumentan las puntuaciones de dolor, y al menos un 50% de las personas con insomnio sufren de dolor crónico (Taylor et al., 2007).

En la actualidad no existe ningún estudio que haya analizado los patrones de sueño en modelos animales de FMS (Frange et al., 2014; Tomim et al., 2016). En cambio, diversos estudios con animales han establecido una relación recíproca entre

las alteraciones del sueño y el dolor (Hicks et al., 1979; Carli et al., 1987; May et al., 2005; Andersen et al., 2006; Muncey et al., 2010; Tomim et al., 2016). Concretamente, han demostrado aumentos de la actividad nociceptiva y a la percepción del dolor, con umbrales de tolerancia menores, debidos a la privación del sueño (Onen et al., 2001; Lautenbacher et al., 2006; Nascimento et al., 2007; Frange et al., 2014; Tomim et al., 2016). Por otro lado, las evidencias sugieren que el dolor persistente puede influir en los estadios del sueño, dependiendo de la intensidad del dolor y las diferentes sensibilidades al dolor de cada estadio del sueño. Los modelos animales de dolor inflamatorio, neuropático y post-operatorio demuestran cambios en la amplitud de la actividad delta y la duración del sueño de ondas lentas (1-4 Hz) (Leys et al., 2013).

Un reciente estudio de Tomim et al. (2016), ha demostrado que el efecto pronociceptivo de la privación del sueño REM (paradoxical-sleep-deprivation, PSD) en ratas está mediado por la alteración de las vías descendentes facilitadoras e inhibitoras del dolor. En este estudio los autores comprobaron que la PSD producía un efecto pronociceptivo en el procesamiento tanto de un dolor tónico (*Formalin Test*) como de un dolor fásico (*Randall and Selitto Test*). Además, la PSD disminuía el efecto antinociceptivo de la morfina inyectada en la sustancia gris periacueductal (PAG) y producía un aumento de la expresión de c-fos en la médula rostro-ventral (RVM) pero no en PAG. La PAG es el centro del sistema modulador descendente del dolor que controla la transmisión nociceptiva en la médula espinal (Pertovaara, 2013). Después de integrar los *inputs* del sistema nervioso central y periférico, proyecta hacia RVM desde donde las vías descendentes proyectan directamente al asta dorsal de la médula a través de la vía del funículo dorsolateral (DLF). Para comprobar si la pronocicepción observada tras la PSD estaba mediada por las vías descendentes facilitadoras e inhibitoras del dolor, realizaron una lesión traumática de la vía DLF a nivel de T1-T2 e inocularon en PAG agonistas y antagonistas tanto de la vía descendente facilitadora como de la inhibitora. El efecto pronociceptivo de la PSD desapareció tras la lesión de la vía DLF, y el tratamiento con agonistas y antagonistas de las vías descendentes evidenció que la PSD producía un aumento del *input* nociceptivo al inhibir la vía inhibitoria descendente e hiperactivar la vía facilitadora descendente del dolor, con

una mayor influencia de la vía facilitadora en el efecto pronociceptivo de la PSD (Tomim et al., 2016). Los pocos estudios que han estudiado los mecanismos subyacentes al efecto pronociceptivo de la PSD se han limitado a la médula espinal, y han mostrado que la PSD modula el sistema serotoninérgico, aumenta la actividad glutamatérgica y reduce la actividad GABAérgica (Frange et al., 2014; Tomim et al., 2016). En concreto, se ha sugerido que la privación del sueño REM Por otro lado, el descenso de serotonina induce insomnio e hiperalgesia tanto en humanos como en animales (Frange et al., 2014).

Los efectos de la privación sobre la nocicepción no son exclusivos de la fase REM. En general, la privación del sueño tiene efectos hiperalgésicos y, además, interfiere en los efectos analgésicos de fármacos serotoninérgicos (Lautenbacher, et al., 2005). En estudios clínicos se ha observado que también la privación específica del sueño NREM provoca dolor muscular, sin que este efecto se dé tras la privación de REM (Moldofsky et al. 1975, Moldofsky y Scarisbrick, 1976; Older et al., 1998; Drewes et al., 1998) y la privación completa también disminuye el umbral de tolerancia al dolor por presión (Onen et al., 2001). La tolerancia, en cambio, aumenta, tras periodos compensatorios de sueño de ondas lentas en fases 3 y 4. Este hecho también podría sugerir que el aumento que observamos en las ondas lentas tenga un objetivo de reducir el dolor percibido tras la administración de la reserpina.

Estas disfunciones de las vías descendentes inhibitoras y facilitadoras del dolor también se han descrito en pacientes con FMS como una de las posibles explicaciones a la sintomatología de dolor generalizado crónico que presentan (Petersel et al., 2011; Lee et al., 2011; Chinn et al., 2016). Como ya se ha mencionado anteriormente, los síntomas presentes en FMS están interrelacionados, y la presencia y severidad de una condición dolorosa crónica, una alteración en los patrones del sueño o una sintomatología depresiva se influyen negativamente de forma recíproca. Asimismo, la co-existencia de esta sintomatología podría deberse a las alteraciones del sistema monoaminérgico presentes en los pacientes con FMS (Moldofsky, 1982; Ohayon, 2009; Cordero et al., 2010; Finan y Smith, 2013).

Ya se ha mencionado en apartados anteriores la influencia de las monoaminas sobre el procesamiento del dolor y del estado de ánimo, pero también tienen un papel clave en la regulación del sueño. La serotonina y la noradrenalina influyen en el establecimiento cíclico entre la vigilia, el sueño de ondas lentas y el sueño REM. Las proyecciones noradrenérgicas y serotoninérgicas del locus coeruleus y del núcleo del rafe dorsal son reguladores clave de los patrones de disparo de las neuronas GABAérgicas del núcleo perigeniculado y de las neuronas tálamo-corticales a lo largo del ciclo sueño/vigilia (Kesic et al., 2011). Estudios con lesiones de locus coeruleus y del núcleo del rafe dorsal muestran que la disfunción de estos sistemas monoaminérgicos altera el acoplamiento tanto de las ondas lentas como de las theta durante el sueño, alterando los patrones normales tanto del SWS como del sueño REM (Kalauzi et al., 2009; Kesic et al., 2011).

Estudios polisomnográficos en pacientes con FMS muestran una alteración predominante en la arquitectura del sueño en este síndrome, la intrusión de ondas alpha (rápidas) durante el sueño de ondas lentas (delta) (Moldofsky, 2010; Roehrs et al., 2013). Esta alteración no es exclusiva de los pacientes con FMS, pero está presente en un 60% de los pacientes estudiados, frente al 25% de pacientes que lo presentan en otros tipos de insomnios (Russell, 2013). La intrusión de ondas alpha durante el sueño de ondas lentas explica en parte la presencia de sueño no reparador, y además se ha descrito en diversos estudios la relación entre esta alteración y la disminución de los umbrales de dolor, lo que influiría también en la sintomatología de dolor generalizado de los pacientes con FMS (Roizenblatt et al., 2001; Roizenblatt et al., 2011; Roehrs et al., 2013). Diversos estudios muestran que cuantas más intrusiones de ondas alpha en las fases de sueño de ondas lentas en pacientes con FMS, mayor puntuación de dolor (hipersensibilidad y/o alodinia) (Moldofsky, 1982, 2008 y 2010; Roehrs et al., 2013; Choy, 2015).

Otra alteración descrita en los pacientes con FMS y que también explica la presencia de sueño no reparador es la elevada fragmentación de los periodos de sueño. Esta fragmentación del sueño se debe principalmente a la presencia de las

ondas alfa en el sueño de ondas lentas previamente descrito y a un aumento de la actividad motora durante el sueño (Togo et al., 2010; Roizenblatt et al., 2011; Russell, 2013).

En nuestro estudio se demuestra que la administración de reserpina altera la arquitectura del sueño, disminuyendo significativamente los periodos de fase REM y aumentando los periodos de SWS en las semanas post-reserpina. También se observa un mayor número de transiciones de fases del sueño, la presencia de incursiones de ondas rápidas durante el SWS y una mayor actividad motora durante el sueño. Tras las evidencias expuestas anteriormente, nuestros hallazgos sugieren la presencia de sueño no reparador y privación inicial de sueño de ondas lentas y justifican así una influencia de las alteraciones de sueño observadas sobre el aumento de las puntuaciones de dolor encontradas en este modelo.

Por otro lado, las alteraciones descritas en el SWS también sugieren la presencia de alteraciones cognitivas en las ratas tratadas con reserpina. A pesar de que existe un significativo predominio del SWS en las semanas posteriores a la administración de reserpina, este aumento de ondas lentas no se correlaciona con un aumento en la presencia de *spindles*, lo que correlaciona con estudios en mujeres con FMS (Landis et al., 2004) e indica que el sueño observado no favorece los procesos de consolidación de la memoria. Todavía es necesario determinar mejor los patrones oscilatorios y su sincronización en el modelo de reserpización y en pacientes con FMS. Sin embargo, las alteraciones observadas podrían constituir, al menos en parte, la base de las alteraciones cognitivas que se dan con elevada frecuencia en esta enfermedad, que incluyen problemas atencionales, déficits de memoria o incapacidad para la planificación (para revisión, Glass, 2009). Sería necesario realizar un estudio más exhaustivo de las habilidades cognitivas de las ratas reserpinizadas para poder confirmar la presencia de alteraciones similares.

En conclusión, los datos obtenidos mediante el estudio del sueño de las ratas sometidas al modelo de FMS inducido por reserpina en rata evidencian la presencia de

alteraciones en los patrones de sueño como consecuencia de la disfunción monoaminérgica provocada por la administración de reserpina. Las alteraciones halladas se corresponden en parte con las descritas en los pacientes con FMS, en cuanto a una pérdida de la arquitectura normal del sueño, una mayor alternancia de las fases del sueño, incursiones de ondas de altas frecuencias en las fases de SWS, disminución en las *spindles* y un aumento de la actividad motora durante el sueño. Estos hallazgos no sólo justifican la presencia de sueño no reparador, sino que además sugieren la presencia de alteraciones cognitivas y de la consolidación de memoria, también presentes en los pacientes con FMS. En conjunto, los resultados obtenidos en el estudio de sueño apoyan la utilidad de la reserpinización como modelo experimental de FMS. Además, podrían servir como base para realizar un estudio más detallado de los patrones oscilatorios que puedan ser empleados en el diagnóstico y en la predicción de la respuesta al tratamiento, como ya ocurre en otras alteraciones neuropsiquiátricas.

5.4. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE FOS

Nuestro trabajo incluyó un estudio de la actividad neuronal medida en términos de expresión de la proteína Fos en los núcleos monoaminérgicos Núcleo del Rafe Dorsal (DR), Locus Coeruleus (LC) y Área Tegmental Ventral (VTA) (principales núcleos serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico, respectivamente), tras la administración de reserpina. Para ello, se trataron a los sujetos bien con una dosis subcutánea de reserpina aguda de 1mg/kg, o bien mediante una inyección subcutánea de 1mg/kg una vez al día durante tres días consecutivos (Nagakura et al., 2009). Los animales del grupo control recibieron el mismo volumen de vehículo (ácido acético en agua destilada) sin reserpina en una única dosis subcutánea. Los grupos tratados con dosis única fueron perfundidos a las 2 horas y 30 minutos de la administración, mientras que los animales del grupo tratado con tres dosis fueron perfundidos a las 6 horas tras la última administración. De esta manera, los grupos de estudio se nombraron de la siguiente forma: AAG, RES_AG y RES_6H.

Tras una dosis aguda de reserpina los animales mostraron un aumento de la expresión de c-fos en los 3 núcleos estudiados (DR, LC y VTA) respecto a los animales control no reserpinizados. Por otro lado, sin embargo, tras el protocolo de administración de una dosis diaria de reserpina repetida durante tres días se observó un incremento significativo en la expresión de c-fos en LC, y una severa disminución en DR y en VTA, respecto a los animales control.

La reserpina actúa bloqueando irreversiblemente el transportador de monoaminas 2 (V-MAT 2), encargado de acumular las monoaminas en vesículas de membrana, una vez sintetizadas o después de ser recaptadas desde la hendidura sináptica, a nivel del terminal sináptico de las neuronas. De esta forma, además de favorecer el transporte y liberación de las monoaminas, regula el entorno citosólico de las neuronas, protegiéndolo de las toxinas derivadas de la degradación y oxidación de las monoaminas. La reserpina inhibe de forma irreversible al transportador vesicular V-MAT 2, por lo que las monoaminas se oxidan en el citosol celular, produciendo unos desechos que tienen acción neurotóxica y pueden producir muerte neuronal (Antkiewicz-Michaluk et al., 2015; Minor y Hanff, 2015).

Es bien conocida la relación entre las neuronas noradrenérgicas de LC, las serotoninérgicas de DR, y las dopaminérgicas de VTA (Flik et al., 2015; Katz et al., 2010; Yetnikoff et al., 2014).

En condiciones fisiológicas, está descrito que VTA ejerce acciones excitatorias sobre DR a través de la activación de los receptores D_2 . A su vez, la dopamina de VTA ejerce una excitación directa de DR a través de los adrenoreceptores α_1 . El dorsal rafe ejerce inhibición directa sobre VTA por medio de la activación de los receptores $5-HT_{2C}$, e indirecta sobre LC a través de la activación de interneuronas gabérgicas por los receptores $5-HT_{2A}$. También se ha descrito una acción inhibitoria de LC sobre VTA, y existen evidencias que sugieren que las vías dopaminérgicas descendentes inhiben la actividad de las neuronas noradrenérgicas de LC a través de los receptores D_2 y los adrenérgicos α_2 (Flik et al., 2015; Katz et al., 2010; Yetnikoff et al., 2014).

Hasta el momento, el único estudio que ha tratado de caracterizar el comportamiento del cerebro de rata mediante inmunodetección de Fos tras someterlas a un tratamiento con reserpina ha sido el de Fritschy et al. en 1991 (Fritschy et al., 1991). En este estudio se compararon el grupo tratado con una inyección de salino (0,5 ml) con el grupo tratado con una única inyección de reserpina (5mg/kg).

Una, dos, seis, ocho, y veinticuatro horas después del tratamiento, las ratas fueron perfundidas. Al finalizar la perfusión, el cerebro fue extraído y fijado en la misma solución fijadora. Posteriormente se llevó a cabo una doble inmunofluorescencia con anticuerpos para Fos y para tirosin hidroxilasa (TH) con el fin de identificar qué neuronas catecolaminérgicas presentaban Fos tras el tratamiento con reserpina.

Los resultados de este estudio mostraron que tras la administración de una única inyección de reserpina de 5mg/kg, numerosos núcleos en varias áreas del cerebro presentaban un intenso marcaje de Fos. Tras tres horas de la administración de reserpina la mayoría de las neuronas presentes en el LC aparecieron fuertemente marcadas; también se detectó presencia de marcaje en DR. Este estudio no incluyó VTA.

En general, los resultados obtenidos por Fritschy et al. (1991) mostraron que tras una dosis aguda de reserpina el marcaje de Fos en la mayoría de los núcleos estudiados era mayor que en las ratas control (tratadas con salino). Estos resultados coinciden parcialmente con los nuestros, ya que tanto en el LC como en DR (y en nuestro caso también en VTA) observamos un incremento de Fos tras una dosis aguda de reserpina, en comparación al grupo control.

En nuestro estudio, la administración aguda de reserpina produjo un aumento de la actividad en los tres núcleos seleccionados. Esto podría ser consecuencia de un aumento en la síntesis de noradrenalina, serotonina y dopamina: debido a la incapacidad de las vesículas para almacenar y liberar estos neurotransmisores a la

hendidura sináptica como consecuencia de la administración de reserpina, los sistemas noradrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos quedarían parcialmente vacíos de estos neurotransmisores, lo que aumentaría la demanda y los mecanismos de *feedback* activarían la producción de los mismos, reflejándose en un aumento de la actividad de la célula. Por otro lado, el aumento de la presencia de estas monoaminas en el citosol celular debido a la rotura de las vesículas de almacenamiento también activaría la síntesis de la encima degradadora MAO, lo que también se reflejaría en un aumento de la actividad celular (Antkiewicz-Michaluk et al., 2015; Minor y Hanff, 2015).

En un estudio electrofisiológico parecido, Katz et al. (2010) también comprobaron que la administración de una dosis aguda de reserpina producía un aumento de la actividad del DR como consecuencia de una disminución de la disponibilidad de 5-HT. Dicha explicación se veía reforzada por el hecho de que el *escitalopram*, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (ISRS), producía una disminución en la actividad de DR al aumentar los niveles de 5-HT (Katz et al., 2010). En el mismo estudio, la administración de *nomifensina*, un inhibidor selectivo de la recaptación de dopamina y noradrenalina, disminuyó la actividad electrofisiológica de VTA y LC al aumentar los niveles de dopamina y noradrenalina, respectivamente, mientras que la de DR aumentó, ya que en este caso los niveles de serotonina no aumentaron (Katz et al., 2010).

Por lo que respecta a los resultados obtenidos a las 6 horas de la tercera administración de reserpina, el incremento de actividad se mantiene en LC pero se invierte en DR y en VTA, hasta alcanzar valores inferiores a los obtenidos en el grupo control.

El aumento de la actividad de LC es directamente proporcional a la disminución de las monoaminas en general, y de la noradrenalina en particular. La vía noradrenérgica del LC ejerce una gran influencia en los circuitos neuronales encargados de la vigilia activa y procesos cognitivos dependientes del estado de vigilia.

En primer lugar, este sistema 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 (por ejemplo, la vigilia). En segundo lugar, en el estado de vigilia, la noradrenalina mejora y/o modula la recolección y procesamiento de la información sensorial saliente a través de acciones sobre la percepción sensorial, la memoria, la atención y los procesos motores (Berridge y Waterhouse, 2003; Bouret y Sara, 2005; Samuels y Szabadi, 2008). Quizás debido a su relación con los circuitos neurales encargados de aquellas actividades que requieren una activación continua, como la vigilia o la percepción sensorial, los circuitos dependientes de la noradrenalina de LC necesitan demandar continuamente noradrenalina, lo que provoca que cuanto menos noradrenalina exista, más necesaria sea su fabricación. Esto explicaría que en el caso de la administración repetida, al haber una mayor depleción se produzca una mayor activación.

El descenso de la actividad de DR observado tras las 6 horas de la tercera administración podría ser debido a la disminución de noradrenalina y dopamina, ya que dichos neurotransmisores presentan, en condiciones fisiológicas, un efecto excitador sobre este núcleo, de modo que si estos disminuyen la actividad de DR cae a límites inferiores (Mansari et al., 2010).

El descenso en la actividad de VTA a las 6 horas de la tercera administración de reserpina podría explicarse por su relación con el Núcleo Accumbens. El circuito entre el Estriado Ventral y el Núcleo Accumbens es un componente clave en la respuesta de estrés ante el dolor y en el sistema de analgesia. El Núcleo Accumbens recibe información cognitiva de la corteza prefrontal, señales emocionales relevantes de la amígdala, e información contextual del hipocampo (Goto y Grace, 2005). La retroalimentación de las aferencias del Núcleo Accumbens tiene un papel clave en la modulación de la liberación de dopamina en VTA, y juega un papel importante en el equilibrio entre la actividad dopaminérgica mesocortical y mesolímbica (Wood et al., 2007a). La excesiva activación de la amígdala y diversas estructuras corticales como consecuencia del estrés crónico, el dolor o los síntomas depresivos, observados tras la

administración de 1 mg/kg durante tres días consecutivos en nuestro estudio, más la depleción dopaminérgica en el Núcleo Accumbens, podrían explicar la disminución en la actividad de VTA que observamos en nuestros resultados (Drevets et al., 2008; Epstein, 2006; Goto y Grace, 2005; Maletic y Raison, 2009; Wood et al., 2007a y 2007b).

Los resultados de nuestro estudio muestran cambios en el patrón de activación de LC, DR y VTA como consecuencia de la administración de reserpina. Los cambios en los patrones son diferentes según si se administra una dosis aguda de 1 mg/kg o una dosis diaria de 1 mg/kg repetida durante tres días consecutivos. A pesar de la evidencia del efecto central de la reserpina sobre las monoaminas, no podemos establecer una relación directa entre estos cambios de actividad neuronal y las alteraciones conductuales observadas en nuestro trabajo, debido a las limitaciones de esta técnica.

5.5. CONSIDERACIONES FINALES

Tras el análisis de los todos resultados obtenidos, consideramos válido el modelo de FMS inducido por reserpina en rata propuesto por Nagakura et al. en 2009. El modelo reproduce al menos tres de los síntomas más relevantes del FMS: dolor, síntomas depresivos y alteraciones del sueño. Asimismo, provoca cambios en la actividad de 3 de los principales núcleos de los sistemas monoaminérgicos (serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico), directamente relacionados con la regulación de estos síntomas.

El presente estudio nos acerca un poco más al conocimiento del FMS y su posible etiopatogenia, pero sin duda y aún más interesante, nos ha abierto la puerta a nuevas preguntas que nos suscitan a seguir investigando en esta línea.

Una de las primeras líneas que vamos a investigar es la caracterización neuroquímica de los centros monoaminérgicos que han modificado su patrón de

activación tras la administración de reserpina, tanto en dosis aguda como en dosis repetida. Es necesario conocer la naturaleza de las células que han resultado Fos-positivas en el análisis inmunohistoquímico para conocer el significado de esta activación, y analizar las consecuencias de su activación o inhibición. Es por ello que empleando técnicas de doble marcaje inmunohistoquímico mediante fluorescencia podríamos comprobar la naturaleza neuroquímica de las células Fos-positivas. No podemos ignorar que aunque la población principal de neuronas en DR, LC y VTA sea serotoninérgica, noradrenérgica o dopaminérgica, respectivamente, existen otras poblaciones neuronales dentro de estos núcleos, como por ejemplo la de células gabaérgicas, que podrían ser las que modificasen su patrón de activación tras la administración de reserpina y las responsables del marcaje de Fos.

Sería un estudio muy interesante ya que la principal limitación de la detección inmunohistoquímica de Fos radica en que únicamente proporciona información sobre si un núcleo está activo o no, pero no indica los niveles de monoaminas presentes en cada uno de los núcleos ni aporta información sobre qué tipo de células están siendo activadas (Kovács et al., 2008).

Por ello, sería también un complemento perfecto al presente trabajo realizar pruebas de microdiálisis in vivo para observar in situ las fluctuaciones de neurotransmisores derivadas de la administración de reserpina. La microdiálisis se utiliza en la actualidad como técnica para la monitorización de la bioquímica tisular de cualquier tejido, incluido el cerebral. La ampliación de este trabajo con dicha técnica permitiría documentar los cambios metabólicos regionales que ocurren en el cerebro de las ratas tratadas con reserpina y compararlo con el grupo control, con el fin de aumentar nuestro conocimiento sobre el comportamiento del cerebro de estas ratas, y determinar la concentración de neurotransmisores en las diferentes áreas del cerebro (Bourne 2003; Brunner y Langer, 2006; Engstrom et al, 2005; Hillered et al, 2005; Tisdall y Smith, 2006; Ungerstedt y Rostami, 2004).

Por otro lado, también 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 información a DR, LC y VTA con el estado de mayor o menor activación de estos 3 núcleos, y también nos ayudaría a determinar por qué los núcleos monoaminérgicos estudiados se activan de distinta forma según si se trata de dosis aguda o repetida, y a explicar su diferente comportamiento.

Otro aspecto que consideramos necesario aclarar es el motivo por el que nuestro estudio sólo ha incluido ratas macho.

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, ya que el FMS se ha descrito clásicamente como una patología predominante en mujeres. Sin embargo, las recientes evidencias muestran que empleando los nuevos criterios diagnósticos de FMS, las diferencias en la prevalencia entre hombres y mujeres no es tan pronunciada (Jones et al., 2015).

En cualquier caso, aunque el FMS es una patología predominante en mujeres, no debemos olvidar que también hay un porcentaje de hombres afectados por esta enfermedad y los síntomas que presentan no difieren de los encontrados en mujeres (Wolfe et al., 2013).

Asimismo, 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 menstruales ejercen sobre estos sistemas en las hembras (Cryan y Slattery, 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 tests 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).

Por ello, con el objetivo de validar el modelo de FMS inducido por reserpina en rata, hemos decidido usar el modelo en machos por ser más estable y menos susceptible de alteraciones hormonales.

Nagakura et al. (2009) no encontraron diferencias significativas entre ratas macho y hembra en cuanto a la sensibilidad al dolor en su modelo. No obstante, en la metodología no se especificaba 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 menstrual de las hembras.

En cualquier caso, el uso de ratas hembra es un objetivo que tenemos en cuenta en nuestro laboratorio para futuros estudios de este modelo, ya que es necesario aumentar nuestro conocimiento sobre el FMS desde todos los puntos de vista posibles.

Otra de las líneas de investigación que abre el hecho de disponer de un modelo animal válido de FMS es poder comprobar el grado de eficacia de los fármacos que actualmente se emplean en el tratamiento del FMS (*duloxetina* y *pregabalina*), o incluso, de los nuevos fármacos que pudieran indicarse en un futuro. Bastaría comprobar si estos fármacos, administrados de forma aislada o combinada, u otros nuevos, mejoran o no la sintomatología reproducida por el modelo validado en este trabajo. Y en caso afirmativo, en qué grado.

Hemos de reconocer, sin embargo, que una de las líneas de investigación más inesperada que nos ha abierto el estudio electrofisiológico de los patrones de sueño de las ratas sometidas al tratamiento con reserpina, es la posibilidad de obtener en este modelo alteraciones cognitivas y de la consolidación de la memoria, otro de los síntomas frecuentes en el FMS. Para ello, sería necesario analizar con más detenimiento y descomponer los patrones de *spindles* observadas en el SWS, para determinar y cuantificar los periodos *up states* y *down states* propios de las *spindles*.

Además, sería necesario comprobar mediante pruebas conductuales de memoria y aprendizaje si las ratas presentan alteraciones de estas funciones tras la administración de reserpina.

El FMS es una enfermedad con un nivel de prevalencia en nuestro entorno y un grado de afectación de la calidad de vida de quienes la sufren que justifica sobradamente cualquier esfuerzo que la comunidad científica pueda hacer para avanzar en el conocimiento de su etiopatogenia.

A fecha de hoy, sigue siendo un síndrome de etiología desconocida lo que condiciona no sólo el disponer de un tratamiento eficaz y específico, sino incluso su propio diagnóstico.

Para cualquier enfermedad, disponer de un modelo animal válido capaz de reproducirla supone un salto de calidad enorme que facilita y acelera los avances científicos en su ámbito de actuación.

El modelo validado en el presente estudio, no sólo abre las puertas al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del FMS, sino que además ofrece datos sólidos acerca de su posible mecanismo etiopatogénico.

06

CONCLUSIONES

1. El modelo de síndrome de fibromialgia inducido por reserpina en rata reproduce síntomas dolorosos (alodinia e hiperalgesia) compatibles con las alteraciones en el procesamiento del dolor presentes en el síndrome de fibromialgia en el ser humano.
2. El modelo de síndrome de fibromialgia inducido por reserpina en rata reproduce síntomas depresivos compatibles con las alteraciones en el estado de ánimo presentes en el síndrome de fibromialgia en el ser humano.
3. El modelo de síndrome de fibromialgia inducido por reserpina en rata produce alteraciones en los patrones de sueño compatibles con las alteraciones del sueño presentes en el síndrome de fibromialgia en el ser humano.
4. La reserpina produce en la rata alteraciones en los patrones de activación de los principales núcleos monoaminérgicos troncoencefálicos, como son el Núcleo del Rafe Dorsal, el Locus Coeruleus y el Área Tegmental Ventral.
5. Las monoaminas, especialmente la serotonina y la noradrenalina, juegan un papel clave en la etiopatogenia del síndrome de fibromialgia.
6. El modelo de síndrome de fibromialgia inducido por reserpina en rata es un modelo animal válido para el estudio preclínico del síndrome de fibromialgia.

07

BIBLIOGRAFÍA

1. Ablin, J. N., & Buskila, D. (2015). Update on the genetics of the fibromyalgia syndrome. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 29(1), 20–28. <http://doi.org/10.1016/j.berh.2015.04.018>
2. Acsády, L., Arabadzisz, D., Katona, I., & Freund, T. F. (1996). Topographic distribution of dorsal and median raphe neurons with hippocampal, septal and dual projection. *Acta Biologica Hungarica*, 47(1-4), 9–19.
3. 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>
4. 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>
5. 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>
6. 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>
7. 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>
8. 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>
9. Amandusson, Å., & Blomqvist, A. (2013). Estrogenic influences in pain processing. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 34(4), 329–349. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.06.001>
10. Andersen, M. L., Nascimento, D. C., MacHado, R. B., Roizenblatt, S., Moldofsky, H., & Tufik, S. (2006). Sleep disturbance induced by substance P in mice. *Behavioural Brain Research*, 167(2), 212–218. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.09.008>

11. 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>
12. Antkiewicz-Michaluk, L., Wąsik, A., Możdżeń, E., Romańska, I., & Michaluk, J. (2015). Withdrawal from repeated administration of a low dose of reserpine induced opposing adaptive changes in the noradrenaline and serotonin system function: a behavioral and neurochemical ex vivo and in vivo studies in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 57, 146–154. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.10.009>
13. 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>
14. Apkarian A.V., Bushnell M.C., Schweinhardt P. Representation of Pain in the Brain. 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. 111-128.
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., 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.
17. Arnold, L. M., Hudson, J. I., Hess, E. V., Ware, A. E., Fritz, D. A., Auchenbach, M. B., et al. (2004). Family study of fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatism*, 50(3), 944–952. <http://doi.org/10.1002/art.20042>
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. Assaf, S. Y., & Miller, J. J. (1978). The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization. *Neuroscience*, 3(6), 539–550. [http://doi.org/10.1016/0306-4522\(78\)90018-0](http://doi.org/10.1016/0306-4522(78)90018-0)
20. Astin, J. A., Berman, B. M., Bausell, B., Lee, W.-L., Hochberg, M., & Forsys, 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. Bair, M. J., Wu, J., Damush, T. M., Sutherland, J. M., & Kroenke, K. (2008). Association of depression and anxiety alone and in combination with chronic musculoskeletal pain in primary care patients. *Psychosomatic Medicine*, 70(8), 890–897. <http://doi.org/10.1097/PSY.0b013e318185c510>
22. Baraniuk, J. N., Whalen, G., Cunningham, J., & Clauw, D. J. (2004). Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 5(1), 48. <http://doi.org/10.1186/1471-2474-5-48>

23. Basbaum A.I., Jessell T.M. Pain. En: Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A. J., editors. Principles of neural science. 5ª ed. New York: McGraw-Hill; 2013. p. 530-555.
24. Basbaum, A. I., & Fields, H. L. (1984). Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annual Review of Neuroscience*, 7(1), 309–338. <http://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.001521>
25. Baumeister, A. A., Hawkins, M. F., & Uzelac, S. M. (2003). The myth of reserpine-induced depression: role in the historical development of the monoamine hypothesis. *Journal of the History of the Neurosciences*, 12(April 2015), 207–220. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1076/jhin.12.2.207.15535>
26. 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.
27. 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>
28. 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>
29. 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>
30. 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>
31. 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)
32. 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>
33. Boomershine, C. (2010). Pregabalin for the management of fibromyalgia syndrome. *Journal of Pain Research*, Volume 3, 81. <http://doi.org/10.2147/JPR.S7884>
34. 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&rendertype=abstract>
35. Borbély, A. A. (2009). Refining sleep homeostasis in the two-process model. *Journal of Sleep Research*, 18(1), 1–2. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2869.2009.00750.x>
36. 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>

37. Bradley, L. A. (2009). Pathophysiology of fibromyalgia. *The American Journal of Medicine*, 122(12 Suppl), S22–30. <http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.09.008>
38. 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>
39. Branco, J., Atalaia, A., & Paiva, T. (1994). Sleep cycles and alpha-delta sleep in fibromyalgia syndrome. *The Journal of Rheumatology*, 21(6), 1113–1117.
40. Brendel, M., Reinisch, V., Kalinowski, E., Levin, J., Delker, A., Därr, S., et al. (2016). Hypometabolism in Brain of Cognitively Normal Patients with Depressive Symptoms is Accompanied by Atrophy-Related Partial Volume Effects. *Current Alzheimer Research*, 13(5), 475–486.
41. 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.1533-2500.2011.00470.x>
42. Burns, J. W., Crofford, L. J., & Chervin, R. D. (2008). Sleep stage dynamics in fibromyalgia patients and controls. *Sleep Medicine*, 9(6), 689–696. <http://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.10.022>
43. Buskila, D. (2009). Developments in the scientific and clinical understanding of fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*, 11(5), 242. <http://doi.org/10.1186/ar2720>
44. Buskila, D., & Cohen, H. (2007). Comorbidity of fibromyalgia and psychiatric disorders. *Current Pain and Headache Reports*, 11(5), 333–338.
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., Neumann, L., Vaisberg, G., Alkalay, D., & WOLFE, F. (1997). Increased rates of fibromyalgia following cervical spine injury. A controlled study of 161 cases of traumatic injury. *Arthritis & Rheumatism*, 40(3), 446–452.
47. Buskila, D., Sarzi-Puttini, P., & Ablin, J. N. (2007). The genetics of fibromyalgia syndrome. *Pharmacogenomics*, 8(1), 67–74. <http://doi.org/10.2217/14622416.8.1.67>
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. Calderón, J. L., & Bolaños, R. (2011). Behavioral Analysis of the Reserpine Induced Motor Changes in a Parkinsonian Mouse Model. *Revista Neuropsicología, Neuropsiquiatría Y Neurociencias*, 11, 49–61. Retrieved from http://neurociencias.udea.edu.co/revista/PDF/REVNEURO_vol11_num2_8.pdf
50. Carli, G., Montesano, A., Rapezzi, S., & Paluffi, G. (1987). Differential effects of persistent nociceptive stimulation on sleep stages. *Behavioural Brain Research*, 26(2-3), 89–98.
51. 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>

52. Ceko, M., Bushnell, M. C., & Gracely, R. H. (2012). Neurobiology underlying fibromyalgia symptoms. *Pain Research and Treatment*, 2012(2), 585419–8. <http://doi.org/10.1155/2012/585419>
53. Chase, M. H., & Morales, F. R. (1990). The atonia and myoclonia of active (REM) sleep. *Annual Review of Psychology*, 41(1), 557–584. <http://doi.org/10.1146/annurev.ps.41.020190.003013>
54. 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/s11916-016-0556-x>
55. Choy, E. H. S. (2015). The role of sleep in pain and fibromyalgia. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(9), 513–520. <http://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.56>
56. Clark, D. L., Brown, E. C., Ramasubbu, R., & Kiss, Z. H. T. (2016). Intrinsic Local Beta Oscillations in the Subgenual Cingulate Relate to Depressive Symptoms in Treatment-Resistant Depression. *Biological Psychiatry*, 0(0). <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.02.032>
57. 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>
58. 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)
59. Colpaert, F., & Colpaert, F. C. (1987). Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology*, 26(9), 1431–1440. [http://doi.org/10.1016/0028-3908\(87\)90110-9](http://doi.org/10.1016/0028-3908(87)90110-9)
60. 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>
61. Cook, D. B., Lange, G., Ciccone, D. S., Liu, W.-C., Steffener, J., & Natelson, B. H. (2004). Functional imaging of pain in patients with primary fibromyalgia. *The Journal of Rheumatology*, 31(2), 364–378.
62. 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>
63. Cox, R., Hofman, W. F., & Talamini, L. M. (2012). Involvement of spindles in memory consolidation is slow wave sleep-specific. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 19(7), 264–267. <http://doi.org/10.1101/lm.026252.112>
64. Cristina Meloni, A. V. (2015). Evaluation of Depression in Women Affected by Fibromyalgia Syndrome. *Journal of Depression and Anxiety*, 04(02). <http://doi.org/10.4172/2167-1044.1000178>
65. Cryan, J. F., & Slattery, D. A. (2014). The Ups and Downs of Modelling Mood Disorders in Rodents. *ILAR Journal*, 55(2), 297–309. <http://doi.org/10.1093/ilar/ilu026>

66. 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>
67. 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)
68. Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 547–569. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.008>
69. 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>
70. Dadabhoy, D., Crofford, L. J., Spaeth, M., Russell, I. J., & Clauw, D. J. (2008). Biology and therapy of fibromyalgia. Evidence-based biomarkers for fibromyalgia syndrome. *Arthritis Research & Therapy*, 10(4), 211. <http://doi.org/10.1186/ar2443>
71. Datta, S., & Hobson, J. A. (2000). The rat as an experimental model for sleep neurophysiology. *Behavioral Neuroscience*, 114(6), 1239–1244. <http://doi.org/10.1037//0735-7044.114.6.1239>
72. Datta, S., & MacLean, R. R. (2007). Neurobiological mechanisms for the regulation of mammalian sleep–wake behavior: Reinterpretation of historical evidence and inclusion of contemporary cellular and molecular evidence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(5), 775–824. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.02.004>
73. David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J.-W., Marsteller, D., Mendez, I., et al. (2009). Neurogenesis-Dependent and -Independent Effects of Fluoxetine in an Animal Model of Anxiety/Depression. *Neuron*, 62(4), 479–493. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.04.017>
74. De Lecea, L., Kilduff, T. S., Peyron, C., Gao, X. B., Foye, P. E., Danielson, P. E., et al. (1998). The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(1), 322–327. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.1.322>
75. 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>
76. Del Pozo-Cruz, J., Alfonso-Rosa, R. M., Castillo-Cuerva, A., Sañudo, B., Nolan, P., & Del Pozo-Cruz, B. (2015). Depression symptoms are associated with key health outcomes in women with fibromyalgia: a cross-sectional study. *International Journal of Rheumatic Diseases*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/1756-185X.12564>
77. Demyttenaere, K., Bruffaerts, R., Lee, S., Posada-Villa, J., Kovess, V., Angermeyer, M. C., et al. (2007). Mental disorders among persons with chronic back or neck pain: results from the World Mental Health Surveys. *Pain*, 129(3), 332–342. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2007.01.022>
78. 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>

79. DeSantana, J., & Sluka, K. (2012). Central mechanisms in the maintenance of chronic widespread noninflammatory muscle pain. *Current Pain and Headache Reports*, 29(5), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
80. Di Franco, M., Iannuccelli, C., & Valesini, G. (2010). Neuroendocrine immunology of fibromyalgia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1193(1), 84–90. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05344.x>
81. Diaz-Piedra, C., Catena, A., Sánchez, A. I., Miró, E., Martínez, M. P., & Buela-Casal, G. (2015). Sleep disturbances in fibromyalgia syndrome: the role of clinical and polysomnographic variables explaining poor sleep quality in patients. *Sleep Medicine*, 16(8), 917–925. <http://doi.org/10.1016/j.sleep.2015.03.011>
82. Dostrovsky J.O., Craig A.D. Ascending projection systems. 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. 182-197.
83. Drevets, W. C., Price, J. L., & Furey, M. L. (2008). Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: implications for neurocircuitry models of depression. *Brain Structure & Function*, 213(1-2), 93–118. <http://doi.org/10.1007/s00429-008-0189-x>
84. Drewes, A. M., Svendsen, L., Taagholt, S. J., Bjerregård, K., Nielsen, K. D., & Hansen, B. (1998). Sleep in rheumatoid arthritis: a comparison with healthy subjects and studies of sleep/wake interactions. *British Journal of Rheumatology*, 37(1), 71–81. <http://doi.org/10.1093/rheumatology/37.1.71>
85. 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>
86. Dunne, F. J., & Dunne, C. A. (2012). Fibromyalgia syndrome and depression: common pathways. *British Journal of Hospital Medicine (London, England: 2005)*, 73(4), 211–217.
87. Ehrlich, G. E. (2003). Pain is real; fibromyalgia isn't. *The Journal of Rheumatology*, 30(8), 1666–1667.
88. 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>
89. 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 (London, England)*, 10(2), 137–144. <http://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.02.001>
90. Epstein, J. (2006). Lack of Ventral Striatal Response to Positive Stimuli in Depressed Versus Normal Subjects. *American Journal of Psychiatry*, 163(10), 1784. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.10.1784>
91. 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 (London, England)*, 16(5), 676–689. <http://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2011.00057.x>

92. España, R. A., & Scammell, T. E. (2004). Sleep neurobiology for the clinician. *Sleep*, 27(4), 811–820.
93. España, R. A., & Scammell, T. E. (2011). Sleep neurobiology from a clinical perspective. *Sleep*, 34(7), 845–858. <http://doi.org/10.5665/SLEEP.1112>
94. Ferrara, M., De Gennaro, L., & Bertini, M. (1999). Selective slow-wave sleep (SWS) deprivation and SWS rebound: do we need a fixed SWS amount per night? *Sleep Research Online : SRO*, 2(1), 15–19.
95. Fietta, Pierluigi, Fietta, P., & Manganelli, P. (2007). Fibromyalgia and psychiatric disorders. *Acta Bio-Medica : Atenei Parmensis*, 78(2), 88–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17933276>
96. 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)
97. Finan, P. H., & Smith, M. T. (2013). The comorbidity of insomnia, chronic pain, and depression: dopamine as a putative mechanism. *Sleep Medicine Reviews*, 17(3), 173–183. <http://doi.org/10.1016/j.smrv.2012.03.003>
98. 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>
99. Flik, G., Folgering, J. H. A., Cremers, T. I. H. F., Westerink, B. H. C., & Dremencov, E. (2015). Interaction Between Brain Histamine and Serotonin, Norepinephrine, and Dopamine Systems: In Vivo Microdialysis and Electrophysiology Study. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(2), 320–328. <http://doi.org/10.1007/s12031-015-0536-3>
100. Forte, M. L., Butler, M., Andrade, K. E., Vincent, A., Schousboe, J. T., & Kane, R. L. (2015). Treatments for Fibromyalgia in Adult Subgroups.
101. Frange, C., Hirotsu, C., Hachul, H., Araujo, P., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2014). Fibromyalgia and Sleep in Animal Models: A Current Overview and Future Directions. *Current Pain and Headache Reports*, 18(8), 434–440. <http://doi.org/10.1007/s11916-014-0434-3>
102. Fritschy, J. M., Frondoza, C. G., & Grzanna, R. (1991). Differential effects of reserpine on brainstem catecholaminergic neurons revealed by fos protein immunohistochemistry. *Brain Research*, 562, 48–56.
103. Fuchs, E. A., & Flugge, G. (2004). Cellular consequences of stress and depression. *Dialogs in Clinical Neuroscience*, 6(2), 171–183.
104. Fuller, P., Sherman, D., Pedersen, N. P., Saper, C. B., & Lu, J. (2011). Reassessment of the structural basis of the ascending arousal system. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(5), 933–956. <http://doi.org/10.1002/cne.22559>
105. 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>

106. Gagnon, J. F., Bédard, M. A., Fantini, M. L., Petit, D., Panisset, M., Rompré, S., et al. (2002). REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia in Parkinson's disease. *Neurology*, 59(4), 585–589.
107. Gardner E.P., Johnson K.O. The somatosensory system: receptors and central pathways. En: Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A. J., editors. *Principles of neural science*. 5ª ed. New York: McGraw-Hill; 2013. p. 475-497.
108. Garzón, M., De Andrés, I., & Reinoso-Suárez, F. (1998). Sleep patterns after carbachol delivery in the ventral oral pontine tegmentum of the cat. *Neuroscience*, 83(4), 1137–1144.
109. 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.
110. Glass, J. M. (2009). Review of Cognitive Dysfunction in Fibromyalgia: A Convergence on Working Memory and Attentional Control Impairments. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 35(2), 299–311. <http://doi.org/10.1016/j.rdc.2009.06.002>
111. 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>
112. Gordon, D. A. (2003). Fibromyalgia--real or imagined? *The Journal of Rheumatology*, 30(8), 1665.
113. 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>
114. Goto, Y., & Grace, A. A. (2005). Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nature Neuroscience*, 8(6), 805–812. <http://doi.org/10.1038/nn1471>
115. Gracely, R. H., & Ambrose, K. R. (2011). Neuroimaging of fibromyalgia. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 25(2), 271–284. <http://doi.org/10.1016/j.berh.2011.02.003>
116. Gracely, R. H., Petzke, F., Wolf, J. M., & Clauw, D. J. (2002). Functional magnetic resonance imaging evidence of augmented pain processing in fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatism*, 46(5), 1333–1343. <http://doi.org/10.1002/art.10225>
117. 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>
118. 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>
119. 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>

120. 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>
121. 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.
122. 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>
123. Harrington, J., & Lee-Chiong, T. (2012). Basic biology of sleep. *Dental Clinics of North America*, 56(2), 319–330. <http://doi.org/10.1016/j.cden.2012.01.005>
124. Harris, R. E., & Clauw, D. J. (2008). Newer treatments for fibromyalgia syndrome. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 4(6), 1331–1342.
125. Harris, R. E., Clauw, D. J., Scott, D. J., McLean, S. A., Gracely, R. H., & Zubieta, J.-K. (2007). Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(37), 10000–10006. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2849-07.2007>
126. Harris, R. E., Sundgren, P. C., Craig, A. D., Kirshenbaum, E., Sen, A., Napadow, V., & Clauw, D. J. (2009). Elevated insular glutamate in fibromyalgia is associated with experimental pain. *Arthritis & Rheumatism*, 60(10), 3146–3152. <http://doi.org/10.1002/art.24849>
127. Harris, R. E., Sundgren, P. C., Pang, Y., Hsu, M., Petrou, M., Kim, S. H., et al. (2008). Dynamic levels of glutamate within the insula are associated with improvements in multiple pain domains in fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatism*, 58(3), 903–907. <http://doi.org/10.1002/art.23223>
128. Häuser, W., Bernardy, K., Üçeyler, N., & Sommer, C. (2009). Treatment of fibromyalgia syndrome with antidepressants: a meta-analysis. *Jama*, 301(2), 198–209. <http://doi.org/10.1001/jama.2008.944>
129. 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.
130. Hen, R., Leonardo, E. D., & Hen, R. (2006). Genetics of Affective and Anxiety Disorders. *Annual Review of Psychology*, 57(1), 117–137. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.57.102904.190118>
131. 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>
132. Hicks, R. A., Coleman, D. D., Ferrante, F., Sahatjian, M., & Hawkins, J. (1979). Pain thresholds in rats during recovery from REM sleep deprivation. *Perceptual and Motor Skills*, 48(3 Pt 1), 687–690. <http://doi.org/10.2466/pms.1979.48.3.687>
133. Hoffman, K. L., Battaglia, F. P., Harris, K., MacLean, J. N., Marshall, L., & Mehta, M. R. (2007). The Upshot of Up States in the Neocortex: From Slow Oscillations to Memory Formation. *Journal of Neuroscience*, 27(44), 11838–11841. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3501-07.2007>

134. Hsu, C. C. (1981). Coexpression of multiple immunoglobulin (Ig) heavy chain classes on human leukemic B lymphocytes (B cells). *Clinical Immunology and Immunopathology*, 18(1), 101–107.
135. Huber, R., Felice Ghilardi, M., Massimini, M., & Tononi, G. (2004). Local sleep and learning. *Nature*, 430(6995), 78–81. <http://doi.org/10.1038/nature02663>
136. Huebl, J., Brücke, C., Merkl, A., Bajbouj, M., Schneider, G.-H., & Kühn, A. A. (2016). Processing of emotional stimuli is reflected by modulations of beta band activity in the subgenual anterior cingulate cortex in patients with treatment resistant depression. *Social Cognitive and Affective Neuroscience*, nsw038. <http://doi.org/10.1093/scan/nsw038>
137. Iijima, M., Fukumoto, K., & Chaki, S. (2012). Acute and sustained effects of a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist in the novelty-suppressed feeding test. *Behavioural Brain Research*, 235(2), 287–292. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.016>
138. Inanici, F., & Yunus, M. B. (2004). History of fibromyalgia: past to present. *Current Pain and Headache Reports*, 8(5), 369–378.
139. Iosifescu, D. V., Greenwald, S., Devlin, P., Mischoulon, D., Denninger, J. W., Alpert, J. E., & Fava, M. (2009). Frontal EEG predictors of treatment outcome in major depressive disorder. *European Neuropsychopharmacology : the Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 19(11), 772–777. <http://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2009.06.001>
140. 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>
141. Jaimcharyatam, N., Rodriguez, C. L., & Budur, K. (2011). Prevalence and correlates of alpha-delta sleep in major depressive disorders. *Innovations in Clinical Neuroscience*, 8(7), 35–49.
142. 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>
143. Jensen, K. B., Petzke, F., Carville, S., Fransson, P., Marcus, H., Williams, S. C. R., et al. (2010). Anxiety and depressive symptoms in fibromyalgia are related to poor perception of health but not to pain sensitivity or cerebral processing of pain. *Arthritis & Rheumatism*, 62(11), 3488–3495. <http://doi.org/10.1002/art.27649>
144. Jindal, A., Mahesh, R., Gautam, B., Bhatt, S., & Pandey, D. (2012). Antidepressant-like effect of etazolate, a cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 inhibitor--an approach using rodent behavioral antidepressant tests battery. *European Journal of Pharmacology*, 689(1-3), 125–131. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.051>
145. Jindal, A., Mahesh, R., Gautam, B., Bhatt, S., & Pandey, D. (2012). Antidepressant-like effect of etazolate, a cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 inhibitor--an approach using rodent behavioral antidepressant tests battery. *European Journal of Pharmacology*, 689(1-3), 125–131. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.05.051>
146. 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 (Hoboken, N.J.)*, 67(2), 568–575. <http://doi.org/10.1002/art.38905>

147. Jones, G. T., Atzeni, F., Beasley, M., Flüß, 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 (Hoboken, N.J.)*, 67(2), 568–575. <http://doi.org/10.1002/art.38905>
148. Jouvet, M. (1962). [Research on the neural structures and responsible mechanisms in different phases of physiological sleep]. *Archives Italiennes De Biologie*, 100, 125–206.
149. Julien, N., Goffaux, P., Arsenault, P., & Marchand, S. (2005). Widespread pain in fibromyalgia is related to a deficit of endogenous pain inhibition. *Pain*, 114(1), 295–302. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2004.12.032>
150. Kalauzi, A., Kesic, S., & Saponjic, J. (2009). Cortico-pontine theta synchronization phase shift following monoaminergic lesion in rat. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 60(4), 79–84.
151. Kalia, M. (2005). Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism*, 54(5), 24–27. <http://doi.org/10.1016/j.metabol.2005.01.009>
152. 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>
153. Katz, N. S., Guiard, B. P., Mansari, El, M., & Blier, P. (2010). Effects of acute and sustained administration of the catecholamine reuptake inhibitor nomifensine on the firing activity of monoaminergic neurons. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 24(8), 1223–1235. <http://doi.org/10.1177/0269881109348178>
154. 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> [pii]
155. Kesic, S., Kalauzi, A., Radulovacki, M., Carley, D. W., & Saponjic, J. (2011). Coupling changes in cortical and pontine sigma and theta frequency oscillations following monoaminergic lesions in rat. *Sleep & Breathing = Schlaf & Atmung*, 15(1), 35–47. <http://doi.org/10.1007/s11325-010-0327-6>
156. Kim, S. H., Kim, D. H., Oh, D.-H., & Clauw, D. J. (2008). Characteristic electron microscopic findings in the skin of patients with fibromyalgia: preliminary study. *Clinical Rheumatology*, 27(2), 219–223. <http://doi.org/10.1007/s10067-007-0739-2>
157. Kim, Y., Perova, Z., Mirrione, M. M., Pradhan, K., Henn, F. A., Shea, S., et al. (2016). Whole-Brain Mapping of Neuronal Activity in the Learned Helplessness Model of Depression. *Frontiers in Neural Circuits*, 10(29), 3. <http://doi.org/10.3389/fncir.2016.00003>
158. 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>
159. Kinney, G. G., Kocsis, B., & Vertes, R. P. (1995). Injections of muscimol into the median raphe nucleus produce hippocampal theta rhythm in the urethane anesthetized rat. *Psychopharmacology*, 120(3), 244–248. <http://doi.org/10.1007/BF02311170>

160. Kosek, E., & Hansson, P. (1997). Modulatory influence on somatosensory perception from vibration and heterotopic noxious conditioning stimulation (HNCS) in fibromyalgia patients and healthy subjects. *Pain*, 70(1), 41–51. [http://doi.org/10.1016/S0304-3959\(96\)03295-2](http://doi.org/10.1016/S0304-3959(96)03295-2)
161. Kumar, P. (2015). Neurophysiology of Exercise: Current State of Learning. *Advances in Life Science and Medicine*, 1(1), 24–32.
162. Landis, C. A., Lentz, M. J., Rothermel, J., Buchwald, D., & Shaver, J. L. F. (2004). Decreased sleep spindles and spindle activity in midlife women with fibromyalgia and pain. *Sleep*, 27(4), 741–750.
163. Lange, M., & Petermann, F. (2010). [Influence of depression on fibromyalgia: A systematic review]. *Schmerz (Berlin, Germany)*, 24(4), 326–333. <http://doi.org/10.1007/s00482-010-0937-8>
164. 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>
165. 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>
166. Lauche, R., Cramer, H., Häuser, W., Dobos, G., & Langhorst, J. (2015). A Systematic Overview of Reviews for Complementary and Alternative Therapies in the Treatment of the Fibromyalgia Syndrome. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2015(5), 610615–13. <http://doi.org/10.1155/2015/610615>
167. Lautenbacher, S., & Rollman, G. B. (1997). Possible deficiencies of pain modulation in fibromyalgia. *The Clinical Journal of Pain*, 13(3), 189–196.
168. Lautenbacher, S., Kundermann, B., & Krieg, J.-C. (2006). Sleep deprivation and pain perception. *Sleep Medicine Reviews*, 10(5), 357–369. <http://doi.org/10.1016/j.smrv.2005.08.001>
169. 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>
170. Lee, K. I., Kim, M. J., Koh, H., Lee, J. I., Namkoong, S., Oh, W. K., & Park, J. (2015). The anti-hypertensive 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>
171. Lee, Y. C., Nassikas, N. J., & Clauw, D. J. (2011). The role of the central nervous system in the generation and maintenance of chronic pain in rheumatoid arthritis, osteoarthritis and fibromyalgia. *Arthritis Research & Therapy*, 13(2), 211. <http://doi.org/10.1186/ar3306>
172. 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>
173. 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

- [3H]imipramine reuptake in the primary fibromyalgia syndrome. *Rheumatology (Oxford, England)*, 40(3), 290–296.
174. Leuchter, A. F., Hunter, A. M., Krantz, D. E., & Cook, I. A. (2015). Rhythms and blues: modulation of oscillatory synchrony and the mechanism of action of antidepressant treatments. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1344(1), 78–91. <http://doi.org/10.1111/nyas.12742>
 175. Leys, L. J., Chu, K. L., Xu, J., Pai, M., Yang, H. S., Robb, H. M., et al. (2013). Disturbances in slow-wave sleep are induced by models of bilateral inflammation, neuropathic, and postoperative pain, but not osteoarthritic pain in rats. *Pain*, 154(7), 1092–1102. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2013.03.019>
 176. 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>
 177. 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.
 178. 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.
 179. Lucki, I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behavioural Pharmacology*, 8(6), 523–532. <http://doi.org/10.1097/00008877-199711000-00010>
 180. 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>
 181. Luppi, P.-H., Clément, O., & Fort, P. (2013). Paradoxical (REM) sleep genesis by the brainstem is under hypothalamic control. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(5), 786–792. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2013.02.006>
 182. 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>
 183. 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>
 184. Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 5291–5338.
 185. Mansari, El, M., Blier, P., Guiard, B. P., Chernoloz, O., Ghanbari, R., & Katz, N. (2010). Relevance of Norepinephrine-Dopamine Interactions in the Treatment of Major Depressive Disorder. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 16(3), e1–e17. <http://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2010.00146.x>
 186. 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>
187. Maru, E., Takahashi, L. K., & Iwahara, S. (1979). Effects of median raphe nucleus lesions on hippocampal EEG in the freely moving rat. *Brain Research*, 163(2), 223–234. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(79\)90351-2](http://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90351-2)
 188. Marvisi, M., Balzarini, L., Mancini, C., Ramponi, S., & Marvisi, C. (2015). Fibromyalgia is frequent in obstructive sleep apnea and responds to CPAP therapy. *European Journal of Internal Medicine*, 26(9), e49–50. <http://doi.org/10.1016/j.ejim.2015.06.010>
 189. May, M. E., Harvey, M. T., Valdovinos, M. G., Kline, R. H., Wiley, R. G., & Kennedy, C. H. (2005). Nociceptor and age specific effects of REM sleep deprivation induced hyperalgesia. *Behavioural Brain Research*, 159(1), 89–94. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.10.005>
 190. McCarter, S. J., St Louis, E. K., & Boeve, B. F. (2012). REM sleep behavior disorder and REM sleep without atonia as an early manifestation of degenerative neurological disease. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 12(2), 182–192. <http://doi.org/10.1007/s11910-012-0253-z>
 191. 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>
 192. Mednick, S. C., McDevitt, E. A., Walsh, J. K., Wamsley, E., Paulus, M., Kanady, J. C., & Drummond, S. P. A. (2013). The critical role of sleep spindles in hippocampal-dependent memory: a pharmacology study. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(10), 4494–4504. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3127-12.2013>
 193. 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>
 194. Miguel, Q., & María Esther, R. F. (2011). Eficacia del Entrenamiento en Mindfulness para Pacientes con Fibromialgia. *Clínica Y Salud*, 22(1), 51–67. <http://doi.org/10.5093/cl2011v22n1a4>
 195. Mileykovskiy, B. Y., Kiyashchenko, L. I., & Siegel, J. M. (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. *Neuron*, 46(5), 787–798. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.035>
 196. Millan, M. J. (2002). Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6), 355–474.
 197. 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>
 198. 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.
 199. 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>
 200. Moldofsky, H. (1982). Rheumatic pain modulation syndrome: the interrelationships between sleep, central nervous system serotonin, and pain. *Advances in Neurology*, 33, 51–57.

201. Moldofsky, H. (2008). The significance of the sleeping-waking brain for the understanding of widespread musculoskeletal pain and fatigue in fibromyalgia syndrome and allied syndromes. *Joint, Bone, Spine : Revue Du Rhumatisme*, 75(4), 397–402. <http://doi.org/10.1016/j.jbspin.2008.01.021>
202. Moldofsky, H. (2009). The significance of dysfunctions of the sleeping/waking brain to the pathogenesis and treatment of fibromyalgia syndrome. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 35(2), 275–283. <http://doi.org/10.1016/j.rdc.2009.05.008>
203. Moldofsky, H. (2010). Rheumatic manifestations of sleep disorders. *Current Opinion in Rheumatology*, 22(1), 59–63. <http://doi.org/10.1097/BOR.0b013e328333b9cc>
204. Moldofsky, H., & Scarisbrick, P. (1976). Induction of Neurasthenic Musculoskeletal Pain Syndrome by Selective Sleep Stage Deprivation. *Psychosomatic Medicine*, 38(1), 35–44. <http://doi.org/10.1097/00006842-197601000-00006>
205. Mölle, M., Bergmann, T. O., Marshall, L., & Born, J. (2011). Fast and Slow Spindles during the Sleep Slow Oscillation: Disparate Coalescence and Engagement in Memory Processing. *Sleep*, 1–15. <http://doi.org/10.5665/sleep.1290>
206. 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>
207. Morris, A. (2004). Fibromyalgia--real or imagined? *The Journal of Rheumatology*, 31(4), 827–828.
208. Morton DB, Griffiths PH. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *The Veterinary record*, 116(16):431-6.
209. Muncey, A. R., Saulles, A. R., Koch, L. G., Britton, S. L., Baghdoyan, H. A., & Lydic, R. (2010). Disrupted sleep and delayed recovery from chronic peripheral neuropathy are distinct phenotypes in a rat model of metabolic syndrome. *Anesthesiology*, 113(5), 1176–1185. <http://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181f56248>
210. 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>
211. Naftel J.P. Vías sensitivas viscerales. En: Haines D.E., editor. *Principios de Neurociencia. Aplicaciones básicas y clínicas*. 4ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014. p. 260-266.
212. 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>
213. Nagakura, Y., Takahashi, M., Noto, T., Sekizawa, T., Oe, T., Yoshimi, E., et al. (2012). Different pathophysiology underlying animal models of fibromyalgia and neuropathic pain: comparison of reserpine-induced myalgia and chronic constriction injury rats. *Behavioural Brain Research*, 226(1), 242–249. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.09.023>
214. Nam, H., Clinton, S. M., Jackson, N. L., & Kerman, I. A. (2014). Learned helplessness and social avoidance in the Wistar-Kyoto rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(April), 109. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00109>

215. Nammi, S., Boini, K. M., Koppula, S., & Sreemantula, S. (2005). Reserpine-induced central effects: pharmacological evidence for the lack of central effects of reserpine methiodide. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 83(6), 509–515. <http://doi.org/10.1139/y05-039>
216. Nascimento, D., Andersen, M., Hipolide, D., Nobrega, J., & Tufik, S. (2007). Pain hypersensitivity induced by paradoxical sleep deprivation is not due to altered binding to brain μ -opioid receptors. *Behavioural Brain Research*, 178(2), 216–220. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.12.016>
217. Neeck, G. (2002). Pathogenic mechanisms of fibromyalgia. *Ageing Research Reviews*, 1(2), 243–255.
218. 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)
219. Nestler, E., & Hyman, S. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13(10), 1161–1169. <http://doi.org/10.1038/nn.2647>
220. Neumann, W.-J., Huebl, J., Brücke, C., Gabriëls, L., Bajbouj, M., Merkl, A., et al. (2014). Different patterns of local field potentials from limbic DBS targets in patients with major depressive and obsessive compulsive disorder. *Molecular Psychiatry*, 19(11), 1186–1192. <http://doi.org/10.1038/mp.2014.2>
221. 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>
222. 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>
223. 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>
224. 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>
225. 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>
226. 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>
227. Older, S. A., Battafarano, D. F., Danning, C. L., Ward, J. A., Grady, E. P., Derman, S., & RUSSELL, I. J. (1998). The effects of delta wave sleep interruption on pain thresholds and fibromyalgia-like symptoms in healthy subjects; correlations with insulin-like growth factor I. *The Journal of Rheumatology*, 25(6), 1180–1186.

228. Onen, S. H., Alloui, A., Gross, A., Eschallier, A., & Dubray, C. (2001). The effects of total sleep deprivation, selective sleep interruption and sleep recovery on pain tolerance thresholds in healthy subjects. *Journal of Sleep Research*, 10(1), 35–42.
229. 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>
230. 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>
231. 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>
232. Park, D.-J., Kang, J.-H., Yim, Y.-R., Kim, J.-E., Lee, J.-W., Lee, K.-E., et al. (2015). Exploring Genetic Susceptibility to Fibromyalgia. *Chonnam Medical Journal*, 51(2), 58–65. <http://doi.org/10.4068/cmj.2015.51.2.58>
233. Paul-Savoie, E., Marchand, S., Morin, M., Bourgault, P., Brissette, N., Rattavong, V., et al. (2012). Is the deficit in pain inhibition in fibromyalgia influenced by sleep impairments? *The Open Rheumatology Journal*, 6(1), 296–302. <http://doi.org/10.2174/1874312901206010296>
234. Paxinos G; Watson C, 2014, Paxinos and Watson's The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates (7th Ed), Academic Press, San Diego
235. Peng, X., Robinson, R. L., Mease, P., Kroenke, K., Williams, D. A., Chen, Y., et al. (2015). Long-term evaluation of opioid treatment in fibromyalgia. *The Clinical Journal of Pain*, 31(1), 7–13. <http://doi.org/10.1097/AJP.0000000000000079>
236. Pertovaara, A. (2006). Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology*, 80(2), 53–83. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.08.001>
237. 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>
238. Petersel, D. L., Dror, V., & Cheung, R. (2011). Central amplification and fibromyalgia: disorder of pain processing. *Journal of Neuroscience Research*, 89(1), 29–34. <http://doi.org/10.1002/jnr.22512>
239. 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>
240. Picchietti, D., & Winkelman, J. W. (2005). Restless legs syndrome, periodic limb movements in sleep, and depression. *Sleep*, 28(7), 891–898.
241. 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*, 47(4), 379–391.

242. Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604), 730–732.
243. Praissman, 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>
244. Price, D. D., Staud, R., Robinson, M. E., Mauderli, A. P., Cannon, R., & Vierck, C. J. (2002). Enhanced temporal summation of second pain and its central modulation in fibromyalgia patients. *Pain*, 99(1), 49–59. [http://doi.org/10.1016/S0304-3959\(02\)00053-2](http://doi.org/10.1016/S0304-3959(02)00053-2)
245. Puig, M. V., & Gullledge, A. T. (2011). Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits. *Molecular Neurobiology*, 44(3), 449–464. <http://doi.org/10.1007/s12035-011-8214-0>
246. Reinoso-Suárez, F., de Andrés, I., & Garzón, M. (2011). Functional anatomy of the sleep-wakefulness cycle: wakefulness. *Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology*, 208, 1–128.
247. Rex, A., Voigt, J. P., Voits, M., & Fink, H. (1998). Pharmacological evaluation of a modified open-field test sensitive to anxiolytic drugs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(3), 677–683. [http://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00461-9](http://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00461-9)
248. Ringkamp M., Raja S.N., Campbell J.N., Meyer R.A. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. 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. 1-30.
249. 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.
250. Roehrs, T., Diederichs, C., Gillis, M., Burger, A. J., Stout, R. A., Lumley, M. A., & Roth, T. (2013). Nocturnal sleep, daytime sleepiness and fatigue in fibromyalgia patients compared to rheumatoid arthritis patients and healthy controls: a preliminary study. *Sleep Medicine*, 14(1), 109–115. <http://doi.org/10.1016/j.sleep.2012.09.020>
251. Roizenblatt, S., Neto, N. S. R., & Tufik, S. (2011). Sleep Disorders and Fibromyalgia. *Current Pain and Headache Reports*, 15(5), 347–357. <http://doi.org/10.1007/s11916-011-0213-3>
252. Roizenblatt, S., Roizenblatt, S., Moldofsky, H., Moldofsky, H., Benedito-Silva, A. A., Benedito-Silva, A. A., et al. (2001). Alpha sleep characteristics in fibromyalgia. *Arthritis & Rheumatism*, 44(1), 222–230. [http://doi.org/10.1002/1529-0131\(200101\)44:1<222::AID-ANR29>3.0.CO;2-K](http://doi.org/10.1002/1529-0131(200101)44:1<222::AID-ANR29>3.0.CO;2-K)
253. Rosenfeld, V. W., Rutledge, D. N., & Stern, J. M. (2015). Polysomnography with quantitative EEG in patients with and without fibromyalgia. *Journal of Clinical Neurophysiology : Official Publication of the American Electroencephalographic Society*, 32(2), 164–170. <http://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000134>
254. 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>

255. Roth, T., Bhadra-Brown, P., Pitman, V. W., Roehrs, T. A., & Resnick, E. M. (2016). Characteristics of Disturbed Sleep in Patients With Fibromyalgia Compared With Insomnia or With Pain-Free Volunteers. *The Clinical Journal of Pain*, 32(4), 302–307. <http://doi.org/10.1097/AJP.0000000000000261>
256. Russell I.J. Fibromyalgia syndrome and myofascial pain syndrome. 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. 658-682.
257. 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.
258. 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.
259. 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.
260. 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>
261. Sandkühler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiological Reviews*, 89(2), 707–758. <http://doi.org/10.1152/physrev.00025.2008>
262. 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>
263. 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.
264. Saper, C. B., Scammell, T. E., & Lu, J. (2005). Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437(7063), 1257–1263. <http://doi.org/10.1038/nature04284>
265. Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., & Mease, P. J. (2011). Chronic widespread pain: from peripheral to central evolution. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 25(2), 133–139. <http://doi.org/10.1016/j.berh.2011.04.001>
266. 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. DOI: 10.1586/17512433.2016.1145052
267. Schäfers, M., Sorkin, L. S., & Sommer, C. (2003). Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha 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)
268. 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)

269. Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus. Texto y atlas de anatomía. Tomo 3. Cabeza, cuello y neuroanatomía. 3ª ed. Madrid. Editorial Médica Panamericana. 2015.
270. Schwindel, C. D., & McNaughton, B. L. (2011). Hippocampal-cortical interactions and the dynamics of memory trace reactivation. *Slow brain oscillations of sleep, resting state, and vigilance*. (1st ed., Vol. 193, pp. 163–177). Elsevier B.V. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53839-0.00011-9>
271. 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>
272. Short, B., Borckardt, J. J., George, M., Beam, W., & Reeves, S. T. (2009). Non-invasive brain stimulation approaches to fibromyalgia pain. *Journal of Pain Management*, 2(3), 259–276.
273. Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*, 7(6), 1009–1014. <http://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>
274. 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>
275. 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.
276. 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>
277. Smith, M. T., & Haythornthwaite, J. A. (2004). How do sleep disturbance and chronic pain interrelate? Insights from the longitudinal and cognitive-behavioral clinical trials literature. *Sleep Medicine Reviews*, 8(2), 119–132. [http://doi.org/10.1016/S1087-0792\(03\)00044-3](http://doi.org/10.1016/S1087-0792(03)00044-3)
278. 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>
279. 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>
280. Staud, R., Cannon, R. C., Mauderli, A. P., Robinson, M. E., Price, D. D., & Vierck, C. J., Jr. (2003). Temporal summation of pain from mechanical stimulation of muscle tissue in normal controls and subjects with fibromyalgia syndrome. *Pain*, 102(1), 87–95. [http://doi.org/10.1016/s0304-3959\(02\)00344-5](http://doi.org/10.1016/s0304-3959(02)00344-5)
281. Staud, R., Craggs, J. G., Perlstein, W. M., Robinson, M. E., & Price, D. D. (2012). Brain activity associated with slow temporal summation of C-fiber evoked pain in fibromyalgia patients and healthy controls. *European Journal of Pain*, 12(8), 1078–1089. <http://doi.org/10.1016/j.ejpain.2008.02.002>

282. Staud, R., Vierck, C. J., Cannon, R. L., Mauderli, A. P., & Price, D. D. (2001). Abnormal sensitization and temporal summation of second pain (wind-up) in patients with fibromyalgia syndrome. *Pain*, 91(1-2), 165–175.
283. Stedenfeld, K. A., Clinton, S. M., Kerman, I. A., Akil, H., Watson, S. J., & Sved, A. F. (2011). Novelty-seeking 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>
284. Steriade, M., Contreras, D., Curró Dossi, R., & Nuñez, A. (1993a). The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks. *Journal of Neuroscience*, 13(8), 3284–3299.
285. Steriade, M., Nuñez, A., & Amzica, F. (1993b). A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *Journal of Neuroscience*, 13(8), 3252–3265.
286. Steriade, M., Nuñez, A., & Amzica, F. (1993c). Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram. *Journal of Neuroscience*, 13(8), 3266–3283.
287. 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>
288. Sullivan, D., Mizuseki, K., Sorgi, A., & Buzsáki, G. (2014). Comparison of sleep spindles and theta oscillations in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(2), 662–674. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0552-13.2014>
289. Sumpton, J.E., Moulin, D.E. (2008). Fibromyalgia: Presentation and management with a focus on pharmacological treatment. *Pain Res Manage.* 13(6): 477-483.
290. Sun, Y., Giacobbe, P., Tang, C. W., Barr, M. S., Rajji, T., Kennedy, S. H., et al. (2015). Deep Brain Stimulation Modulates Gamma Oscillations and Theta–Gamma Coupling in Treatment Resistant Depression. *Brain Stimulation*, 8(6), 1033–1042. <http://doi.org/10.1016/j.brs.2015.06.010>
291. Surget, A., Saxe, M., Leman, S., Ibarguen-Vargas, Y., Chalon, S., Griebel, G., et al. (2008). Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biological Psychiatry*, 64(4), 293–301. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.022>
292. 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>
293. 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.
294. 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*, 1–27. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.01.025>
295. Taylor, D. J., Mallory, L. J., Lichstein, K. L., Durrence, H. H., Riedel, B. W., & Bush, A. J. (2007). Comorbidity of chronic insomnia with medical problems. *Sleep*, 30(2), 213–218.

296. Teruel-Martí, V., Cervera-Ferri, A., Nuñez, A., Valverde-Navarro, A. A., Olucha-Bordonau, F. E., & Ruiz-Torner, A. (2008). Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat. *Brain Research*, 1218, 87–96. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.04.022>
297. 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>
298. Todd, A. J. (2010). Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(12), 823–836. <http://doi.org/10.1038/nrn2947>
299. Tomim, D. H., Pontarolla, F. M., Bertolini, J. F., Arase, M., Tobaldini, G., Lima, M. M. S., & Fischer, L. (2016). The Pronociceptive Effect of Paradoxical Sleep Deprivation in Rats: Evidence for a Role of Descending Pain Modulation Mechanisms. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1706–1717. <http://doi.org/10.1007/s12035-014-9059-0>
300. Torrence, C., & Compo, G. P. (1998). A Practical Guide to Wavelet Analysis. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 79(1), 61–78. [http://doi.org/10.1175/1520-0477\(1998\)079<0061:APGTWA>2.0.CO;2](http://doi.org/10.1175/1520-0477(1998)079<0061:APGTWA>2.0.CO;2)
301. 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>
302. Uçar, M., Sarp, Ü., Karaaslan, Ö., Gül, A. I., Tanik, N., & Arik, H. O. (2015). Health anxiety and depression in patients with fibromyalgia syndrome. *The Journal of International Medical Research*, 43(5), 679–685. <http://doi.org/10.1177/0300060515587578>
303. Valverde Navarro A.A., Navalón Martínez H., Ferrer Piquer S., Blasco Serra A. Anatomofisiología del dolor. En: Tornero Tornero C., director. *Anestesia. Fundamentos y manejo clínico*. Madrid. Editorial Médica Panamericana. 2015. p 204-216.
304. Valverde-Navarro, A. A., Olucha, F. E., García-Verdugo, J. M., Hernández-Gil, T., Ruiz-Torner, A., & Martínez-Soriano, F. (1996). Distribution of basal-expressed c-fos-like immunoreactive cells of the periaqueductal grey matter of the rat. *Neuroreport*, 7(15-17), 2749–2752.
305. Van Houdenhove, B., & Luyten, P. (2006). Stress, depression and fibromyalgia. *Acta Neurologica Belgica*, 106(4), 149–156.
306. Van Someren, E. J. W., Van Der Werf, Y. D., Roelfsema, P. R., Mansvelder, H. D., & da Silva, F. H. L. (2011). Slow brain oscillations of sleep, resting state, and vigilance. *Progress in Brain Research*, 193, 3–15. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-53839-0.00001-6>
307. Vanegas, H., & Schaible, H.-G. (2004). Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Research. Brain Research Reviews*, 46(3), 295–309. <http://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.07.004>
308. Veltri, A., Scarpellini, P., Piccinni, A., Conversano, C., Giacomelli, C., Bombardieri, S., et al. (2012). Methodological approach to depressive symptoms in fibromyalgia patients. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 30(6 Suppl 74), 136–142.

309. Vertes, R. P., Fortin, W. J., & Crane, A. M. (1999). Projections of the median raphe nucleus in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 407(4), 555–582. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19990517\)407:4<555::AID-CNE7>3.3.CO;2-5](http://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990517)407:4<555::AID-CNE7>3.3.CO;2-5)
310. Vijayan, S., Klerman, E. B., Adler, G. K., & Kopell, N. J. (2015). Thalamic mechanisms underlying alpha-delta sleep with implications for fibromyalgia. *Journal of Neurophysiology*, 114(3), 1923–1930. <http://doi.org/10.1152/jn.00280.2015>
311. Villanueva, V. L., & Valía, J. C. (2004). Fibromialgia: diagnóstico y tratamiento. El estado de la cuestión. *Revista De La ...*, 430–443. Retrieved from http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s1134-80462004000700005&script=sci_arttext
312. Vyazovskiy, V. V., & Harris, K. D. (2013). Sleep and the single neuron: the role of global slow oscillations in individual cell rest. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 443–451. <http://doi.org/10.1038/nrn3494>
313. Walitt, B., Ceko, M., Gracely, J. L., & Gracely, R. H. (2016). Neuroimaging of Central Sensitivity Syndromes: Key Insights from the Scientific Literature. *Current Rheumatology Reviews*, 12(1), 55–87.
314. 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>
315. Warren S., Capra N.F., Yezierski R.P. Sistema Somatosensitivo I: tacto discriminativo y sensibilidad postural. En: Haines D.E., editor. *Principios de Neurociencia. Aplicaciones básicas y clínicas*. 4ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014a. p. 226-240.
316. Warren S., Yezierski R.P., Capra N.F. Sistema Somatosensitivo II: nocicepción, sensibilidad térmica y tacto no discriminativo. En: Haines D.E., editor. *Principios de Neurociencia. Aplicaciones básicas y clínicas*. 4ª ed. Barcelona: Elsevier; 2014b. p. 241-259.
317. Westlund K.N., Willis W.D. Pain System. En: Paxinos G., editor. *The rat nervous system*. 4ª ed. Sydney: Elsevier; 2015. p. 703-731.
318. White, K. P. (2004). Fibromyalgia: the answer is blowin' in the wind. *The Journal of Rheumatology*, 31(4), 636–639.
319. Winson, J. (1974). Patterns of hippocampal theta rhythm in the freely moving rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 36(3), 291–301.
320. 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>
321. 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>
322. Wolfe, F., Fitzcharles, M. A., Goldenberg, D. L., CLAUW, D. J., HAUSER, 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>

323. 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.
324. Wood, P. B., Glabus, M. F., Simpson, R., Patterson, J. C., 2nd, & Patterson, J. C. (2009). Changes in Gray Matter Density in Fibromyalgia: Correlation With Dopamine Metabolism. *The Journal of Pain*, 10(6), 609–618. <http://doi.org/10.1016/j.jpain.2008.12.008>
325. Wood, P. B., Patterson, J. C., Sunderland, J. J., Tainter, K. H., Glabus, M. F., & Lilien, D. L. (2007a). Reduced presynaptic dopamine activity in fibromyalgia syndrome demonstrated with positron emission tomography: a pilot study. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, 8(1), 51–58. <http://doi.org/10.1016/j.jpain.2006.05.014>
326. Wood, P. B., Schweinhardt, P., Jaeger, E., Dagher, A., Hakyemez, H., Rabiner, E. A., et al. (2007b). Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. *European Journal of Neuroscience*, 25(12), 3576–3582. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05623.x>
327. 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.1533-2500.2011.00497.x>
328. 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 C-reactive protein. *Rheumatology International*, 32(8), 2479–2485. <http://doi.org/10.1007/s00296-011-1990-z>
329. Yetnikoff, L., Lavezzi, H. N., Reichard, R. A., & Zahm, D. S. (2014). An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience*, 282, 23–48. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.04.010>
330. Yilmaz, P., Diers, M., Diener, S., Rance, M., Wessa, M., & Flor, H. (2010). Brain correlates of stress-induced analgesia. *Pain*, 151(2), 522–529. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2010.08.016>
331. 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>
332. Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16(2), 109–110.

08

ANEXOS

ANEXO I. DESCRIPTIVOS DEL ELECTROVONFREY TEST

	Group		Estadístico	Error típ.	
REC1NORMAL	AAG	Media	1,0674	,03977	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,9799	
			Límite superior	1,1550	
		Media recortada al 5%	1,0714		
		Mediana	1,0194		
		Varianza	,019		
		Desv. típ.	,13776		
		Mínimo	,82		
		Máximo	1,24		
		Rango	,42		
		Amplitud intercuartil	,24		
		Asimetría	-,141	,637	
		Curtosis	-1,156	1,232	
		RES	Media	,4360	,03075
	Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	,3683	
			Límite superior	,5037	
	Media recortada al 5%		,4332		
	Mediana		,4020		
	Varianza		,011		
	Desv. típ.		,10653		
	Mínimo		,29		
	Máximo		,63		
	Rango		,33		
	Amplitud intercuartil		,17		
	Asimetría		,752	,637	
	Curtosis		-,489	1,232	
AAG	Media		,9461	,04041	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,8572		
		Límite superior	1,0351		
	Media recortada al 5%	,9549			
	Mediana	,9789			
	Varianza	,020			
	Desv. típ.	,13999			
	Mínimo	,61			
	Máximo	1,12			
	Rango	,51			
	Amplitud intercuartil	,17			
	Asimetría	-1,300	,637		
	Curtosis	1,904	1,232		

REC3NORMAL	RES	Media		,4419	,02380		
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,3896			
			Límite superior	,4943			
		Media recortada al 5%		,4369			
		Mediana		,4128			
		Varianza		,007			
		Desv. típ.		,08244			
		Mínimo		,35			
		Máximo		,63			
		Rango		,28			
		Amplitud intercuartil		,11			
		Asimetría		1,209	,637		
		Curtosis		,921	1,232		
			AAG	Media		,9192	,02328
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,8679	
Límite superior	,9704						
Media recortada al 5%				,9208			
Mediana				,9349			
Varianza				,007			
Desv. típ.				,08063			
Mínimo				,79			
Máximo				1,02			
Rango				,23			
Amplitud intercuartil				,17			
Asimetría				-,360	,637		
Curtosis				-1,094	1,232		

REC5NORMAL	RES	Media		,5189	,03204
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,4484	
			Límite superior	,5894	
		Media recortada al 5%		,5150	
		Mediana		,5080	
		Varianza		,012	
		Desv. típ.		,11098	
		Mínimo		,36	
		Máximo		,75	
		Rango		,39	
		Amplitud intercuartil		,17	
		Asimetría		,548	,637
		Curtosis		,039	1,232
		REC7NORMAL	AAG	Media	
Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior			,8689	
	Límite superior			1,1278	
Media recortada al 5%				,9916	
Mediana				,9472	
Varianza				,042	
Desv. típ.				,20376	
Mínimo				,76	
Máximo				1,36	
Rango				,60	
Amplitud intercuartil				,30	
Asimetría				,781	,637
Curtosis				-,485	1,232
REC7NORMAL	RES			Media	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,4623	
			Límite superior	,5341	
		Media recortada al 5%		,5008	
		Mediana		,5137	
		Varianza		,003	
		Desv. típ.		,05650	
		Mínimo		,39	
		Máximo		,56	
		Rango		,17	
		Amplitud intercuartil		,08	
		Asimetría		-1,093	,637
		Curtosis		,141	1,232

ANEXO II. DESCRIPTIVOS DEL RANDALL AND SELITTO TEST

	Group		Estadístico	Error típ.	
REC1NORMAL	AAG	Media	1,1629	,04837	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1,0565	
			Límite superior	1,2694	
		Media recortada al 5%	1,1472		
		Mediana	1,0907		
		Varianza	,028		
		Desv. típ.	,16755		
		Mínimo	1,02		
		Máximo	1,59		
		Rango	,57		
		Amplitud intercuartil	,13		
		Asimetría	1,856	,637	
		Curtosis	3,217	1,232	
		RES	Media	,4977	,03290
	Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	,4253	
			Límite superior	,5702	
	Media recortada al 5%		,4915		
	Mediana		,4542		
	Varianza		,013		
	Desv. típ.		,11397		
	Mínimo		,37		
	Máximo		,74		
	Rango		,38		
	Amplitud intercuartil		,13		
	Asimetría		1,287	,637	
	Curtosis	,900	1,232		
AAG	Media	1,0200	,04266		
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,9262		
		Límite superior	1,1139		
	Media recortada al 5%	1,0230			
	Mediana	1,0808			
	Varianza	,022			
	Desv. típ.	,14777			
	Mínimo	,79			
	Máximo	1,20			
	Rango	,41			
	Amplitud intercuartil	,28			
	Asimetría	-,450	,637		
	Curtosis	-1,541	1,232		

REC3NORMAL	RES	Media		,4713	,03966		
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,3840			
			Límite superior	,5586			
		Media recortada al 5%		,4620			
		Mediana		,4251			
		Varianza		,019			
		Desv. típ.		,13739			
		Mínimo		,30			
		Máximo		,81			
		Rango		,50			
		Amplitud intercuartil		,19			
		Asimetría		1,465	,637		
		Curtosis		2,235	1,232		
			AAG	Media		,9910	,04245
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,8975	
Límite superior	1,0844						
Media recortada al 5%				,9863			
Mediana				,9588			
Varianza				,022			
Desv. típ.				,14707			
Mínimo				,78			
Máximo				1,29			
Rango				,51			
Amplitud intercuartil				,22			
Asimetría				,620	,637		
Curtosis				-,116	1,232		

RECSNORMAL	RES	Media		,4617	,03915		
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,3756			
			Límite superior	,5479			
		Media recortada al 5%		,4494			
		Mediana		,4283			
		Varianza		,018			
		Desv. típ.		,13563			
		Mínimo		,31			
		Máximo		,83			
		Rango		,52			
		Amplitud intercuartil		,11			
		Asimetría		2,050	,637		
		Curtosis		5,372	1,232		
		REC7NORMAL	AAG	Media		1,0332	,05373
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,9150	
Límite superior	1,1515						
Media recortada al 5%				1,0244			
Mediana				,9458			
Varianza				,035			
Desv. típ.				,18613			
Mínimo				,81			
Máximo				1,41			
Rango				,60			
Amplitud intercuartil				,31			
Asimetría				,896	,637		
Curtosis				-,355	1,232		
REC7NORMAL	RES			Media		,3950	,03669
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,3143	
		Límite superior	,4758				
		Media recortada al 5%		,3918			
		Mediana		,3818			
		Varianza		,016			
		Desv. típ.		,12710			
		Mínimo		,22			
		Máximo		,63			
		Rango		,40			
		Amplitud intercuartil		,21			
		Asimetría		,566	,637		
		Curtosis		-,728	1,232		

ANEXO III. DESCRIPTIVOS DEL FORCED SWIMMING TEST_PRETEST

	CONEXP		Estadístico	Error típ.	
NADAR	CONTROL	Media	24,11	1,495	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	20,66	
			Límite superior	27,56	
		Media recortada al 5%	24,07		
		Mediana	23,00		
		Varianza	20,111		
		Desv. típ.	4,485		
		Mínimo	19		
		Máximo	30		
		Rango	11		
		Amplitud intercuartil	9		
		Asimetría	,259	,717	
		Curtosis	-1,790	1,400	
		RESERPINA	Media	20,00	2,449
	Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	13,70	
			Límite superior	26,30	
	Media recortada al 5%		19,56		
	Mediana		18,00		
	Varianza		36,000		
	Desv. típ.		6,000		
	Mínimo		16		
	Máximo		32		
	Rango		16		
	Amplitud intercuartil		6		
	Asimetría		2,233	,845	
	Curtosis	5,177	1,741		
CONTROL	Media	7,11	1,379		
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3,93		
		Límite superior	10,29		
	Media recortada al 5%	6,85			
	Mediana	7,00			
	Varianza	17,111			
	Desv. típ.	4,137			
	Mínimo	3			
	Máximo	16			
	Rango	13			
	Amplitud intercuartil	6			
	Asimetría	1,247	,717		
	Curtosis	1,831	1,400		

ESCALAR	RESERPINA	Media		5,17	,792		
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3,13			
			Límite superior	7,20			
		Media recortada al 5%		5,13			
		Mediana		4,50			
		Varianza		3,767			
		Desv. típ.		1,941			
		Mínimo		3			
		Máximo		8			
		Rango		5			
		Amplitud intercuartil		4			
		Asimetría		,638	,845		
		Curtosis		-1,243	1,741		
		INMOVILIDAD	CONTROL	Media		148,78	1,949
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	144,28	
Límite superior	153,27						
Media recortada al 5%				148,64			
Mediana				147,00			
Varianza				34,194			
Desv. típ.				5,848			
Mínimo				142			
Máximo				158			
Rango				16			
Amplitud intercuartil				10			
Asimetría				,598	,717		
Curtosis				-1,022	1,400		
INMOVILIDAD	RESERPINA			Media		154,83	2,414
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	148,63	
		Límite superior	161,04				
		Media recortada al 5%		155,26			
		Mediana		156,50			
		Varianza		34,967			
		Desv. típ.		5,913			
		Mínimo		143			
		Máximo		159			
		Rango		16			
		Amplitud intercuartil		6			
		Asimetría		-2,234	,845		
		Curtosis		5,221	1,741		

ANEXO IV. DESCRIPTIVOS DEL FORCED SWIMMING TEST_TEST

	CONEXP		Estadístico	Error típ.	
NADAR	CONTROL	Media	14,11	1,338	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	11,03	
			Límite superior	17,20	
		Media recortada al 5%	13,96		
		Mediana	13,00		
		Varianza	16,111		
		Desv. típ.	4,014		
		Mínimo	10		
		Máximo	21		
		Rango	11		
		Amplitud intercuartil	8		
		Asimetría	,716	,717	
		Curtosis	-,878	1,400	
		RESERPINA	Media	4,78	,572
	Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	3,46	
			Límite superior	6,10	
	Media recortada al 5%		4,81		
	Mediana		5,00		
	Varianza		2,944		
	Desv. típ.		1,716		
	Mínimo		2		
	Máximo		7		
	Rango		5		
	Amplitud intercuartil		3		
	Asimetría		-,134	,717	
	Curtosis	-,825	1,400		
CONTROL	Media	3,89	1,486		
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,46		
		Límite superior	7,31		
	Media recortada al 5%	3,54			
	Mediana	2,00			
	Varianza	19,861			
	Desv. típ.	4,457			
	Mínimo	0			
	Máximo	14			
	Rango	14			
	Amplitud intercuartil	6			
	Asimetría	1,652	,717		
	Curtosis	2,966	1,400		

ESCALAR	RESERPINA	Media		1,22	,324		
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,48			
			Límite superior	1,97			
		Media recortada al 5%		1,19			
		Mediana		1,00			
		Varianza		,944			
		Desv. típ.		,972			
		Mínimo		0			
		Máximo		3			
		Rango		3			
		Amplitud intercuartil		2			
		Asimetría		,502	,717		
		Curtosis		-,009	1,400		
		INMOVILIDAD	CONTROL	Media		42,00	1,443
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	38,67	
Límite superior	45,33						
Media recortada al 5%				41,94			
Mediana				43,00			
Varianza				18,750			
Desv. típ.				4,330			
Mínimo				35			
Máximo				50			
Rango				15			
Amplitud intercuartil				6			
Asimetría				,285	,717		
Curtosis				,590	1,400		
RESERPINA	Media				54,00	,441	
	Intervalo de confianza para la media al 95%			Límite inferior	52,98		
			Límite superior	55,02			
	Media recortada al 5%			54,00			
	Mediana			54,00			
	Varianza			1,750			
	Desv. típ.			1,323			
	Mínimo			52			
	Máximo			56			
	Rango			4			
	Amplitud intercuartil			2			
	Asimetría			,000	,717		
Curtosis			-1,248	1,400			

ANEXO V. DESCRIPTIVOS DEL NOVELTY-SUPPRESSED FEEDING TEST

	GRUPO		Estadístico	Error típ.	
TIEMPOCOMER	RES	Media	5,4833	,72251	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3,8172	
			Límite superior	7,1494	
		Media recortada al 5%	5,3626		
		Mediana	5,0500		
		Varianza	4,698		
		Desv. típ.	2,16753		
		Mínimo	3,14		
		Máximo	10,00		
		Rango	6,86		
		Amplitud intercuartil	3,02		
		Asimetría	1,218	,717	
		Curtosis	1,297	1,400	
		AAG	Media	2,8667	,44443
			Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1,8418
	Límite superior			3,8915	
	Media recortada al 5%		2,8224		
	Mediana		2,4200		
	Varianza		1,778		
	Desv. típ.		1,33328		
	Mínimo		1,37		
	Máximo		5,16		
	Rango		3,79		
	Amplitud intercuartil	2,44			
	Asimetría	,693	,717		
Curtosis	-,901	1,400			
RES	Media	,5813	,10913		
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,3297		
		Límite superior	,8330		
	Media recortada al 5%	,5779			
	Mediana	,4894			
	Varianza	,107			
	Desv. típ.	,32739			
	Mínimo	,10			
	Máximo	1,12			
	Rango	1,02			
	Amplitud intercuartil	,51			
	Asimetría	,281	,717		
	Curtosis	-,789	1,400		

AACERCARSEMIN	AAG	Media		1,9715	,30410		
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1,2702			
			Límite superior	2,6727			
		Media recortada al 5%		1,9975			
		Mediana		2,0661			
		Varianza		,832			
		Desv. típ.		,91229			
		Mínimo		,23			
		Máximo		3,24			
		Rango		3,00			
		Amplitud intercuartil		1,36			
		Asimetría		-,592	,717		
		Curtosis		,443	1,400		
		TOCAROLERMIN	RES	Media		,5057	,10507
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,2634	
Límite superior	,7479						
Media recortada al 5%				,4904			
Mediana				,3974			
Varianza				,099			
Desv. típ.				,31520			
Mínimo				,16			
Máximo				1,12			
Rango				,96			
Amplitud intercuartil				,50			
Asimetría				,985	,717		
Curtosis				,298	1,400		
TOCAROLERMIN	AAG			Media		1,3196	,25215
				Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	,7382	
		Límite superior	1,9011				
		Media recortada al 5%		1,3155			
		Mediana		1,3333			
		Varianza		,572			
		Desv. típ.		,75645			
		Mínimo		,23			
		Máximo		2,48			
		Rango		2,24			
		Amplitud intercuartil		1,36			
		Asimetría		,053	,717		
		Curtosis		-,855	1,400		

ANEXO VI. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FOS_DORSAL RAFE

	Condicion		Estadístico	Error típ.	
Fos	AAG	Media	45,78	3,732	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	37,90	
			Límite superior	53,65	
		Media recortada al 5%	45,48		
		Mediana	49,00		
		Varianza	250,654		
		Desv. típ.	15,832		
		Mínimo	19		
		Máximo	78		
		Rango	59		
		Amplitud intercuartil	24		
		Asimetría	-,021	,536	
		Curtosis	-,500	1,038	
		RES_AG	Media	99,13	6,573
			Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	85,04
	Límite superior			113,23	
	Media recortada al 5%		97,31		
	Mediana		90,00		
	Varianza		647,981		
	Desv. típ.		25,455		
	Mínimo		71		
	Máximo		160		
	Rango		89		
	Amplitud intercuartil		37		
	Asimetría		1,161	,580	
	Curtosis		,974	1,121	
	RES_6H		Media	19,53	1,881
			Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	15,54
		Límite superior		23,52	
		Media recortada al 5%	19,14		
		Mediana	18,00		
		Varianza	60,140		
		Desv. típ.	7,755		
		Mínimo	8		
		Máximo	38		
		Rango	30		
Amplitud intercuartil		9			
Asimetría		,990	,550		
Curtosis		1,120	1,063		

ANEXO VII. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FOS_LOCUS COERULEUS

	Condicion		Estadístico	Error típ.	
Fos	AAG	Media	37,06	4,579	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	27,39	
			Límite superior	46,72	
		Media recortada al 5%	35,84		
		Mediana	34,00		
		Varianza	377,467		
		Desv. típ.	19,429		
		Mínimo	13		
		Máximo	83		
		Rango	70		
		Amplitud intercuartil	30		
		Asimetría	,902	,536	
		Curtosis	,366	1,038	
		RES_AG	Media	58,16	3,656
			Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	50,61
	Límite superior			65,71	
	Media recortada al 5%		57,37		
	Mediana		54,00		
	Varianza		334,223		
	Desv. típ.		18,282		
	Mínimo		34		
	Máximo		97		
	Rango		63		
	Amplitud intercuartil		27		
	Asimetría		,557	,464	
	Curtosis		-,717	,902	
	RES_6H		Media	93,95	5,833
			Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	81,74
		Límite superior		106,16	
		Media recortada al 5%	93,56		
		Mediana	95,00		
		Varianza	680,366		
		Desv. típ.	26,084		
Mínimo		54			
Máximo		141			
Rango		87			
Amplitud intercuartil		40			
Asimetría		,133	,512		
Curtosis		-,885	,992		

ANEXO VIII. DESCRIPTIVOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA DE FOS_ÁREA TEGMENTAL VENTRAL

		Condicion		Estadístico	Error típ.	
Fos	AAG	Media		44,25	5,347	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	32,48		
			Límite superior	56,02		
		Media recortada al 5%		44,17		
		Mediana		50,50		
		Varianza		343,114		
		Desv. típ.		18,523		
		Mínimo		17		
		Máximo		73		
		Rango		56		
		Amplitud intercuartil		35		
		Asimetría		-,122	,637	
		Curtosis		-1,387	1,232	
		RES_AG	Media		179,33	7,792
			Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	161,36	
	Límite superior			197,30		
	Media recortada al 5%		180,70			
	Mediana		189,00			
	Varianza		546,500			
	Desv. típ.		23,377			
	Mínimo		131			
	Máximo		203			
	Rango		72			
	Amplitud intercuartil		35			
	Asimetría		-1,202	,717		
	Curtosis		1,053	1,400		
	RES_6H		Media		28,09	2,380
			Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	22,79	
		Límite superior		33,39		
		Media recortada al 5%		28,21		
		Mediana		28,00		
		Varianza		62,291		
		Desv. típ.		7,892		
		Mínimo		14		
		Máximo		40		
		Rango		26		
Amplitud intercuartil		16				
Asimetría		-,342	,661			
Curtosis		-,455	1,279			