

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 138**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09833276 .0**
96 Fecha de presentación: **07.10.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2327299**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2011**

54 Título: **Modelo de roedor de enfermedad para dolor muscular crónico**

30 Prioridad:
16.12.2008 JP 2008319048

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.07.2012

73 Titular/es:
Astellas Pharma Inc.
3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP

72 Inventor/es:
NAGAKURA, Yukinori y
OE, Tomoya

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 385 138 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modelo de roedor de enfermedad para dolor muscular crónico.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un modelo de roedor de enfermedad en el que un dolor crónico, particularmente dolor muscular crónico y/o alodinia táctil crónica, se induce por un tratamiento para disminuir el nivel de aminas biogénicas, y a un procedimiento para cribar un agente terapéutico para un dolor crónico, particularmente fibromialgia, que usa dicho modelo animal de enfermedad.

Técnica anterior

El dolor se define como una sensación desagradable que va acompañada de lesión de tejido existente o se expresa a partir de una experiencia tal, o una experiencia de una acción emocional (Asociación internacional para el estudio del dolor, 1979), y se divide en dolor agudo y dolor crónico.

En el dolor agudo, un estímulo nociceptivo que viola un tejido del cuerpo biológico es la entrada en un nociceptor periférico, convertido en una acción potencial y transferida como un impulso a la médula espinal, en la que es influenciada por diversos sistemas inhibidores tales como sistema descendente, y asciende el sistema de transferencia sensorial y alcanza la corteza cerebral, de manera que es reconocido el dolor agudo. Es decir, el dolor agudo es un dolor fisiológico producido por un estímulo nociceptivo y tiene una significancia como reacción de aviso en el cuerpo biológico. El dolor agudo desaparece por la cancelación del estímulo nociceptivo o curando la lesión.

Por otra parte, el dolor crónico es un dolor que se refiere independientemente de la curación de la lesión del tejido o un dolor que se refiere independientemente de la ausencia de lesión de tejido evidente. Es decir, el dolor crónico es "un dolor que se refiere independientemente de la superación del periodo generalmente necesario para curar la enfermedad, o un dolor relacionado con enfermedades no cancerígenas progresivas".

El dolor crónico no tiene una significancia fisiológica como sistema de aviso del cuerpo biológico a diferencia del caso de dolores agudos y, lo que es más, estropea enormemente calidad de vida de los pacientes. Por tanto, el dolor crónico es una enfermedad independiente y requiere un tratamiento, concretamente eliminación del dolor, pero la mayoría de los casos de dolor crónico son de difícil cura.

La fibromialgia es una enfermedad que tiene un dolor crónico insoportable sistémico como síntoma principal acompañado de diversos síntomas comórbidos tales como insomnio, sensación de fatiga sistémica, síntoma depresivo y similares. Los patrones de diagnóstico del Colegio americano de reumatología son la continuación de un dolor sobre una amplia parte del cuerpo durante 3 meses o más y la presencia de dolor con la palpación en 11 puntos o más entre los 18 puntos sensibles en todo el cuerpo (ligamentos, tendones, músculos y similares en contacto con los huesos). Algunas veces va acompañado de un dolor producido por un estímulo táctil o estímulo frío que generalmente no produce un dolor, llamado alodinia táctil o alodinia fría. Además, también va frecuentemente acompañado de una hiperalgesia térmica en la que se acelera la sensibilidad al estímulo térmico. Como la tasa de prevalencia de la fibromialgia es aproximadamente del 2% de la población, está presente un número considerablemente grande de pacientes. Sin embargo, como no está presente un procedimiento terapéutico suficientemente eficaz, el problema se ha dirigido fuertemente hacia el desarrollo de un nuevo procedimiento terapéutico que tenga alta eficacia.

El mecanismo patofisiológico de la fibromialgia no se ha revelado suficientemente. Como el dolor crónico insoportable sistémico y diversos síntomas comórbidos tales como insomnio, sensación de fatiga sistémica, síntoma depresivo y similares, al igual que las características de fibromialgia, no pueden describirse completamente por una anomalía de nivel periférico, se considera que una anomalía del mecanismo de control del dolor del sistema nervioso central participa en el mecanismo patofisiológico de la fibromialgia (por ejemplo, véase la referencia de no patente 1). En realidad, los resultados de estudios que usaron una obtención de imágenes de resonancia magnética funcional (fRMN) y una tomografía de emisión de un único fotón (SPET) muestran que hay una anomalía en la función cerebral de pacientes con fibromialgia (por ejemplo, véanse las referencias de no patente 2 y 3).

Los cambios cuantitativos y las anomalías funcionales de diversos neurotransmisores, citocinas u hormonas son sugeridos en pacientes con fibromialgia. La concentración de aminoácido excitante, sustancia P o factor de crecimiento nervioso en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con fibromialgia es mayor en comparación con la de los grupos de no paciente. Por otra parte, la concentración de metabolito de serotonina, dopamina o norepinefrina en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con fibromialgia es inferior en comparación con la de los grupos de no paciente (por ejemplo, véase la referencia de no patente 4). Se ha informado que hay una correlación entre la cantidad de aminoácido excitante como un transmisor excitante del cerebro en la ínsula cerebral y el nivel de dolor de pacientes con fibromialgia (por ejemplo, véase la referencia de no patente 5).

Además, se ha informado que hay una anomalía en el mecanismo de liberación de dopamina cerebral para un

estímulo de dolor en pacientes con fibromialgia (por ejemplo, véase la referencia de no patente 4). Citocinas tales como interleucina-1 y factor de necrosis tumoral se han detectado a partir del tejido de piel de pacientes con fibromialgia (por ejemplo, véase la referencia de no patente 6). Además, se ha sugerido que la función de secreción de la hormona de crecimiento o factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) se reduce en pacientes con fibromialgia (por ejemplo, véase la referencia de no patente 4). Por tanto, se ha sugerido la posibilidad de que muchos neurotransmisores, citocinas u hormonas y similares contribuyan al mecanismo patofisiológico de fibromialgia, pero no se ha revelado todavía que el cambio sea la patogénesis causal y cuál es el consiguiente fenómeno. Es decir, todavía no se ha revelado el mecanismo patofisiológico de la fibromialgia (por ejemplo, véase la referencia de no patente 6).

Recientemente se ha informado de que la pregabalina (un ligando del canal de Ca^{2+} nervioso), la duloxetina (una serotonina selectiva y el inhibidor de la recaptación de norepinefrina) o el pramipexol (un agonista de receptores de dopamina) alivian la puntuación de síntomas de dolor de pacientes con fibromialgia estadísticamente significativamente en comparación con el grupo de placebo (por ejemplo, véanse las referencias de no patente 7 a 9).

Sin embargo, los efectos de estos fármacos son limitados y todavía no hay procedimiento terapéutico que sea suficientemente eficaz sobre los síntomas centrados en el dolor de pacientes con fibromialgia. Por consiguiente, hay una fuerte demanda del desarrollo de otro agente terapéutico excelente que tenga efectos suficientes y muestre menos efectos secundarios.

En general, la validez de un modelo animal de enfermedad se evalúa desde el punto de vista de la validez de aspecto (tanto si el modelo como la enfermedad humana se parecen o no sintomáticamente), validez de la construcción (tanto si el modelo se basa o no en el fundamento teórico) y validez predictiva (tanto si los efectos del agente terapéutico guardan relación o no en el entorno del modelo y clínico). Al igual que el modelo animal de enfermedad de dolor crónico que va acompañado de dolor muscular, se ha informado de un procedimiento en el que carragenina o agua ácida se inyectan intramuscularmente (por ejemplo, véanse las referencias de no patente 10 y 11) y un procedimiento en el que se aplica una carga de natación forzada repetida (por ejemplo, véase la referencia de no patente 12). Sin embargo, hasta la fecha no se ha informado de un modelo animal que refleje suficientemente el mecanismo patofisiológico de la fibromialgia desde el punto de vista de la validez de aspecto, validez de la construcción y validez predictiva.

Con respecto a la acción inductora del dolor de la reserpina, hasta la fecha se ha informado de que una administración única intraperitoneal de reserpina produce hipersensibilidad a la estimulación térmica en ratas. Sin embargo, se ha informado de que esta hipersensibilidad a la estimulación térmica es un dolor agudo transitorio que desaparece en el plazo de 24 horas (por ejemplo, véase la referencia de no patente 13). Todavía no se ha informado de la inducción de la generación de un dolor por reserpina durante un largo periodo de tiempo de 1 día o más.

Con respecto a la acción de la reserpina sobre el nivel de aminas biogénicas, se ha informado de que la administración subcutánea repetida de reserpina de 0,5 mg/kg/día durante 2, 7 y 14 días consecutivos induce el agotamiento crónico de catecolamina en prácticamente todas las regiones cerebrales de ratas (véase la referencia de no patente 14). Aunque no se han evaluado sensibilidades nociceptivas por pruebas de comportamiento.

Con respecto al presente uso de animales no humanos para cribar el tratamiento terapéutico del dolor crónico, los efectos de la pregabalina sobre el músculo y la hiperalgesia cutánea en dos modelos de dolor muscular crónico en ratas, el modelo inflamatorio inducido por inyección intramuscular de carragenina y el modelo no inflamatorio inducido por dos inyecciones unilaterales de solución salina ácida en el músculo gemelo (véase la referencia de no patente 15).

Referencia de no patente 1: Nature Clinical Practice Rheumatology, 2006, vol. 2, p. 90 - 97

Referencia de no patente 2: Journal of Rheumatology, 2004, vol. 31, p. 364 - 378

Referencia de no patente 3: American Journal of the Medical Science, 1998, vol. 315, p. 385 - 396

Referencia de no patente 4: Current Opinion in Investigational Drugs, 2007, vol. 16, p. 829 - 841

Referencia de no patente 5: Arthritis & Rheumatism, 2008, vol. 58, p. 903 - 907

Referencia de no patente 6: Joint Bone Spine, 2008, vol. 75, p. 273 - 279

Referencia de no patente 7: The Journal of Rheumatology, 2008, vol. 35, p. 502 - 514

Referencia de no patente 8: Pain, 2008, vol. 136, p. 432 - 444

Referencia de no patente 9: Arthritis & Rheumatism, 2005, vol. 52, p. 2495 - 2505

Referencia de no patente 10: Pain, 2000, vol. 35, p. 333 - 343

Referencia de no patente 11: Muscle & Nerve, 2000, vol. 24, p. 37 - 46

Referencia de no patente 12: Physiology & Behavior, 2006, vol. 88, p. 82 - 87

Referencia de no patente 13: European Journal of Pharmacology, 1982, vol. 83, p. 325 - 328

Referencia de no patente 14: Journal of Neurological Science, 1992, vol. 110, p. 205-214

Referencia de no patente 15: Journal of Pain, 2007, vol. 8, p. 422-429

Divulgación de la invención

Problemas que va a resolver la invención

- 5 Con el fin de crear un agente terapéutico para fibromialgia, es esencial un modelo animal no humano de enfermedad que refleje el mecanismo patofisiológico de fibromialgia desde el punto de vista de la validez de aspecto, validez de la construcción y validez predictiva y que también puede llevar a cabo eficientemente el cribado de una sustancia de prueba. Sin embargo, no se ha informado de un modelo animal no humano de enfermedad que satisfaga completamente tales condiciones.
- 10 Por consiguiente, los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos con el objetivo de desarrollar un modelo animal no humano de enfermedad que genere persistentemente síntomas de dolor crónico de dolor muscular y alodinia táctil y síntomas depresivos, que son síntomas característicos de fibromialgia, y también tenga excelente predictibilidad de efectos clínicos de agentes terapéuticos, y un procedimiento de cribado que use el mismo.

Medios para resolver los problemas

- 20 Como resultado, se encontró que administrando reserpina a un roedor podía generarse dolor muscular crónico y alodinia táctil crónica que es mantenida durante 1 semana o más después de su administración. Además, se confirmó que esta aparición de dolor muscular crónico y alodinia táctil crónica estaba originada por la disminución del nivel de aminas biogénicas producido por la reserpina. Además, se confirmó que el roedor administrado con reserpina generaba persistentemente un síntoma depresivo junto con el dolor muscular crónico y alodinia táctil crónica. Además, se confirmó que la pregabalina, duloxetine y pramipexol, cuya eficacia sobre la fibromialgia se ha confirmado por ensayos clínicos, son eficaces en este modelo animal de enfermedad, pero el diclofenac, que es un agente antiinflamatorio no esteroideo, no es eficaz.

Por tanto, la presente invención se refiere a:

- 30 [1] El uso de un roedor al que se administró reserpina para la inducción de dolor muscular crónico y/o alodinia táctil crónica como modelo animal de enfermedad para dolor crónico.
- [2] El uso descrito en [1], en el que el modelo animal de enfermedad expresa adicionalmente un síntoma de depresión.
- 35 [3] El uso descrito en [1] o [2] en el que el roedor es una rata.
- [4] Un procedimiento para cribar un agente terapéutico de dolor crónico, caracterizado porque una sustancia de prueba se administra al modelo animal de enfermedad descrito en una cualquiera de [1] a [3].
- 40 [5] El procedimiento de cribado descrito en [4], en el que se mide el valor umbral de dolor por presión muscular, el valor umbral de sensación de dolor en la piel, sensibilidad al frío y/o sensibilidad al calor.
- [6] El procedimiento de cribado descrito en [4] o [5], en el que el dolor crónico es fibromialgia.

Efecto de la invención

- 50 Por el tratamiento para disminuir el nivel de aminas biogénicas, el modelo de roedor de enfermedad usado en la presente invención expresa persistentemente síntomas de dolor crónico de dolor muscular y alodinia táctil y expresa un síntoma de depresión como un síntoma comórbido. Este modelo de roedor de enfermedad es excelente en la validez de aspecto en términos de que muestra los síntomas de dolor crónico sostenidos (dolor muscular y alodinia táctil) y también va acompañado del síntoma de depresión. Como la amina biogénica tal como dopamina, norepinefrina, serotonina y similares participan profundamente en la transmisión de la sensación de dolor, la atenuación del mecanismo que controla el dolor por la amina biogénica podría convertirse en un mecanismo patofisiológico de dolor crónico. Es decir, este modelo de roedor de enfermedad es excelente en la validez de la construcción en términos de que la reducción del nivel de aminas biogénicas del sistema nervioso central participa en los síntomas de dolor. Además, este modelo de roedor de enfermedad también es excelente en la validez predictiva en términos de que los agentes cuya eficacia sobre la fibromialgia se ha confirmado por ensayos clínicos son eficaces en su interior y un mero agente antiinflamatorio no esteroideo no es eficaz. Por tanto, dicho modelo de roedor de enfermedad es notablemente útil como modelo de enfermedad de dolores crónicos, particularmente fibromialgia. Por consiguiente, los candidatos para el agente terapéutico de dolores crónicos, particularmente fibromialgia, pueden evaluarse eficazmente por la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica que muestra la influencia de la administración repetida de reserpina en el valor umbral de dolor por presión muscular en rata macho (A) y rata hembra (B).

La Fig. 2 es una gráfica que muestra la influencia de la administración repetida de reserpina en el valor umbral de sensación de dolor en la piel en rata macho (A) y rata hembra (B).

La Fig. 3 es una gráfica que muestra respectivamente las influencias del tratamiento de administración repetida de reserpina en las cantidades de dopamina (A, D y G), norepinefrina (B, E y H) y serotonina (C, F y I) en la médula espinal, tálamo y corteza prefrontal (círculo abierto: grupo de administración de vehículo, círculo cerrado: grupo de administración de 0,1 mg/kg, triángulo invertido cerrado, grupo de administración de 0,3 mg/kg, triángulo cerrado: grupo de administración de 1 mg/kg).

La Fig. 4 es una gráfica que muestra el tiempo de inmovilidad en una prueba de natación forzada en el 1º día (A), 3º día (B), 5º día (C), 7º día (D) y 14º día (E) después de la administración repetida de reserpina.

La Fig., 5 es una gráfica que muestra respectivamente los efectos de pregabalina (A y B), duloxetine (C y D), pramipexol (E y F) y diclofenac (G y H) sobre la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular y reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel, que se indujeron por administración de reserpina repetida.

La Fig. 6 es una gráfica que muestra las influencias del tratamiento de una administración única de reserpina en el valor umbral de dolor por presión muscular (A), valor umbral de sensación de dolor en la piel (B), sensibilidad al frío (C) y sensibilidad al calor (D).

La Fig. 7 es una gráfica que muestra respectivamente las influencias de la administración única de vehículo (círculo abierto) y la administración única de reserpina (círculo cerrado) en la cantidad de dopamina (A), norepinefrina (B), serotonina (C), DOPAC (D), MHPG (E) y 5-HIAA (F) en la médula espinal.

La Fig. 8 es una gráfica que muestra respectivamente las influencias de la administración única de vehículo (círculo abierto) y la administración única de reserpina (círculo cerrado) en la cantidad de dopamina (A), norepinefrina (B), serotonina (C), DOPAC (D), MHPG (E) y 5-HIAA (F) en el tálamo.

La Fig. 9 es una gráfica que muestra respectivamente las influencias de la administración única de vehículo (círculo abierto) y la administración única de reserpina (círculo cerrado) en la cantidad de dopamina (A), norepinefrina (B), serotonina (C), DOPAC (D), MHPG (E) y 5-HIAA (F) en la corteza prefrontal.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

Lo siguiente describe la presente invención adicionalmente en detalle. Ejemplos del roedor que va a usarse en la presente invención incluyen roedores tales como rata, ratón, jerbo de Mongolia, cobaya, hámster y similares.

Macho o hembra, semanas de edad, peso corporal, la presencia o ausencia de administración y similares de roedores no están particularmente limitados, en tanto que puedan emplearse en la preparación del modelo de roedor de enfermedad de interés y en el cribado de una sustancia de prueba.

La amina es un término general de compuestos en los que el átomo de hidrógeno del amoníaco (NH₃) está sustituido con un grupo hidrocarburo tal como un grupo alquilo y similares. Amina biogénica significa una amina biosintetizada *in vivo*, y ejemplos de las mismas incluyen una catecolamina, una indolamina y una imidazolamina. Ejemplos de la catecolamina incluyen dopamina, norepinefrina (noradrenalina) y epinefrina (adrenalina). Ejemplos de la indolamina incluyen serotonina y melatonina. Ejemplos de la imidazolamina incluyen histamina.

Un tratamiento para reducir el nivel de aminas biogénicas es un tratamiento para reducir el nivel de aminas en un mamífero, y ejemplos del mismo incluyen administración de un agente que reduce el nivel de aminas biogénicas. Ejemplos del agente que reduce el nivel de aminas biogénicas incluyen un inhibidor de transportadores vesiculares de monoaminas, un inhibidor de los nervios simpáticos, un inhibidor de la biosíntesis de aminas biogénicas y una neurotoxina. Ejemplos del inhibidor de transportadores vesiculares de monoaminas incluyen reserpina y tetrabenazina. Ejemplos del inhibidor de los nervios simpáticos incluyen guanetidina, bretilio y α -metildopa. Ejemplos del inhibidor de la biosíntesis de aminas biogénicas incluyen p-clorofenilalanina, α -metiltirosina y carbidopa. Ejemplos de la neurotoxina incluyen 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT) y N-(cloroetil)-N-etil-2-bromobencilamina (DSP-4).

El procedimiento para administrar reserpina que reduce el nivel de aminas biogénicas e induce dolor muscular crónico y/o alodinia táctil crónica se ajusta opcionalmente según la especie y el peso corporal del animal y propiedades del agente. La administración puede ser tanto una administración única como administración repetida (administración de dos o más veces dejando hueco durante un cierto periodo de tiempo). Por ejemplo, en el caso de la administración repetida, la administración puede llevarse a cabo una vez o dos o más veces al día durante 2 días a 1 mes. La vía de administración incluye administración subcutánea, administración intraperitoneal, administración por vía oral y similares, aunque no se limitan a éstas. La dosis se ajusta opcionalmente según la especie y peso corporal del animal, vía de administración, propiedades del agente y similares. Por ejemplo, es preferible de 0,3 mg/kg a 1 mg/kg cuando la reserpina se administra subcutáneamente repetidamente a la rata una vez al día durante 3 días. Por tanto, es preferible de 1 mg/kg a 3 mg/kg en el caso de administración única de reserpina a la rata. Como disolvente de administración puede usarse agua, solución salina fisiológica y similares, aunque no se limitan a éstos.

La administración puede llevarse a cabo usando una jeringuilla y similares, aunque no se limita a este procedimiento.

El dolor crónico es un dolor que es referido por un paciente independientemente de superar el periodo de tiempo generalmente requerido para curar la enfermedad o un dolor relacionado con enfermedades no cancerígenas progresivas. Aunque el dolor crónico continúa generalmente durante 3 a 6 meses o más en el caso del ser humano, no es apropiado aplicar la duración del dolor de tal ser humano a otros mamíferos que tienen periodos de vida diferentes del ser humano. En el caso de roedores que tienen un periodo de vida de aproximadamente 1 a 3 años, un dolor que es generalmente mantenido durante varios días o más puede considerarse un dolor crónico.

El dolor crónico en el modelo de roedor de enfermedad para su uso en la presente invención puede evaluarse por un valor umbral de dolor por presión muscular que es un índice del dolor muscular crónico y/o por la reducción de un valor umbral de sensación de dolor en la piel que es un índice de alodinia táctil. Además, el dolor crónico también puede evaluarse por la reducción del valor umbral de reacción para una estimulación mecánica tal como una estimulación plantar por un Randall-Selitto y una estimulación por pellizco, reducción del umbral de reacción para una estimulación térmica, reducción del umbral de reacción para estimulación por frío, reducción de umbral de reacción para estimulación eléctrica, aumento del comportamiento de dolor para estimulación química, aumento del comportamiento de dolor espontáneo tal como comportamiento de elevación de las patas en ausencia de una estimulación y similares. Sin embargo, los procedimientos de evaluación de dolores crónicos no se limitan a éstos.

Por ejemplo, el dolor crónico puede evaluarse por la medición de uno o dos o más de un valor umbral de dolor por presión muscular que se convierte en el índice del dolor muscular crónico; reducción de un valor umbral de sensación de dolor en la piel que se convierte en el índice de alodinia táctil; sensibilidad al frío que se convierte en el índice de alodinia fría; y sensibilidad al calor que se convierte en el índice de hiperalgesia térmica.

El valor umbral de dolor por presión muscular es una magnitud de la estimulación por presión mínima a la que un animal genera una reacción de retirada cuando una estimulación por presión gradualmente creciente se aplica a un músculo, y al igual que su medición, pueden usarse diversos procedimientos convencionalmente conocidos seleccionándolos según la especie de animal. Por ejemplo, en el caso de rata, puede medirse mediante el procedimiento de Schafers y col. como se muestra más adelante en los ejemplos, es decir, el tamaño de estimulación por presión mínima al que la rata muestra una reacción de retirada se usa como el valor umbral de dolor por presión muscular, añadiendo una estimulación por presión gradualmente creciente al músculo gemelo de la pata trasera derecha.

El valor umbral de sensación de dolor en la piel es una magnitud de la estimulación táctil mínima a la que un animal genera una reacción de retirada cuando una estimulación táctil gradualmente creciente se aplica a la piel, y al igual que su medición, pueden usarse diversos procedimientos convencionalmente conocidos seleccionándolos según la especie de animal. Por ejemplo, en el caso de rata, por el procedimiento de pelo de von Frey como se muestra más adelante en los ejemplos, filamentos de von Frey que tienen diferentes diámetros se aplican a la superficie plantar de la pata trasera derecha por el procedimiento de pelo de von Frey como se muestra más adelante en los ejemplos, y el filamento de diámetro mínimo al que la rata muestra una reacción de retirada se mide como el valor umbral de dolor de piel.

La sensibilidad al frío es la reactividad de un animal cuando un estímulo frío se añade al mismo, y al igual que su medición, diversos procedimientos convencionalmente conocidos pueden usarse seleccionándolos según la especie de animal. Por ejemplo, en el caso de rata, como se muestra más adelante en los ejemplos, puede medirse como el número de reacciones cuando se aplica acetona a las patas traseras de la rata por el procedimiento de acetona.

La sensibilidad al calor es la reactividad de un animal cuando un estímulo de calor se añade al mismo, y al igual que su medición, diversos procedimientos convencionalmente conocidos pueden usarse seleccionándolos según la especie de animal. Por ejemplo, en el caso de rata, como se muestra más adelante en los ejemplos, puede medirse mediante el procedimiento de Hargreaves y col., como la ocultación por reacción de retirada de la pata trasera cuando la pata trasera de una rata se estimula con calor de infrarrojos.

Por otra parte, el síntoma depresivo puede evaluarse usando, como índice, el aumento del tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada. Sin embargo, la medición del síntoma depresivo no se limita a este índice, y además de éste, el tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola, actividad motora espontánea y similares también pueden usarse como índice.

En el procedimiento de cribado de la presente invención, la administración de una sustancia de prueba puede llevarse a cabo en cualquier momento después del tratamiento para inducir dolor muscular crónico y/o alodinia táctil crónica. Por ejemplo, se administra en el plazo de 1 semana después de completarse el tratamiento. Por ejemplo, el efecto de una sustancia de prueba puede evaluarse administrándola durante un periodo opcional desde el 3º día hasta el 7º día después de la administración repetida de reserpina a un roedor, durante el cual el valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel son significativamente reducidos (Ejemplo 1) y el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada como índice de síntoma depresivo es

significativamente reducido (Ejemplo 3). Además, su efecto puede evaluarse administrando la sustancia de prueba durante un periodo opcional desde el 2º día hasta el 10º día después de la administración única de reserpina a un roedor, durante el cual el valor umbral de dolor por presión muscular, el valor umbral de sensación de dolor en la piel y la sensibilidad al frío son significativamente acelerados (Ejemplo 5).

5 Como sustancia de prueba puede usarse un compuesto sintético convencionalmente conocido o novedoso, un producto natural, un anticuerpo, un ácido nucleico, un péptido, una proteína y similares, además de un extracto de tejido biológico, un sobrenadante de cultivo celular y similares.

10 La administración de una sustancia de prueba se lleva a cabo según las características de la sustancia de prueba, por administración por vía oral, administración intravenosa, administración percutánea, administración intraperitoneal, administración intratecal, administración intracerebroventricular y similares. La sustancia de prueba se administra generalmente usando un disolvente de administración. Por ejemplo, si la sustancia de prueba se administra por vía oral, se prefiere un procedimiento en el que se disuelva o suspenda en agua, un disolvente orgánico o similares, y se administra forzosamente usando una jeringuilla, un cuentagotas o similares.

15 En la realización del procedimiento de cribado de la presente invención se desea usar un grupo de control en el que solución salina fisiológica, agua destilada o similares solos en lugar de la sustancia de prueba como un grupo de control comparativo con el que se compara el grupo administrado con la sustancia.

20 Ejemplos

Lo siguiente describe la presente invención adicionalmente en detalle basándose en los ejemplos, aunque la presente invención no se limita a estos ejemplos.

25 Ejemplo 1 Influencia de administración repetida de reserpina en el valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel

30 1. Procedimientos de prueba

Se usaron ratas Sprague-Dawley macho y hembra (Japan SLC, Hamamatsu, Japón).

La medición del valor umbral de dolor por presión muscular se llevó a cabo según el procedimiento de Schafers y col. (Schafers M. y col., Pain, 104, 579 - 588, 2003). Un estímulo por presión de gradualmente creciente a 250 g como máximo se añadió al músculo gemelo de la pata trasera derecha de la rata. La magnitud del estímulo por presión mínimo al que la rata muestra reacción de retirada del estímulo por presión de la pata trasera derecha se midió como el valor umbral de dolor por presión muscular (g). La medición se llevó a cabo 3 veces en cada momento de tiempo de la medición, y el promedio se usó como valor de medición. La medición del valor umbral de sensación de dolor en la piel se llevó a cabo según el procedimiento de Chaplan y col. (Chaplan y col., J. Neurosci. Methods, 53, 55 - 63, 1994). Éste se midió usando una serie de filamentos de von Frey que tenían diferentes diámetros que podían añadir una presión constante. Después de la adaptación de cada rata a una jaula de fondo de malla de alambre para la medición, el filamento de von Frey (0,42, 0,74, 1,2, 2,1, 3,5, 6,0, 9,3 ó 15,8 g) se aplicó a la superficie plantar de la pata trasera derecha de la rata hasta que se produjo la reacción de retirada en la pata trasera derecha o no se produjo la reacción con un lapso de 6 segundos. El filamento de von Frey se aplicó usando el procedimiento de arriba y abajo. Es decir, aplicando en primer lugar un filamento de diámetro medio, se aplicó un filamento que tenía un diámetro de menor rango cuando la reacción de retirada se observó o se aplicó un filamento que tenía un diámetro de mayor rango cuando no se observó la reacción de retirada. El valor umbral de sensación de dolor en la piel en cada momento de tiempo de la medición se calculó como un valor umbral de reacción de retirada de la pata trasera (g) usando la fórmula de cálculo informada por Chaplan y col. (Chaplan y col., descrito anteriormente). Las influencias de la reserpina en el valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel se examinaron por el siguiente protocolo. Se usaron un total de 24 animales para cada una de las ratas macho y hembra. Después de medir el valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel antes del tratamiento con reserpina (línea base), basándose en la dosis de administración de reserpina se dividieron en un grupo de disolvente (0,5% de disolución acuosa de ácido acético), un grupo de 0,1 mg/kg de reserpina, un grupo de 0,3 mg/kg y un grupo de 1 mg/kg (el número de animales por grupo fue 6). El disolvente o la reserpina se administraron subcutáneamente en el lomo de las ratas de cada grupo una vez al día durante 3 días. Todo el volumen de administración del disolvente o reserpina se fijó a 1 ml por 1 kg de peso corporal de cada animal. Después de la administración final del disolvente o reserpina, el valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel de cada rata se midieron 1, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días después. La medición del valor umbral de dolor por presión muscular y del valor umbral de sensación de dolor en la piel se llevó a cabo por los experimentadores que no conocían las dosis de administración de reserpina a los animales.

65 Todos los valores medidos se expresaron como valor promedio \pm error estándar. La prueba de significancia estadística de los valores medidos entre los grupos de administración de reserpina y el grupo de administración de disolvente en cada momento de tiempo se llevó a cabo por un análisis bilateral de la varianza y el método de

Bonferroni. El valor de probabilidad (P) inferior al 5% se juzgó como estadísticamente significativo ($P < 0,05$ se expresó como * en las gráficas).

2. Resultados

5

(1) Valor umbral de dolor por presión muscular

Los resultados en machos y hembras se muestran respectivamente en la Fig. 1A y la Fig. 1B. El tratamiento con reserpina redujo significativamente el valor umbral de dolor por presión muscular en ratas tanto macho como hembra (análisis bilateral de la varianza). El valor umbral de dolor por presión muscular fue notablemente reducido en el grupo de 1 mg/kg de reserpina. En comparación con el grupo de disolvente, el valor umbral de dolor por presión muscular en el grupo de 1 mg/kg de reserpina fue estadísticamente significativamente bajo hasta 10 días después de la administración final de reserpina en ratas macho, y hasta 7 días después de la administración final de reserpina en ratas hembra (análisis bilateral de la varianza y método de Bonferroni).

15

Los resultados anteriores revelaron que la administración subcutánea repetida de 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante 3 días induce reducción suficiente y persistente del valor umbral de dolor por presión muscular en ratas macho y hembra. Esta acción farmacológica inductora de dolor muscular persistente de la reserpina no se ha informado hasta ahora, pero se encontró recientemente por este ejemplo.

20

(2) Valor umbral de sensación de dolor en la piel

Los resultados en machos y hembras se muestran respectivamente en la Fig. 2A y la Fig. 2B. El tratamiento con reserpina redujo significativamente el valor umbral de sensación de dolor en la piel en ratas tanto macho como hembra (análisis bilateral de la varianza). El valor umbral de sensación de dolor en la piel fue notablemente reducido en el grupo de 1 mg/kg de reserpina. En comparación con el grupo de disolvente, el valor umbral de sensación de dolor en la piel en el grupo de 1 mg/kg de reserpina fue estadísticamente significativamente bajo hasta 21 días después de la administración final de reserpina en ratas macho, y hasta 14 días después de la administración final de reserpina en ratas hembra (análisis bilateral de la varianza y método de Bonferroni).

30

Los resultados anteriores revelaron que la administración subcutánea repetida de 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante 3 días induce reducción suficiente y persistente del valor umbral de sensación de dolor en la piel en ratas macho y hembra (alodinia táctil: un dolor generado por un estímulo táctil que generalmente no produce dolor). Esta acción farmacológica de la reserpina a reducir persistentemente el valor umbral de sensación de dolor en la piel no se ha informado hasta ahora, pero se encontró recientemente por este ejemplo. Es decir, como se generan síntomas de dolor crónico de dolor muscular coherente y alodinia táctil, los resultados anteriores de (1) y (2) mostraron que este modelo animal de enfermedad es excelente desde el punto de vista de la validez de aspecto.

35

Ejemplo 2 Influencias de la administración repetida de reserpina en las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en la médula espinal, tálamo y corteza prefrontal

40

1. Procedimientos de prueba

Como animal se usaron ratas Sprague-Dawley macho (7 semanas de edad, Japan SLC, Hamamatsu, Japón).

45

Un total de 96 ratas se dividieron en 8 programas de muestra (recogida de muestras antes de la administración y 1, 3, 5, 7, 10, 14 ó 21 días después de la administración final) y cada uno de ellos se dividió adicionalmente en un grupo de administración de vehículo (0,5% de disolución acuosa de ácido acético), un grupo de administración de 0,1 mg/kg de reserpina, un grupo de administración de 0,3 mg/kg y un grupo de administración de 1 mg/kg, a 3 ratas por grupo. Como se muestra en el Ejemplo 1, el vehículo o 0,1, 0,3 ó 1 mg/kg de reserpina se administraron repetidamente a cada rata una vez al día durante 3 días, y el cerebro y la médula espinal se recogieron rápidamente 1, 3, 5, 7, 10, 14 ó 21 días después de la administración final. El tálamo y la corteza prefrontal se separaron del cerebro en un disco frío con hielo.

50

Con respecto al muestreo antes de la administración, las muestras se recogieron antes de empezar la administración repetida de vehículo o reserpina. Las muestras recogidas se congelaron rápidamente y se guardaron a -80°C hasta su uso en las mediciones. El día de la medición, tejidos de muestras respectivas se sometieron a medición del peso en húmedo, se homogeneizaron en ácido perclórico 0,2 M/disolución de EDTA-2Na 0,1 mM usando un homogeneizador ultrasónico. Después de la centrifugación a 15.000 g y a 4°C durante 15 minutos, el sobrenadante se ajustó a pH 3,5 usando acetato sódico y se filtró usando un filtro. Las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en estas muestras se midieron usando una cromatografía líquida de alta resolución (columna: SC-50DS 30, 150 mm, Eicom Co., Ltd., Kyoto, Japón, composición de la fase móvil: tampón acetato sódico 0,1 M, tampón citrato 0,1 M, pH 3,5, 5 mg/l de EDTA-2Na, 190 mg/l de ácido octanosulfónico de sodio, 17% de metanol) y un detector electroquímico (ECD-300, Eicom Co., Ltd., Kyoto, Japón). La medición se llevó a cabo en condiciones de velocidad de flujo 0,5 ml/min, voltaje aplicado 750 mV y 25°C . Las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en las muestras se cuantificaron comparando áreas pico de muestras de patrones

65

respectivos medidos el mismo día de la medición de muestras. Todos los valores medidos se expresaron como valor promedio \pm error estándar en las gráficas, y la unidad de los valores medidos se fijó a ng/g de peso húmedo de tejido.

- 5 La diferencia estadística de los valores medidos entre el grupo de administración de reserpina y el grupo de administración de vehículo en cada programa de prueba se llevó a cabo por el análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni. El valor de probabilidad (P) inferior al 5% se juzgó como estadísticamente significativo (P < 0,05 se expresó como * en las gráficas). Además, los valores promedio de grupos respectivos en cada momento de tiempo se expresaron como porcentajes de los valores promedio de grupos de administración de vehículo correspondientes.

2. Resultados

15 Los efectos de la administración de reserpina sobre las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en la médula espinal se muestran respectivamente en la Fig. 3A, la Fig. 3B y la Fig. 3C, los efectos de la administración de reserpina sobre las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en el tálamo se muestran respectivamente en la Fig. 3D, la Fig. 3E y la Fig. 3F y los efectos de la administración de reserpina sobre las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en la corteza prefrontal se muestran respectivamente en la Fig. 3 g, la Fig. 3H y la Fig. 3I.

20 En la médula espinal, por la administración de 0,1, 0,3 y 1 mg/kg de reserpina, la cantidad de dopamina 1 día después se redujo al 46,4%, 26,3% y 18,4% del grupo de administración de vehículo, y todas fueron una reducción significativa en comparación con el grupo de administración de vehículo. Del mismo modo, la cantidad de norepinefrina se redujo al 19,1%, 2,6% y 0,6%, y todas fueron una reducción significativa. Por tanto, la cantidad de serotonina se redujo al 45,4%, 15,7% y 0,1%, y todas fueron una reducción significativa. Después, las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina se aumentaron gradualmente. Sin embargo, las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina después de 21 días en el grupo de administración de 1 mg/kg de reserpina fueron el 70,1%, 59,4% y 67,8%, respectivamente, del grupo de administración de vehículo, y todas fueron significativamente bajas en comparación con el grupo de administración de vehículo. Es decir, se reveló que la administración repetida de 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante 3 días reduce notablemente y persistentemente las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en la médula espinal de rata.

35 En el tálamo, por la administración de 0,1, 0,3 y 1 mg/kg de reserpina, la cantidad de dopamina 1 día después se redujo al 49,2%, 53,2% y 24,5% del grupo de administración de vehículo, y todas fueron una reducción significativa en comparación con el grupo de administración de vehículo. Del mismo modo, la cantidad de norepinefrina se redujo al 43,8%, 6,1% y 1,2%, y todas fueron una reducción significativa. Por tanto, la cantidad de serotonina se redujo al 28,8%, 14,8% y 8,9%, y todas fueron una reducción significativa. Después, todas las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina se aumentaron gradualmente. Sin embargo, las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina después de 21 días en el grupo de administración de 1 mg/kg de reserpina fueron 66,5%, 46,0% y 60,7%, respectivamente, del grupo de administración de vehículo, y todas fueron significativamente menores en comparación con el grupo de administración de vehículo. Es decir, se reveló que la administración repetida de 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante 3 días reduce notablemente y persistentemente las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en el tálamo de rata.

45 En la corteza prefrontal, la administración de 0,1, 0,3 y 1 mg/kg de reserpina, la cantidad de dopamina 1 día después se redujo al 49,1%, 21,4% y 13,4% del grupo de administración de vehículo, y todas fueron una reducción significativa en comparación con el grupo de administración de vehículo. Del mismo modo, la cantidad de norepinefrina se redujo al 10,2%, 0,7% y 0,2%, y todas fueron una reducción significativa. Por tanto, la cantidad de serotonina se redujo al 42,0%, 15,5% y 4,6%, y todas fueron una reducción significativa. Después, todas las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina se aumentaron gradualmente. Sin embargo, las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina después de 21 días en el grupo de administración de 1 mg/kg de reserpina fueron el 54,9%, 29,1% y 47,0%, respectivamente, del grupo de administración de vehículo, y todas fueron significativamente menores en comparación con el grupo de administración de vehículo. Es decir, se reveló que la administración repetida de 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante 3 días reduce notablemente y persistentemente las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina en la corteza prefrontal de rata.

60 La dopamina, norepinefrina y serotonina participan en la transmisión de la sensación de dolor, y la médula espinal, el tálamo y la corteza prefrontal son las principales regiones responsables de la transmisión de la sensación de dolor. Por consiguiente, estos resultados muestran que la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel mostrados en el Ejemplo 1 se inducen por la reducción del nivel de aminas biogénicas en las regiones relacionados con la ruta de la transmisión de la sensación de dolor. Es decir, se mostró que este modelo animal de enfermedad es excelente en la validez de la construcción desde el punto de vista de que la reducción del nivel de aminas biogénicas en el sistema nervioso central asociada a la transmisión de dolor participa en esto como un mecanismo de patogénesis del dolor.

65

Ejemplo 3 Influencia de la administración repetida de reserpina en el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada

1. Procedimientos de prueba

5 Como animal se usaron ratas Sprague-Dawley macho (7 semanas de edad, Japón SLC, Hamamatsu, Japón). La prueba de natación forzada se llevó a cabo modificando el procedimiento de Porsolt y col. (1977) del siguiente modo. Un alambre suave equipado con un imán (1 mm de diámetro, 3 mm de longitud) se unió a ambas extremidades delanteras de cada animal, y el animal se dejó que nadara en un baño de agua de plástico cilíndrico (20 cm de diámetro, 45 cm de altura) lleno de agua ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) a una profundidad de 30 cm. En esta prueba, el tiempo de inmovilidad de cada animal se midió usando un dispositivo de medición automático de natación forzada (versión 1.06 de prueba de arañazos MicroAct; Neuroscience, Tokio, Japón) que detecta el movimiento de las extremidades delanteras equipadas con el imán mediante una bobina alrededor del cilindro.

15 La influencia de la reserpina en el tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada se examinó según el siguiente protocolo. Un total de 80 ratas se dividieron en 5 programas de muestra (medición del tiempo de inmovilidad después de 1, 3, 5, 7 ó 14 días de la administración final) y cada uno de ellos se dividió adicionalmente en un grupo de administración de vehículo (0,5% de disolución acuosa de ácido acético) y un grupo de administración de 1 mg/kg de reserpina, a 8 ratas por grupo. Como se muestra en el Ejemplo 1, el vehículo o 1 mg/kg de reserpina se administraron repetidamente subcutáneamente una vez al día durante 3 días. Una prueba de natación forzada incluyó una sesión de prueba previa (15 minutos de nado) y una sesión de prueba (5 minutos de nado) 24 horas después de la sesión de prueba previa, y la medición del tiempo de inmovilidad se llevó a cabo en la sesión de prueba. La sesión de prueba previa se llevó a cabo después de 0 (es decir, justo después de la administración final), 2, 4, 6 y 13 días de la administración final del vehículo o reserpina, y la sesión de prueba se llevó a cabo después de 1, 3, 5, 7 y 14 días de la administración final del vehículo o reserpina. Cada rata se sometió a sólo una prueba de natación forzada. Todos los valores medidos se expresaron como valor promedio \pm error estándar. La diferencia estadística de los valores medidos entre los grupos de administración de reserpina y el grupo de administración de vehículo en cada programa de prueba se llevó a cabo por la prueba de la t de Student. El valor de probabilidad (P) inferior al 5% se juzgó como estadísticamente significativo ($P < 0,05$ se expresó como * en las gráficas).

2. Resultados

35 Los resultados de las pruebas de natación forzada después de 1, 3, 5, 7 y 14 días de la administración final de reserpina se muestran en la Fig. 4A, la Fig. 4B, la Fig. 4C, la Fig. 4D y la Fig. 4E, respectivamente. No se encontraron aumentos significativos en el tiempo de inmovilidad por la administración de reserpina después de 1 día de la administración final ($P = 0,625$, prueba de la t de Student). Por otra parte, el grupo de administración de reserpina mostró un aumento significativo en el tiempo de inmovilidad en comparación con el grupo de administración de vehículo después de 3, 5, 7 y 14 días de la administración final (respectivamente $P = 0,0007$, $P = 0,004$, $P < 0,0001$ y $P = 0,0008$, prueba de la t de Student). Los resultados anteriores muestran que la administración repetida de 1 mg/kg de reserpina una vez al día durante 3 días induce un síntoma depresivo al menos durante el periodo de 3 a 14 días de la administración final. Como es muy sabido que pacientes con fibromialgia presentan depresión como síntoma comórbido a una alta tasa, se muestra que el modelo animal de enfermedad tiene una alta similitud con los pacientes con fibromialgia desde el punto de vista de que presenta un síntoma depresivo como un síntoma comórbido. Es decir, se mostró que el modelo animal de enfermedad es excelente desde el punto de vista de la validez de aspecto debido a que el síntoma de dolor iba acompañado de un síntoma depresivo.

Ejemplo 4 Evaluación de los efectos de fármacos en la reducción inducida por la administración repetida de reserpina del valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel

1. Procedimientos de prueba

55 Como animal se usaron ratas Sprague-Dawley macho (Japan SLC, Hamamatsu, Japón). Un total de 30 ratas se usaron para cada fármaco. Como se muestra en el Ejemplo 1, 1 mg/kg de reserpina se administró repetidamente subcutáneamente en el lomo de 24 ratas una vez al día durante 3 días para inducir la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel. Las otras 6 ratas se sometieron a la prueba como un grupo de control sano sin llevar a cabo el tratamiento con reserpina.

60 Todas las evaluaciones de los efectos del fármaco se llevaron a cabo 5 días después de la administración final de reserpina. En este momento, la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel fueron niveles sorprendente y estadísticamente significativos (Ejemplo 1) y el tiempo de inmovilidad en el momento de la prueba de natación forzada, como índice de un síntoma depresivo, fue significativamente prolongado en comparación con el grupo de control (Ejemplo 3).

65 El día de la evaluación del efecto del fármaco (5 días después de la administración final de reserpina), el valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel fueron en primer lugar

medidos en todas las ratas (24 ratas tratadas con reserpina y 6 ratas sanas). Las 24 ratas tratadas con reserpina se dividieron en 4 grupos basándose en las dosis del fármaco de prueba y el valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel se midieron después de 30, 60, 120 ó 240 minutos de la administración del fármaco o disolvente. En las 6 ratas sanas, la administración del fármaco no se llevó a cabo, pero sólo se llevó a cabo la medición del valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel. La medición de los efectos del fármaco se llevó a cabo por experimentadores que no conocían las dosis de tratamiento con fármaco de los animales. Los disolventes, las dosis de administración y las vías de administración de los fármacos de prueba respectivos se muestran en la siguiente tabla

Fármaco de prueba	Disolvente	Vía de administración	Dosis de administración
Pregabalina	Agua destilada	Administración por vía oral	0, 3, 10, 30 mg/kg
Duloxetina	Agua destilada	Administración por vía oral	0, 3, 10, 30 mg/kg
Pramipexol	Solución salina fisiológica	Administración subcutánea	0, 0,1, 0,3, 1 mg/kg
Diclofenac	0,5% de metilcelulosa	Administración por vía oral	0, 1, 3, 10 mg/kg

Todos los valores medidos se expresaron como valor promedio \pm error estándar. La prueba de significancia estadística de los valores medidos entre los grupos de administración de fármaco de prueba y el grupo de administración de disolvente en cada momento de tiempo se llevó a cabo por un análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni. El valor de probabilidad (P) inferior al 5% se juzgó como estadísticamente significativo ($P < 0,05$ se expresó como * en las gráficas).

2. Resultados

Los efectos de la pregabalina en la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular inducida por la administración repetida de reserpina y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel se muestran respectivamente en la Fig. 5A y la Fig. 5B. La pregabalina recuperó dependientemente de la dosis la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular inducida por la administración repetida de reserpina y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel. El efecto de la pregabalina fue estadísticamente significativo a una dosis de 10 ó 30 mg/kg por el índice de valor umbral de dolor por presión muscular, y a una dosis de 30 mg/kg por el índice de valor umbral de sensación de dolor en la piel (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Este resultado muestra que el efecto útil de la pregabalina, cuya utilidad se ha demostrado por un ensayo clínico en pacientes con fibromialgia (Mease PJ y col., J. Rheumatol., 35, 502 - 514, 2008), puede detectarse por el modelo animal de enfermedad.

Los efectos de la duloxetina en la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular inducida por la administración repetida de reserpina y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel se muestran respectivamente en la Fig. 5C y la Fig. 5D. La duloxetina recuperó estadísticamente significativamente la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular inducida por la administración repetida de reserpina a una dosis de 30 mg/kg (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). La duloxetina mostró una tendencia a recuperar la reducción del valor umbral de sensación de dolor de la piel inducida por la administración repetida de reserpina, pero no fue estadísticamente significativa (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Este resultado muestra que el efecto útil de la duloxetina, cuya utilidad se ha demostrado por un ensayo clínico en pacientes con fibromialgia (Russell IJ y col., dolor, 136, 432 - 444, 2008), puede detectarse por el modelo animal de enfermedad.

Los efectos de pramipexol en la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular inducida por la administración repetida de reserpina y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel se muestran respectivamente en la Fig. 5E y la Fig. 5F. El pramipexol recuperó dependientemente de la dosis la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular inducida por la administración repetida de reserpina y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel. El efecto del pramipexol fue estadísticamente significativo a una dosis de 0,3 ó 1 mg/kg por el índice de valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Este resultado muestra que el efecto útil del pramipexol, cuya utilidad se ha demostrado por un ensayo clínico en pacientes con fibromialgia (Holman AJ y Myers RR, Arthritis Rheum., 52, 2495 - 2505, 2005), puede detectarse por el modelo animal de enfermedad.

Los efectos de un agente antiinflamatorio no esteroideo, diclofenac, en la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular inducida por la administración repetida de reserpina y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel se muestran respectivamente en la Fig. 5G y la Fig. 5H. El diclofenac hasta la dosis de 10 mg/kg no recuperó la reducción del valor umbral de dolor por presión muscular inducida por la administración repetida de reserpina y la reducción del valor umbral de sensación de dolor en la piel. El efecto del diclofenac no fue estadísticamente significativo por el índice de valor umbral de dolor por presión muscular y el valor umbral de sensación de dolor en la piel (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Este resultado está de acuerdo con los hallazgos de que los agentes antiinflamatorios no esteroideos ibuprofeno (Yunus MB y col., J

Rheumatol, 16, 527 - 532, 1989) y naproxeno (Goldenberg DL y col., Arthritis Rheum, 29, 1371 - 1377, 1986) no tienen un efecto significativo en el tratamiento de pacientes con fibromialgia, mostrando así que el modelo animal de enfermedad no detecta no específicamente efectos de analgésicos.

5 Los resultados de la evaluación de los cuatro fármacos de prueba anteriormente mencionados mostraron que el modelo animal de enfermedad tiene una alta predictibilidad en el efecto clínico de fármacos de prueba en los pacientes con enfermedad de dolor crónico tales como de fibromialgia. Es decir, el modelo animal de enfermedad es excelente en la validez predictiva.

10 Ejemplo 5 Influencia de la administración única de reserpina en el valor umbral de dolor por presión muscular, valor umbral de sensación de dolor en la piel, sensibilidad al frío y sensibilidad al calor

1. Procedimientos de prueba

15 Se usaron ratas Sprague-Dawley macho (Japan SLC, Hamamatsu, Japón). La medición del valor umbral de dolor por presión muscular se llevó a cabo del mismo modo que en el Ejemplo 1. Es decir, un estímulo por presión de gradualmente creciente a 250 g como máximo se añadió al músculo gemelo de la pata trasera derecha de cada rata. La magnitud del estímulo por presión mínimo al que la rata muestra reacción de retirada del estímulo por presión de la pata trasera derecha se midió como valor umbral de dolor por presión muscular (g). La medición se llevó a cabo 3
20 veces en cada momento de tiempo de la medición, y el promedio se usó como valor de medición.

La medición del valor umbral de sensación de dolor en la piel se llevó a cabo del mismo modo que en el Ejemplo 1. Es decir, éste se midió usando una serie de filamentos de von Frey que tenían diferentes diámetros que podían
25 añadir una presión constante. Después de la adaptación de cada rata a una jaula de fondo de malla de alambre para la medición, el filamento de von Frey (0,42, 0,74, 1,2, 2,1, 3,5, 6,0, 9,3 ó 15,8 g) se aplicó a la superficie plantar de la pata trasera derecha de la rata hasta que se produjo la reacción de retirada en la pata trasera derecha o no se produjo la reacción dentro de 6 segundos. El filamento de von Frey se aplicó usando el procedimiento de arriba y abajo. Es decir, aplicando en primer lugar un filamento de diámetro aproximadamente medio, se aplicó un filamento
30 que tenía un diámetro de menor rango cuando la reacción de retirada se observó o se aplicó un filamento que tenía un diámetro de mayor rango cuando no se observó la reacción de retirada. El valor umbral de sensación de dolor en la piel en cada momento de tiempo se calculó como un valor umbral de reacción de retirada de la pata trasera (g).

La medición de sensibilidad al frío se llevó a cabo según el procedimiento de Choi y col. (Choi y col., Pain, 59, 369 -
35 376, 1994). Después de la adaptación de cada rata a una jaula de fondo de malla de alambre para la medición, 50 µl de acetona se pulverizaron a la superficie plantar de la pata trasera derecha de la rata usando una jeringuilla para la inyección de insulina. El número de reacciones de la pata trasera derecha (estremecimiento, elevación y lamedura de las patas) producidas durante 1 minuto justo después de la pulverización se midió y se usó como índice de sensibilidad al frío. En cada momento de tiempo de la medición, la pulverización de acetona se llevó a cabo 3 veces
40 a intervalos de 5 minutos, y el promedio se usó como el valor medido. En este sistema de medición, la mayor frecuencia de reacción representa la aceleración de la sensibilidad al frío.

La medición de la sensibilidad al calor se llevó a cabo mediante el procedimiento de Hargreaves y col. (Hargreaves y
45 col., Pain, 32, 77 - 88, 1988). Una caja de medición transparente se puso sobre una placa de vidrio soportada con plataformas y una rata se puso en su interior y se aclimató. Una fuente de calor de infrarrojos móvil se dispuso bajo la placa de vidrio y se centró en la superficie plantar de la pata trasera derecha de la rata. El tiempo de latencia requerido para que la rata muestre una reacción de retirada de pata trasera derecha de la fuente de calor se midió como el tiempo de latencia de retirada y se usó como índice de sensibilidad al calor. Según este sistema de
medición, el tiempo de latencia de retirada más corto representa la aceleración de la sensibilidad al calor de la piel.

50 Las influencias de la administración única de reserpina sobre el valor umbral de dolor por presión muscular, valor umbral de sensación de dolor en la piel, sensibilidad al frío y sensibilidad al calor se examinaron según el siguiente protocolo. Se usaron un total de 12 ratas macho. Se midieron el valor umbral de dolor por presión muscular, valor umbral de sensación de dolor en la piel, sensibilidad al frío y sensibilidad al calor antes del tratamiento con reserpina (líneas base) y luego se dividieron en un grupo de disolvente (0,5% de disolución acuosa de ácido acético) y un
55 grupo de reserpina (3 mg/kg) (el número de animales por grupo fue 6). El disolvente o reserpina se administraron subcutáneamente en el lomo de las ratas de cada grupo. El volumen de administración del disolvente o reserpina se fijó a 1 ml por 1 kg de peso corporal del animal en todos los casos. El valor umbral de dolor por presión muscular, valor umbral de sensación de dolor en la piel, sensibilidad al frío y sensibilidad al calor de cada rata se midieron en los momento de tiempo de medición de la fase aguda después de la administración del disolvente o reserpina (2, 4,
60 8 y 24 horas) y la fase crónica (2, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días). La medición se llevó a cabo por experimentadores que no conocían las dosis de sustancia administradas.

Todos los valores medidos se expresaron como valor promedio \pm error estándar. La prueba de significancia estadística de los valores medidos entre los grupos de administración de reserpina y el grupo de administración de
65 disolvente en cada momento de tiempo se llevó a cabo por el análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni. El valor de probabilidad (P) inferior al 5% se juzgó como estadísticamente significativo ($P < 0,05$ se

expresó como * en las gráficas).

2. Resultados

5 (1) Valor umbral de dolor por presión muscular

10 El cambio en el transcurso de tiempo en el valor umbral de dolor por presión muscular por administración única de reserpina se muestra en la Fig. 6A. La reserpina aumentó significativamente el valor umbral de dolor por presión muscular después de 2, 4, 8 y 24 horas de su administración. Por otra parte, redujo significativamente el valor umbral de dolor por presión muscular después de 2, 3, 5, 7 y 10 días de la administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Es decir, se reveló que, en la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración) y la fase crónica (en y después de 2 días de la administración), la administración subcutánea única de reserpina induce diferentes cambios en el valor umbral de dolor por presión muscular (hiposensibilidad en la fase aguda e hipersensibilidad en la fase crónica).

15 (2) Valor umbral de sensación de dolor en la piel

20 El cambio en el transcurso de tiempo en el valor umbral de sensación de dolor en la piel por administración única de reserpina se muestra en la Fig. 6B. La reserpina redujo significativamente el valor umbral de sensación de dolor en la piel después de 2 horas de su administración. Por tanto, la reserpina redujo significativamente el valor umbral de sensación de dolor en la piel durante la fase crónica de 2, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días después de su administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Es decir, la administración subcutánea única de reserpina indujo una alodinia táctil transitoria (se recupera 4 horas después de su administración) durante la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración). Se reveló que esta alodinia táctil se recuperó una vez y luego reapareció durante la fase crónica (en y después de 2 días de la administración) como alodinia táctil persistente.

25 (3) Sensibilidad al frío

30 El cambio en el transcurso de tiempo en la sensibilidad al frío por administración única de reserpina se muestra en la Fig. 6C. La reserpina no mostró aumento significativo en el número de reacciones en el plazo de 24 horas después de su administración. Por otra parte, aumentó significativamente el número de reacciones después de 2, 3, 5, 7 y 10 días de su administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Es decir, se reveló que la administración subcutánea única de reserpina no produce un cambio en la sensibilidad al frío durante la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración), pero induce la aceleración de la sensibilidad al frío durante la fase crónica (en y después de 2 días de la administración)

35 (4) Sensibilidad al calor

40 El cambio en el transcurso de tiempo en la sensibilidad al calor por administración única de reserpina se muestra en la Fig. 6D. La reserpina acortó significativamente el tiempo de latencia a 2 y 4 horas después de su administración y 2 y 5 días después de la administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Es decir, la administración subcutánea única de reserpina indujo una aceleración transitoria (se recupera 8 horas después de su administración) de la sensibilidad al calor durante la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración). Se reveló que esta aceleración de la sensibilidad al calor se recuperó una vez y luego reapareció durante la fase crónica (en y después de 2 días de la administración).

50 Basándose en los resultados del Ejemplo 5, se reveló que, en los animales que recibieron el tratamiento con reserpina, un cambio en el valor umbral de la sensación de dolor diferente del caso de fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración) se genera durante la fase crónica (en y después de 2 días de la administración) después del tratamiento con reserpina.

55 Ejemplo 6 Influencias de la administración única de reserpina en las cantidades de dopamina, norepinefrina, serotonina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC; un metabolito de dopamina), 3-metoxi-4-hidroxifeniletenglicol (MHPG; un metabolito de norepinefrina) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA; un metabolito de serotonina) en la médula espinal, tálamo y corteza prefrontal.

1. Procedimientos de prueba

60 Como animal se usaron ratas Sprague-Dawley macho (7 semanas de edad, Japón SLC, Hamamatsu, Japón).

65 Un total de 72 ratas se dividieron en 12 programas de muestra (recogida de muestras antes de la administración, 2, 4, 8 y 24 horas después de la administración y 2, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días después) y cada uno de ellos se dividió adicionalmente en un grupo de administración de vehículo (0,5% de disolución acuosa de ácido acético) y un grupo de administración de 3 mg/kg de reserpina, a 3 ratas por grupo. Como se muestra en el Ejemplo 5, el vehículo o 3 mg/kg de reserpina se administraron subcutáneamente sólo una vez a cada rata, y el cerebro y la médula espinal se

recogieron rápidamente después de 2, 4, 8 ó 24 horas o 2, 3, 5, 7, 10, 14 ó 21 días de la administración. El tálamo y la corteza prefrontal se separaron del cerebro en un disco frío con hielo. Con respecto al muestreo antes de la administración, las muestras se recogieron antes de empezar la administración del vehículo o reserpina. Las muestras recogidas se congelaron rápidamente y se guardaron a -80°C hasta su uso en las mediciones. El día de la medición, tejidos de muestras respectivas se sometieron a medición del peso en húmedo, se homogeneizaron en ácido perclórico 0,2 M/disolución de EDTA-2Na 0,1 mM usando un homogeneizador ultrasónico. Después de la centrifugación a 15.000 g y a 4°C durante 15 minutos, el sobrenadante se ajustó a pH 3,5 usando acetato sódico y se filtró usando un filtro. Las cantidades de dopamina, norepinefrina, serotonina, DOPAC, MHPG y 5-HIAA en estas muestras se midieron usando una cromatografía líquida de alta resolución (columna: SC-50DS 3,0, 150 mm, Eicom Co., Ltd., Kioto, Japón, composición de la fase móvil: tampón acetato sódico 0,1 M, tampón citrato 0,1 M, pH 3,5, 5 mg/l de EDTA-2Na, 200 mg/l de ácido octanosulfónico de sodio, 16% de metanol) y un detector electroquímico (ECD-300, Eicom Co., Ltd., Kioto, Japón). La medición se llevó a cabo en condiciones de velocidad de flujo 0,5 ml/min, voltaje aplicado 750 mV y 25°C. Las cantidades de dopamina, norepinefrina, serotonina, DOPAC, MHPG y 5-HIAA en las muestras se cuantificaron comparando áreas pico de muestras de patrones respectivos medidos el mismo día de la medición de muestras.

Todos los valores medidos se expresaron como valor promedio \pm error estándar en las gráficas, y la unidad de los valores medidos se fijó a ng/g de peso húmedo de tejido. La diferencia estadística de los valores medidos entre el grupo de administración de reserpina y el grupo de administración de vehículo en cada programa de prueba se llevó a cabo por el análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni. El valor de probabilidad (P) inferior al 5% se juzgó como estadísticamente significativo (P < 0,05 se expresó como * en las gráficas).

2. Resultados

(1) Cambios en la médula espinal

Los efectos de la administración única de reserpina en las cantidades de dopamina, norepinefrina, serotonina, DOPAC, MHPG y 5-HIAA en la médula espinal se muestran respectivamente en la Fig. 7A, la Fig. 7B, la Fig. 7C, la Fig. 7D, la Fig. 7E y la Fig. 7F. Después de 2, 4, 8 y 24 horas y 2, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días de la administración, la reserpina redujo significativamente cada una de las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Por otra parte, la reserpina aumentó significativamente la cantidad de DOPAC después de 2, 4, 8 y 24 horas de su administración, y la cantidad de 5-HIAA después de 4, 8, 24 horas y 2 días, pero no cambió significativamente en ambos casos después de 2 días o en y después de 3 días después de la administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Además, la reserpina redujo significativamente la cantidad de MHPG después de 4 horas y 7 días de la administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Es decir, en la médula espinal, las cantidades de dopamina, norepinefrina, serotonina y MHPG se redujeron por la administración subcutánea única de reserpina durante tanto la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración) como la fase crónica (en y después de 2 días de la administración). Por otra parte, las cantidades de DOPAC y 5-HIAA sólo aumentaron durante la fase aguda (sólo DOPAC aumentó después de 2 días de la administración), de manera que se reveló que muestran cambios diferentes durante la fase aguda y la fase crónica.

(2) Cambios en el tálamo

Los efectos de la administración única de reserpina en las cantidades de dopamina, norepinefrina, serotonina, DOPAC, MHPG y 5-HIAA en el tálamo se muestran respectivamente en la Fig. 8A, la Fig. 8B, la Fig. 8C, la Fig. 8D, la Fig. 8E y la Fig. 8F. Después de 2, 4, 8 y 24 horas y 2, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días de la administración, la reserpina redujo significativamente cada una de las cantidades de dopamina y norepinefrina y redujo significativamente la cantidad de serotonina después de 8 y 24 horas y 3, 5, 7 y 10 días de la administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Por otra parte, la reserpina aumentó significativamente la cantidad de 5-HIAA después de 2, 4, 8 y 24 horas de su administración, pero no hubo diferencia significativa en y después de 2 días de la administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Además, la reserpina no cambió significativamente las cantidades de DOPAC y MHPG (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Es decir, en el tálamo, las cantidades de dopamina, norepinefrina y serotonina se redujeron por la administración subcutánea única de reserpina durante tanto la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración) como la fase crónica (en y después de 2 días de la administración). Por otra parte, la cantidad de 5-HIAA sólo aumentó durante la fase aguda, de manera que se reveló que muestra diferentes cambios durante la fase aguda y la fase crónica.

(3) Cambios en la corteza prefrontal

Los efectos de la administración única de reserpina en las cantidades de dopamina, norepinefrina, serotonina, DOPAC, MHPG y 5-HIAA en la corteza prefrontal se muestran respectivamente en la Fig. 9A, la Fig. 9B, la Fig. 9C, la Fig. 9D, la Fig. 9E y la Fig. 9F. La reserpina redujo significativamente la cantidad de dopamina después de 2, 4, 8 y 24 horas y 2, 3, 5, 7, 10 y 14 días de la administración, la cantidad de norepinefrina después de 2, 4, 8 y 24 horas y 2, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días de la administración y la cantidad de serotonina después de 2, 4, 8 y 24 horas y 2, 3, 5, 7

5 y 10 días de la administración, respectivamente (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Por tanto, la reserpina redujo significativamente la cantidad de MHPG después de 4 horas y 7 días de la administración y la cantidad de 5-HIAA después de 8 horas y 2, 3, 5, 7, 10, 14 y 21 días de la administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Por otra parte, la reserpina redujo significativamente la cantidad de DOPAC después de 2, 3, 5, 7, 10 y 14 días de la administración, pero no cambió significativamente en el plazo de 24 horas después de la administración (análisis bilateral de la varianza y el método de Bonferroni). Es decir, en la corteza prefrontal, las cantidades de dopamina, norepinefrina, serotonina, MHPG y 5-HIAA se redujeron por la administración subcutánea única de reserpina durante tanto la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración) como la fase crónica (en y después de 2 días de la administración). Por otra parte, la cantidad de DOPAC se redujo sólo durante la fase crónica, de manera que se reveló que muestra diferentes cambios durante la fase aguda y la fase crónica.

15 Un resumen de los cambios en los niveles de aminas biogénicas y los niveles de metabolitos respectivos durante la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración) por el tratamiento de una administración única de reserpina, y un resumen de los cambios en los niveles de aminas biogénicas y los niveles de metabolitos respectivos durante la fase crónica (en y después de 2 días de la administración) por el tratamiento de una administración única de reserpina se muestra en las siguientes Tabla 1 y Tabla 2, respectivamente.

[Tabla 1]

20

	Dopamina	Metabolito de dopamina DOPAC	Norepinefrina	Metabolito de norepinefrina MHPG	Serotonina	Metabolito de serotonina 5-HIAA
Médula espinal	↓	↑	↓	↓	↓	↑
Tálamo	↓	-	↓	-	↓	↑
Corteza prefrontal	↓	-	↓	↓	↓	↓

Flecha hacia abajo o flecha hacia arriba: indica que el objeto es significativamente reducido, o significativamente aumentado, en la rata tratada con reserpina en comparación con la rata tratada con vehículo en el momento de la medición durante la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración) después del tratamiento con reserpina.
 -: Indica que no hay diferencia estadística entre la rata tratada con reserpina y la rata tratada con vehículo en el momento de la medición durante la fase aguda después del tratamiento con reserpina.
 Nota): En el momento de la medición durante la fase aguda después del tratamiento con reserpina, la sensibilidad para estimulación (por filamento) táctil y estimulación por calor es acelerada, pero la sensibilidad para la estimulación por presión muscular es reducida y la sensibilidad para la estimulación por frío no cambia.

[Tabla 2]

	Dopamina	Metabolito de dopamina DOPAC	Norepinefrina	Metabolito de norepinefrina MHPG	Serotonina	Metabolito de serotonina 5- HIAA
Médula espinal	↓	-	↓	↓	↓	- (Distinto de después de 2 días)
Tálamo	↓	-	↓	-	↓	-
Corteza prefrontal	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Flecha hacia abajo o flecha hacia arriba: Indica que el objeto es significativamente reducido, o significativamente aumentado, en la rata tratada con reserpina en comparación con la rata tratada con vehículo en el momento de la medición durante la fase crónica (2 días o más después de la administración) después del tratamiento con reserpina.
 -: Indica que no hay diferencia estadística entre la rata tratada con reserpina y la rata tratada con vehículo en el momento de la medición durante la fase crónica después del tratamiento con reserpina.
 Nota): En el momento de la medición durante la fase crónica después del tratamiento con reserpina, todas las sensibilidades para estimulación de la presión muscular, estimulación (por filamento) táctil, estimulación por frío y estimulación por calor se aceleran.

5 Basándose en los resultados del Ejemplo 6 se reveló que los niveles de los metabolitos de aminas biogénicas en los animales que recibieron el tratamiento con reserpina se diferencian entre la fase aguda (en el plazo de 24 horas después de la administración) y la fase crónica (2 días o más después de la administración), dependiendo de la especie de amina o las regiones en el cerebro. Como se ha sugerido que el aumento de los niveles de metabolitos de aminas biogénicas significa la activación de señales de aminas biogénicas (Roth y col., 1976), se considera que los cambios en los niveles de metabolitos de aminas biogénicas están influyendo en los valores umbral de la sensación de dolor. Es decir, se mostró que la diferencia en los valores umbral de la sensación de dolor durante la fase crónica y la fase aguda descritas en el Ejemplo 5 es debida a la diferencia en las condiciones de activación de las señales de aminas biogénicas sugeridas por los niveles de metabolitos de aminas biogénicas.

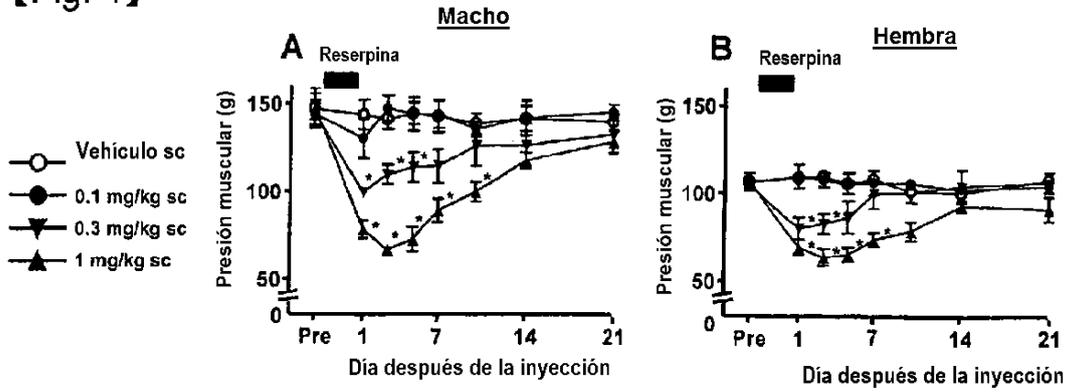
Aplicabilidad industrial

15 El modelo animal de enfermedad para su uso en la presente invención que expresa tanto síntomas de dolor crónico (dolor muscular crónico y alodinia táctil crónica) como síntoma depresivo es extremadamente útil como modelo que refleja estados de enfermedad de dolores crónicos, particularmente fibromialgia, y sustancias como candidatos de agentes terapéuticos para dolores crónicos, particularmente fibromialgia, pueden ser eficientemente evaluadas
 20 mediante un procedimiento de cribado que usa este modelo animal de enfermedad.

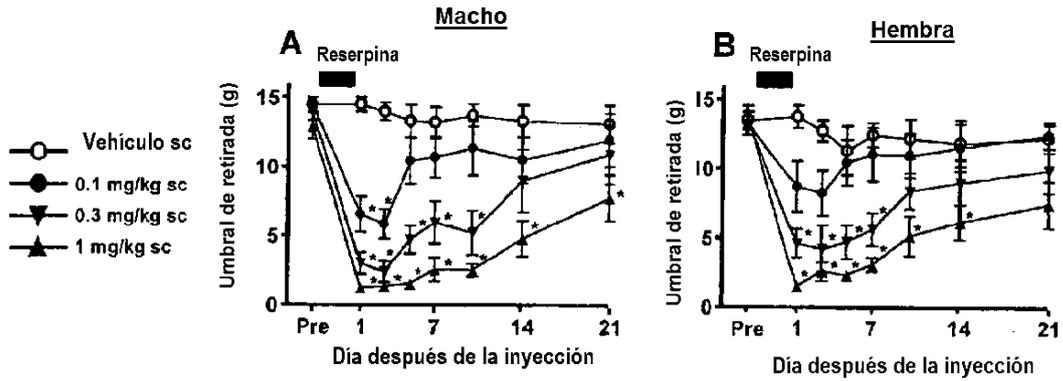
REIVINDICACIONES

1. Uso de un roedor al que se administró reserpina para la inducción de dolor muscular crónico y/o alodinia táctil crónica como modelo animal de enfermedad para dolor crónico.
- 5 2. El uso según la reivindicación 1, en el que el modelo animal de enfermedad expresa adicionalmente un síntoma de depresión.
3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el roedor es una rata.
- 10 4. Un procedimiento para cribar un agente terapéutico de dolor crónico, caracterizado porque una sustancia de prueba se administra al modelo animal de enfermedad como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. El procedimiento para cribar según la reivindicación 4, en el que se miden el valor umbral de dolor por presión muscular, el valor umbral de sensación de dolor en la piel, la sensibilidad al frío y/o la sensibilidad al calor.
6. El procedimiento para cribar según la reivindicación 4 ó 5, en el que el dolor crónico es fibromialgia.

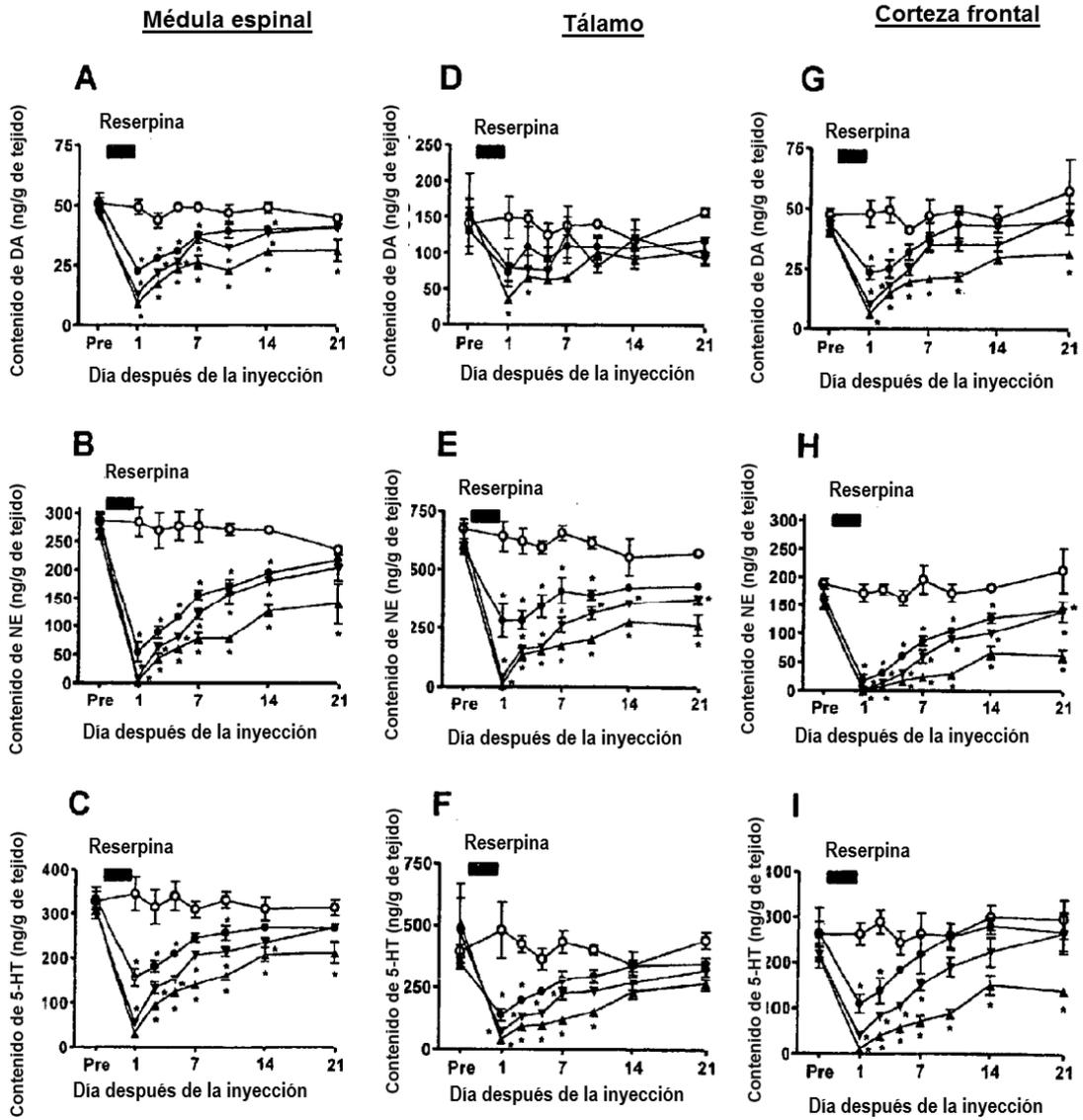
【Fig. 1】



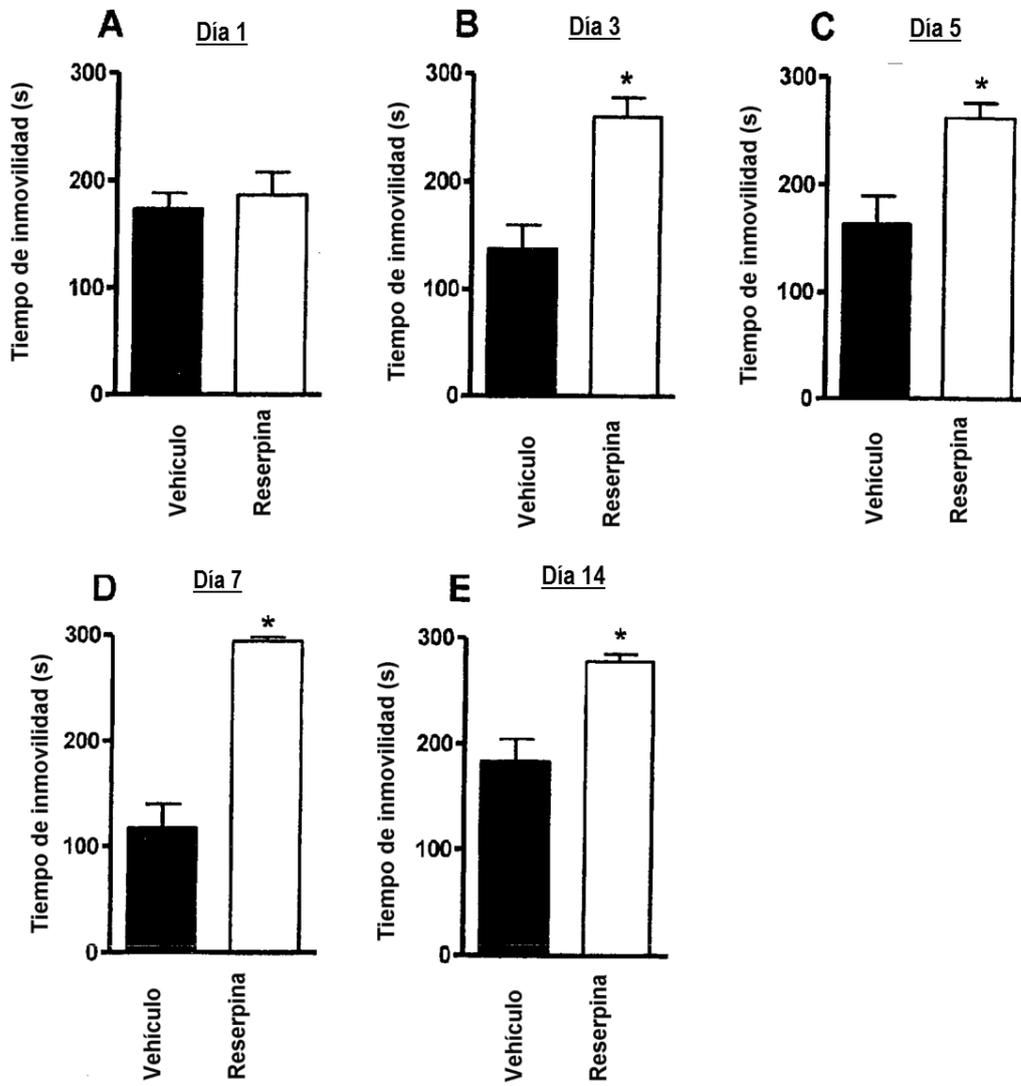
【Fig. 2】



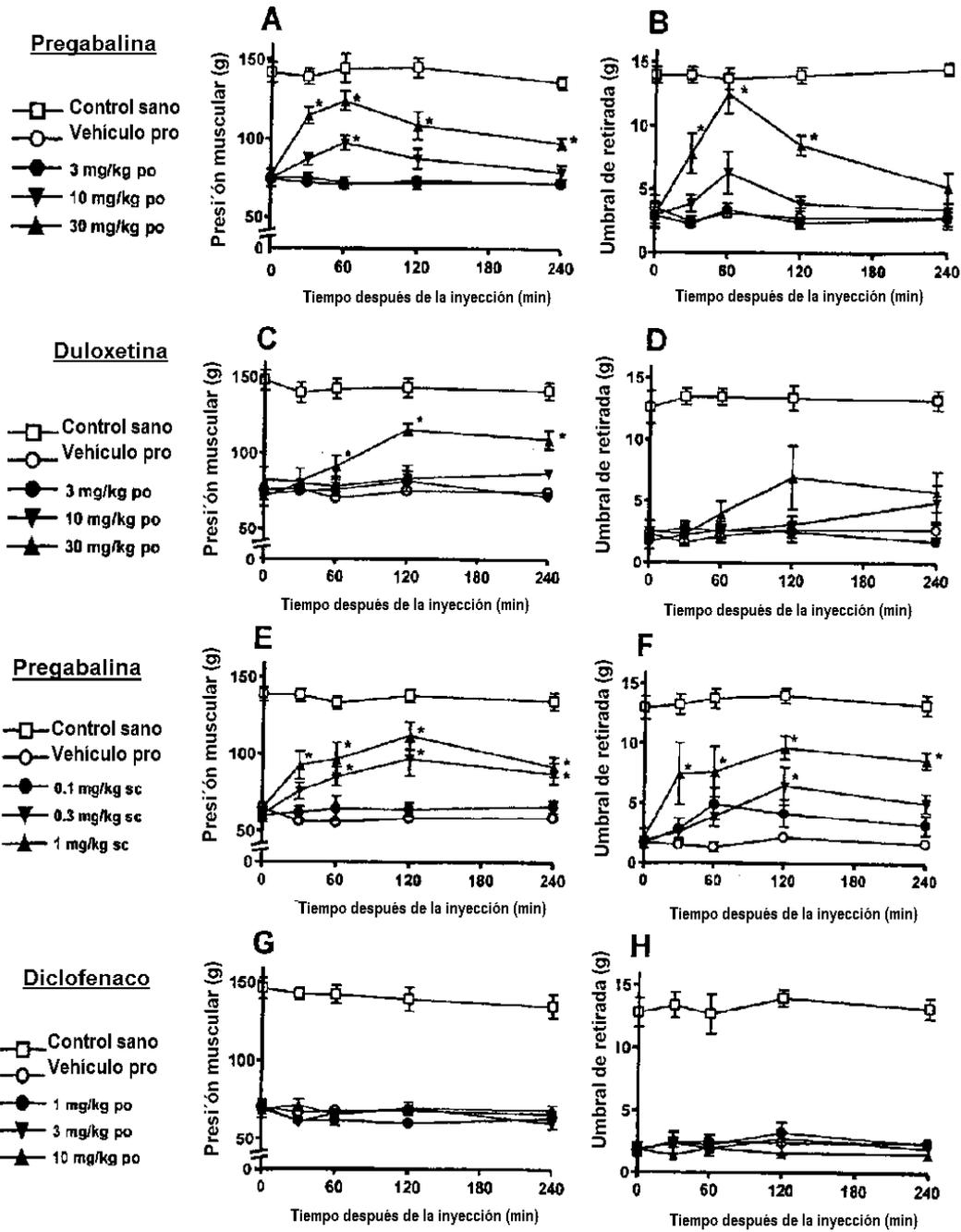
[Fig. 3]



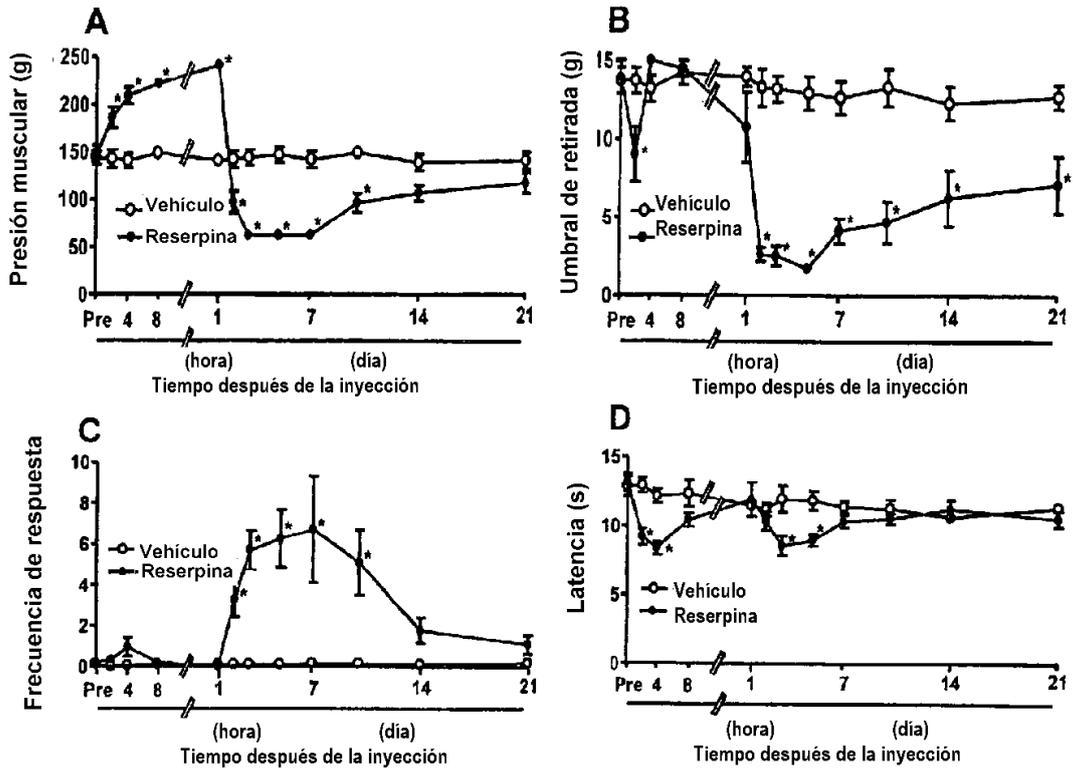
[Fig. 4]



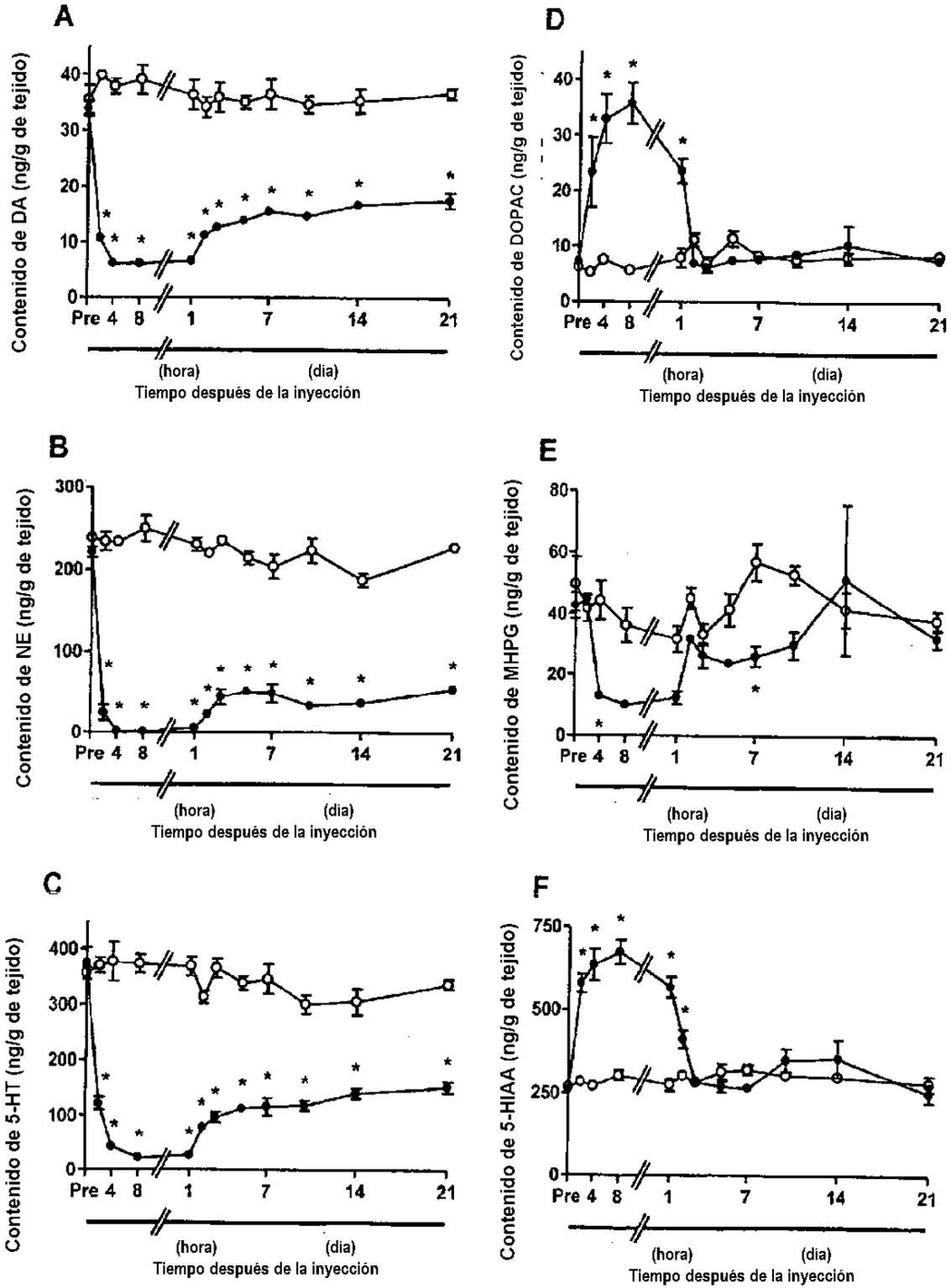
[Fig. 5]



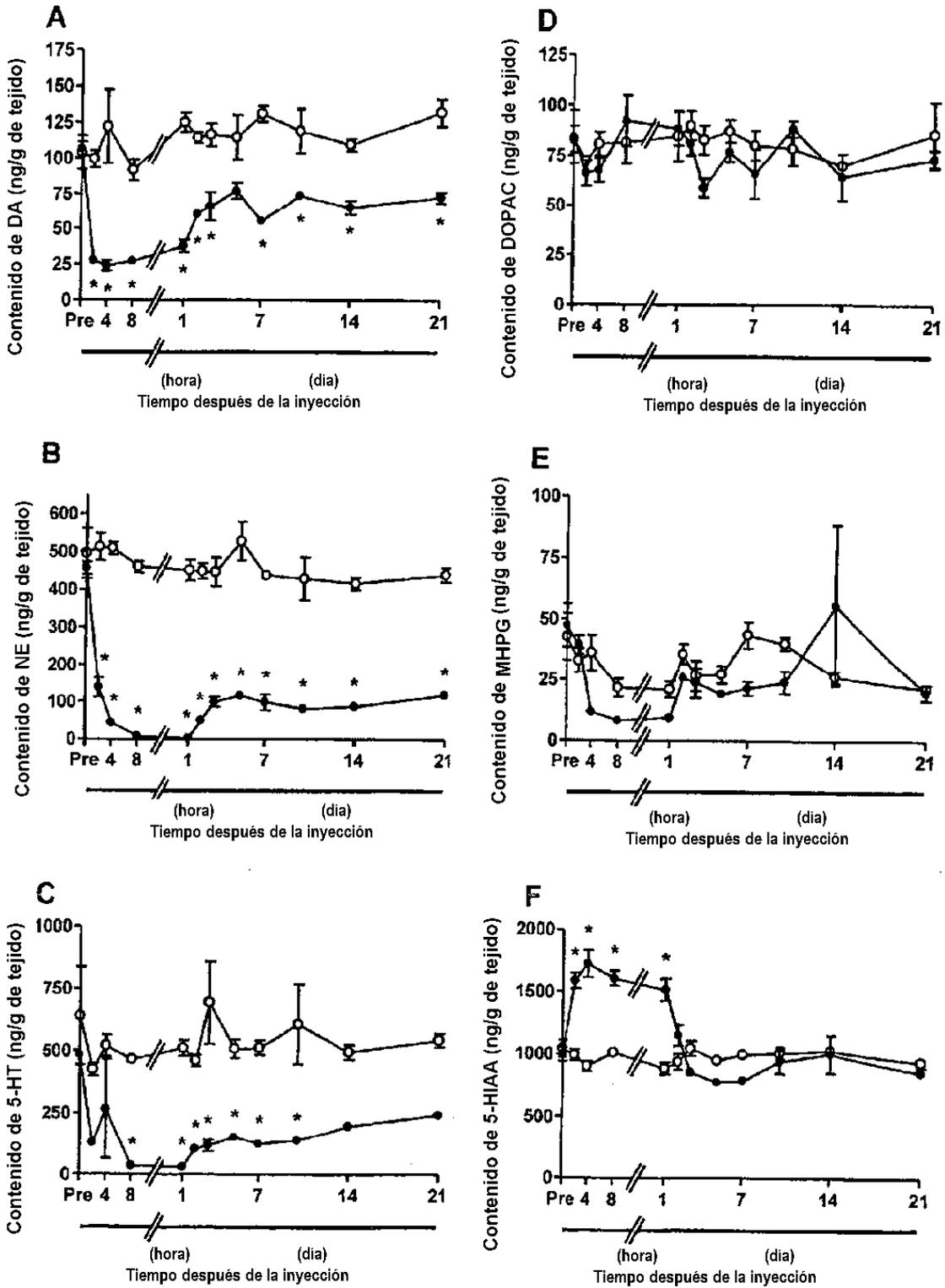
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]

