

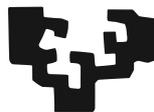
**Interleuquina 6 en modelos
animales de depresión:
meta-análisis de la evidencia.**

Begoña Treceño Dalmau

Tesis Doctoral

2018

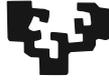
eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

eman ta zabal zazu



Universidad Euskal Herriko
del País Vasco Unibertsitatea

Universidad del País Vasco UPV/EHU
Facultad de Medicina y Enfermería
Departamento de Neurociencias

Tesis Doctoral

**Interleuquina 6 en modelos animales de
depresión: meta-análisis de la
evidencia.**

Begoña Treceño Dalmau

Director: Francisco Javier Ballesteros Rodríguez

Programa de Doctorado de Neurociencias

2018

A Ama y Aita.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que han contribuido a que pueda estar escribiendo esto:

En primer lugar, a mi director, Javier Ballesteros, porque no estaría escribiendo esto si no me hubiera dado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutela.

A Biki, Borja, Isa, Jose Ramón, June, Naiara y Sonia por los cafés, las charlas, los consejos y por hacer que subir a la facultad sea algo que apetece hacer, donde te encuentras a gusto, que es muy importante para mí.

Al grupo del ON5, June Gutiérrez y Mariana, que son, ambas, personas increíbles, dulces, trabajadoras y amables, y me hicieron pasar muchos buenos momentos cuando estábamos juntas y me los hacen pasar ahora que ya no lo estamos.

A Eduardo por su ayuda en las búsquedas bibliográficas.

A Cecilia, David, Isa y June que han estado ahí siempre, y han estado de verdad, cuando es fácil y cuando no lo es tanto.

A Ibon, por las cosas importantes y por los detalles pequeños, que a veces significan mucho más que los grandes.

Y por último y más importante, a mis padres, que me han apoyado en todos los aspectos durante toda mi vida y jamás podré recompensar todo lo que me han dado, y mucho menos plasmarlo en palabras.

Realmente me siento profundamente agradecida a todas y cada una de las personas que han sido nombradas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Depresión	3
1.1.1. Hipótesis más aceptadas sobre la etiología de la depresión	3
Historia de los antidepresivos y la "Hipótesis monoaminérgica de la depresión"	3
<i>Déficit de monoaminas</i>	<i>3</i>
<i>Hipo-regulación y desensibilización de los receptores de monoaminas</i>	<i>4</i>
<i>Desensibilización o hiporegulación del autoreceptor de serotonina 1A (5-HT_{1A}) somatodendrítico</i>	<i>4</i>
Hipótesis de la neurogénesis y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor)	5
<i>Plasticidad neuronal</i>	<i>5</i>
<i>Neurogénesis y BDNF</i>	<i>5</i>
Hipótesis neuroinmune	5
1.2. Inflamación	6
El proceso inflamatorio	7
1.2.1. Moléculas inflamatorias	7
Citoquinas	8
Interleuquina 6 (IL-6)	8
1.3. El estrés y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en condiciones normales	9
1.3.1. El estrés en condiciones normales	9
1.3.2. El eje HPA en condiciones normales	9
Circuito hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA)	10
Receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides	11
1.4. Posible relación entre la inflamación y la depresión	11

Relación entre el eje HPA y el sistema inmune.....	12
Alteraciones del eje HPA en depresión.....	12
Citoquinas y estrés.....	13
Modulación del eje HPA mediada por IL-6.....	14
Relación entre moléculas inflamatorias y depresión.....	15
1.4.1. Estudios en animales.....	15
Administración de lipopolisacáridos (LPS).....	15
Animales KO (knockout) de IL-6.....	16
1.4.2. Estudios en pacientes deprimidos.....	16
Posible efecto antidepressivo de algunos anti-inflamatorios..	16
Marcadores inflamatorios en pacientes deprimidos.....	16
1.4.3. Relación de las citoquinas con monoaminas.....	17
Acción anti-inflamatoria de los antidepressivos.....	17
1.4.4. Los modelos animales de depresión.....	18
Modelos inducidos por estrés.....	18
Modelos inducidos por intervenciones quirúrgicas.....	20
Modelos inducidos por administración de lipopolisacáridos (LPS), interferón- γ (IFN- γ) y corticosterona o por inducción de tumores.....	20
1.5. Medicina basada en la evidencia.....	21
1.5.1. Tipos de diseños de investigación.....	21
1.5.2. Calidad de estudios experimentales y observacionales....	21
1.6. Meta-análisis.....	23
1.6.1. Uso del meta-análisis.....	23
Meta-análisis en humanos vs meta-análisis en animales.....	24
Heterogeneidad entre estudios de las estimaciones del efecto.....	25
Sesgo de publicación.....	26
1.7. Calidad de meta-análisis.....	27
1.8. OBJETIVOS.....	28

2. METODOLOGÍA	29
2.1. Selección de marcador inmunológico y modelos animales	29
2.2. Métodos	30
2.2.1. Búsqueda bibliográfica.....	30
2.2.2. Selección de estudios.....	30
2.2.2.1. Criterios de inclusión/exclusión.....	30
2.2.2.2. Evaluación de validez y calidad de los estudios....	31
2.2.3. Obtención de datos.....	33
2.3. Meta-análisis	34
2.3.1. Obtención de resultados combinados.....	34
2.3.2. Heterogeneidad.....	34
2.3.2.1. Selección de subgrupos	35
2.3.3. Sesgo de publicación o efecto de pequeños estudios.....	36
3. RESULTADOS	37
3.1. Características de los estudios	37
3.1.1. Diagrama de flujo.....	37
3.1.2. Características de los estudios.....	39
3.2. Evaluación de validez y calidad de los estudios	45
3.3. Diferencias en los niveles de IL-6 entre controles y modelos de depresión	45
3.4. Estudios de meta-análisis	48
3.5. Heterogeneidad	50
3.5.1. Análisis de heterogeneidad y sensibilidad de los estudios	50
3.5.2. Análisis de subgrupos.....	53
3.5.3. Meta-análisis acumulativo.....	56
3.6. Riesgo de sesgos de publicación	58
4. DISCUSIÓN	62
4.1. Diferencias en los niveles de IL-6 entre controles y modelos de depresión	63

4.2. Debilidad de los criterios actuales para la evaluación de la calidad y el riesgo de sesgos de los estudios animales64

5. CONCLUSIONES 69

REFERENCIAS DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS 70

REFERENCIAS GENERALES 73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Circuito hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en condiciones de estrés	10
Figura 2: Modulación de moléculas inflamatorias por parte del eje HPA y activación de dicho eje por parte de IL-6	13
Figura 3: Aumento de moléculas pro-inflamatorias como consecuencia de la disfunción de los receptores de glucocorticoides	15
Figura 4: Breve diagrama de los diferentes tipos de diseños de investigación	22
Figura 5: Breve esquema de algunas de las guías propuestas como referencia en la creación y evaluación de calidad de informes de investigación	23
Figura 6: Breve esquema de algunas de las guías propuestas como referencia en la creación y evaluación de calidad de revisiones sistemáticas y meta-análisis	27
Figura 7: Diagrama de flujo de los estudios encontrados en la búsqueda bibliográfica	38
Figura 8: <i>Forest plot</i> de la diferencia de concentración de la IL-6 entre modelos animales de depresión y controles	49
Figura 9: Gráfico de riesgo de sesgos de publicación (<i>funnel plot</i>). Diferencia de concentración de la IL-6 entre modelos animales de depresión y controles	50
Figura 10: Gráfico de Baujat; diagrama de dispersión para explorar la heterogeneidad	51
Figura 11: <i>Forest plot</i> del análisis de influencia de los estudios.....	52
Figura 12: <i>Forest plot</i> del meta-análisis acumulativo	57
Figura 13: Gráfico de riesgo de sesgos de publicación (<i>funnel plot</i>) del método de <i>trim and fill</i> . Diferencia de concentración de la IL-6 entre modelos animales de depresión y controles	59
Figura 14: <i>Forest plot</i> realizado mediante el método de <i>trim and fill</i> . Diferencia de concentración de la IL-6 entre modelos animales de depresión y controles	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características de los animales utilizados en los estudios.	40
Tabla 2(a): Características de las muestras utilizadas en los estudios (hasta 2012).	41
Tabla 2(b): Características de las muestras utilizadas en los estudios (desde 2013)..	42
Tabla 3: Características experimentales de los estudios	44
Tabla 4(a): Datos de concentración de IL-6 obtenidos de los estudios (hasta 2013): tamaños de efectos estimados y error estándar	46
Tabla 4(b): Datos de concentración de IL-6 obtenidos de los estudios (desde 2014): tamaños de efectos estimados y error estándar	47
Tabla 5: Análisis de subgrupos mediante el modelo de efectos aleatorios..	53
Tabla 5 (cont.): Análisis de subgrupos mediante el modelo de efectos aleatorios..	54
Tabla 6: Meta-regresión de los diferentes subgrupos.	56

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I: Listado de abreviaturas y siglas	83
<i>I.I. Abreviaturas y siglas que aparecen en el texto general ...</i>	<i>83</i>
<i>I.II. Abreviaturas y siglas que aparecen en los datos de estadística</i>	<i>86</i>
<i>I.III. Abreviaturas y siglas que aparecen en las tablas de resultados</i>	<i>86</i>
ANEXO II: Algoritmo de búsqueda en MEDLINE/PubMed	89
ANEXO III: Script utilizado en RStudio para la elaboración de los análisis	92
ANEXO IV: Coordenadas en el gráfico de Baujat	96
ANEXO V: Análisis de influencia o sensibilidad	97
ANEXO VI: Resultados del meta-análisis acumulativo	98
ANEXO VII: Ejemplo de tabla de riesgo de sesgos y calidad de los estudios	99

RESUMEN

La depresión es el trastorno psiquiátrico más extendido y pese a ser también uno de los más estudiados, aún se desconocen los mecanismos implicados en su etiología. Existen, no obstante, cada vez más evidencias de una implicación del sistema inmune en la patogenia de la depresión.

Recientemente se han realizado varios estudios de meta-análisis dónde algunos marcadores inflamatorios, como la interleuquina 6 (IL-6), se han asociado con la depresión mayor en humanos, pero no hemos encontrado este tipo de estudios meta-analíticos sobre estas diferencias en citoquinas en modelos animales de depresión.

El objetivo de este trabajo es la valoración de la asociación entre la concentración de moléculas inflamatorias y la presencia de conductas "depresivo-like" en modelos animales de depresión y su relevancia en la investigación translacional mediante el análisis de la variación de la cantidad de interleuquina 6 en modelos animales de depresión inducidos por estrés provocando un fenotipo "depresivo-like" de manera crónica y si los resultados encontrados en la experimentación animal justifican el paso hacia la experimentación en humanos.

Mediante una búsqueda bibliográfica en MEDLINE y EMBASE con diferentes combinaciones de palabras clave, encontramos 43 estudios originales que cumplían los criterios de inclusión, de los que obtuvimos 59 datos que provenían de muestras de cerebro o sangre de modelos animales de depresión inducidos por estrés con efecto crónico y no modificados genéticamente y valoramos la calidad de estos estudios calculando el riesgo de sesgos mediante la "SYRACLE's tool for assessing risk of bias".

Utilizando el programa R, calculamos la diferencia estandarizada de la media (DEM) y su intervalo de confianza del 95%, mediante el modelo de efectos aleatorios, a partir de la "g de Hedges", estimando el tamaño del efecto de cada uno de los estudios (TE) y su error estándar (eeTE) a partir de las medias de la concentración de IL-6 en los animales sometidos a estrés y los controles y el número de animales en cada grupo.

Exploramos la heterogeneidad entre los estudios y sus posibles causas mediante la construcción de un gráfico de Baujat, análisis de influencia, análisis de subgrupos y análisis de meta-regresión.

Valoramos también el posible sesgo de publicación o efecto de pequeños estudios a través del *funnel plot*, la prueba de asimetría de Egger y el método de *trim and fill*.

Los resultados del meta-análisis han mostrado un aumento significativo (DEM=1,39; IC-95%=[1,11-1,67]; $p < 0,0001$) de los niveles de IL-6 en los modelos animales de depresión frente a sus controles. Encontramos una heterogeneidad muy alta ($I^2 = 94,8\%$) entre los estudios no explicada ni por ningún estudio individual ($1,34 < DEM < 1,45$; $94,3\% < I^2 < 94,9\%$), ni por ninguna de las características de los estudios examinadas en el análisis de subgrupos (I^2 subgrupos $\geq 86,7\%$). El meta-análisis acumulativo mostró una tendencia, que se va acrecentando progresivamente desde el año 2013, a un aumento de la concentración de IL-6 en los modelos animales y utilizando el método de *trim and fill* hemos observado un posible sesgo de publicación hacia éstos valores de aumento de IL-6 en modelos animales.

Observamos que la inducción de un fenotipo *depresivo-like* mediante la aplicación de modelos de estrés crónico aumenta la concentración de la interleuquina 6 de manera significativa, pero la alta heterogeneidad encontrada entre los estudios, no explicada por ningún estudio individual, ni por diferencias entre los subgrupos, no permite validar estos resultados.

Además, encontramos un posible sesgo de publicación o de pequeños estudios hacia un aumento del tamaño del efecto de la inducción de los modelos de depresión sobre la concentración de la interleuquina 6.

Los métodos de cuantificación de riesgo de sesgos y validez de estudios animales no son válidos en muchas ocasiones y la calidad de los estudios encontrados es baja o muy baja para la realización de un meta-análisis.

Por lo tanto, los estudios clínicos centrados en la variación de la interleuquina 6 en individuos deprimidos no estarían justificados por los resultados obtenidos en estudios en animales ya que, en base a nuestros resultados, la relación entre marcadores inflamatorios y la depresión, aunque significativa, presenta una calidad de la evidencia muy baja, con una alta heterogeneidad de resultados no explicada y una fuerte sospecha de sesgo de publicación.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DEPRESIÓN

La depresión mayor es actualmente considerada una de las causas más importantes de mortalidad y morbilidad, siendo el más prevalente de los trastornos del estado de ánimo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS 2017), más de 300 millones de personas (en torno al 4% de la población mundial) sufren esta patología. En general, es más común en mujeres y sus síntomas suelen comenzar entre los 15 y los 30 años, pero se puede manifestar en ambos géneros, a cualquier edad y en todos los contextos socio-económicos. Sus síntomas pueden causar desde problemas en la vida cotidiana del individuo (a nivel laboral y personal), disminuyendo considerablemente la calidad de vida, hasta problemas más graves como el suicidio, siendo éste la segunda causa de muerte en jóvenes (15-30 años) (OMS 2017).

Se conocen algunos aspectos de los desequilibrios neuroquímicos y estructurales en pacientes (Price and Drevets 2012) y parece que es una patología que muestra cierta heredabilidad, pero la etiología de la depresión continúa siendo desconocida.

De hecho, las terapias farmacológicas antidepresivas se descubrieron empíricamente y se centran en la regulación de monoaminas (serotonina; 5-HT, dopamina; DA y noradrenalina; NA), principalmente.

1.1.1. Hipótesis más aceptadas sobre la etiología de la depresión

Historia de los antidepresivos y la "Hipótesis monoaminérgica de la depresión"

Déficit de monoaminas

En la década de los 50 se comenzaron a usar unas sustancias que parecían tener efectos en el estado de ánimo como terapia antidepresiva. Así comenzaron los primeros antidepresivos, los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAOs), que es la enzima encargada de degradar las monoaminas. Pocos años después aparecieron los antidepresivos tricíclicos que actúan impidiendo la recaptación de serotonina y noradrenalina (Lopez-Munoz and Alamo 2009). Tras comprobar que la inhibición de la degradación de monoaminas, o de su recaptación, revertía los estados depresivos, comenzó a cobrar fuerza la hipótesis de que la causa de la depresión sería un déficit de monoaminas en el cerebro (Sulser 1983).

Basándose en esta teoría, y así mismo respaldándola, los estudios en antidepresivos se guiaron hacia la regulación de estos sistemas apareciendo en los años 90 los llamados antidepresivos de segunda generación; los inhibidores selectivos de monoaminas, con menos efectos secundarios que las terapias anteriores ya que actuaban más específicamente sólo en los recaptadores de monoaminas. Según el recaptador de monoaminas diana (Stahl 1998) se dividen en:

- ISRS (Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Serotonina).
- ISRD (Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Dopamina).
- ISRN (Inhibidores Selectivos de la Recaptación de Noradrenalina).
- Inhibidores duales: Inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN) y los inhibidores de la recaptación de dopamina y noradrenalina (IRDN).

Todos estos antidepresivos utilizados en clínica presentan una serie de problemas de eficacia; se necesitan semanas o incluso meses de tratamiento para comenzar a percibir una mejora clínica (Lopez-Munoz and Alamo 2009), no todos los sujetos responden igual a cada tratamiento, un tercio de los pacientes son resistentes a la farmacoterapia existente y también es necesario señalar la amplia gama de efectos secundarios, la tolerancia y la dependencia que producen los medicamentos antidepresivos.

Hipo-regulación y desensibilización de los receptores de monoaminas

Con el fin de explicar el lapso de tiempo necesario para obtener una mejoría clínica surge la teoría de la hipo-regulación y/o desensibilización de los receptores de monoaminas. El aumento de concentración de monoaminas en el espacio sináptico aumenta el número de receptores activados por éstas y con el tiempo esta situación lleva a una disminución de la densidad de receptores (hiporegulación) o de su funcionalidad (desensibilización) (Peroutka and Snyder 1980). El problema con esta teoría es que este fenómeno se da en un periodo de tiempo más corto que el que se necesita para obtener resultados con las terapias farmacológicas (Riva and Creese 1989).

Desensibilización o hiporegulación del autoreceptor de serotonina 1A (5-HT_{1A}) somatodendrítico

Existe otra hipótesis que intenta explicar este lapso de tiempo entre el inicio del tratamiento farmacológico y la aparición de efectos

clínicos. La teoría sostiene que es necesaria una disminución de densidad o una desensibilización de los autoreceptores 5-HT_{1A} somatodendríticos que inhiben la descarga de serotonina en el espacio sináptico (Blier and de Montigny 1994), por lo que su disminución de densidad o de función aumentaría la serotonina disponible.

Hipótesis de la neurogénesis y del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor)

Plasticidad neuronal

La plasticidad neuronal se puede definir como la capacidad de adaptación celular a variaciones en el entorno fisiológico aumentando o disminuyendo la neurogénesis o la apoptosis (Duman *et al.* 1999).

Las principales vías neuronales que se conocen que responden al entorno promoviendo esta adaptación mediante la plasticidad neuronal incluyen, además de los receptores de neurotransmisores y otros moduladores, los factores neurotróficos como el BDNF (Duman and Li 2012). Todos ellos, mediante cascadas de transducción de señales (AMPC, MAP-quinasa, y otros), convergen en la activación o inhibición de factores de transcripción como CREB (cAMP response element-binding), que son los responsables de inducir la neurogénesis o la apoptosis.

Neurogénesis y BDNF

Se ha encontrado en muestras de pacientes una disminución del volumen del hipocampo (Frodl and O'Keane 2013) y de la corteza pre-frontal, así como disminución del BDNF en estas áreas (Yu and Chen 2011). La farmacoterapia con antidepresivos parece compensar estos cambios (Lee and Kim 2010), apoyando la teoría de que la depresión estaría basada en una disminución de factores de crecimiento neuronal, como el BDNF, variando el equilibrio neurogénesis/apoptosis hacia las vías de muerte celular y reduciendo así la creación de nuevas neuronas.

Hipótesis neuroinmune

La hipótesis neuroinmune o hipótesis de las citoquinas, considera la depresión como una adaptación disfuncional tras un proceso inflamatorio crónico, que puede darse en individuos predispuestos cuando este proceso se mantiene fuera de los límites fisiológicos.

Esta teoría se sustenta, sobre todo, en el aumento de marcadores inflamatorios encontrados en depresión, así como la co-morbilidad de la depresión con varias enfermedades como cáncer, VIH, hepatitis C,

artritis reumatoide o lupus (Evans *et al.* 2005), que se conoce que están relacionadas con procesos inmunes o inflamatorios crónicos. En estos pacientes, además, parece que se encuentra una relación directamente proporcional de la cantidad de IL-6 en fluidos espinales y la gravedad de los síntomas neuropsiquiátricos (Evans *et al.* 2005).

Algunos autores (Lanquillon *et al.* 2000) han encontrado diferencias inmunológicas en los pacientes respondedores y no respondedores a las farmacoterapias antidepresivas señalando un aumento en marcadores pro-inflamatorios en éstos últimos, relacionando la eficacia antidepresiva con una disminución de los niveles de citoquinas.

Asimismo, existen estudios (Hannestad *et al.* 2011, Maes *et al.* 1995) que apuntan hacia posibles efectos de los antidepresivos actuales sobre el sistema inmune.

1.2. INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta adaptativa desencadenada por estímulos o condiciones consideradas nocivas como una infección o lesión tisular. La inflamación aguda es un proceso auto-regulado con función adaptativa caracterizada por la defensa del huésped ante patógenos externos o daño tisular, mientras que la inflamación crónica es un proceso inflamatorio leve que no posee capacidad de extinguirse por sí mismo (Medzhitov 2008).

Los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en la respuesta inflamatoria aguda ante una infección producida por un patógeno o ante un tejido dañado se conocen bastante bien; incluso los procesos que llevan a una inflamación crónica localizada, producida por infecciones crónicas o por enfermedades autoinmunes, son parcialmente conocidos (Kim *et al.* 2014). Sin embargo, se conoce poco aún acerca de las causas y mecanismos implicados en la inflamación crónica sistémica que se observa en enfermedades como la diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares.

Estos estados de inflamación crónica parecen estar relacionados con una disfunción en la homeostasis de sistemas fisiológicos no implicados directamente con las respuestas inmunes a la infección (Straub *et al.* 2011).

Independientemente de la causa, la inflamación parece ser una respuesta adaptativa encargada de restablecer la homeostasis.

El proceso inflamatorio

La respuesta inflamatoria aguda implica una distribución coordinada entre el plasma y los leucocitos de componentes pro-inflamatorios hacia el sitio diana de infección o daño. Los mastocitos y macrófagos son los encargados del reconocimiento inicial de la infección (Medzhitov 2008), desencadenando la producción y liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas. Estos mediadores posibilitan el acceso de los leucocitos y proteínas plasmáticas a tejidos extravasculares hacia el sitio diana.

En estos espacios extravasculares se crea una matriz provisional donde, al igual que en el endotelio de los vasos sanguíneos, se produce una unión inducible y selectiva de integrinas y leucocitos con selectinas de las células endoteliales que permite la extravasación selectiva de neutrófilos de los vasos sanguíneos hacia el sitio afectado, donde se activan por contacto con un patógeno o inducidos por las citoquinas secretadas por las células del tejido (Janssen and Henson 2012).

La respuesta inflamatoria aguda culmina con la eliminación de los agentes infecciosos tras lo que se procede a la reparación de los tejidos por parte de los macrófagos. En esta última fase, disminuyen las moléculas pro-inflamatorias y aumentan las anti-inflamatorias, inhibiendo así el reclutamiento de neutrófilos y promoviendo, a su vez, el de monocitos y macrófagos. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β : Transforming Growth Factor beta) y otros factores de crecimiento producidos por los macrófagos, también tienen un papel crucial en esta etapa (Janssen and Henson 2012).

Estos mecanismos de inflamación inducida por infección son ampliamente conocidos, a diferencia de los de otros procesos inflamatorios. Los estados inflamatorios crónicos sistémicos no parecen encajar en el patrón clásico de transición de la inflamación aguda a la inflamación crónica.

1.2.1. Moléculas inflamatorias

Existe una compleja red de regulación que interviene en la respuesta inflamatoria, la cual, está formada por diversos inductores (lipopolisacáridos de la pared celular de las bacterias, alérgenos, colágeno, etc.) que inducen la movilización de moléculas como las inmunoglobulinas activando así la producción de mediadores (interleuquinas, aminas vasoactivas, etc.) (Conti *et al.* 2017). Son

estos mediadores los que provocan la adaptación de los tejidos implicados a la situación específica de estrés.

Citoquinas

Las citoquinas son mediadores solubles producidos por diferentes tipos de células, entre ellas macrófagos y mastocitos, que actúan en la comunicación célula-célula durante la respuesta inmune donde intervienen en la inflamación, tanto en la activación del endotelio y leucocitos como en la inducción de la respuesta de fase aguda (Raphael *et al.* 2015).

Existen varios tipos de citoquinas pro- y anti-inflamatorias; IFN- γ , quimioquinas, linfoquinas, interleuquinas, TGF- β , factores estimulantes de colonias o TNF- α y algunas de ellas poseen actividad pro- o anti-inflamatoria dependiendo de la situación, ya que pueden ejercer diferentes efectos en función de la localización o de la situación (Ramesh *et al.* 2013) .

Interleuquina 6 (IL-6)

La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina prototípica con funciones tanto pro- como anti- inflamatorias. Posee estructura glucoproteica y es secretada por diversos tipos celulares implicados en la inflamación como macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos (Tanaka and Kishimoto 2014). Se expresa a demanda como respuesta a la infección interviniendo en la síntesis de proteínas de la fase aguda y la hematopoyesis y su producción se detiene tras la restauración de la homeostasis. Posee actividad pro-inflamatoria redundante dentro de su familia de citoquinas, interviniendo en la producción de inmunoglobulinas mediante la diferenciación de linfocitos B y en la activación de linfocitos T citotóxicos (Scheller *et al.* 2014).

En cuanto a su actividad anti-inflamatoria, es capaz de inducir indirectamente el aumento de cortisol, inhibiendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α y la IL-1. Este aumento de cortisol se produce al actuar en el eje HPA (Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal) a nivel de la pituitaria estimulando la producción de ACTH (hormona adrenocorticotropina) (Gadek-Michalska *et al.* 2013) (Figuras 1 y 2).

La IL-6 está implicada en los síntomas típicos relacionados con la inflamación, como fatiga, somnolencia, disminución de la motivación, dolor articular y muscular y cefalea (Chrousos 2000, Kelley *et al.*

2003). Esta molécula puede también intervenir en procesos metabólicos, el desarrollo embrionario y la consolidación de la memoria (Patki *et al.* 2013).

Los niveles plasmáticos de la IL-6 parecen verse afectados por factores como la edad, la cantidad de estrógenos, y el índice de masa corporal (IMC) (Ershler *et al.* 1993, Mohamed-Ali *et al.* 1997). En individuos sanos, según algunos autores (Sothorn *et al.* 1995, Vgontzas *et al.* 2002, Vgontzas *et al.* 1999), las concentraciones de IL-6 muestran un patrón circadiano característico, con un aumento de concentración durante las horas de sueño, y una disminución durante las horas de la mañana.

Una disfunción en la expresión de esta citoquina parece ser que puede derivar en diversas enfermedades autoinmunes, de inflamación crónica, o cánceres (Tanaka and Kishimoto 2014). En humanos, se ha encontrado una relación entre el aumento de la IL-6 y la artritis reumatoide (Robak *et al.* 1998). Un anticuerpo contra el receptor de IL-6 ha demostrado (Tanaka and Kishimoto 2012, Tanaka *et al.* 2012) la eficacia del bloqueo de la IL-6 para su tratamiento. En animales, se ha observado que ratones deficientes en IL-6 muestran mayor resistencia a la artritis inducida (Ohshima *et al.* 1998).

1.3. EL ESTRÉS Y EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-ADRENAL (HPA) EN CONDICIONES NORMALES

1.3.1. El estrés en condiciones normales

El estrés es necesario para la supervivencia animal, proporciona la capacidad de estar alerta ante el peligro y reaccionar de una forma rápida a cualquier estímulo nocivo, además de mantener la homeostasis en situaciones de adaptación. Esta respuesta de estrés adaptativa está dirigida a un aumento de la capacidad de reacción; aumentando el catabolismo, acelerando la respiración y el ritmo cardíaco y elevando la presión arterial permitiendo a la sangre una mayor circulación en los músculos y el cerebro. Estas acciones son reguladas por el sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) (Figura 1), un complejo sistema neuroendocrino compuesto de diferentes estructuras cerebrales y órganos periféricos (Shirazi *et al.* 2015).

1.3.2. El eje HPA en condiciones normales

El eje HPA está implicado en la ansiedad y en la depresión así como en la funcionalidad cognitiva. El funcionamiento del eje se basa en una

serie de bucles de retroalimentación positiva y negativa entre el cerebro, la pituitaria y las glándulas adrenales que regulan la producción de glucocorticoides.

Circuito hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA)

Un estímulo estresante es procesado en la amígdala (Figura 1) que activa el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) liberando la hormona o el factor de liberación de corticotropina (CRH/CRF) hacia la glándula pituitaria que a su vez libera adrenocorticotropina (ACTH) en el torrente sanguíneo.

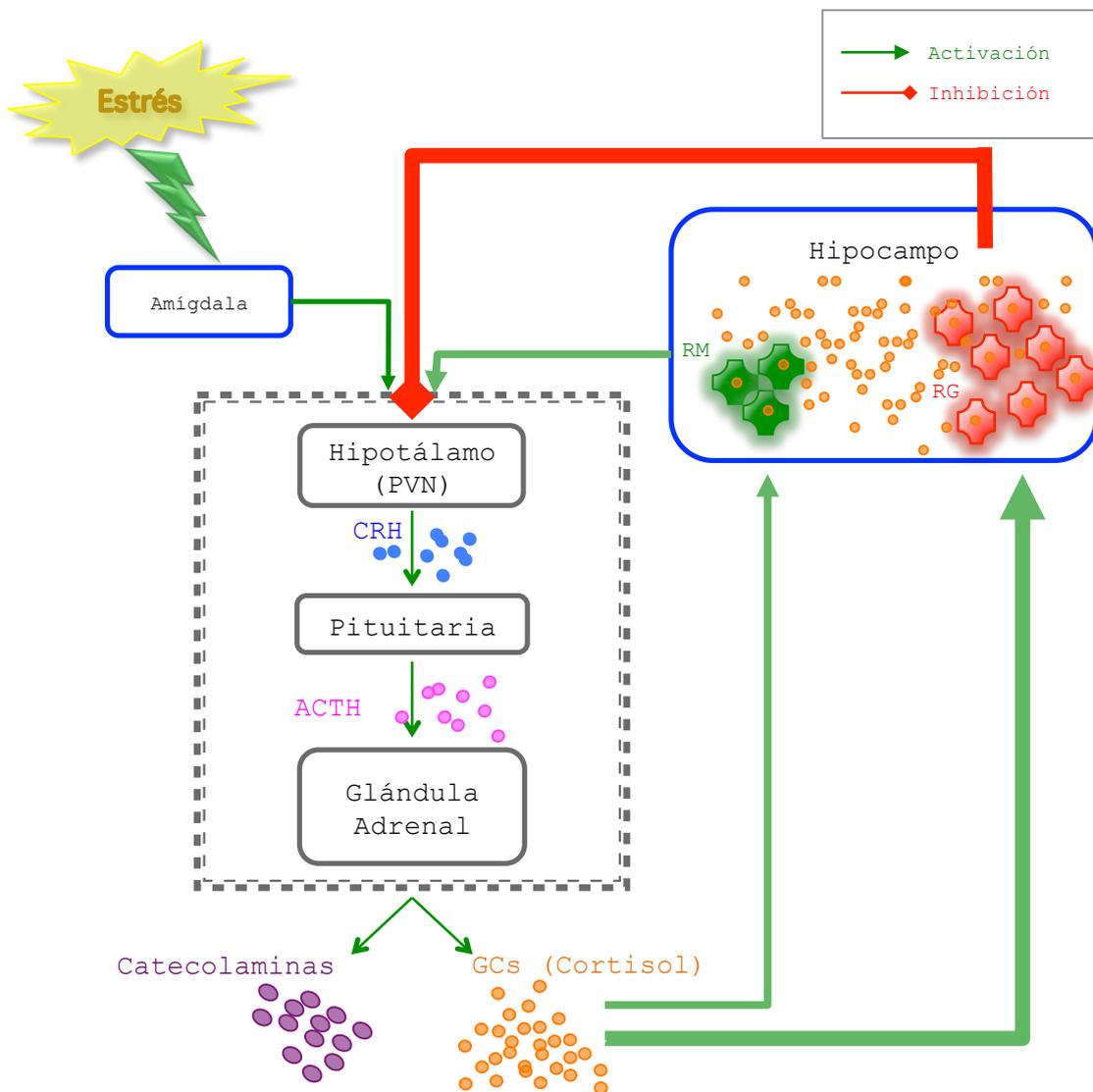


Figura 1: Circuito hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en condiciones de estrés. **Nota;* PVN; núcleo paraventricular del hipotálamo, CRH; hormona de liberación de corticotropina, ACTH; adrenocorticotropina, GCs; glucocorticoides, RM; receptor mineralocorticoide, RG; receptor corticoide.

El córtex de la glándula adrenal es estimulado por la ACTH secretando glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores). Estos glucocorticoides generan una retroalimentación negativa en el hipotálamo y la pituitaria disminuyendo la liberación de CRH y ACTH (Figura 1) (Herman *et al.* 2016, Shirazi *et al.* 2015).

Receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides

El cortisol, producido por las glándulas adrenales, llega al cerebro donde ejerce su acción a través de dos subtipos de receptores intracelulares: los receptores tipo I o receptores mineralocorticoides (RM), a los que se une con gran afinidad, y los receptores tipo II, receptores glucocorticoides (RG), por los que presenta menor afinidad (Budziszewska 2002).

Esta diferencia de afinidad produce una regulación de la ocupación de los receptores dada por la concentración de cortisol. A menor concentración se une principalmente a los receptores mineralocorticoides que se encuentran predominantemente en el hipocampo, pero es necesario alcanzar niveles más altos de cortisol para ocupar los receptores de glucocorticoides, cuya localización es más amplia en todo el cerebro (Budziszewska 2002).

Los RM del hipocampo son los que regulan la activación mediada por cortisol, mientras que los RG intervienen en la ruta de retroalimentación de la pituitaria y áreas activadas del cerebro como la amígdala (Figura 1).

1.4. POSIBLE RELACIÓN ENTRE LA INFLAMACIÓN Y LA DEPRESIÓN

Existen analogías destacadas entre los síntomas depresivos y los producidos por procesos inflamatorios; pérdida de apetito, fatiga, letargia, hiperalgesia, anhedonia, reducción de la libido, falta de concentración y trastornos del sueño, entre otros.

Las citoquinas pro-inflamatorias se encuentran elevadas en cerebro y en el sistema periférico (Dowlati *et al.* 2010) en enfermos de depresión y algunos estudios (Udina *et al.* 2012) muestran que su inducción puede producir consecuencias fisiopatológicas.

Se ha observado que las citoquinas pro-inflamatorias pueden interferir en el hipocampo disminuyendo la plasticidad sináptica, la neurogénesis o la potenciación a largo plazo (LTP) y aumentando el estrés oxidativo (Bonaccorso *et al.* 2003); en el eje HPA intervienen en la disminución de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides (Kadmiel and

Cidlowski 2013) disminuyendo la sensibilidad a su inhibición y también parecen estar implicadas en la reducción de niveles de serotonina (5-HT).

Además, los linfocitos poseen receptores funcionales de serotonina y de dopamina y en el proceso inflamatorio, las plaquetas secretan gránulos densos cargados de serotonina (Fisar and Raboch 2008).

Relación entre el eje HPA y el sistema inmune

Hans Selye creía que el estrés es la respuesta no específica del cuerpo a cualquier demanda y describió el "síndrome general de adaptación", que se activa por un organismo para superar varios desafíos (Selye 1946). Consideró que se dan los mismos tipos de respuesta bioquímica, como las variaciones en los niveles de cortisol, ante diferentes tipos de estrés.

Alteraciones del eje HPA en depresión

La alteración del sistema neuroinmune-endocrino se acepta como uno de los mecanismos biológicos fundamentales que pueden estar implicados en los trastornos psiquiátricos (Du and Pang 2015, Keller *et al.* 2017). Existen evidencias de una hiperactividad en el eje HPA en individuos deprimidos y se observa a menudo en estos pacientes una alteración de la actividad adrenocortical. Se ha observado que cuanto más severa es la condición patológica de la depresión los pacientes presentan mayor hiperactividad del eje HPA (Pruessner *et al.* 2003). Estudios *post-mortem* en individuos deprimidos muestran un mayor número de neuronas que expresan CRH y un aumento en los niveles de ARNm del receptor CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). Esta hiperactividad HPA va acompañada de una disminución del *feedback* inhibitorio dependiente de glucocorticoides (Du and Pang 2015), posiblemente debida a una disfunción de los receptores de glucocorticoides (Von Werne Baes *et al.* 2012) y un desequilibrio en la relación RG/RM observado en depresión (Budziszewska 2002).

Aunque no todos los individuos con alteraciones del eje HPA sufren problemas psiquiátricos y no todos los pacientes deprimidos muestran esta hiperactividad HPA (Von Werne Baes *et al.* 2012), el bloqueo de la retroalimentación lleva a una situación de estrés prolongada con altos niveles de CRH y glucocorticoides que se ha estudiado como posible mecanismo de inducción de la depresión. Estas hormonas también actúan como neuromoduladores en el cerebro afectando a funciones emocionales, cognitivas y de comportamiento (Keller *et al.* 2017).

Citoquinas y estrés

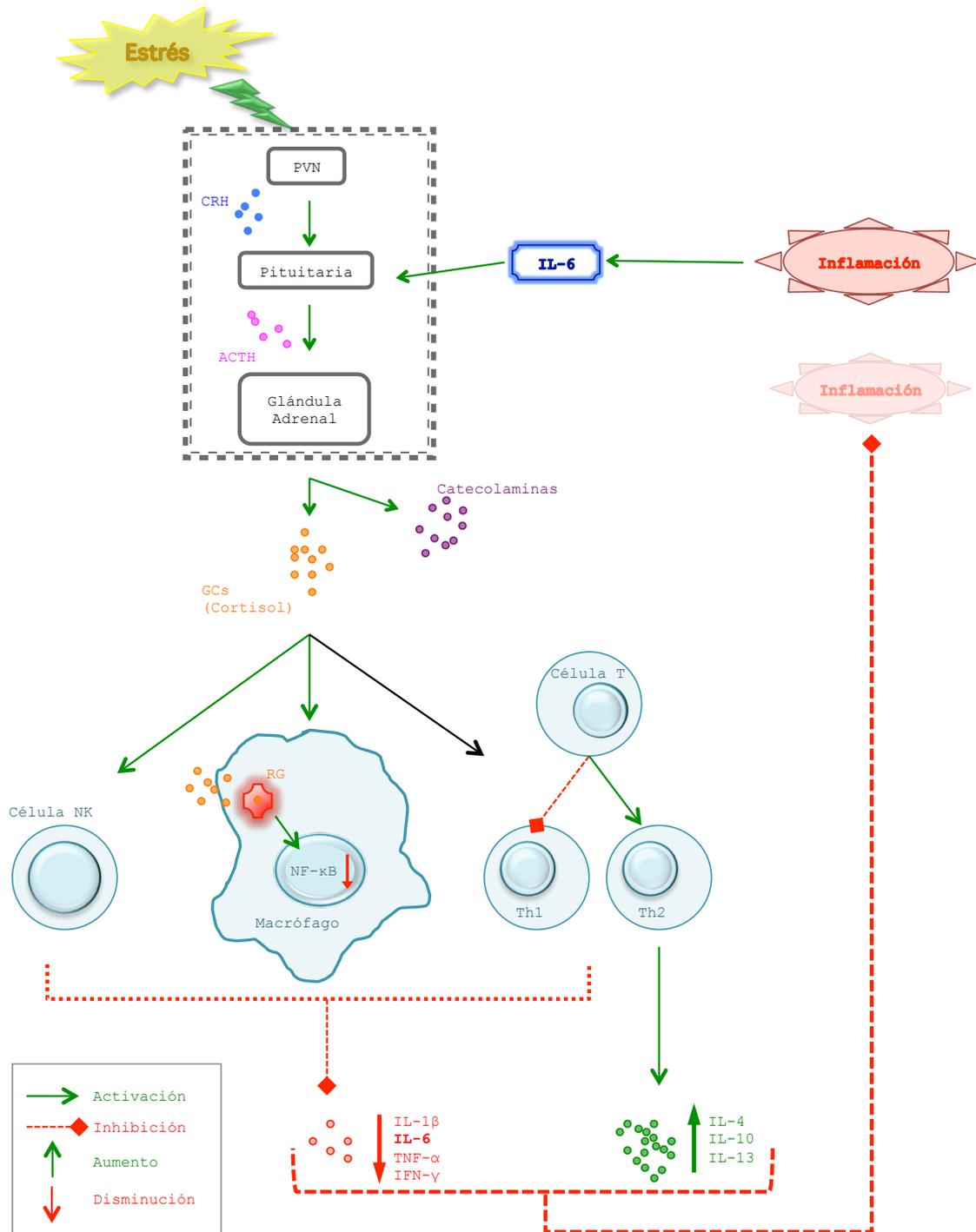


Figura 2: Modulación de moléculas inflamatorias por parte del eje HPA y activación de dicho eje por parte de IL-6. ***Nota;** PVN; núcleo paraventricular del hipotálamo, CRH; hormona de liberación de corticotropina, ACTH; adrenocorticotropina, RG; receptor de glucocorticoides, RA; receptores adrenérgicos, NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (ver ANEXO I para más abreviaturas).

Al comienzo, el estrés crónico produce una disminución de la concentración de citoquinas pro-inflamatorias, así como un aumento de las anti-inflamatorias (Tian *et al.* 2014) (Figura 2).

Si el estrés continúa, se produce un aumento de la resistencia a glucocorticoides mediante un descenso en la densidad y/o función de los RGS (receptores de glucocorticoides) (Kadmiel and Cidlowski 2013) disminuyendo la sensibilidad al cortisol de las células inmunes y su capacidad de inhibir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 o TNF- α (Figura 3).

En animales sanos (Kurosawa *et al.* 2016), la administración de IL-6 y el aumento de ACTH derivado, genera una hipertrofia de la glándula suprarrenal y produce un hiperaumento de los niveles de cortisol en plasma inhibiendo la producción de IL-6.

Modulación del eje HPA mediada por IL-6

La IL-6 estimula el eje HPA (Figura 2). La administración aguda de IL-6 aumenta los niveles de ACTH mediante la estimulación de la pituitaria (Harbuz *et al.* 1992). En humanos tratados crónicamente con IL-6 (Mastorakos *et al.* 1993) se observan aumentos en la ACTH aunque no se observan variaciones en los niveles de cortisol. Este aumento en la ACTH se asemeja a lo que se espera en el estrés crónico (Aguilera 1994). El efecto crónico de un aumento de IL-6 se estudió en modelos transgénicos con expresión constitutiva de IL-6 en el sistema nervioso central. Este modelo animal muestra neurodegeneración, gliosis y descomposición de la barrera hematoencefálica (Campbell *et al.* 1993).

En estado basal, estos animales presentan niveles normales de cortisol en el plasma, pero tras someterles a estrés por restricción de movimiento para activar la función del eje HPA se encontró un mayor aumento en los niveles de cortisol que en animales normales, no debido a niveles más altos de ACTH, ya que los niveles de esta hormona no cambiaron respecto a los animales normales (Raber *et al.* 1997).

Por lo tanto, los mecanismos mediante los que actúan las citoquinas inflamatorias durante el estrés crónico no parecen ser los mismos que los observados en un estrés agudo.

Algunos autores sugieren que estas incoherencias son resultados del tipo, duración e intensidad de los factores de estrés, métodos de detección y diferencias individuales (Reiche *et al.* 2004).

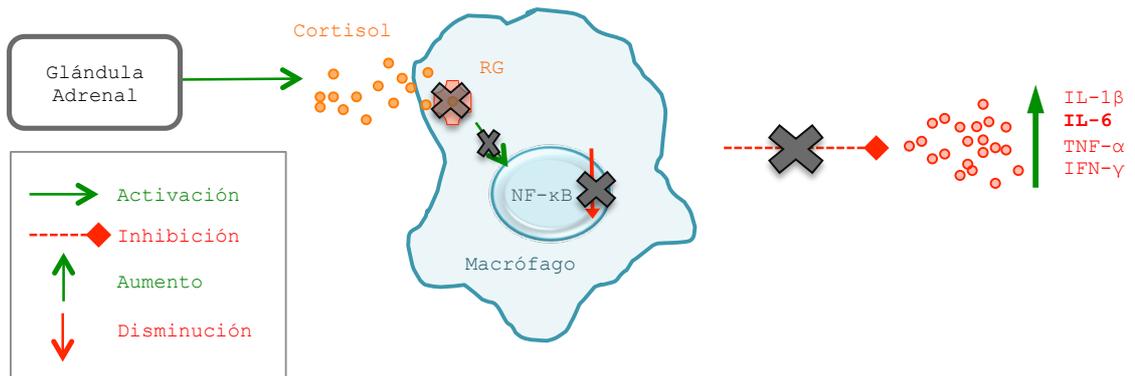


Figura 3: Aumento de moléculas pro-inflamatorias como consecuencia de la disfunción de los receptores de glucocorticoides. ***Nota;** RG; receptor de glucocorticoides, NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (ver ANEXO II para más abreviaturas).

Relación entre moléculas inflamatorias y depresión

Como ya se ha comentado anteriormente, existen evidencias que indican que la proporción en la que pacientes con enfermedades relacionadas con el sistema inmune como cáncer, VIH, hepatitis C, artritis reumatoide o lupus padecen depresión es mayor que en el resto de la población (Evans et al. 2005).

Las terapias con citoquinas, comúnmente IFN-γ, se utilizan como inmunomoduladores, antiproliferativos y antivirales frente a enfermedades relacionadas con el sistema inmune como son el cáncer o la hepatitis C. En estos pacientes se ha observado un aumento en síntomas relacionados con trastornos del estado de ánimo (Sarkar and Schaefer 2014).

Un 50% de pacientes tratados con IFN-γ como antiviral o en terapias contra el cáncer, desarrollan una depresión mayor (Capuron et al. 2002).

1.4.1. Estudios en animales

Administración de lipopolisacáridos (LPS)

Existen muchos estudios donde se utiliza como modelo de depresión la inducción de ésta con sustancias como LPS (lipopolisacáridos de la pared celular de bacterias Gram +) (Kubera et al. 2013) o corticosterona (Lebedeva et al. 2017), administradas crónicamente, que

producen un fenotipo depresivo-like. Esto lleva a pensar que puede haber una relación entre la inducción de la inflamación crónica y la depresión.

Utilizando estos modelos, se han hecho estudios en los que se somete a los animales previamente inoculados con LPS a diferentes tipos de estrés y se ha observado una variación de moléculas tanto pro- como anti- inflamatorias (Moynihan *et al.* 1990).

En otros casos también se observa un aumento de citoquinas como IL-6 o IL-1, así como aumento de células Th1 en el balance Th1/Th2, en animales con fenotipo depresivo-like sometidos a tratamiento con LPS (Seidel *et al.* 1995), aunque otros estudios no encuentran diferencias en otras citoquinas como IL-2 (Irwin *et al.* 2003).

Animales KO (knockout) de IL-6

En estudios con animales, inactivando genéticamente los receptores para IL-6, se han observado fenotipos resistentes a la depresión (Kong *et al.* 2015).

En animales carentes del gen que codifica para IL-6 se ha observado que, al inyectar IL-6 intracerebroventricular, los niveles de ARNm y proteína del transportador de serotonina (SERT) aumentan, sin variar los niveles del transportador de dopamina (Kong *et al.* 2015). En estos animales KO, también se ha observado un descenso en el comportamiento "depresivo-like" en diferentes test de conducta y un aumento a la sensibilidad del escitalopram en test de eficacia antidepresiva como el test de natación forzada (FST).

1.4.2. Estudios en pacientes deprimidos

Posible efecto antidepresivo de algunos anti-inflamatorios

Algunos estudios atribuyen efectos antidepresivos a las terapias con anti-inflamatorios no esteroideos (Pasco *et al.* 2010) y en otros no se ven diferencias significativas (Almeida *et al.* 2010), aunque parece haber una gran heterogeneidad en los resultados (Eyre *et al.* 2015).

Marcadores inflamatorios en pacientes deprimidos

En los últimos años, la inmunología psiquiátrica se ha centrado en la respuesta inmune innata y la inflamación para comprender el papel del sistema inmune en la depresión.

Se han publicado meta-análisis de estudios en humanos apuntando hacia aumentos en moléculas pro-inflamatorias como TNF- α y IL-6 en sujetos

deprimidos (Dowlati *et al.* 2010, Hiles *et al.* 2012, Howren *et al.* 2009, Liu *et al.* 2012). Estas citoquinas, y otras como la IL-1 β y el IFN- γ , han demostrado estar relacionadas en procesos como neuroplasticidad, neurotransmisión, estrés oxidativo y funciones neuroendocrinas consideradas importantes en el desarrollo de la depresión.

1.4.3. Relación de las citoquinas con monoaminas

Se está estudiando la posible modulación de algunos neurotransmisores como la serotonina (5-HT) o la dopamina (DA) por parte de las citoquinas (Catena-Dell'Osso *et al.* 2013).

Es conocido el papel de la serotonina en la regulación de los estados de ánimo, por lo que despierta gran interés la posible implicación de las citoquinas en su modulación. Algunas citoquinas pro-inflamatorias han demostrado ser capaces de interferir en la síntesis, liberación y recaptación de serotonina. El aminoácido triptófano, precursor de la 5-HT, se convierte en 5-hidroxitriptófano por la acción de la enzima triptófano hidrolasa (TH). Esta conversión es necesaria para la síntesis de 5-HT pero se ve reducida en presencia de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que disminuye la cantidad de triptófano disponible convirtiéndolo en kinurenina. Esta enzima, IDO, se encuentra predominantemente en macrófagos, astrocitos y microglía y parece aumentar esta reacción en presencia de citoquinas. En animales, se ha observado una relación del aumento de citoquinas con una mayor actividad IDO y un fenotipo depresivo (Catena-Dell'Osso *et al.* 2013).

También se estudia la interferencia de las citoquinas con la dopamina. Se ha observado un déficit de la actividad dopaminérgica en áreas como la corteza prefrontal y el cuerpo estriado en depresión y terapias con interferón- γ han mostrado reducir, en animales, los niveles de dopamina en cerebro (Raison and Miller 2001). Parece que las citoquinas modulan, de alguna manera, la actividad del transportador de dopamina y, a nivel de síntesis, se ha observado que pueden inhibir la función del co-factor tetrahidrobiopterina (BH₄) que actúa junto con la enzima tirosina hidroxilasa transformando la tirosina en L-DOPA (Raison and Miller 2001).

Acción anti-inflamatoria de los antidepresivos

También existen estudios, tanto en animales como en humanos, en los que se obtiene una disminución significativa de los niveles de citoquinas tras la administración crónica de diferentes

antidepresivos, y la eficacia de la terapia parece estar relacionada con esta disminución (Hannestad *et al.* 2011).

En enfermos de depresión, se ha observado que concretamente la proteína C-reactiva, el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6 disminuyen tras terapias antidepresivas, aunque algunos estudios especifiquen la alta heterogeneidad de estos datos (Eyre *et al.* 2016, Hannestad *et al.* 2011).

En muchos estudios de investigación en animales se ha comenzado a tomar la bajada de citoquinas como una prueba de eficacia antidepresiva, asemejándola a las pruebas comportamentales como el test de campo abierto (OFT), el test de natación forzada (FST) u otros, usados comúnmente como test de eficacia antidepresiva en los que se observa la variación de comportamiento de los animales tras la inducción del modelo y tras la administración de los antidepresivos (Grundmann *et al.* 2010, Xia *et al.* 2006).

1.4.4. Los modelos animales de depresión

Existen diversos modelos animales de depresión; a continuación se explican brevemente los más comunes y estandarizados (Abelaira *et al.* 2013).

Modelos inducidos por estrés

Tanto los modelos de estrés agudo como crónico muestran un patrón similar de variación de citoquinas, pero ha de tenerse en cuenta que en un modelo agudo en el que se toman muestras tras tan solo horas de ser inducido el estrés, se mide un efecto de ansiedad aguda, no de depresión, ya que no se mide el efecto a largo plazo. Por ese motivo, en este trabajo tan solo se han tenido en cuenta aquellos modelos inducidos por estrés en el que el efecto y el comportamiento "depresivo-like" no desaparece con el tiempo y sólo es revertido por sustancias antidepresivas.

- Modelos inducidos por estrés agudo

Estrés de campo abierto (OFS; Open Field Stress): El animal, al encontrarse por primera vez en un "campo abierto" intensamente iluminado, tiende a mantenerse en la periferia. La administración de antidepresivos aumenta la exploración.

Estrés por natación forzada (FSS; Forced Swimming Stress): Los roedores tienden a mantenerse inmóviles al sumergirlos en un

recipiente con agua. Este comportamiento se revierte con antidepresivos.

Estrés social agudo (ASS; Acute Social Stress): Los animales son expuestos una sola vez a un compañero dominante agresivo.

Los modelos inducidos por un estrés agudo pueden servir como modelos de ansiedad aguda, pero generalmente, sobre todo el campo abierto y la natación forzada, se utilizan como test de eficacia antidepresiva.

- Modelos inducidos por estrés crónico

Estrés crónico de baja intensidad (CMS o CUMS; Chronic Mild Stress o Chronic Unpredictable Mild Stress): En este modelo se somete a los animales de estudio a una serie de estímulos estresantes de una forma constante pero imprevisible a lo largo de varias semanas.

Separación materna (MS o MD; Maternal Separation o Deprivation): Se separa a las crías de su madre alrededor del día 9 post-natal durante un tiempo determinado cada día durante un número de días variable con la intención de producir un efecto en las crías que se manifestará en la edad adulta como un fenotipo de tipo depresivo.

Estrés crónico por Derrota o Indefensión Social (CSS o CSD; Chronic Social Stress o Chronic Social Defeat): Los animales experimentales se someten a estrés de derrota social durante un número variable de días consecutivos. Cada día, cada ratón se introduce en la jaula de un residente desconocido, generalmente perteneciente a cepas conocidas por su agresividad. Una vez que el animal experimental es físicamente derrotado, ambos animales (derrotados y agresores) se mantienen en contacto sensorial durante 24 h permitiendo contacto visual y olfativo pero no físico (mediante separación de algún tipo; mallas, rejillas...).

Estrés crónico por inmovilización o restricción (CIS or CRS; Chronic Inmovilización Stress or Chronic Restraint Stress): El estrés se induce introduciendo a los animales en tubos de sujeción para restringir el movimiento durante un tiempo variable al día, durante un número variable de días.

Oscuridad total (DD; Total Darkness): Los ratones se mantienen en un ciclo de 24 horas de oscuridad constante durante un número de días variable.

Trastorno de estrés postraumático (PTSD; Post Traumatic Stress Disorder): Los animales se someten a restricción de movimiento (véase estrés por inmovilización o restricción) durante 2 horas, después, se

les somete a estrés por natación forzada tras lo cual se exponen a éter hasta la pérdida de conocimiento. Tras la recuperación se les suministra un choque eléctrico de pie. Este proceso no se repite pero sus consecuencias neuroquímicas y de comportamiento se mantienen en el tiempo y no son revertidas sin el uso de sustancias como antidepresivos.

Ambiente frío y seco añadiendo "footshock" (Cold-dry; cold and dry environment): Se mantiene a los animales en una cabina climatizada a unos 6°C de temperatura y una humedad relativa cercana al 30% durante un tiempo variable al día, durante un número variable de días. Se puede variar el modelo añadiendo pequeños *electroshocks* en el pie todos los días, antes de someterlos al ambiente frío y seco.

Estrés crónico por natación forzada (CFSS; Chronic Forced Swimming Stress): En este modelo se somete a los animales a varias sesiones de natación forzada (se introduce al animal en un recipiente con agua en el que no puede llegar al suelo sin hundirse durante un periodo de tiempo) en repetidas ocasiones.

Modelos inducidos por intervenciones quirúrgicas

Bulbectomía olfatoria (bilateral) (OB; (Bilateral) Olfactory Bulbectomy): Esta intervención afecta al eje HPA (Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal), ya que en roedores, la vía olfativa está unida al sistema límbico. Se produce fisiológicamente una inflamación implícita debido a la cirugía de manera aguda. El comienzo del trastorno de tipo depresivo aparece después de 2-5 semanas, momento en el que la reacción inmune aguda ha desaparecido.

Modelos inducidos por administración de lipopolisacáridos (LPS), interferón- γ (IFN- γ) y corticosterona o por inducción de tumores

Tras la administración, tanto de LPS como de INF- γ y de corticosterona o la inoculación de células tumorales, se desencadena una reacción inmune fisiológica aguda produciendo inflamación. En estos modelos, el aumento de la IL-6 podría ser tan sólo una respuesta aguda y a corto plazo al tratamiento en sí y puede revertirse de forma natural (Dantzer 2001, Tonelli et al. 2008). La corticosterona es una importante molécula anti-inflamatoria; está directamente implicada en la respuesta inmune y en la producción de otras moléculas anti-inflamatorias tales como IL-6, por lo que la variación de IL-6 producida por la "depresión" se vería enmascarada por la propia producción derivada del aumento de corticosterona.

1.5. MEDICINA BASADA EN LA EVIDENCIA

La medicina basada en la evidencia se centra en el análisis sistemático de las pruebas proporcionadas por la investigación clínica, ya sea mediante ensayos clínicos experimentales como observacionales o por ensayos en animales de experimentación. Con el objetivo de evaluar esta información de forma objetiva y precisa es necesario sintetizar las evidencias sin caer en sesgos de selección de resultados.

1.5.1. Tipos de diseños de investigación

En un diseño experimental (Figura 4) el investigador posee el control de, al menos, algunas condiciones del estudio, específicamente lo concerniente a la asignación de los participantes y el cegamiento de los sujetos a las intervenciones en estudio.

Los ensayos de laboratorio en animales de experimentación suelen pertenecer a este grupo, generalmente con diseños cuasi-aleatorios.

Los diseños observacionales tienen como objetivo observar las variaciones naturales entre los participantes del estudio producidas por el efecto de una intervención o una exposición.

1.5.2. Calidad de estudios experimentales y observacionales

La validez de un estudio es lo que define la fortaleza de su resultado.

La validez externa aporta una mayor capacidad de extrapolar los resultados obtenidos a el resto de la población o a otras poblaciones. Los estudios con mayor número de participantes o multicéntricos poseen mayor validez externa y también aquellos ensayos en los que la población en estudio es representativa de la población en la que se va a administrar la intervención.

La validez interna se obtiene con un estricto control de los factores externos a la intervención y los resultados obtenidos reflejan más fielmente las variaciones producidas exclusivamente por la intervención. Son los estudios pequeños, generalmente de laboratorio, y más controlados, los que poseen mayor validez interna.

Para aumentar todo lo posible la validez y la calidad de los estudios, se han desarrollado numerosas guías y en el siguiente esquema (Figura 5) se muestran algunas de ellas, las más utilizadas.

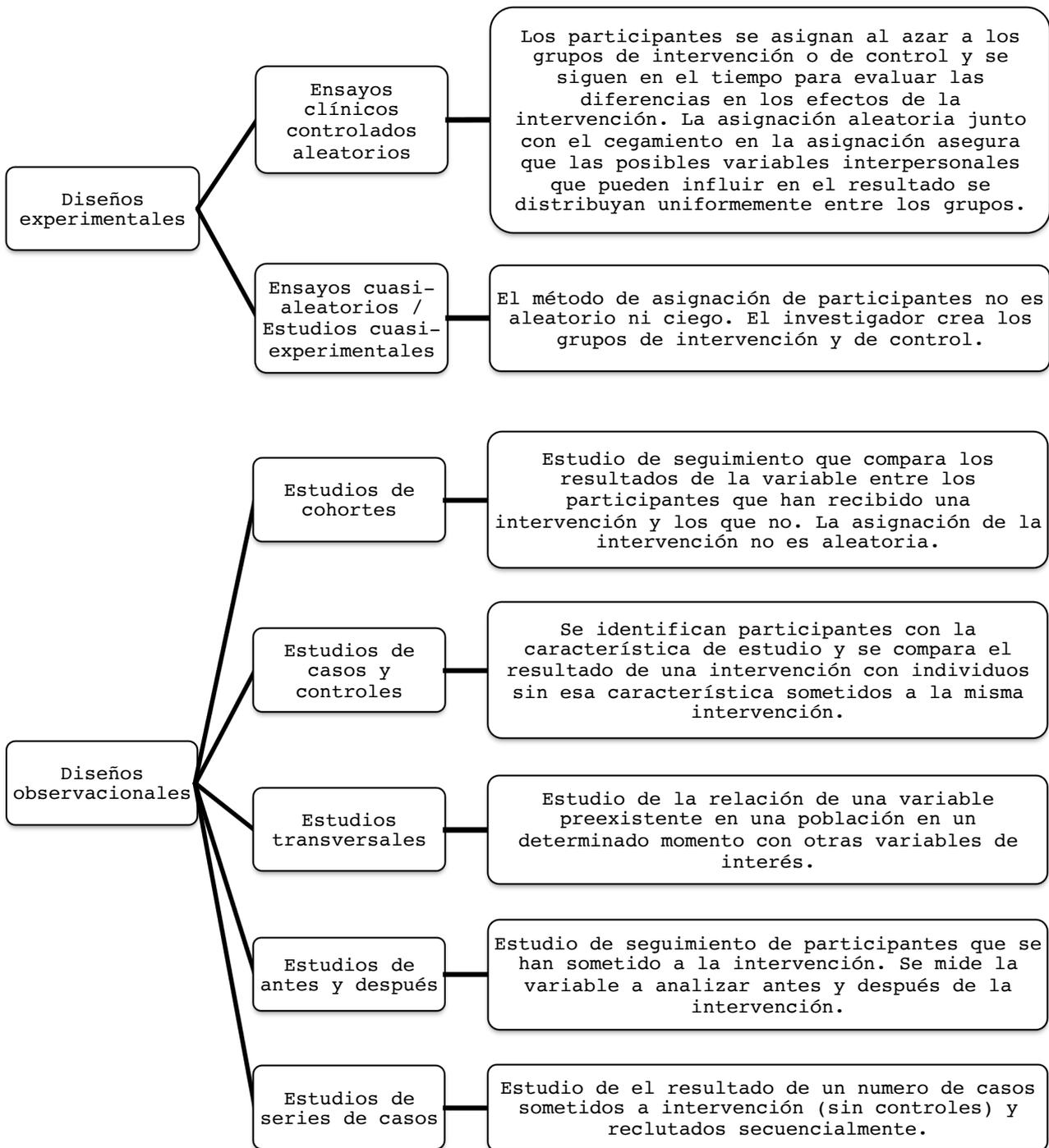


Figura 4: Breve diagrama de los diferentes tipos de diseños de investigación.

En general estas guías constan de una lista de características que ha de cumplir un estudio, como la aleatorización, el cegamiento, etc. Los ensayos en humanos suelen seguir estas pautas con más o menos rigurosidad y existen registros de ensayos clínicos y bases de datos donde constan la mayoría de los estudios que se realizan.

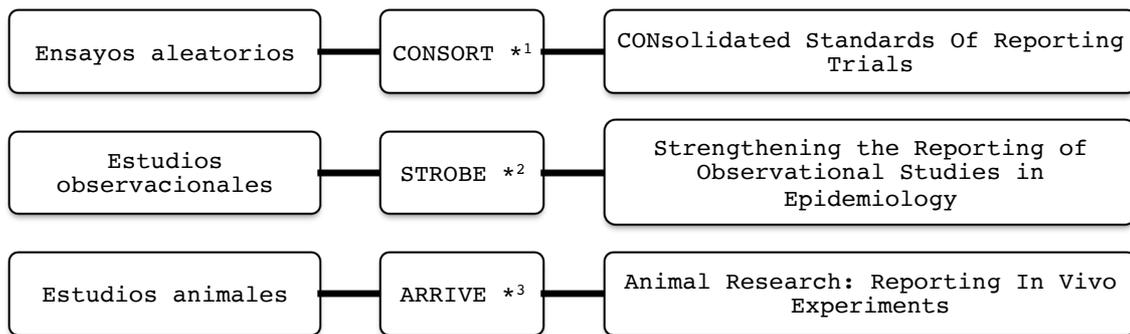


Figura 5: Breve esquema de algunas de las guías propuestas como referencia en la creación y evaluación de calidad de informes de investigación. ***Nota;** *1.(Begg et al. 1996), *2.(Vandenbroucke et al. 2014), *3.(Kilkenny et al. 2010b, McGrath et al. 2010).

En el caso de estudios en animales no es así; no existen registros ni bases de datos con todos los estudios animales, por lo que la fuente de información son las revistas científicas, en las que un estudio puede ser o no publicado, y la rigurosidad en la metodología de los diseños experimentales en animales es mucho menor. Las guías como ARRIVE (Kilkenny et al. 2010a), pretenden aportar un estándar de calidad que, si es adoptado, puede estandarizar de alguna manera los ensayos animales y hacer así posible la revisión y comparación de datos de diferentes estudios.

1.6. META-ANÁLISIS

1.6.1. Uso del meta-análisis

Probablemente, ningún estudio por sí mismo, pueda ofrecer respuestas indudables sobre ningún tema pero los métodos meta-analíticos reducen ciertas limitaciones de los estudios individuales, como el tamaño del estudio o sesgos de población y pueden convertirse en herramientas para proponer y comprobar nuevas hipótesis no observadas en los estudios originales.

Ya en 1976, Glass planteó la importancia de las técnicas meta-analíticas y definió el meta-análisis como "el análisis estadístico de una gran colección de resultados de los análisis de estudios individuales, con el objetivo de integrar los hallazgos."

El meta-análisis es un diseño de estudio global, cuantitativo y fiable, que se utiliza para analizar sistemáticamente los resultados

de estudios previos con el objetivo de inferir una conclusión de esas investigaciones.

La gran cantidad de literatura y ensayos existentes sobre un mismo tema convierten al meta-análisis en una importante herramienta capaz de sintetizar las evidencias, generando una visión global imparcial de las mismas y proporcionando un resultado único incluso cuando existe gran controversia entre los estudios individuales. Además, mediante los análisis de heterogeneidad, se puede analizar las posibles causas de esa controversia.

Los resultados de un meta-análisis, muchas veces gracias a los diferentes abordajes en los análisis de heterogeneidad, pueden revelar nueva información planteando o incluso resolviendo nuevos interrogantes o generando nuevas hipótesis no abordadas en los estudios originales.

Los meta-análisis se realizan para evaluar la fuerza de la evidencia de una determinada cuestión. Se puede determinar si existe un efecto determinado o no y si éste es positivo o negativo, con mayor fiabilidad de la que ofrece cualquiera de los ensayos analizados por sí solo.

La estimación del tamaño del efecto ofrecida por un meta-análisis siempre será más precisa que la de cualquier estudio individual, así como la validez externa del mismo, ya que analiza datos de diferentes ensayos en diferentes poblaciones y puede que utilizando diferentes métodos, y siempre ofrecerá un tamaño de muestra mayor.

Meta-análisis en humanos vs meta-análisis en animales

El uso de animales de experimentación como medio para comprender la fisiopatología de enfermedades humanas está ampliamente extendido, aunque sigue habiendo ciertos aspectos éticos y de validez de las extrapolaciones en los que es necesario avanzar más.

En muchos casos, se carece de evidencias en humanos o éstas no son suficientes, por lo que es necesario recurrir a los estudios animales. Para poder evaluar todos los estudios de un tema y llegar a una conclusión, no es suficiente con revisar la literatura, sino que es necesario proceder a ejecutar diferentes pruebas estadísticas con todos esos datos.

Un meta-análisis tiene mucho más peso que un solo estudio; las hipótesis y la estimación del tamaño del efecto poseen mayor poder

estadístico que los estudios individuales. Nos podemos encontrar con estudios con tamaños de efecto grandes pero no estadísticamente significativos pero, si estos efectos siguen la misma tendencia, se puede obtener la significación estadística al someterlos a un meta-análisis. Esto es muy útil en estudios que requieren un gran número de participantes o animales para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Un meta-análisis puede servir para disminuir el uso de animales de experimentación o para disminuir el número de experimentos necesarios para observar una evidencia.

Aún así, y pese a que los meta-análisis de intervenciones clínicas en humanos han aumentado exponencialmente, no sucede lo mismo con la investigación en animales. Los estudios en animales no suelen ser tan metodológicamente rigurosos y existen más guías para llevar a cabo estudios en humanos que en animales.

Hasta ahora, el debate sobre la utilidad o no de los meta-análisis para evaluar los experimentos animales se ha centrado en si los resultados de estos estudios se pueden extrapolar y decidir si comenzar o no estudios clínicos de una intervención en humanos.

Otro problema en la realización de meta-análisis de experimentos en animales es que, en la mayoría de ellos, el cegamiento no es posible y no se suele especificar en el ensayo nada al respecto. A menudo, tampoco se hace referencia a la presencia o ausencia de aleatorización. Esto presenta un problema a la hora de realizar análisis de riesgo de sesgos intra-estudios. Se debe asignar un riesgo incierto a la mayor parte de los aspectos que conforman el examen de riesgo de sesgos, lo que disminuye la calidad de la evidencia obtenida.

Existen herramientas específicas para valorar el riesgo de sesgos en estudios animales como la "*SYRCLE's tool for assessing risk of bias*" (Hooijmans *et al.* 2014) desarrollada por el grupo SYRCLE (SYStematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation), pero son muy similares a las utilizadas en humanos y no tienen en cuenta la ausencia de este tipo de información en los estudios publicados de experimentación animal (Wei *et al.* 2016).

Heterogeneidad entre estudios de las estimaciones del efecto

Como ya se ha comentado anteriormente, una de las utilidades de la realización de un meta-análisis es la posibilidad de examinar las posibles fuentes de la heterogeneidad de los estudios incluidos.

Los resultados del tamaño del efecto obtenidos en un meta-análisis deben interpretarse cuidadosamente si existe heterogeneidad (Greenland 1987); se debe cuestionar si estos resultados se pueden generalizar y cómo hacerlo en el caso de que se pueda.

La Colaboración Cochrane (Higgins *et al.* 2011b) define dos tipos de fuentes de heterogeneidad; la heterogeneidad clínica y la heterogeneidad metodológica.

La heterogeneidad clínica viene dada por las diferencias en las intervenciones y en los efectos estudiados y la variabilidad que existe entre los participantes y/o los controles.

La heterogeneidad metodológica se produce por la variabilidad en el diseño del estudio; el uso o no del cegamiento o la aleatorización y las diferencias en la definición o medición de los resultados. La heterogeneidad que se basa exclusivamente en este tipo de variabilidad indica que los estudios sufren algún tipo de sesgo.

El valor de la heterogeneidad estadística que se obtiene de un meta-análisis depende la variabilidad de los datos obtenidos de los estudios individuales como consecuencia de la heterogeneidad clínica y/o metodológica entre estos estudios, que no puede ser atribuida al azar.

En el caso de encontrar heterogeneidad entre los estudios, si todos los estudios apuntan hacia un mismo efecto y el intervalo de confianza del tamaño del efecto combinado no cruza el valor de la hipótesis nula, no se puede concluir que no exista un efecto, aunque el tamaño de ese efecto no se pueda estimar con esos datos.

Sesgo de publicación

Los estudios con resultados estadísticamente significativos tienen más probabilidad de ser publicados (Sterling 1959); esto implica un sesgo de publicación o sesgo de pequeños estudios.

El sesgo de publicación puede llevar a repetir estudios con resultados negativos o poco significativos por investigadores diferentes, o posibles errores en los estudios con resultados positivos que no serán rebatidos por estudios con resultados negativos (Sterling 1959).

En el contexto de un meta-análisis, las investigaciones que se obtienen de las búsquedas bibliográficas se limitan a estudios publicados. Por otro lado, se pueden encontrar trabajos no publicados en libros de congresos y bases de datos de ensayos clínicos, lo que

ayuda a disminuir el sesgo de publicación. En experimentación animal, sin embargo, solventar este problema es complicado ya que, a diferencia de los ensayos clínicos en humanos, no existen registros ni bases de datos en la que consten todos los experimentos realizados independientemente de los resultados obtenidos.

1.7. CALIDAD DE META-ANÁLISIS

A menudo, la calidad de los resultados del meta-análisis no es la esperada, una causa puede ser la calidad de los estudios incluidos o la alta heterogeneidad encontrada entre ellos. Éstos son aspectos extrínsecos al propio análisis y sólo se pueden buscar sus posibles causas. Existen otros aspectos de la calidad de un meta-análisis que sí es posible mejorar como la claridad y transparencia de los protocolos o de la obtención de datos. Para ayudar a la realización de este tipo de estudios se han establecido diferentes guías (Figura 6) que van actualizando con el paso del tiempo.

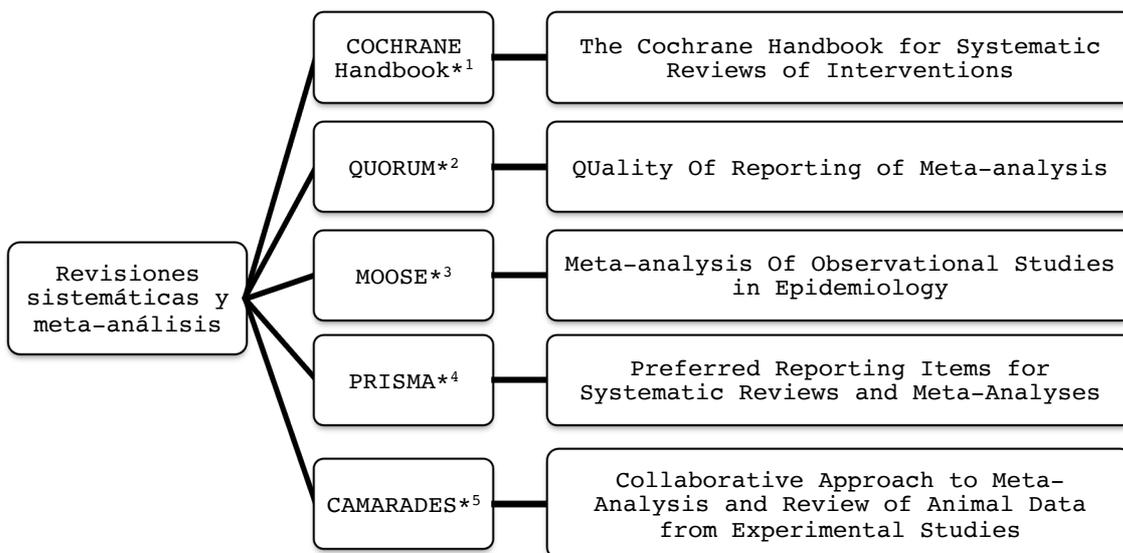


Figura 6: Breve esquema de algunas de las guías propuestas como referencia en la creación y evaluación de calidad de revisiones sistemáticas y meta-análisis. ***Nota;** *1.(Higgins et al. 2011b), *2.(Moher et al. 1999), *3.(Stroup et al. 2000), *4.(Moher et al. 2010), *5.(Vesterinen et al. 2014).

Existen grandes diferencias en la comparación, análisis e interpretación de datos procedentes de estudios humanos o animales. Anteriormente se ha comentado la existencia de guías para la realización y publicación de estudios pero, a menudo, en ensayos

animales no son viables algunos de los indicadores que se utilizan en ensayos clínicos, como el cegamiento de las intervenciones y de los evaluadores.

La síntesis sistemática de datos en investigación básica es relativamente novedosa y cada vez más se están realizando revisiones sistemáticas y meta-análisis sobre estudios en animales. En 2004, se estableció la iniciativa CAMARADES (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies) para promover y apoyar el uso de enfoques similares a los utilizados por la Colaboración Cochrane a datos de estudios en animales.

El SyRF (CAMARADES-NC3Rs Preclinical Systematic Review & Meta-analysis Facility; <http://syrf.org.uk/>) es una plataforma en línea para realizar meta-análisis de estudios preclínicos, donde se ofrece una guía de realización de meta-análisis y revisiones sistemáticas *on line*.

Su objetivo es proporcionar una fuente fácilmente accesible de apoyo metodológico, tutoría, orientación, materiales educativos y asistencia práctica a quienes deseen emprender una revisión sistemática y meta-análisis de datos de estudios en animales de experimentación. También ofrece una plataforma de difusión de protocolos y datos de estudios animales que puede que nunca sean publicados en revistas científicas.

1.8. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es la valoración de la asociación entre la concentración de moléculas inflamatorias y la presencia de conductas "*depresivo-like*" en modelos animales de depresión y su relevancia en la investigación translacional.

Concretamente, mediante el análisis de la variación de la cantidad de interleuquina-6 en diferentes áreas del cerebro y sangre en modelos animales de depresión inducidos por estrés que provocan un fenotipo "*depresivo-like*" de manera crónica e irreversible de forma fisiológica y si éstos resultados de la experimentación animal justifican el paso hacia la experimentación en humanos.

2. METODOLOGÍA

A continuación se detallan los métodos utilizados para la realización de este estudio.

2.1. SELECCIÓN DE MARCADOR INMUNOLÓGICO Y MODELOS ANIMALES

Selección de marcador inmunológico

Se seleccionó la interleuquina 6 como marcador inmunológico ya que los estudios que relacionan el sistema inmunológico, más concretamente el proceso inflamatorio, con la depresión se centran en el estudio de las citoquinas como marcadores de inflamación. Dentro de las citoquinas más comúnmente analizadas en este aspecto, se encuentran la IL-6, la IL-1 β y el TNF- α , ya que parece que, según algunos estudios en humanos (Bufalino *et al.* 2013, Dowlati *et al.* 2010, Kim *et al.* 2007), son las que se encuentran elevadas en pacientes que sufren de depresión.

La IL-6 es el marcador que más se repite en la bibliografía y presenta tendencia a estar elevada en depresión en un mayor número de estudios y meta-análisis en humanos (Haapakoski *et al.* 2015, Hodes *et al.* 2011).

Selección de modelos animales de depresión a incluir en este trabajo

Los modelos animales de depresión inducidos por intervenciones quirúrgicas o por administración de sustancias que intervienen en el sistema inmune, no son adecuados para este estudio, ya que el sistema inmune se ve alterado y no se podría asegurar si las posibles modificaciones que se observen en moléculas inflamatorias sean consecuencia del fenotipo depresivo o de la propia inducción del modelo.

Los modelos de depresión inducidos mediante un estrés agudo, por lo general, son más bien modelos de ansiedad, que se revierten en poco tiempo y no se podría diferenciar un cambio en los marcadores de inflamación debido a ansiedad aguda o a un comportamiento "depresivo-like".

Por estos motivos, en este trabajo se han incorporado exclusivamente estudios que utilizan modelos animales de depresión inducidos por estrés, que causan un fenotipo "depresivo-like" crónico, que sólo puede ser revertido por la administración de antidepresivos y no de forma fisiológica tras un periodo de tiempo. Estos modelos son:

- Estrés crónico de baja intensidad
- Separación materna
- Indefensión social
- Estrés crónico por inmovilización o restricción
- Oscuridad total
- Trastorno de estrés postraumático
- Ambiente frío y seco añadiendo "footshock"
- Estrés crónico por natación forzada

Se han elegido este tipo de modelos por que son los que más se pueden asemejar a lo que sucede en humanos, ya que se pretenden comparar los resultados de este trabajo con los que existen en la bibliografía en pacientes deprimidos.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Búsqueda bibliográfica

La búsqueda de los estudios a incluir en este trabajo se realizó en MEDLINE a través de PubMed (ANEXO II) y, con las modificaciones pertinentes, en EMBASE a través de OVID, con diferentes combinaciones de palabras clave. Esta búsqueda está actualizada a fecha de septiembre de 2016. Además, se incluyeron estudios de otras fuentes como referencias en los artículos estudiados y otras búsquedas bibliográficas para distintos marcadores.

2.2.2. Selección de estudios

2.2.2.1. Criterios de inclusión/exclusión

Se recogen a continuación los criterios seguidos para la inclusión o exclusión de los ensayos encontrados en las búsquedas bibliográficas:

Criterios de inclusión

- Datos de variación de IL-6: Trabajos en los que se estudia la variación de IL-6 en modelos animales de depresión en comparación con controles.
- Modelos animales de depresión inducidos por estrés con efecto crónico: Modelos animales de depresión inducidos por situaciones estresantes que derivan en un fenotipo "depresivo-like" no revertido fisiológicamente.
- Muestras de cerebro o sangre.

Criterios de exclusión

- Estudios no originales o revisiones.
- Estudios en cultivos celulares.
- Modelos animales modificados genéticamente: Modelos inducidos mediante modificación genética o inducidos en animales ya modificados genéticamente, como ratones KO.
- Comorbilidad con cualquier patología.
- Modelos de depresión inducidos por la administración de sustancias: Los modelos inducidos por cualquier tipo de compuesto bioquímico (LPS, corticosterona ...).
- Modelos de depresión inducidos por lesiones como bulbectomía olfatoria.
- Modelo de estrés agudo: Trabajos que utilizan modelos de estrés agudo como los comentados anteriormente.
- Muestra proveniente de un periodo agudo: Trabajos en los que la muestra se ha tomado tras un periodo menor de 72 horas tras el último estrés. En caso contrario, el resultado obtenido podría reflejar el efecto agudo de la última estimulación estresante.

2.2.2.2. Evaluación de validez y calidad de los estudios

La validez y la calidad de los estudios se estimó mediante la valoración del riesgo de sesgos utilizando la "*SYRCLE's tool for assessing risk of bias*" (Hooijmans et al. 2014) desarrollada por el grupo SYRCLE (SYstematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation).

Criterios para la evaluación de la calidad y el riesgo de sesgos de los estudios.

La herramienta desarrollada por el grupo SYRCLE para el cálculo del riesgo de sesgos en estudios en animales, la "*SYRCLE's tool for assessing risk of bias*" o "*SYRCLE's RoB tool*", está adaptada de la herramienta "*Cochrane RoB tool*" (Higgins et al. 2011b) teniendo en cuenta algunas de las diferencias que existen entre la investigación en humanos y en animales.

Se exponen a continuación los criterios para la evaluación de la calidad de los estudios animales, mediante la valoración de posibles fuentes de sesgos, según la "*SYRCLE's RoB tool*":

Sesgo de selección:

1. *Generación de secuencia de asignación aleatoria:* La finalidad de la generación de una secuencia aleatoria es que los grupos que se obtienen sean homogéneos y comparables.

2. *Características basales:* Al igual que con la generación de una secuencia aleatoria, la finalidad de que los individuos en los grupos tengan similares características basales es que los grupos que se obtienen sean comparables y la única variable sea la intervención o el tratamiento a juzgar.

3. *Ocultamiento de la asignación* de los grupos de tratamiento y control.

Sesgo de realización:

4. *Organización aleatoria de los animales:* La estabulación aleatoria de los animales puede ser importante si las condiciones de los habitáculos no son homogéneas.

5. *Cegamiento del personal:* En la "Cochrane RoB tool" se tiene en cuenta también el cegamiento de los participantes, pero en el caso de estudios en animales no es de aplicación.

Sesgo de detección:

6. *Evaluación aleatoria de resultados:* En muchos casos, los resultados de distintos tipos de análisis o tests, pueden diferir dependiendo de la hora del día o de los diferentes momentos de otros ciclos biológicos de los animales en los que se obtienen las muestras.

7. *Cegamiento de los evaluadores.*

Sesgo de reporte o de desgaste:

8. *Datos de resultado incompletos:* En muchos casos, nos encontramos con trabajos que ofrecen rangos de tamaño muestral en lugar de datos concretos. En estos casos, no se ofrece información alguna de la posible diferencia entre el número de animales inicial y final. En los estudios en humanos, es muy importante el reporte de individuos que abandonan el tratamiento o lo incumplen, pero en estudios animales, lo importante sería conocer el posible sesgo de reporte en el caso de eliminar datos de animales, por ejemplo, por asumirlos como datos atípicos, extremos o "outliers". Para eliminar este posible sesgo, se pueden incluir los datos obtenidos de todos los animales, los tamaños

de muestra exactos y los datos de análisis de sensibilidad con los posibles "outliers".

Sesgo de informes:

9. *Informe selectivo de resultados.*

Otros métodos de cuantificación de calidad de estudios

La iniciativa CAMARADES, propone otra serie de criterios (Krauth et al. 2013) para el cálculo de riesgo de sesgos.

Algunos de estos criterios utilizados por Krauth et al. como posibles riesgos de sesgo, a menudo son los propios criterios de inclusión/exclusión a la hora de seleccionar los estudios para el análisis.

En el caso de éste trabajo esos criterios son :

- *Uso de animales con comorbilidad:* En el caso de sospechar, incluso sin aparecer explícitamente en el estudio a incluir, que existiera algún tipo de comorbilidad, el estudio habría sido eliminado inmediatamente por cumplir los criterios de exclusión.
- *Modelo de dosis-respuesta:* La existencia o no del fenotipo *depresivo-like* es condicionante imprescindible para la inclusión de un estudio en este trabajo, pero no se cuantifica la relación de la intensidad de estrés necesario para inducirlo con la gravedad de los síntomas.
- *Tiempo óptimo:* El incumplimiento del tiempo necesario de *washout*; es decir, el tiempo necesario para excluir efectos residuales de tratamiento agudo. En este caso, es uno de los criterios de exclusión para este meta-análisis.

Por otro lado, otros de los criterios recopilados en esta guía, a menudo, son poco viables en la investigación básica, como es el caso del cálculo del tamaño muestral ya que el tamaño de la muestra en los experimentos en animales viene regulado por los comités de ética pertinentes y no por cálculo de tamaño muestral.

2.2.3. Obtención de datos

El tamaño del efecto estimado de cada uno de los estudios ("g de Hedges") y su error estándar (seg) se calcula a partir de los datos de las medias de la concentración de IL-6 en los animales sometidos a estrés y las medias de los animales control, su error estándar (o su

desviación estándar transformándola en el error estándar), y el número de animales en cada grupo (Ellis 2010).

Si existen estudios que proporcionan diferentes datos de variación de la concentración de IL-6 en diferentes áreas en las que se han obtenido las muestras; se toma cada uno de estos datos de forma independiente para realizar el meta-análisis. En los casos en los que se obtengan diferentes datos de una misma área en un mismo estudio, se calcula el tamaño del efecto (TE) mediante un análisis de subgrupos.

La diferencia estandarizada de la media (DEM) y su intervalo de confianza del 95% (IC-95%) se calculan a partir de la "g de Hedges", su error estándar y el tamaño de muestra de cada estudio (Ellis 2010).

2.3. META-ANÁLISIS

2.3.1. Obtención de resultados combinados

Asumimos que los estudios incluidos son una muestra aleatoria de todos los posibles estudios de variación de la IL-6 en modelos animales crónicos de depresión inducidos por estrés; por este motivo se utilizó el modelo de efectos aleatorios para calcular el "tamaño del efecto combinado" de los modelos de depresión sobre la variación de la IL-6.

Utilizando los datos de la diferencia de medias estimada para cada uno de los estudios y su error estándar, el gráfico de intervalos de confianza o *forest plot* estima la diferencia combinada de medias estandarizada y su correspondiente intervalo de confianza. El peso que cada estudio, en el modelo de efectos aleatorios, se calcula a partir de dos fuentes de variación: la variabilidad *intra-estudio* y la variabilidad *entre-estudios*. Así mismo, se puede predecir el intervalo de confianza de un posible nuevo estudio (Higgins *et al.* 2009).

2.3.2. Heterogeneidad

La magnitud de la heterogeneidad entre los estudios se evalúa mediante la I^2 , que representa la variabilidad entre estudios no explicada por el error aleatorio (Higgins and Thompson 2002).

En el caso de encontrar valores altos de heterogeneidad ($I^2 > 60\%$) entre los estudios en los análisis primarios, se realizan diferentes pruebas con el fin de explicar esta heterogeneidad.

La contribución de cada uno de los estudios al tamaño total del efecto y la heterogeneidad se evalúan gráficamente mediante la construcción de un gráfico de Baujat (Baujat *et al.* 2002). En el eje horizontal se

sitúa su contribución de cada estudio a la heterogeneidad total y el eje vertical corresponde a la diferencia estandarizada del tamaño del efecto con y sin cada uno de los estudios; lo que indica su influencia en el efecto total.

Para evaluar la importancia de cada uno de los estudios en las estimaciones combinadas se realiza un análisis de influencia. El análisis de influencia de los estudios individuales sobre los resultados combinados se realiza eliminando cada estudio de uno en uno y recalculando los valores de los resultados combinados al eliminar cada uno de ellos.

La posible valoración de resultados que expliquen la heterogeneidad entre los estudios se examina a través de un análisis de subgrupos mediante el modelo de efectos aleatorios y meta-regresión mediante el modelo de efectos mixtos (Thompson and Higgins 2002).

2.3.2.1. Selección de subgrupos

Primera selección

La selección de subgrupos se realizó en base a las posibles fuentes de variabilidad de los estudios.

Las características de los estudios seleccionadas que conforman los subgrupos para realizar análisis de subgrupos y meta-regresión son las siguientes:

- Área de estudio (plasma / suero o diferentes áreas del cerebro).
- Edad de los animales.
- Género.
- Especie.
- Cepa.
- Molécula analizada (ARNm o proteína).
- Objetivo del estudio.
- Si el resultado primario del estudio fue comparar la variabilidad de IL-6 en modelos animales de depresión con controles o no.
- El modelo utilizado para desencadenar el fenotipo de tipo depresivo.
- Número de animales por jaula.

Selección derivada de primeros resultados

Si los análisis de subgrupos iniciales no explican la heterogeneidad y en el caso de observar, tras la obtención de los primeros resultados, algún tipo de sesgo relacionado con la fecha de publicación de los estudios, se añade el año de publicación como subgrupo en los análisis.

2.3.3. Sesgo de publicación o efecto de pequeños estudios

El gráfico de embudo (*funnel plot*) permite observar el posible sesgo de publicación o efecto de pequeños estudios (Peters *et al.* 2008), así como la representación gráfica de la heterogeneidad. Se genera un gráfico de dispersión de la variabilidad del tamaño del efecto de cada estudio en el eje "y" frente a la diferencia estandarizada de medias (DEM) en el eje "x". La prueba de asimetría de Egger cuantifica la asimetría de los puntos en el gráfico ofreciendo una probabilidad estadística de sesgos en el conjunto de estudios. Se considera significación estadística para la asimetría si $p < 0,05$.

El método de *trim and fill* (Duval and Tweedie 2000) estima los resultados del meta-análisis ajustándolos a la inclusión de los posibles estudios omitidos. En el gráfico de riesgo de sesgos (*funnel plot*) del método de *trim and fill* se observa cómo, mediante esta aproximación, se eliminan los estudios que aportan mayor asimetría en el *funnel plot*, se estima un nuevo valor con la nueva simetría y se reemplazan los estudios eliminados por valores que encajan en esa simetría.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa R (R Core Team, 2017; <https://www.R-project.org>) a través de RStudio (<https://www.rstudio.com>). En el ANEXO III se pueden encontrar los scripts utilizados.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS

3.1.1. Diagrama de flujo

Tras la eliminación de duplicados (Figura 7), se obtuvieron 2582 resultados de MEDLINE y EMBASE, de los cuales 1769 fueron excluidos ya que los títulos no aludían a temas relacionados con trastornos del estado de ánimo o eran revisiones. Se estudiaron 833 resúmenes y se añadieron con posterioridad 77 estudios provenientes de las primeras búsquedas, pero añadidos tras las mismas, y de la bibliografía de otros estudios. De todos ellos, 140 ensayos poseían información, *a priori*, de variaciones de la concentración de citoquinas en modelos animales de depresión y no eran revisiones.

Uno de ellos no era un estudio original, otro se basaba en animales genéticamente modificados, 5 inducían el modelo de depresión con la administración de una citoquina, 30 no utilizaban modelos animales de estrés crónico y en 5 de los estudios no se medían concentraciones de IL-6.

De los 98 textos analizados más exhaustivamente, se encontró uno que no analizaba la IL-6, en 3 de ellos los datos provenían de muestras de bazo, 37 no pertenecían a modelos animales de depresión inducidos por estrés, en otros 7 estudios éste estrés era únicamente agudo y en 7 ensayos las muestras se tomaban tras menos de 72 horas tras cualquier tipo de estrés.

Se analizaron 43 estudios en los que se mostraban datos de variación de la interleuquina 6 en cerebro o sangre, entre controles y modelos animales de depresión inducidos por estrés con efecto crónico.

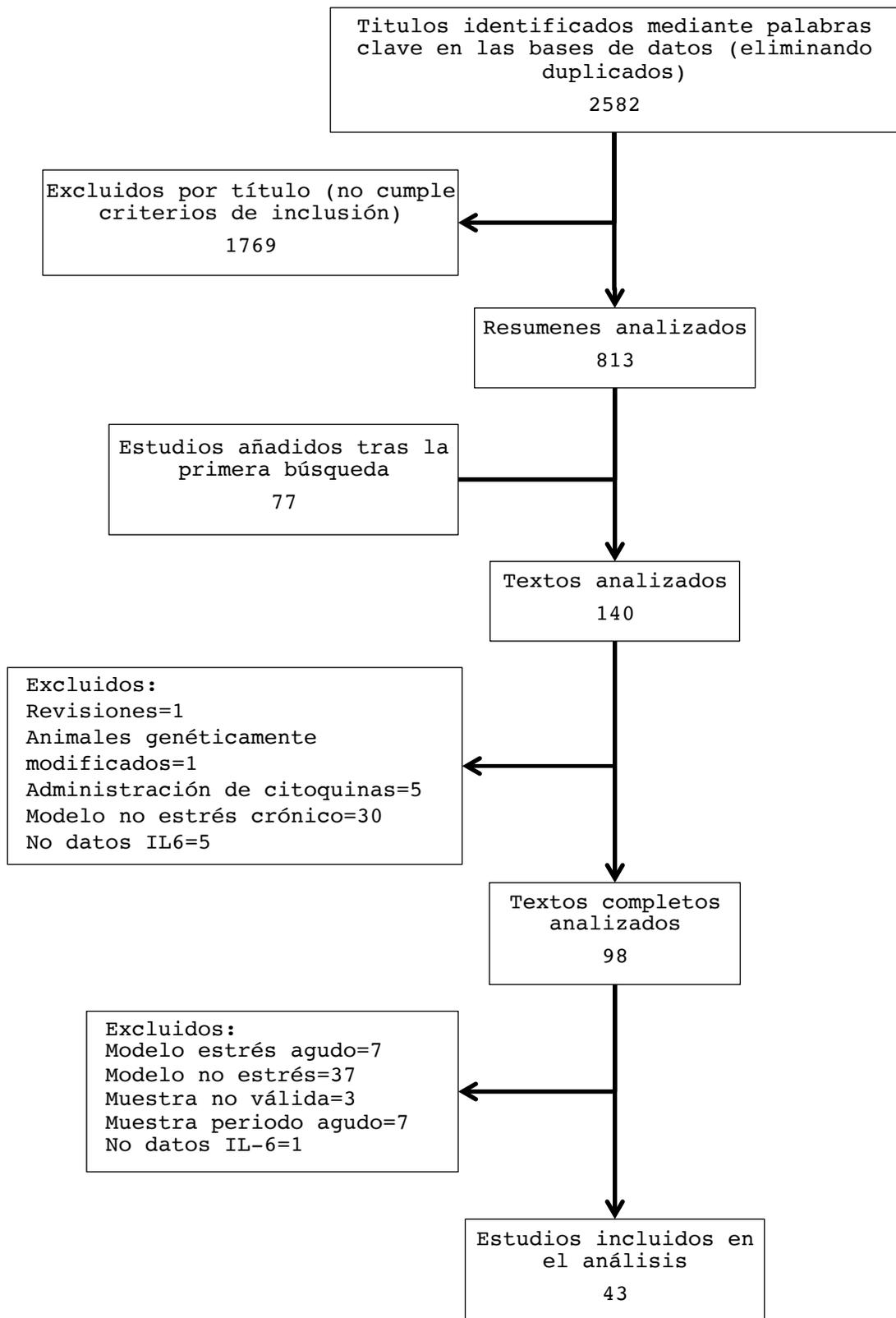


Figura 7: Diagrama de flujo de los estudios encontrados en la búsqueda bibliográfica.

3.1.2. Características de los estudios

A continuación se describen las características de los estudios incluidos tenidas en cuenta para este trabajo. Se encuentran recogidas de forma resumida en la tabla 1 (características de los animales), tablas 2a y 2b (características de las muestras) y tabla 3 (características experimentales de los estudios).

Número de datos y estudios

En este trabajo se han analizado una totalidad de 43 estudios, en animales, de los que se han extraído 59 datos de la variación de concentración de IL-6 entre individuos control y animales inducidos a diferentes modelos de depresión. Los estudios se recogen en el listado de estudios incluidos (ver referencias de estudios incluidos).

Especie, cepa y género

32 datos se han obtenido de ratas; 21 de ellos proceden de la cepa Sprague Dawley (SD); 18 de ellos en machos, uno tanto en machos como en hembras y en dos de los estudios (de los que se obtiene un dato de cada uno) no se define el género. Los otros 11 datos proceden de la cepa Wistar; 9 de machos y dos (del mismo estudio) en machos y hembras (Tabla 1).

De los datos en ratón, 27 en total, 12 provienen de la cepa "C57 black 6" (C57BL/6); 10 de los cuales de machos, uno de hembras y en uno de los estudios no se especifica el género. De la cepa CD-1 se han obtenido 4 datos y 5 de la cepa BALB/c, todos ellos de machos. Uno de los estudios (con 1 dato) en la cepa "Swiss Albino" no especifica el género y el otro (también con 1 dato) se lleva a cabo en machos. Se han obtenido 4 datos de 3 estudios en la cepa ICR (Institute of Cancer Research), de los que consta que no ha habido modificación genética, todos ellos en machos (Tabla 1).

Agrupación

Otra de las características de los estudios tenida en cuenta es el número de animales que se encuentran en una misma caja, lo tomamos como agrupación y existe un alto número de estudios (18 estudios que ofrecen 28 del total de datos) en los que no se especifica nada al respecto, encontramos 6 estudios en los que separan a los animales individualmente, tres estudios en los que los alojan en parejas y 16 estudios en los que agrupan a los animales en grupos de tres o más (Tabla 1).

Estudio	Especie	Cepa	Género	Edad (semanas)	Agrupación
Mormede 2002	Ratón	C57BL/6	♀	6-9	1
Bartolomucci 2003	Ratón	CD-1	♂	-	>2
Xia 2006	Rata	SD	♂	-	1
Pan 2006	Rata	SD	♂	-	1
Li 2008	Ratón	Swiss albino	♂	-	-
Xiu 2010	Rata	Wistar	♂	-	2
Grundmann 2010	Rata	SD	♂	-	2
Tagliari 2010	Rata	Wistar	♂	6-9	>2
Wann 2010	Ratón	CD-1	♂	6-9	1
Tagliari 2011	Rata	Wistar	♂	6-9	>2
Wu 2011	Ratón	C57BL/6J	♂	6-9	>2
Monje 2011	Ratón	C57BL/6N	♂	>9	2
Farooq 2012	Ratón	BALB/cByJ	♂	6-9	>2
Kim 2012	Ratón	C57BL/6	-	6-9	-
Della 2012	Rata	Wistar	♂	6-9	-
McQuaid 2013	Ratón	BALB/cByJ	♂	6-9	>2
Girotti 2013	Rata	SD	♂	-	>2
Mutlu 2013	Ratón	BALB/cByJ	♂	>9	>2
Burke 2013	Rata	Wistar	♂/♀	>9	-
Mackos 2013	Ratón	CD-1	♂	6-9	>2
Jiang 2013	Rata	SD	♂	-	-
Peng 2013	Rata	SD	♂	6-9	-
Ablimit 2013	Ratón	ICR	♂	-	-
Wu 2013	Ratón	C57BL/6J	♂	6-9	>2
Patki 2013	Rata	SD	♂	-	-
Park 2014	Rata	SD	-	<6	-
Lu 2014	Ratón	C57BL/6	♂	6-9	>2
Guo 2014	Rata	SD	-	-	-
Liu 2014	Rata	Wistar	♂	6-9	-
Aga-Mizrachi 2014	Rata	Wistar	♂	>9	-
Jiang 2014	Rata	SD	♂	-	-
Stewart 2015	Ratón	C57BL/6J	♂	>9	1
Reus 2015	Rata	Wistar	♂	>9	>2
Zhu 2015	Rata	SD	♂	-	>2
Guan 2015	Rata	SD	♂	-	1
Mahanti 2015	Ratón	BALB/c	♂	6-9	>2
Bollinger 2016	Rata	SD	♂/♀	>9	-
Thomas 2016	Ratón	Swiss albino	-	-	-
Wu 2016	Ratón	ICR	♂	-	-
Zhuang 2016	Ratón	C57BL/6J	♂	>9	>2
Lu 2016	Rata	SD	♂	-	-
Tao 2016	Ratón	ICR	♂	-	-
Ramirez 2016	Ratón	C57BL/6	♂	6-9	>2

Tabla 1: Características de los animales utilizados en los estudios.
***Nota;** "-"; dato no especificado en el estudio.

Área

De los 32 estudios que ofrecen tan solo un valor de variación de IL-6 en un área concreta y analizando una sola molécula, ya sea proteína o ARNm; 5 de ellos analizan el hipocampo, tan sólo uno la corteza pre-frontal, dos recogen la muestra del hipotálamo y 23 analizan la sangre periférica, ya sea el suero (18 estudios) o el plasma (5 estudios). Los 12 estudios restantes procesan muestras de más de un área, en casi todos los casos áreas del cerebro o sangre periférica pero sólo uno de ellos ofrece datos de ambos (Tablas 2a,b).

Molécula

De estos 43 estudios, 31 de ellos calculan la concentración de IL-6 analizando uno de los dos tipos de molécula (ARNm o proteína) que se estudian en este trabajo, y tan solo un área, ya sea parte del cerebro o sangre periférica, 10 estudios ofrecen dos datos de la variación de IL-6 según el área y la molécula analizadas y dos estudios muestran 3 y 5 datos respectivamente estudiando la concentración de IL-6 tanto en diferentes áreas como a través de las diferentes moléculas (Tablas 2a,b).

Estudio	Área	Molécula
Mormede 2002	Hipotálamo	ARNm
Bartolomucci 2003a	Hipocampo	ARNm
Bartolomucci 2003b	Hipotálamo	ARNm
Xia 2006	Suero	Proteína
Pan 2006	Suero	Proteína
Li 2008	Plasma	Proteína
Xiu 2010	Suero	Proteína
Grundmann 2010	Plasma	Proteína
Tagliari 2010	Suero	Proteína
Wann 2010	Plasma	Proteína
Tagliari 2011	Hipocampo	Proteína
Wu 2011	Suero	Proteína
Monje 2011a	Hipocampo	Proteína
Monje 2011b	Plasma	Proteína
Farooq 2012	Suero	Proteína
Kim 2012	Suero	Proteína
Della 2012a	Hipocampo	Proteína
Della 2012b	Corteza pre-frontal	Proteína

Tabla 2(a): Características de las muestras utilizadas en los estudios (hasta 2012). ***Nota;** "-"; dato no especificado en el estudio.

Estudio	Área	Molécula
McQuaid 2013a	Hipocampo	ARNm
McQuaid 2013b	Corteza pre-frontal	ARNm
Girotti 2013	Hipotálamo	Proteína
Mutlu 2013	Plasma	Proteína
Burke 2013a	Hipocampo	ARNm
Burke 2013b	Corteza pre-frontal	ARNm
Mackos 2013	Suero	Proteína
Jiang 2013a	Hipocampo	Proteína
Jiang 2013b	Corteza pre-frontal	Proteína
Peng 2013	Hipocampo	Proteína
Ablimit 2013	Suero	Proteína
Wu 2013	Suero	Proteína
Patki 2013a	Corteza pre-frontal	ARNm
Patki 2013b	Hipocampo	ARNm
Park 2014	Hipocampo	Proteína
Lu 2014	Hipocampo	ARNm
Guo 2014	Hipocampo	Proteína
Liu 2014a	Hipocampo	Proteína
Liu 2014b	Corteza pre-frontal	Proteína
Aga-Mizrachi 2014	Suero	Proteína
Jiang 2014	Suero	Proteína
Stewart 2015	Suero	Proteína
Reus 2015	Suero	Proteína
Zhu 2015	Suero	Proteína
Guan 2015a	Hipocampo	ARNm
Guan 2015b	Corteza pre-frontal	ARNm
Mahanti 2015	Suero	Proteína
Bollinger 2016	Corteza pre-frontal	ARNm
Thomas 2016	Suero	Proteína
Wu 2016	Suero	Proteína
Zhuang 2016a	Hipocampo	ARNm
Zhuang 2016b	Hipotálamo	ARNm
Zhuang 2016c	Corteza pre-frontal	ARNm
Lu 2016a	Hipocampo	ARNm
Lu 2016b	Corteza pre-frontal	ARNm
Lu 2016c	Hipocampo	ARNm
Lu 2016d	Corteza pre-frontal	Proteína
Lu 2016e	Suero	Proteína
Tao 2016a	Suero	Proteína
Tao 2016b	Hipocampo	Proteína
Ramirez 2016	Plasma	Proteína

Tabla 2(b): Características de las muestras utilizadas en los estudios (desde 2013). ***Nota;** "-"; dato no especificado en el estudio.

Tamaño de muestra

En 7 de los estudios integrados en el análisis especifican muestras de menos de 6 animales, mientras que 17 de ellos disponen de datos de entre 6 y 10 animales y 9 estudios obtienen sus datos de más de 10 animales (Tabla 3).

Objetivos y resultados de los estudios (IL-6)

En este trabajo tomamos como resultados primarios (1) aquellos obtenidos con el propósito de cuantificar los efectos del estrés (mediante la inducción de los modelos de depresión) en la concentración de IL-6. En la descripción de objetivos de los estudios éstos comprenden: "efectos del estrés", "ASS' (síndrome de sabda anormal)" y "KO de IL-10" separando los dos últimos del objetivo de "efectos del estrés" ya que su propósito es estudiar el "Abnormal Sabda Syndrom" y el KO de IL-10 mediante el uso de controles sanos que presentan o no el fenotipo de tipo depresivo, con lo que en su resultado primario ofrecen una comparación de animales *naïve* control y animales *naïve* con fenotipo depresivo. 15 estudios tienen como objetivo medir los efectos del estrés, y el estudio del síndrome de sabda anormal y del KO de IL-10 son el objetivo de un estudio cada uno de ellos (Tabla 3).

Los resultados secundarios (2) son, por consiguiente, los que presentan los estudios cuyos objetivos no son los mencionados en el párrafo anterior. En este apartado incluimos 19 estudios que estudian el efecto de una sustancia antidepresiva o potencialmente antidepresiva y dos estudios que lo hacen con un ansiolítico, un estudio que estudia cambios neuroquímicos producidos por la inoculación de tumores, un estudio que valora las implicaciones de la eliminación de células T, un estudio que valora los beneficios de un ambiente enriquecido, un estudio realizado para validar un modelo de depresión modificado y un estudio valora el efecto de un pre-tratamiento de electroacupuntura en el modelo de restricción crónica en ratas (Tabla 3).

Aleatorización

La aleatorización de los grupos experimentales se expone claramente en 19 de los estudios, mientras que en uno de ellos no es posible dado el tipo de manipulación necesaria para inducir el modelo de depresión en ese caso. En 23 estudios no se menciona la aleatorización (Tabla 3).

Estudio	n	IL-6	Objetivo	Aleatorización	Modelo
Mormede 2002	10	1	KO de IL-10	-	CMS
Bartolomucci 2003	17	1	Efectos del estrés	-	CSS
Xia 2006	7	2	Antidepresivo	-	CMS
Pan 2006	7	2	Antidepresivo	-	CMS
Li 2008	10	1	Efectos del estrés	Sí	CMS
Xiu 2010	8	2	Tumor	Sí	CMS
Grundmann 2010	10	2	Antidepresivo	Sí	CIS
Tagliari 2010	9	1	Efectos del estrés	Sí	CMS
Wann 2010	15	1	Efectos del estrés	Sí	CMS
Tagliari 2011	5	1	Efectos del estrés	-	CMS
Wu 2011	12	2	Antidepresivo	-	CSS
Monje 2011	10	1	Efectos del estrés	-	DD
Farooq 2012	7	1	Efectos del estrés	-	CMS
Kim 2012	10,5	2	Depleción de cél. T	Sí	CIS
Della 2012	6	2	Antidepresivo	-	CMS
McQuaid 2013	10	2	Entorno enriquecido	-	CSS
Girotti 2013	5	1	Efectos del estrés	-	CMS
Mutlu 2013	8	2	Antidepresivo	-	CMS
Burke 2013	8	1	Efectos del estrés	-	MS
Mackos 2013	9	2	Eficacia ansiolítica	-	CIS
Jiang 2013	10	2	Antidepresivo	Sí	CMS
Peng 2013	9	2	Eficacia ansiolítica	Sí	PTSD
Ablimit 2013	15	1	Estudio del ASS'	Sí	CD(+Fsh)
Wu 2013	12	2	Antidepresivo	-	CSS
Patki 2013	4	2	Validar un modelo	-	CSS
Park 2014	7	2	Antidepresivo	Sí	MS
Lu 2014	4	2	Antidepresivo	-	CMS
Guo 2014	8	2	Pre-tratamiento	-	CMS
Liu 2014	7	2	Antidepresivo	-	CMS
Aga-Mizrachi 2014	14,5	1	Efectos del estrés	Sí	PTSD
Jiang 2014	10	1	Efectos del estrés	Sí	CMS
Stewart 2015	10	1	Efectos del estrés	No	CSS
Reus 2015	5,5	2	Antidepresivo	-	MS
Zhu 2015	10	2	Antidepresivo	Sí	CMS
Guan 2015	18	1	Efectos del estrés	Sí	CFSS
Mahanti 2015	15	1	Efectos del estrés	Sí	CIS
Bollinger 2016	10	1	Efectos del estrés	-	CIS
Thomas 2016	8	2	Antidepresivo	-	CFSS
Wu 2016	5,5	2	Antidepresivo	-	CMS
Zhuang 2016	6	2	Antidepresivo	Sí	CMS
Lu 2016	8	2	Antidepresivo	Sí	CMS
Tao 2016	10	2	Antidepresivo	Sí	CMS
Ramirez 2016	5,5	2	Antidepresivo	Sí	CSS

Tabla 3: Características experimentales de los estudios. *Nota; "-"; dato no especificado en el estudio (ver ANEXO I para las abreviaturas).

Modelo de depresión

El modelo de depresión más utilizado en los estudios analizados es el modelo de "estrés crónico de baja intensidad" (CMS); 22 de los estudios ofrecen un total de 32 datos de este modelo. Otro de los modelos más utilizados, contando con 7 estudios en este trabajo, es el de "estrés crónico por derrota o indefensión social" (CSS). El modelo de "separación materna" (MS) es utilizado por 3 estudios y dos estudios ofrecen datos del modelo de "estrés crónico por natación forzada" (CFSS). También el modelo de "Estrés crónico por inmovilización o restricción" (CIS) se repite con cierta frecuencia, incluyéndose en 5 de los estudios. Así mismo, dos de los estudios incluidos utilizan el modelo de "trastorno de estrés postraumático" (PTSD). Por otro lado, tan sólo en uno de los estudios aparece un modelo combinado de "ambiente frío y seco" con administración de "footshock" (Cold-dry/Fsh) y otro de los modelos utilizados por un estudio solamente, es el de "oscuridad permanente" (DD) (Tabla 3).

3.2. EVALUACIÓN DE VALIDEZ Y CALIDAD DE LOS ESTUDIOS

En 19 de los 43 estudios se evidencia específicamente la aleatorización de los animales en los diferentes grupos de ensayo. En un estudio, la aleatorización no fue posible debido a las características del experimento. Ninguno de los estudios incluyó explícitamente métodos de cegamiento. La ausencia de especificaciones sobre los métodos de asignación, aleatorización o cegamiento obligan a asignar riesgos de sesgo inciertos a los estudios, por lo que no es posible tabular el riesgo de sesgos y evaluar la calidad de los estudios.

En el ANEXO VII se puede encontrar un ejemplo de la evaluación del riesgo de sesgos según otros parámetros importantes en este estudio.

3.3. DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE IL-6 ENTRE CONTROLES Y MODELOS DE DEPRESIÓN.

En 36 de los estudios, que aportan el 84,8% de los datos, se muestra un aumento en la concentración de IL-6 en los modelos animales de depresión frente a los controles, mientras que un 15,3% de los datos (9 datos de 5 estudios) indican un descenso de esta interleuquina en dichos modelos. Dos de los estudios poseen datos tanto de aumento como de disminución de la concentración de IL-6 dependiendo de el área y/o la molécula analizadas (Tabla 4).

Estudio	IL6m	SDm	nm	IL6c	SDc	nc	g	seg	Datos	
Mormede 2002	19.1	8.9	10	13.3	8.2	10	0.65	0.19	gráf.	
Bartolomucci 2003a	10.5	4.4	24	9.8	4.7	10	-0.34	0.14	gráf.	
Bartolomucci 2003b	11.5	5.6	24	13.3	4.6	10	0.14	0.14		
Xia 2006	147.2	13.8	7	114.8	4.2	7	2.98	0.57	gráf.	
Pan 2006	1502.0	169.3	7	1282.0	169.3	7	1.22	0.30	gráf.	
Li 2008	134.0	34.8	10	91.0	17.4	10	1.50	0.24	gráf.	
Xiu 2010	276.0	45.3	8	172.0	158.4	8	0.84	0.25	gráf.	
Grundmann 2010	159.5	19.9	10	64.5	8.2	10	5.97	1.07	gráf.	
Tagliari 2010	6.1	3.3	9	6.4	2.9	9	-0.09	0.20	num.	
Wann 2010	7.5	9.7	15	10.0	9.7	15	-0.25	0.13	gráf.	
Tagliari 2011	50.1	14.0	5	10.0	11.0	5	2.87	0.74	gráf.	
Wu 2011	110.8	137.2	12	22.5	30.1	12	0.86	0.17	gráf.	
Monje 2011a	42.0	19.9	10	20.0	9.5	10	0.50	0.19	gráf.	
Monje 2011b	2.2	1.6	10	1.0	2.8	10	1.35	0.23		
Farooq 2012	2.5	0.7	7	1.9	0.3	7	1.00	0.29	gráf.	
Kim 2012	18.4	19.2	11	10.6	7.0	10	0.51	0.18	gráf.	
Della 2012a	5.1	13.1	9	0.3	0.3	9	0.48	0.21	gráf.	
Della 2012b	0.6	0.6	9	1.7	0.2	9	-2.40	0.36		
McQuaid 2013a	1.5	0.5	11	1.0	0.3	9	0.87	0.20	gráf.	
McQuaid 2013b	1.5	0.6	11	1.0	0.3	9	0.88	0.20	gráf.	
Girotti 2013	2.3	1.3	5	1.0	0.6	5	1.20	0.40	gráf.	
Mutlu 2013	1977.6	2022.2	8	171.1	34.8	8	1.19	0.27	num.	
Burke 2013a	♂	74.0	22.6	8	100.0	39.6	8	-0.76	0.24	gráf.
	♀	70.0	19.0	10	124.0	63.2	10	-1.11	0.21	
Burke 2013b	♂	67.5	52.3	8	100.0	43.1	8	-0.64	0.24	
	♀	56.5	28.5	10	68.8	24.5	10	-0.44	0.19	
Mackos 2013	58.8	45.6	6	6.8	9.0	12	1.87	0.32	gráf.	
Jiang 2013a	160.5	28.5	10	122.0	19.0	10	1.41	0.23	gráf.	
Jiang 2013b	184.0	44.3	10	131.0	25.3	10	1.52	0.24		
Peng 2013	38.8	13.2	9	23.6	3.6	9	1.50	0.26	gráf.	
Ablimit 2013	CD	135.6	5.7	15	120.6	5.1	15	3.24	0.55	num.
	CD+FSh	155.6	7.6	14	120.6	5.1	15			
Wu 2013	260.0	134.4	10	70.0	63.2	10	1.73	0.26	gráf.	
Patki 2013a	0.4	0.1	4	0.3	0.1	4	1.22	0.47	gráf.	
Patki 2013b	0.6	0.1	4	0.3	0.1	4	3.06	0.96		

Tabla 4(a): Datos de concentración de IL-6 obtenidos de los estudios (hasta 2013) y tamaños de efectos estimados como g de Hedges (g) y error estándar de g (seg). ***Nota;** IL6m: Media de la concentración de IL-6 en el modelo animal; IL6c: Media de la concentración de IL-6 en animales control; gráf.: Datos de medias y error estándar extrapolados de gráficos; num.: Datos numéricos de medias y error estándar tomados directamente de texto o tablas (ver ANEXO I para las abreviaturas).

Estudio	IL6m	SDm	nm	IL6c	SDc	nc	g	seg	Datos	
Park 2014	471.0	105.3	7	168.2	5.0	7	3.80	0.77	num.	
Lu 2014	1.6	0.2	4	1.0	0.0	4	4.28	1.52	gráf.	
Guo 2014	121.6	35.1	8	72.6	18.7	8	1.65	0.31	gráf.	
Liu 2014a	47.4	13.5	7	25.5	6.7	7	1.92	0.38	gráf.	
Liu 2014b	77.6	18.0	7	47.2	14.8	7	1.73	0.36		
Aga-Mizrachi 2014	133.0	28.5	9	32.5	47.0	20	2.31	0.24	gráf.	
Jiang 2014	46.4	9.5	10	27.2	10.1	10	1.87	0.27	gráf.	
Stewart 2015	13.9	12.6	10	5.1	3.8	10	0.90	0.20	gráf.	
Reus 2015	113.4	53.5	6	62.4	27.4	6	1.10	0.36	gráf.	
Zhu 2015	436.0	385.8	10	218.0	94.9	10	0.74	0.20	gráf.	
Guan 2015a	1.0	0.7	18	1.0	0.3	18	-0.55	0.11	gráf.	
Guan 2015b	0.9	0.3	18	1.0	0.2	18	-0.06	0.11		
Mahanti 2015	243.0	116.2	15	82.0	31.0	15	1.84	0.18	gráf.	
Bollinger 2016	♂	185.0	265.6	10	100.0	94.9	10	-0.27	0.13	gráf.
	♀	345.0	664.1	10	146.0	170.8	10			
Thomas 2016	213.0	25.5	8	154.0	9.9	8	2.89	0.48	gráf.	
Wu 2016	144.0	10.6	6	129.0	8.4	6	1.44	0.40	gráf.	
Zhuang 2016a	0.6	0.2	6	0.3	0.2	6	1.80	0.42	gráf.	
Zhuang 2016b	0.8	0.3	6	0.3	0.1	6	2.18	0.48		
Zhuang 2016c	0.8	0.3	6	0.3	0.1	6	1.48	0.38		
Lu 2016a	0.8	0.2	8	0.3	0.0	8	3.05	0.51	gráf.	
Lu 2016b	0.5	0.2	8	0.2	0.0	8	2.77	0.46		
Lu 2016c	47.2	4.5	8	20.6	1.7	8	7.36	1.92		
Lu 2016d	46.8	7.6	8	23.9	2.5	8	3.80	0.68		
Lu 2016e	46.7	7.9	8	23.8	2.0	8	3.75	0.66		
Tao 2016a	64.6	12.0	10	15.0	6.3	10	4.95	0.80	gráf.	
Tao 2016b	35.5	7.3	10	11.7	7.9	10	3.00	0.41		
Ramirez 2016	88.6	7.0	6	10.2	4.2	6	12.35	7.24	gráf.	

Tabla 4(b): Datos de concentración de IL-6 obtenidos de los estudios (desde 2014) y tamaños de efectos estimados como g de Hedges (g) y error estándar de g (seg). ***Nota;** IL6m: Media de la concentración de IL-6 en el modelo animal; IL6c: Media de la concentración de IL-6 en animales control; gráf.: Datos de medias y error estándar extrapolados de gráficos; num.: Datos de medias y error estándar tomados directamente de texto o tablas (ver ANEXO I para las abreviaturas).

La mayoría de los datos de las medias y su errores estándar se extrapolaron a partir de los gráficos encontrados en los escritos de los estudios, ya que no se encontraron los datos numéricos (Tabla 4).

3.4. ESTUDIOS DE META-ANÁLISIS

En la figura 8 se muestra el *forest plot* obtenido al realizar el meta-análisis de las variaciones en la concentración de IL-6 en los modelos animales de depresión anteriormente mencionados frente a sus controles.

Según el modelo de efectos aleatorios (Figura 8), la inducción del fenotipo "depresivo-like" mostró un efecto positivo (DEM = 1,39) en el aumento de la concentración de IL-6. El intervalo de confianza del 95% de la diferencia estandarizada de medias se sitúa entre 1,11 y 1,67.

El intervalo de confianza del 95% en el que se situaría el valor de variación de IL-6 en un modelo animal de depresión inducido por estrés crónico para un posible futuro estudio se sitúa entre valores de -0,65 y 3,43. El valor estimado de la heterogeneidad (τ^2) se situó en un valor de 1,018. El índice I^2 muestra la variación total de la estimación del tamaño del efecto debida a las diferencias entre estudios no explicadas por el azar. El análisis mostró una alta heterogeneidad entre los estudios ($I^2 = 94,8\%$).

En el gráfico para valorar posibles sesgos de publicación (Figura 9) se observa que los estudios tienden a encontrarse en valores positivos del eje X, es decir, tienden a mostrar valores de aumento de concentración de la IL-6 en modelos animales de depresión frente a los controles. El *funnel plot* sitúa a la mayoría de los ensayos en el área $p < 0,01$ sugiriendo un importante sesgo de publicación ya que es la más alejada del efecto medio. La asimetría en el *funnel plot* muestra que el posible sesgo de publicación o efecto de pequeños estudios sugiere la publicación de efectos positivos.

Los datos de Tao 2016a, Lu 2014, Lu 2016c y Grundmann 2010 son los que se encuentran más alejados de la diferencia estandarizada de medias hacia valores positivos. Por otro lado, Della 2012b es el que se encuentra más alejado hacia valores negativos.

Las coordenadas de Ramirez 2016 se encuentran alejadas del resto de estudios con una diferencia estandarizada de medias de 12,35 Y un error estándar de 7,24.

La prueba de asimetría para el modelo de efectos mixtos mediante meta-regresión de Egger confirma la presencia de sesgo de publicación o efecto de pequeños estudios ($p < 0,0001$).

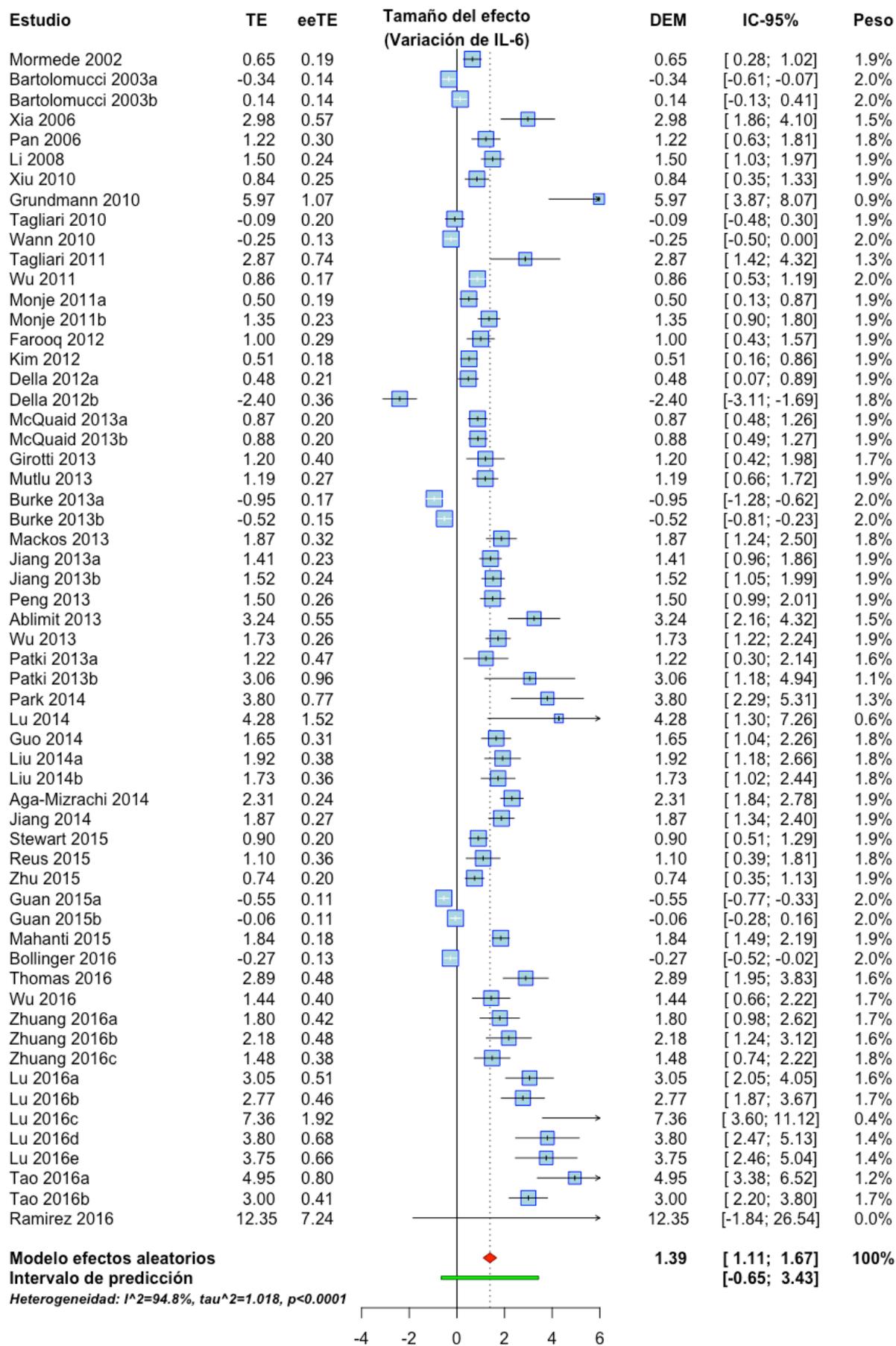


Figura 8: Forest plot de la diferencia de concentración de la IL-6 entre modelos animales de depresión y controles.

***Nota;** TE: Tamaño estimado del efecto; eeTE: error estándar del tamaño estimado del efecto; DEM: Diferencia estandarizada de medias; τ^2 : Valor estimado de heterogeneidad; I^2 : Variabilidad entre estudios no explicada por el error aleatorio.

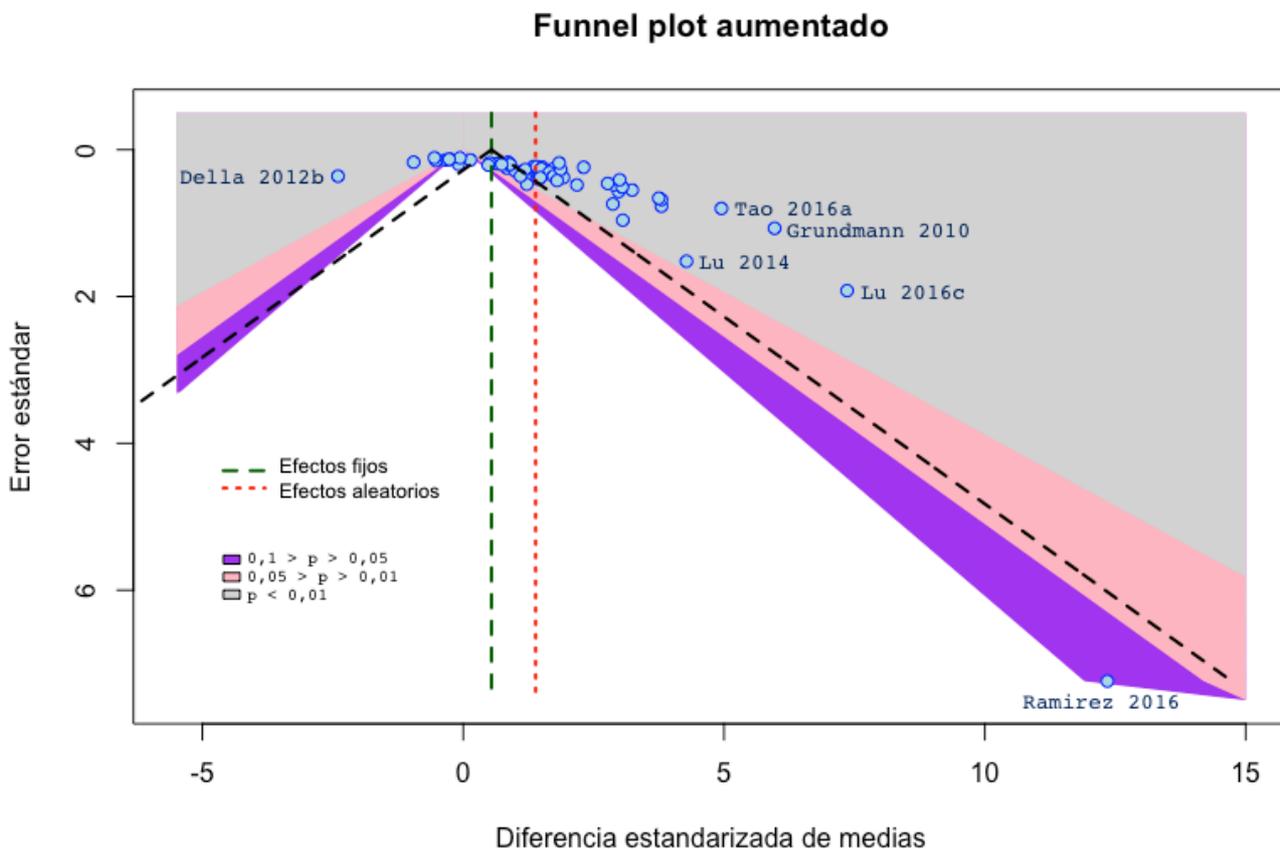


Figura 9: Gráfico de riesgo de sesgos (funnel plot). Diferencia de concentración de la IL-6 entre modelos animales de depresión y controles.

3.5. HETEROGENEIDAD

3.5.1. Análisis de heterogeneidad y sensibilidad de los estudios

A continuación, se detallan los resultados de los análisis de sensibilidad aplicados a los datos de variación de la IL-6 en modelos animales de depresión.

Según el gráfico de Baujat, la mayoría de datos se sitúan por debajo de 40% de heterogeneidad (eje X) y llegan hasta 1 en el eje Y (Figura 10). Otro grupo de datos contribuyen a la heterogeneidad en un rango de 40%-80% y al tamaño del efecto entre 1 y 3.

Entre los puntos que se encuentran más dispersos encontramos los que corresponden a Della 2012b, Burke 2013 a y b, Aga-Mizrachi 2014 y Mahanti 2015 que contribuyen a la heterogeneidad un 50%-80% y al tamaño del efecto en un 1,5%-5%. Los que corresponden a Wann 2010, Guan 2015b, Bollinger 2016 y Tao 2016 a y b, que poseen una contribución a la heterogeneidad de un 30%-40% y una contribución al tamaño del efecto de 2%-2,5%. Uno de los datos, Guan 2015a, destaca por su alta contribución tanto al tamaño del efecto como a la heterogeneidad total (8,2; 98,6%; ANEXO IV).

En la Figura 11 se presenta el análisis de influencia de los estudios.

Las DEM resultantes (Figura 11) de la omisión de cada uno de los estudios ($1,34 < DEM < 1,45$) no muestran diferencias significativas al compararlas con la estimación combinada de todos los estudios ($DEM = 1,39$) y todos los resultados de la DEM se encuentran dentro del intervalo de confianza del 95% de la estimación combinada ($IC-95\% = [1,11 ; 1,67]$). Tampoco la heterogeneidad muestra diferencias con la estimación combinada de I^2 ($I^2 = 94,8\%$) al omitir ninguno de los estudios ($94,3\% < I^2 < 94,9\%$; ANEXO V).

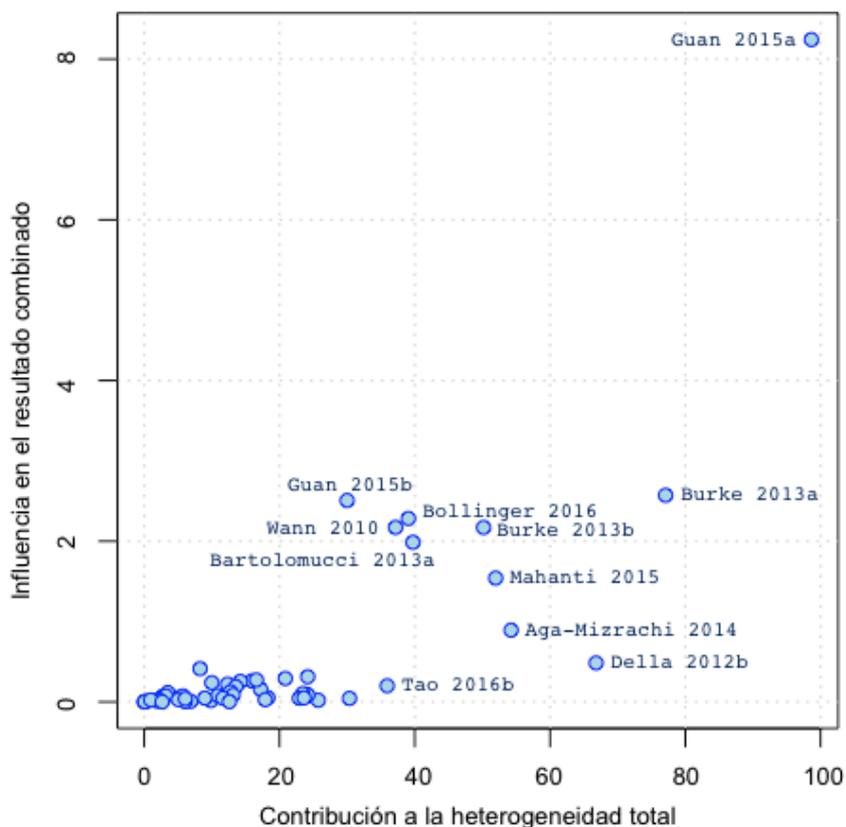


Figura 10: Gráfico de Baujat; diagrama de dispersión para explorar la heterogeneidad.

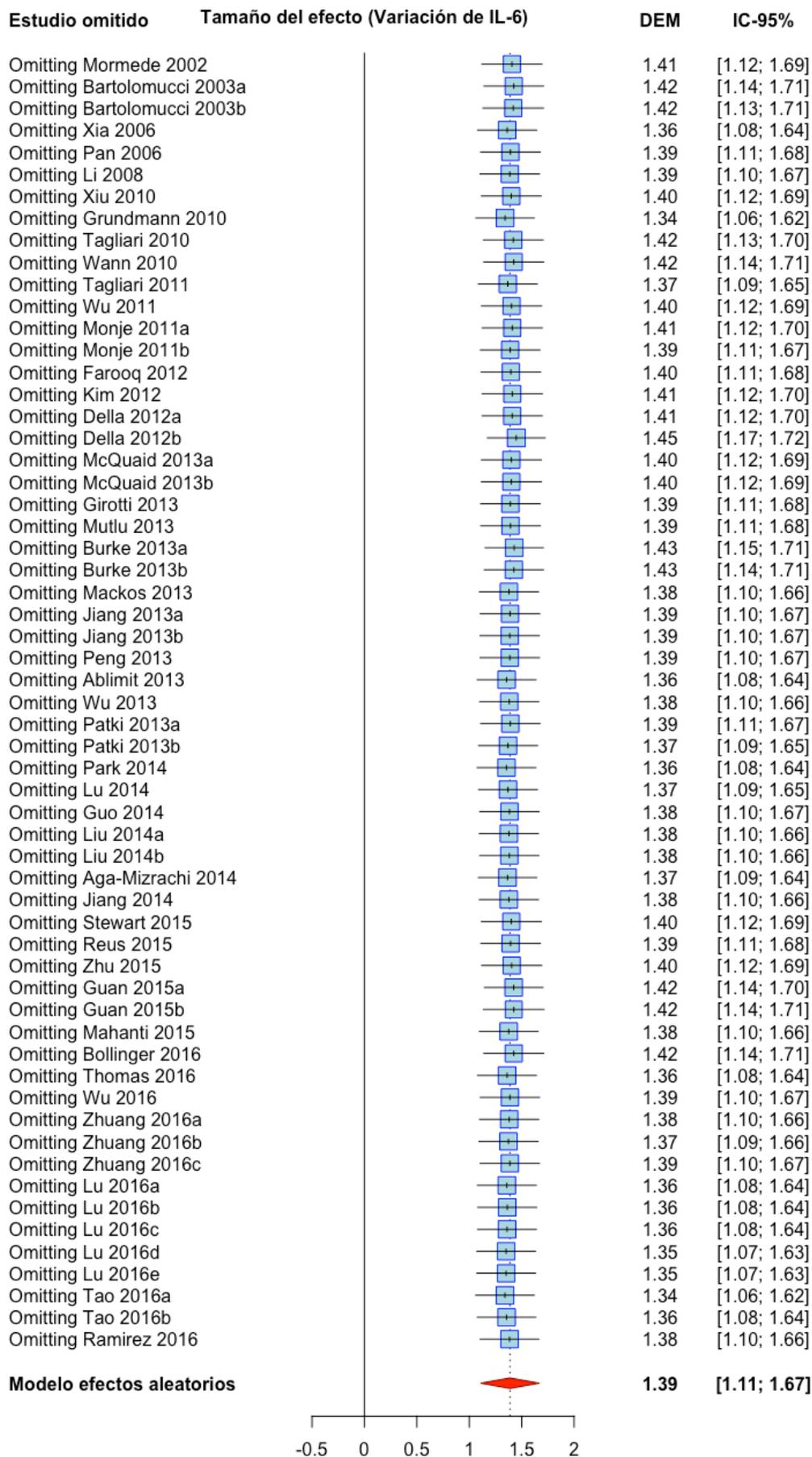


Figura 11: Forest plot del análisis de influencia de los estudios.
***Nota;** DEM: Diferencia estandarizada de medias; IC-95%: Intervalo de confianza del 95%.

3.5.2. Análisis de subgrupos

La tabla 5 expone los resultados del análisis de subgrupos mediante el modelo de efectos aleatorios. Los subgrupos engloban las características analizadas de los estudios.

Una de las características analizadas es el área de la que fue tomada la muestra para la cuantificación de la IL-6. Los datos obtenidos de los estudios provienen de tres áreas diferentes del cerebro; hipocampo, hipotálamo y corteza pre-frontal, así como de plasma o suero de la sangre de los roedores.

		k	DEM	tau²	I² (%)	p
Estimación combinada		59	1.39	1.02	94.8	
Modelo de efectos aleatorios						
Especie	Ratón	27	1.36	0.69	92.7	0.810
	Rata	32	1.42	1.32	95.6	
Cepa'	BALB/c	5	1.17	0.17	78.3	0.0001
	C57BL/6	12	1.14	0.21	76.2	
	CD-1	4	0.28	0.35	93.3	
	ICR	4	3.04	1.37	84.5	
	SD	21	1.90	1.31	95.4	
	Swiss albino	2	2.13	0.82	85.1	
	Wistar	11	0.61	1.55	96.2	
Género	-	4	2.08	1.52	92.5	<0,0001
	Hembras	1	0.65	--	--	
	Machos y hembras	3	-0.57	0.09	80.2	
	Machos	51	1.49	1.00	94.3	
Edad de los animales	-	27	1.92	1.31	95.3	<0.0001
	<6 semanas	1	3.80	--	--	
	6-9 semanas	19	0.96	0.75	93.2	
	> 9 semanas	12	0.88	1.07	95.7	
Agrupación'	-	28	1.79	1.84	95.8	0.010
	1	7	0.54	0.43	94.3	
	2	4	1.48	0.67	90.2	
	Grupo	20	1.15	0.57	90.6	

Tabla 5: Análisis de subgrupos mediante el modelo de efectos aleatorios. ***Nota:** "--"; dato no especificado en el estudio; *k*: número de datos en cada subgrupo; *DEM*: Diferencia estandarizada de medias; *tau²*: Valor estimado de heterogeneidad dentro de los subgrupos; *I²*: Variabilidad entre estudios de los no explicada por el error aleatorio dentro de los subgrupos; *p*: valor-*p* de las diferencias en los subgrupos (ver ANEXO I para las abreviaturas y subgrupos).

		k	DEM	tau²	I² (%)	p
Estimación combinada		59	1.39	1.02	94.8	
Modelo de efectos aleatorios						
Área'	Hipocampo	18	1.53	1.30	95.4	0.089
	Hipotálamo	4	0.92	0.38	86.7	
	Corteza pre-frontal	11	0.82	1.03	95.6	
	Sangre periférica	26	1.62	0.80	92.4	
Área''	Cerebro	33	1.17	0.96	94.9	0.099
	Sangre periférica	26	1.62	0.80	92.4	
Área'''	Cerebro	33	1.17	0.96	94.9	0.222
	Plasma	6	1.62	1.34	95.0	
	Suero	20	1.63	0.64	90.1	
Molécula	ARNm	19	0.82	0.60	93.9	0.003
	Proteína	40	1.59	0.90	92.4	
Objetivo'	Efectos de antidepresivos	31	2.01	1.09	90.1	<0.0001
	Efectos del estrés	19	0.58	0.72	96.0	
	Otros	9	1.15	0.23	77.8	
Prioridad de IL-6	1	21	0.69	0.74	95.9	<0.0001
	2	38	1.80	0.84	89.1	
Modelo	Natación forzada	3	0.55	0.57	96.2	0.001
	Inmovilización o restricción	5	1.60	1.44	97.0	
	Estrés crónico de baja intensidad	32	1.65	1.13	92.6	
	Ambiente frío y seco + "footshock"	1	3.24	--	--	
	Derrota o indefensión social	10	0.86	0.43	90.3	
	Oscuridad permanente	2	0.92	0.32	87.7	
	Separación materna	4	0.57	1.06	94.8	
	Trastorno de estrés post-traumático (TSPT)	2	1.91	0.27	80.9	
Año de publicación	Antes de 2013	18	0.72	0.59	93.0	0.003
	De 2013 a 2016	41	1.71	1.31	95.3	

Tabla 5 (cont.): Análisis de subgrupos mediante el modelo de efectos aleatorios. ***Nota;** k: número de datos en cada subgrupo; DEM: Diferencia estandarizada de medias; tau²: Valor estimado de heterogeneidad dentro de los subgrupos; I²: Variabilidad entre estudios de los no explicada por el error aleatorio dentro de los subgrupos; p: valor-p de las diferencias en los subgrupos (ver ANEXO I para las abreviaturas y subgrupos).

Se crearon tres conjuntos de subgrupos (Tabla 5) con el fin de averiguar si se obtenían datos diferentes dependiendo de las diferentes combinaciones de comparación. La separación en subgrupos del área en que se tomó la muestra, en ninguno de los casos, explica la heterogeneidad entre los estudios ($86,7\% \leq I^2 \leq 95,6\%$). Tampoco se observan diferencias significativas ($p \geq 0,089$) en la variación del tamaño del efecto entre las diferentes áreas.

La I^2 de los subgrupos de las diferentes características estudiadas es mayor del 76% en todos los casos (Tabla 5), por lo que la heterogeneidad entre los estudios no puede ser explicada por diferencias en la edad, especie o cepa de los animales, el área o la molécula analizada (ARNm o proteína), el objetivo del estudio, el resultado primario del estudio, el modelo utilizado para desencadenar fenotipo depresivo, el número de animales por jaula, su género o el año de publicación del estudio.

No se encontraron diferencias significativas ($p=0,81$) en la variación del tamaño del efecto entre las muestras de rata y de ratón (Tabla 5). Por otro lado, los subgrupos en los que se dividen las características de: edad de los animales, cepa, molécula analizada (ARNm o proteína), el objetivo del estudio, si el resultado primario del estudio fue comparar la cantidad de IL -6 en modelos animales de depresión con controles o no, el modelo utilizado para desencadenar fenotipo depresivo, número de animales por jaula, género y época de publicación (antes de 2013 vs de 2013 a 2016) sí muestran diferencias significativas en los valores de tamaño del efecto combinado ($p < 0,05$).

La variabilidad encontrada dentro de cada subgrupo adquiere valores de $0,09 \leq \tau^2 \leq 0,6$ (Tabla 5) para las cepas de ratón BALB/c, C57BL/6 y CD-1, los estudios con muestras de machos y hembras, los valores de muestras de hipotálamo, la cuantificación de ARNm, los animales estabulados individualmente y en grupo, los ensayos cuyos objetivos no son la valoración de los efectos del estrés ni de antidepresivos, los modelos de depresión inducidos por natación forzada, derrota social, oscuridad permanente y TSPT, así como los estudios publicados antes de 2013. Los datos procedentes de ratón, los animales estabulados en parejas, los animales de entre 6 y 9 semanas, la cepa de ratón Swiss albino, las muestras de sangre frente a las de cerebro, los análisis de proteína y los estudios que investigan efectos del estrés muestran valores de $0,64 \leq \tau^2 \leq 1$. El resto de subgrupos ofrecen valores de $\tau^2 \geq 1$.

En la siguiente tabla (Tabla 6), se encuentran los resultados del análisis de meta-regresión de los subgrupos anteriormente comentados.

	H^2	R^2 (%)	τ^2	I^2 (%)
Estimación combinada			1,0185	94,8
Molécula	14,24	25,47	0,7591	92,98
Área'	17,31	3,56	0,9822	94,22
Área''	16,84	11,33	0,9031	94,06
Área'''	16,49	11,77	0,8987	93,93
Objetivo'	14,18	26,18	0,7519	92,95
Prioridad del Resultado	14,61	24,15	0,7726	93,16
Modelo	15,11	12,74	0,8888	93,38
Especie	18,68	0,6	1,0124	94,65
Cepa	16,03	12,06	0,8957	93,76
Agrupación'	17,96	1,23	1,006	94,43
Grupos de edad	19,45	0,00	1,059	94,86
Género	16,79	8,81	0,9287	94,04
Año publicación	19,10	0,00	1,0357	94,76

Tabla 6: Meta-regresión de los diferentes subgrupos. ***Nota;** τ^2 : Valor estimado de heterogeneidad de los subgrupos; I^2 : Variabilidad entre estudios de los no explicada por el error aleatorio de los subgrupo; H^2 : Variabilidad no explicada de la variabilidad muestral. R^2 : Valor que representa la heterogeneidad explicada.

Los valores de heterogeneidad residual valorada mediante la I^2 (Tabla 6) superan en todos los casos el 92% ($92,95 \leq I^2 \leq 94,86$) frente al valor de 94,8% de la I^2 de la estimación del tamaño del efecto combinado sin tener en cuenta los subgrupos. Los valores de τ^2 encontrados en las características sometidas a meta-regresión ($0,75 \leq \tau^2 \leq 1,06$) tampoco difieren significativamente del valor de τ^2 inicial.

3.5.3. Meta-análisis acumulativo

A continuación, se ilustran los resultados del meta-análisis acumulativo ordenado cronológicamente para la variación de la IL-6 en modelos animales de depresión frente a controles.

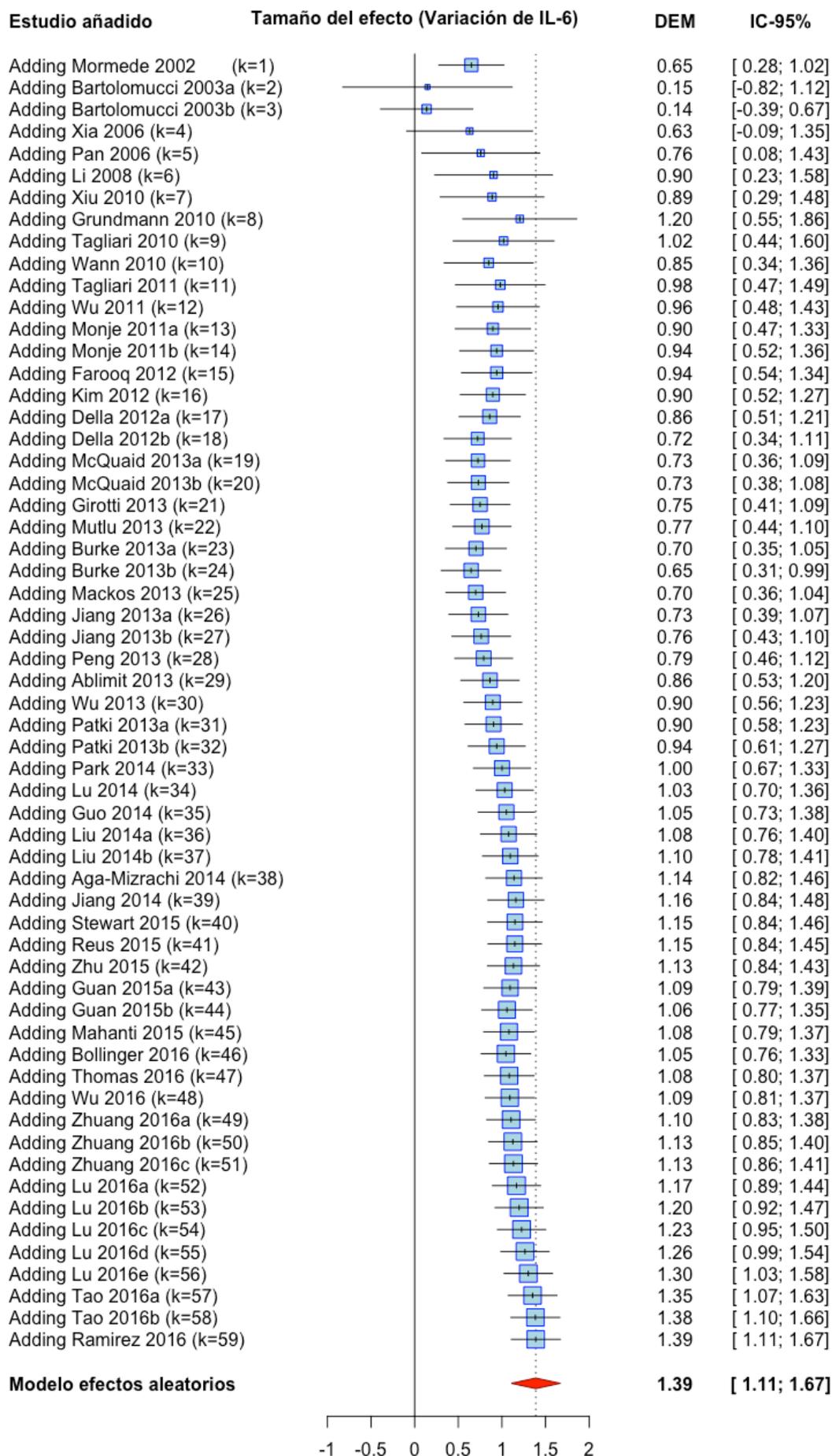


Figura 12: Forest plot del meta-análisis acumulativo. *Nota; DEM: Diferencia estandarizada de medias.

El meta-análisis acumulativo (Figura 12; ANEXO VI) muestra una tendencia a un aumento positivo del tamaño del efecto a lo largo del tiempo desde el año 2013 hasta 2016, pese a que del año 2002 al 2013 parece seguir una tendencia homogénea.

Hasta 2013, los valores del aumento de la IL-6 en modelos animales de depresión frente a controles se mantiene en valores inferiores a 1 ($0,15 \leq DEM \leq 0,98$; de 2002 a 2013), salvo los estudios de Grundmann 2010 y Tagliari 2011 que acumulan una DEM de 1,20 y 1,02 respectivamente.

A partir de 2014, la DEM acumulada para la variación de IL-6 en modelos animales de depresión frente a controles va aumentando hasta alcanzar el valor de 1,39 ($1,00 \leq DEM \leq 1,39$; de 2013 a 2016).

3.6. RIESGO DE SESGOS DE PUBLICACIÓN

La figura 13 presenta el gráfico de riesgo de sesgos de publicación con los nuevos estudios estimados mediante el método de *trim and fill*.

Se puede observar que la mayoría de los supuestos ensayos añadidos muestran una disminución de la concentración de la IL-6 de los animales sometidos a estrés frente a los controles. Éstos datos se encuentran tabulados en el *forest plot* de la Figura 14.

La figura 14 muestra los resultados de estimación de la diferencia de medias según el modelo de efectos aleatorios obtenidos mediante el método de *trim and fill*. La adición de los posibles nuevos estudios disminuye el tamaño del efecto estimado a 0,42 frente la diferencia de medias estimada, $DEM = 1,39$ obtenida del *forest plot* original. Esta aproximación, sin embargo, no varía significativamente la heterogeneidad entre los estudios ($I^2 = 95,6\%$).

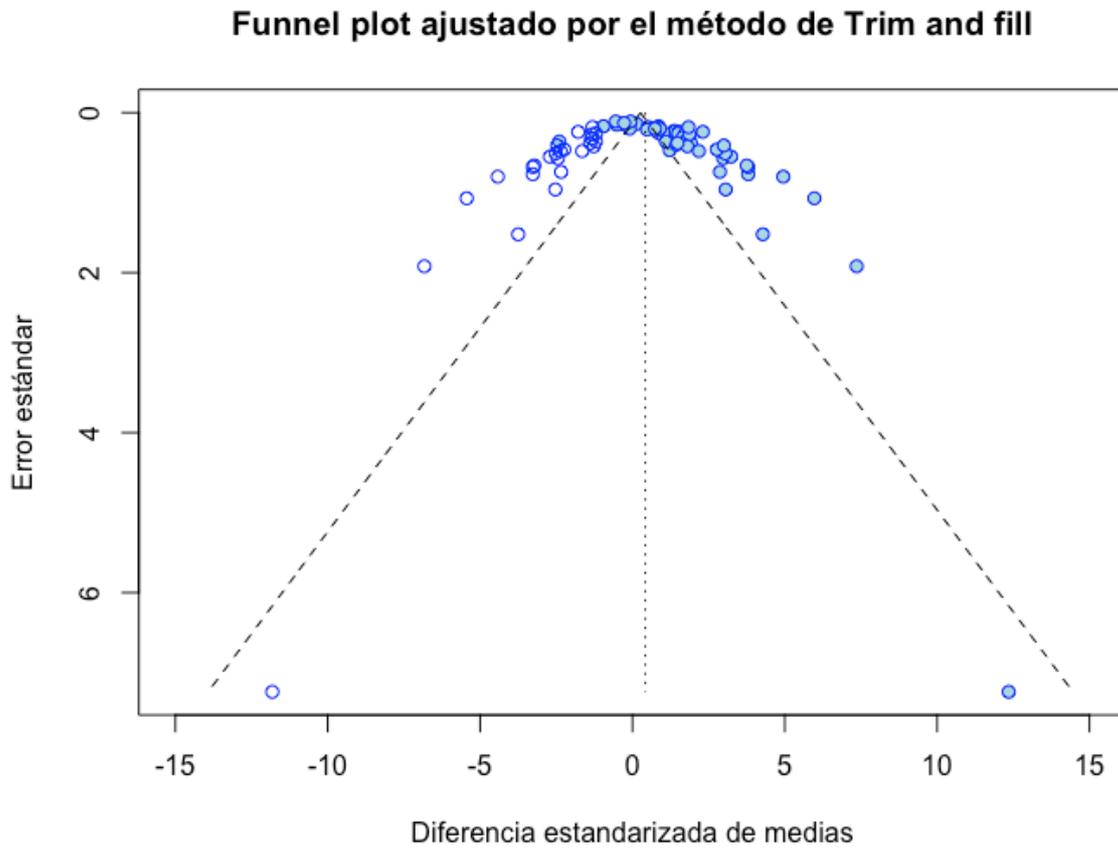


Figura 13: Gráfico de riesgo de sesgos (funnel plot) del método de "trim and fill". Diferencia de concentración de la IL-6 entre modelos animales de depresión y controles.

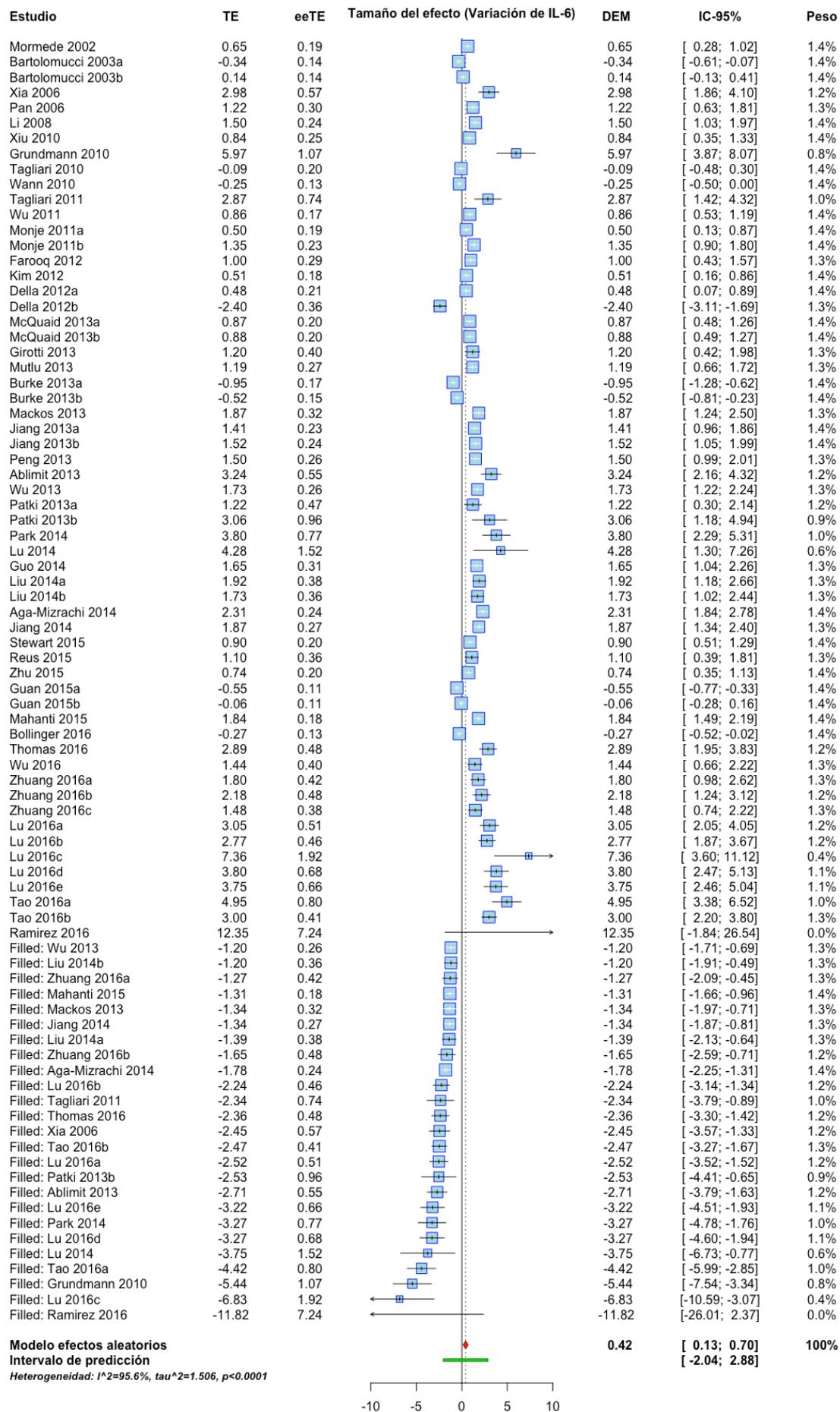


Figura 14: Forest plot realizado mediante el método de trim and fill. Diferencia de concentración ajustada de la IL-6 entre modelos animales de depresión y controles.

***Nota;** TE: Tamaño estimado del efecto; eeTE: error estándar del tamaño estimado del efecto; DEM: Diferencia estandarizada de medias; tau²: Valor estimado de heterogeneidad; I²: Variabilidad entre estudios no explicada por el error aleatorio.

En resumen, los resultados del meta-análisis muestran un aumento significativo (Figura 8; $p < 0,0001$; DEM=1,39) de los niveles de IL-6 en los modelos animales de depresión analizados frente a sus controles. Por otro lado, la heterogeneidad entre los diferentes estudios es muy alta ($I^2 = 94,8\%$) y no es explicada ni, por ningún estudio individual (Figura 11 ; $1,34 < DEM < 1,45$; $94,3\% < I^2 < 94,9\%$; ANEXO V) ni por ninguna de las características de los estudios examinadas en el análisis de subgrupos (I^2 subgrupos $\geq 86,7\%$). El meta-análisis acumulativo (Figura 12) muestra una tendencia, que se va acrecentando progresivamente desde el año 2013, a un aumento de la concentración de IL-6 en los modelos animales frente a sus controles. Utilizando el método de *trim and fill* se observa un posible sesgo de publicación hacia éstos valores de aumento de IL-6 en modelos animales.

4. DISCUSIÓN

Existen varios estudios en los que se realizan meta-análisis de las diferencias de citoquinas en pacientes deprimidos e individuos sanos, pero no se ha publicado ninguna valoración meta-analítica de estos posibles cambios en animales. En este trabajo se ha pretendido estimar la diferencia de concentración de un marcador inflamatorio, la interleuquina 6, entre modelos animales de depresión y controles sanos, mediante la realización de un meta-análisis de los estudios encontrados al respecto, con la intención de valorar la posible relación entre los procesos inflamatorios y los fenotipos *depresivo-like* en animales, su relevancia en la investigación translacional y si éstos resultados de la experimentación animal justifican el paso hacia la experimentación en humanos.

Con los estudios de los que disponemos, no podemos concretar si las elevadas concentraciones de citoquinas encontradas en pacientes de depresión serían causa o consecuencia de la misma ya que se puede inducir un fenotipo *depresivo-like* en animales con la administración de lipopolisacáridos produciendo una respuesta inmune, pero también se puede observar que aumentan las moléculas pro-inflamatorias tras la exposición tanto a estrés crónico como agudo (Guan *et al.* 2015).

Una explicación al posible aumento de IL-6 encontrado en depresión podría ser la disminución de la función los receptores de glucocorticoides implicados en la inhibición de la transcripción de moléculas pro-inflamatorias en las células inmunes (Kadmiel and Cidlowski 2013). En este caso las variaciones de IL-6 serían consecuencia de un malfuncionamiento previo a causa de un estrés prolongado.

Por otro lado, la IL-6 podría causar esta disfunción ya que es capaz de actuar sobre el eje HPA aumentando su función y elevando los niveles de cortisol (Gadek-Michalska *et al.* 2013), que si se mantiene, podría ser la causa de una *down-regulación* de sus propios receptores.

Se encontraron 43 estudios en los que se cuantificaba la diferencia de concentración de la IL-6 entre modelos animales de depresión inducidos por estrés y sus respectivos controles.

Los resultados del meta-análisis indican un aumento de los niveles de IL-6 en los modelos animales de depresión analizados frente a sus controles. La heterogeneidad entre los diferentes estudios es muy alta

y no es explicada por ningún estudio individual, ni por ninguna de las características de los estudios examinadas y se ha observado un posible sesgo de publicación hacia resultados más positivos.

4.1. DIFERENCIAS EN LOS NIVELES DE IL-6 ENTRE CONTROLES Y MODELOS DE DEPRESIÓN.

Según Jacob Cohen (Cohen 1988), un tamaño del efecto estimado con un valor mayor o igual a 0,8 indica un tamaño del efecto grande y adquiere significación estadística ($p < 0,05$) si el intervalo de confianza del 95% no pasa por el valor de la hipótesis nula. La diferencia estandarizada de medias de la variación en concentración de la interleuquina 6 entre los modelos animales de depresión y los controles, según el modelo de efectos aleatorios, corresponde a 1,39, y el intervalo de confianza del 95% es [1,11;1,67], lo que parece indicar que la inducción de estos modelos aumenta la concentración de IL-6. No existen, o al menos no hemos encontrado, meta-análisis de estudios animales a este respecto, pero estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos en los estudios meta-analíticos de ensayos en humanos (Dowlati *et al.* 2010, Haapakoski *et al.* 2015, Hiles *et al.* 2012, Howren *et al.* 2009, Liu *et al.* 2012), que analizan las diferencias en la concentración de IL-6 en pacientes de depresión frente a individuos sanos, donde también se observan aumentos de moderados a grandes de IL-6 en estos pacientes.

El valor estimado de τ^2 corresponde a 1,018. Una varianza entre los estudios (τ^2) mayor de 1 sugiere que existe una gran heterogeneidad entre ellos. El 94,8% (I^2) de la heterogeneidad no es explicada por el azar, por lo que es necesario analizar las posibles fuentes de variación.

Se ha observado también un posible sesgo hacia los datos positivos con mayor concentración de IL-6 en modelos animales de depresión frente a controles.

El gráfico de Baujat, muestra que el valor de la diferencia de IL-6 en hipocampo de Guan 2015a contribuye a la heterogeneidad en un 98,6%, con una influencia en el resultado combinado mayor que el resto de estudios. El análisis de influencia, sin embargo, muestra que la omisión de este estudio, ni la de ningún otro, modifica significativamente la diferencia de IL-6 o la heterogeneidad obtenidas en el meta-análisis.

Se han encontrado diferencias significativas de la diferencia de medias de IL-6 entre los subgrupos de algunas de las características analizadas. Además, en algunos de los subgrupos se ha encontrado una variabilidad de $0,09 \leq \tau^2 \leq 0,6$, considerablemente inferior a la $\tau^2=1,02$ que muestra la estimación combinada de todos los estudios.

A pesar de encontrar diferencias entre los subgrupos y una disminución de la variabilidad dentro de muchos de ellos, en ninguno de los casos la heterogeneidad no explicada por error aleatorio (I^2) de los subgrupos, tanto en el análisis de subgrupos como en el análisis de meta-regresión, fue inferior a 86,7% y 92,95% respectivamente. Esto indica que las diferencias en los subgrupos analizados, no explican la alta heterogeneidad.

Los estudios publicados a partir de 2013 muestran una tendencia a aumentar los valores de concentración de IL-6 en los modelos animales de depresión frente a los controles. Esto puede indicar un aumento progresivo de sesgo de publicación hacia los valores positivos, lo que también se ha observado mediante el *funnel plot* y corroborado por el análisis de *trim and fill*, que muestra una disminución de la DEM al corregir y ajustar los resultados al posible sesgo. Un sesgo de publicación hacia valores positivos también es reportado por Liu et al. (2012) en cuanto a los estudios en humanos.

4.2. DEBILIDAD DE LOS CRITERIOS ACTUALES PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y EL RIESGO DE SESGOS DE LOS ESTUDIOS ANIMALES

En investigación clínica existen herramientas estandarizadas para la evaluación de la calidad y la validez interna de los estudios, como la "*Cochrane RoB tool*" (Higgins et al. 2011a) o el "NOS" (Newcastle-Ottawa quality assessment scale for case-control studies) (Wells et al. 2009).

En el trabajo desarrollado por Wei (Wei et al. 2016) se comparan las herramientas de la valoración del riesgo de sesgos de SCYRCLE y Cochrane, llegando a la conclusión de que la "*SYRCLE's RoB tool*" se puede utilizar para evaluar la validez y calidad de los estudios animales dentro del marco del uso del GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation) en revisiones sistemáticas y meta-análisis de experimentación básica.

En la práctica, la mayor parte de las dimensiones que se juzgan en estas herramientas no son siempre viables en experimentación animal ya que están perfeccionados para estudios cénicos y, a menudo, otros no se especifican en los trabajos de experimentación animal. Siguiendo estos criterios de evaluación, la calidad de los estudios que pueden ser encontrados será baja o muy baja.

En investigación clínica, a menudo, las muestras de población son muy heterogéneas y el número de individuos muy grande, esto implica que dentro de los grupos de estudio se pueden recoger individuos o grupos de individuos con características muy diferentes, por ejemplo, estudiando pacientes con depresión nos podemos encontrar con grupos en los que existe comorbilidad con diferentes patologías y grupos en los que no. Estos estudios, no es necesario excluirlos del meta-análisis, probablemente se separarían los subgrupos para analizarlos.

Una de las características de la experimentación animal es que se puede, y se suele, utilizar animales con la misma edad, peso, *background* genético y entorno, por lo que los grupos que se pueden obtener, si no hay intervención previa en los individuos, serán muy similares ya que, además, el tamaño de la muestra suele ser pequeño. Esto hace que no sea estrictamente necesario generar secuencias de asignación aleatoria ya que las características basales de los animales serán muy similares.

Por lo tanto, en estudios animales las muestras suelen ser homogéneas ya que existe muy poca variabilidad entre los animales de un mismo estudio. Esto hace que, en cada estudio, la muestra posea unas características concretas que se pueden adecuar o no a los criterios de inclusión y exclusión del meta-análisis y los estudios directamente se aceptan o rechazan, por ejemplo en el caso de la comorbilidad, según interese o no esta característica.

Por otro lado, se debe tener en cuenta que, a menudo, quien se encarga del proceso entero que envuelve el experimento, desde que se adquieren los animales hasta que se obtienen los resultados finales, es un único investigador, por lo que no es viable ningún tipo de ocultamiento de asignación de los grupos de tratamiento y control o el cegamiento del personal y de los evaluadores.

En investigación animal no existe la costumbre de publicar previamente los protocolos de los ensayos. De este modo, la hipótesis inicial y los resultados primarios y secundarios pueden variar según los datos que se van obteniendo al realizar los experimentos. Existen

iniciativas, como CAMARADES, que pretenden crear bases de datos donde se recogen los protocolos de los ensayos antes de publicarse y que se encuentran al alcance de todos los investigadores, pero aún no se ha convertido en una práctica estandarizada. Esto dificulta la posibilidad de encontrar todos los estudios realizados sobre un tema y tras búsquedas exhaustivas se pretende, al menos, encontrar una muestra representativa de el total de estudios realizados.

Todo esto hace que los criterios propuestos para evaluar los riesgos de sesgo no sean adecuados para este tipo de estudios animales.

Existen otros criterios importantes a tener en cuenta a la hora de cuantificar la calidad de los estudios en animales a incluir en un meta-análisis que no se recogen en las guías disponibles (ver ANEXO VII para un ejemplo de la valoración del riesgo de sesgos según los parámetros importantes en este estudio).

En demasiadas ocasiones los datos numéricos de los resultados (en este caso, las medias y desviaciones o errores estándar) no se incluyen en el texto de los estudios y es necesario pedírselos a los autores o, normalmente, extraerlos directamente de los gráficos.

Los datos de la cuantificación de la IL-6 no siempre son resultados primarios, sino que pueden ser resultados secundarios o incluso, en algunos trabajos de investigación básica, se utiliza el aumento de la IL-6 como prueba para la validación de un modelo de depresión animal. En este último caso, si no se observan cambios en IL-6, el modelo no se daría por válido y no se publicarían los resultados, lo que impide una valoración objetiva de la variación de citoquinas en los modelos animales y es una posible fuente de sesgo de publicación.

Por otro lado, existen diferentes modelos animales de depresión. En este trabajo se han utilizado estudios de modelos de estrés crónico que, en teoría, se consideran los más parecidos a lo que ocurre en humanos. Los diferentes tipos de modelos no se utilizan indistintamente, ya que no comparten las mismas variaciones bioquímicas y comportamentales, sino que cada uno de ellos posee algunas de las características propias de los pacientes deprimidos. Esto plantea la duda de qué tipo de modelo es el adecuado para qué tipo de investigación, y si los modelos existentes realmente son válidos para observar todas las variaciones bioquímicas que se producen en la depresión.

Otro gran problema que encontramos al hacer un meta-análisis en investigación básica es el sesgo de publicación. Lo más común es que los resultados negativos o sin diferencias significativas no sean publicados, y lo sean aquellos que coinciden y corroboran resultados anteriores de otros grupos. Esto plantea un gran problema para la obtención de un tamaño de efecto fiable en un meta-análisis.

La calidad de un meta-análisis viene dada, en gran medida, por la calidad de los estudios incluidos; como se ha comentado anteriormente, la calidad de los estudios incluidos en este meta-análisis se considera baja o muy baja, aunque las herramientas existentes para su valoración no son del todo adecuadas.

Teniendo en cuenta la baja calidad de los estudios encontrados en animales para este trabajo, la alta heterogeneidad no explicada de los mismos y la posibilidad de un sesgo de publicación, los resultados de este meta-análisis han de ser interpretados con cautela.

Varios de los meta-análisis encontrados en humanos no exploran ni cuantifican la calidad de los estudios (Dowlati *et al.* 2010, Hiles *et al.* 2012, Howren *et al.* 2009), en los trabajos en los que se cuantifica y se muestra la calidad de los estudios, al menos la mitad de ellos poseen alta calidad, aunque en cada uno de ellos los estándares de valoración son diferentes. Sin embargo, la heterogeneidad de los estudios en humanos es también alta o muy alta, y se ha encontrado sesgo de publicación hacia los valores positivos (Hiles *et al.* 2012), por lo que la calidad de estos meta-análisis también debe considerarse baja o muy baja.

En algunos trabajos de investigación básica se utiliza el aumento de la concentración de IL-6 como prueba para la validación de un modelo de depresión (Patki *et al.* 2013) y otros estudios (Della *et al.* 2012, Grundmann *et al.* 2010, Jiang *et al.* 2013, Liu *et al.* 2014, Lu *et al.* 2016, Lu *et al.* 2014, Mutlu *et al.* 2013, Pan *et al.* 2006, Park *et al.* 2014, Ramirez and Sheridan 2016, Reus *et al.* 2015, Tagliari *et al.* 2011, Tao *et al.* 2016, Thomas *et al.* 2016, Wu *et al.* 2011, Wu *et al.* 2016, Wu *et al.* 2013, Xia *et al.* 2006, Zhu *et al.* 2015, Zhuang *et al.* 2016) valoran la eficacia de antidepresivos mediante su capacidad para reducir los niveles de moléculas pro-inflamatorias.

Estos estudios, se han realizado bajo la hipótesis de que en depresión los niveles de citoquinas se ven alterados en comparación con individuos sanos, pero no existen datos en animales que corroboren esta hipótesis ya que, como se ha encontrado en este trabajo, los

datos obtenidos del meta-análisis de los ensayos existentes no son concluyentes considerando su heterogeneidad y riesgo de sesgo de publicación.

Esto plantea dudas en cuanto a la importancia e interés de la investigación translacional, al menos en este caso concreto.

5. CONCLUSIONES

1. Los resultados del meta-análisis de los estudios incluidos en esta revisión muestran que la inducción de un fenotipo *depresivo-like* mediante el uso de modelos de estrés crónico aumenta la concentración de la interleuquina 6 con un tamaño del efecto estimado de 1,39 (IC-95%=[1,11-1,67]).
2. La heterogeneidad encontrada entre los estudios es muy alta ($I^2=94,8\%$), lo que pone en duda la validez de los resultados encontrados.
3. Esta heterogeneidad no es explicada por ningún estudio individual, ni por diferencias entre los subgrupos de estudios en base a diferentes características metodológicas analizadas.
4. Existe un sesgo de publicación o de pequeños estudios hacia valores positivos y aumento del tamaño del efecto de la inducción de los modelos de depresión sobre la concentración de la interleuquina 6.
5. La calidad de los estudios encontrados es baja o muy baja para la realización de un meta-análisis.
6. Los métodos de valoración de la calidad de estudios animales no son válidos en muchas ocasiones.
7. En este caso, los estudios clínicos centrados en la variación de la interleuquina 6 en individuos deprimidos no están justificados por los resultados obtenidos en estudios en animales.
8. Con nuestros resultados, no se puede afirmar que exista un relación entre marcadores inflamatorios y depresión en modelos animales, lo que plantea serias dudas sobre su interés translacional a estudios humanos.

REFERENCIAS DE LOS ESTUDIOS INCLUIDOS

- Ablimit A, Kuhnel H, Strasser A, Upur H. 2013. Abnormal Savda syndrome: long-term consequences of emotional and physical stress on endocrine and immune activities in an animal model. *Chin J Integr Med* 19: 603-609.
- Aga-Mizrachi S, et al. 2014. Methylphenidate and desipramine combined treatment improves PTSD symptomatology in a rat model. *Transl Psychiatry* 4: e447.
- Bartolomucci A, Palanza P, Parmigiani S, Pederzani T, Merlot E, Neveu PJ, Dantzer R. 2003. Chronic psychosocial stress down-regulates central cytokines mRNA. *Brain Res Bull* 62: 173-178.
- Bollinger JL, Bergeon Burns CM, Wellman CL. 2016. Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex. *Brain Behav Immun* 52: 88-97.
- Burke NN, Llorente R, Marco EM, Tong K, Finn DP, Viveros MP, Roche M. 2013. Maternal deprivation is associated with sex-dependent alterations in nociceptive behavior and neuroinflammatory mediators in the rat following peripheral nerve injury. *J Pain* 14: 1173-1184.
- Della FP, et al. 2012. Tianeptine exerts neuroprotective effects in the brain tissue of rats exposed to the chronic stress model. *Pharmacol Biochem Behav* 103: 395-402.
- Farooq RK, Isingrini E, Tanti A, Le Guisquet AM, Arlicot N, Minier F, Leman S, Chalon S, Belzung C, Camus V. 2012. Is unpredictable chronic mild stress (UCMS) a reliable model to study depression-induced neuroinflammation? *Behav Brain Res* 231: 130-137.
- Girotti M, Donegan JJ, Morilak DA. 2013. Influence of hypothalamic IL-6/gpl30 receptor signaling on the HPA axis response to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology* 38: 1158-1169.
- Grundmann O, Lv Y, Kelber O, Butterweck V. 2010. Mechanism of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint stress is mediated by the interrelationship of the immune, oxidative defense, and neuroendocrine system. *Neuropharmacology* 58: 767-773.
- Guan XT, Lin WJ, Tang MM. 2015. Comparison of stress-induced and LPS-induced depressive-like behaviors and the alterations of central proinflammatory cytokines mRNA in rats. *Psych J* 4: 113-122.
- Guo T, Guo Z, Yang X, Sun L, Wang S, Yingge A, He X, Ya T. 2014. The Alterations of IL-1Beta, IL-6, and TGF-Beta Levels in Hippocampal CA3 Region of Chronic Restraint Stress Rats after Electroacupuncture (EA) Pretreatment. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: 369158.
- Jiang H, Wang Z, Wang Y, Xie K, Zhang Q, Luan Q, Chen W, Liu D. 2013. Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: involvement of its anti-inflammatory action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 47: 33-39.
- Jiang P, Zhang L, Zhu W, Li H, Dang R, Tang M. 2014. Chronic stress causes neuroendocrine-immune disturbances without affecting renal vitamin D metabolism in rats. *J Endocrinol Invest* 37: 1109-1116.
- Kim SJ, Lee H, Lee G, Oh SJ, Shin MK, Shim I, Bae H. 2012. CD4+CD25+ regulatory T cell depletion modulates anxiety and depression-like behaviors in mice. *PLoS One* 7: e42054.

- Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P, Tang Y. 2008. Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci* 82: 934-942.
- Liu XL, Luo L, Liu BB, Li J, Geng D, Liu Q, Yi LT. 2014. Ethanol extracts from *Hemerocallis citrina* attenuate the upregulation of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in rats. *J Ethnopharmacol* 153: 484-490.
- Lu J, Shao RH, Hu L, Tu Y, Guo JY. 2016. Potential antiinflammatory effects of acupuncture in a chronic stress model of depression in rats. *Neurosci Lett* 618: 31-38.
- Lu M, Yang JZ, Geng F, Ding JH, Hu G. 2014. Iptakalim confers an antidepressant effect in a chronic mild stress model of depression through regulating neuro-inflammation and neurogenesis. *Int J Neuropsychopharmacol* 17: 1501-1510.
- Mackos AR, Eubank TD, Parry NM, Bailey MT. 2013. Probiotic *Lactobacillus reuteri* attenuates the stressor-enhanced severity of *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun* 81: 3253-3263.
- Mahanti S, Majhi A, Kundu K, Basu A, Bishayi B. 2015. Systemic *Staphylococcus aureus* infection in restraint stressed mice modulates impaired immune response resulting in improved behavioral activities. *J Neuroimmunol* 288: 102-113.
- McQuaid RJ, Audet MC, Jacobson-Pick S, Anisman H. 2013. Environmental enrichment influences brain cytokine variations elicited by social defeat in mice. *Psychoneuroendocrinology* 38: 987-996.
- Monje FJ, Cabatic M, Divisch I, Kim EJ, Herkner KR, Binder BR, Pollak DD. 2011. Constant darkness induces IL-6-dependent depression-like behavior through the NF-kappaB signaling pathway. *J Neurosci* 31: 9075-9083.
- Mormede C, Castanon N, Medina C, Moze E, Lestage J, Neveu PJ, Dantzer R. 2002. Chronic mild stress in mice decreases peripheral cytokine and increases central cytokine expression independently of IL-10 regulation of the cytokine network. *Neuroimmunomodulation* 10: 359-366.
- Mutlu O, Gumuslu E, Ulak G, Celikyurt IK, Akar F, Bektas E, Demirtas T, Kir HM, Musul MM, Erden F. 2013. Antidepressant-Like Activity of Agomelatine in the Mouse Unpredictable Chronic Mild Stress Model. *Drug Development Research* 74: 203-215.
- Pan Y, Zhang WY, Xia X, Kong LD. 2006. Effects of icariin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis action and cytokine levels in stressed Sprague-Dawley rats. *Biol Pharm Bull* 29: 2399-2403.
- Park HJ, Kim SK, Kang WS, Woo JM, Kim JW. 2014. Effects of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* on cytokine genes in the hippocampus of maternal separation rats. *Can J Physiol Pharmacol* 92: 95-101.
- Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S. 2013. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res* 1539: 73-86.
- Peng Z, et al. 2013. Gastrodin ameliorates anxiety-like behaviors and inhibits IL-1beta level and p38 MAPK phosphorylation of hippocampus in the rat model of posttraumatic stress disorder. *Physiol Res* 62: 537-545.
- Ramirez K, Sheridan JF. 2016. Antidepressant imipramine diminishes stress-induced inflammation in the periphery and central nervous

- system and related anxiety- and depressive- like behaviors. *Brain Behav Immun* 57: 293-303.
- Reus GZ, et al. 2015. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett* 584: 83-87.
- Stewart AM, Roy S, Wong K, Gaikwad S, Chung KM, Kalueff AV. 2015. Cytokine and endocrine parameters in mouse chronic social defeat: implications for translational 'cross-domain' modeling of stress-related brain disorders. *Behav Brain Res* 276: 84-91.
- Tagliari B, Tagliari AP, Schmitz F, da Cunha AA, Dalmaz C, Wyse AT. 2011. Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochem Res* 36: 487-493.
- Tagliari B, dos Santos TM, Cunha AA, Lima DD, Delwing D, Sitta A, Vargas CR, Dalmaz C, Wyse AT. 2010. Chronic variable stress induces oxidative stress and decreases butyrylcholinesterase activity in blood of rats. *J Neural Transm (Vienna)* 117: 1067-1076.
- Tao W, Dong Y, Su Q, Wang H, Chen Y, Xue W, Chen C, Xia B, Duan J, Chen G. 2016. Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway. *Behav Brain Res* 308: 177-186.
- Thomas J, Khanam R, Vohora D. 2016. Augmentation of effect of venlafaxine by folic acid in behavioral paradigms of depression in mice: Evidence of serotonergic and pro-inflammatory cytokine pathways. *Pharmacol Rep* 68: 396-403.
- Wann BP, Audet MC, Anisman H. 2010. Impact of acute and chronic stressor experiences on heart atrial and brain natriuretic peptides in response to a subsequent stressor. *Horm Behav* 58: 907-916.
- Wu J, Du J, Xu C, Le J, Xu Y, Liu B, Dong J. 2011. Icaritin attenuates social defeat-induced down-regulation of glucocorticoid receptor in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 98: 273-278.
- Wu S, Gao Q, Zhao P, Gao Y, Xi Y, Wang X, Liang Y, Shi H, Ma Y. 2016. Sulforaphane produces antidepressant- and anxiolytic-like effects in adult mice. *Behav Brain Res* 301: 55-62.
- Wu X, Wu J, Xia S, Li B, Dong J. 2013. Icaritin opposes the development of social aversion after defeat stress via increases of GR mRNA and BDNF mRNA in mice. *Behav Brain Res* 256: 602-608.
- Xia X, Pan Y, Zhang WY, Cheng G, Kong LD. 2006. Ethanolic extracts from *Curcuma longa* attenuates behavioral, immune, and neuroendocrine alterations in a rat chronic mild stress model. *Biol Pharm Bull* 29: 938-944.
- Xiu LJ, Lin HM, Wei PK. 2010. The effect of chronic mild stress on tumor-bearing rats' behavior and its mechanism. *Neurosci Lett* 473: 1-4.
- Zhu X, Jing L, Chen C, Shao M, Fan Q, Diao J, Liu Y, Lv Z, Sun X. 2015. Danzhi Xiaoyao San ameliorates depressive-like behavior by shifting toward serotonin via the downregulation of hippocampal indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Ethnopharmacol* 160: 86-93.
- Zhuang F, et al. 2016. Cytokines and glucocorticoid receptors are associated with the antidepressant-like effect of alaric. *Peptides* 76: 115-129.

REFERENCIAS GENERALES:

- Abelaira HM, Reúus GZ, Quevedo J. 2013. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 35: S112-S120.
- Aguilera G. 1994. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol* 15: 321-350.
- Almeida OP, Alfonso H, Jamrozik K, Hankey GJ, Flicker L. 2010. Aspirin use, depression, and cognitive impairment in later life: the health in men study. *J Am Geriatr Soc* 58: 990-992.
- Baujat B, Mahe C, Pignon JP, Hill C. 2002. A graphical method for exploring heterogeneity in meta-analyses: application to a meta-analysis of 65 trials. *Stat Med* 21: 2641-2652.
- Begg C, et al. 1996. Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement. *Jama* 276: 637-639.
- Blier P, de Montigny C. 1994. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* 15: 220-226.
- Bonaccorso S, Maier SF, Meltzer HY, Maes M. 2003. Behavioral changes in rats after acute, chronic and repeated administration of interleukin-1beta: relevance for affective disorders. *J Affect Disord* 77: 143-148.
- Budziszewska B. 2002. Effect of antidepressant drugs on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and glucocorticoid receptor function. *Pol J Pharmacol* 54: 343-349.
- Bufoalino C, Hepgul N, Aguglia E, Pariante CM. 2013. The role of immune genes in the association between depression and inflammation: a review of recent clinical studies. *Brain Behav Immun* 31: 31-47.
- Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MBA, Mucke L. 1993. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 10061-10065.
- Capuron L, Gumnick JF, Musselman DL, Lawson DH, Reemsnyder A, Nemeroff CB, Miller AH. 2002. Neurobehavioral effects of interferon-alpha in cancer patients: phenomenology and paroxetine responsiveness of symptom dimensions. *Neuropsychopharmacology* 26: 643-652.
- Catena-Dell'Osso M, Rotella F, Dell'Osso A, Fagiolini A, Marazziti D. 2013. Inflammation, serotonin and major depression. *Curr Drug Targets* 14: 571-577.
- Chrousos GP. 2000. Stress, chronic inflammation, and emotional and physical well-being: concurrent effects and chronic sequelae. *J Allergy Clin Immunol* 106: S275-291.
- Cohen J. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Hillsdale, N.J.: L. Erlbaum Associates.
- Conti P, Carinci F, Caraffa A, Ronconi G, Lessiani G, Theoharides TC. 2017. Link between mast cells and bacteria: Antimicrobial defense, function and regulation by cytokines. *Med Hypotheses* 106: 10-14.
- Dantzer R. 2001. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* 15: 7-24.
- Della FP, et al. 2012. Tianeptine exerts neuroprotective effects in the brain tissue of rats exposed to the chronic stress model. *Pharmacol Biochem Behav* 103: 395-402.

- Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctot KL. 2010. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 67: 446-457.
- Du X, Pang TY. 2015. Is Dysregulation of the HPA-Axis a Core Pathophysiology Mediating Co-Morbid Depression in Neurodegenerative Diseases? *Front Psychiatry* 6: 32.
- Duman RS, Li N. 2012. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367: 2475-2484.
- Duman RS, Malberg J, Thome J. 1999. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 46: 1181-1191.
- Duval S, Tweedie R. 2000. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* 56: 455-463.
- Ellis PD. 2010. *The Essential Guide to Effect Sizes: Statistical Power, Meta-Analysis, and the Interpretation of Research Results*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ershler WB, Sun WH, Binkley N, Gravenstein S, Volk MJ, Kamoske G, Klopp RG, Roecker EB, Daynes RA, Weindruch R. 1993. Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and in vitro production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine Cytokine Res* 12: 225-230.
- Evans DL, et al. 2005. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biol Psychiatry* 58: 175-189.
- Eyre HA, Air T, Proctor S, Rositano S, Baune BT. 2015. A critical review of the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 57: 11-16.
- Eyre HA, Lavretsky H, Kartika J, Qassim A, Baune BT. 2016. Modulatory Effects of Antidepressant Classes on the Innate and Adaptive Immune System in Depression. *Pharmacopsychiatry* 49: 85-96.
- Fisar Z, Raboch J. 2008. Depression, antidepressants, and peripheral blood components. *Neuro Endocrinol Lett* 29: 17-28.
- Frodl T, O'Keane V. 2013. How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. *Neurobiol Dis* 52: 24-37.
- Gadek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Bugajski J. 2013. Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. *Pharmacol Rep* 65: 1655-1662.
- Gene VG. 1976. Primary, Secondary, and Meta-Analysis of Research. *Educational Researcher* 5: 3-8.
- Glass GV. 1976. Primary, Secondary, and Meta-Analysis of Research. *Educational Researcher* 5: 3-8.
- Greenland S. 1987. Quantitative methods in the review of epidemiologic literature. *Epidemiol Rev* 9: 1-30.
- Grundmann O, Lv Y, Kelber O, Butterweck V. 2010. Mechanism of St. John's wort extract (STW3-VI) during chronic restraint stress is mediated by the interrelationship of the immune, oxidative defense, and neuroendocrine system. *Neuropharmacology* 58: 767-773.

- Guan X-T, Lin W-J, Tang M-M. 2015. Comparison of stress-induced and LPS-induced depressive-like behaviors and the alterations of central proinflammatory cytokines mRNA in rats. *PsyCh journal* 4: 113-122.
- Haapakoski R, Mathieu J, Ebmeier KP, Alenius H, Kivimaki M. 2015. Cumulative meta-analysis of interleukins 6 and 1beta, tumour necrosis factor alpha and C-reactive protein in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 49: 206-215.
- Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. 2011. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology* 36: 2452-2459.
- Harbuz MS, Stephanou A, Sarlis N, Lightman SL. 1992. The effects of recombinant human interleukin (IL)-1 alpha, IL-1 beta or IL-6 on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation. *J Endocrinol* 133: 349-355.
- Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. 2016. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Compr Physiol* 6: 603-621.
- Higgins JP, Thompson SG. 2002. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med* 21: 1539-1558.
- Higgins JP, Thompson SG, Spiegelhalter DJ. 2009. A re-evaluation of random-effects meta-analysis. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc* 172: 137-159.
- Higgins JP, Altman DG, Gotzsche PC, Juni P, Moher D, Oxman AD, Savovic J, Schulz KF, Weeks L, Sterne JA. 2011a. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ* 343: d5928.
- Higgins JPT, Green S, (editors). 2011b. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011]*: The Cochrane Collaboration, 2011.
- Hiles SA, Baker AL, de Malmanche T, Attia J. 2012. A meta-analysis of differences in IL-6 and IL-10 between people with and without depression: exploring the causes of heterogeneity. *Brain Behav Immun* 26: 1180-1188.
- Hodes GE, et al. 2011. A functional role for interleukin 6 in susceptibility to depression. *Neuropsychopharmacology* 36: S202.
- Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. 2014. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol* 14: 43.
- Howren MB, Lamkin DM, Suls J. 2009. Associations of depression with C-reactive protein, IL-1, and IL-6: a meta-analysis. *Psychosom Med* 71: 171-186.
- Irwin M, Clark C, Kennedy B, Christian Gillin J, Ziegler M. 2003. Nocturnal catecholamines and immune function in insomniacs, depressed patients, and control subjects. *Brain Behav Immun* 17: 365-372.
- Janssen WJ, Henson PM. 2012. Cellular regulation of the inflammatory response. *Toxicol Pathol* 40: 166-173.
- Jiang H, Wang Z, Wang Y, Xie K, Zhang Q, Luan Q, Chen W, Liu D. 2013. Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: involvement of its anti-inflammatory action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 47: 33-39.
- Kadmiel M, Cidlowski JA. 2013. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 34: 518-530.

- Keller J, Gomez R, Williams G, Lembke A, Lazzeroni L. 2017. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Mol Psychiatry* 22: 527-536.
- Kelley KW, Bluthé RM, Dantzer R, Zhou JH, Shen WH, Johnson RW, Broussard SR. 2003. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* 17 Suppl 1: S112-118.
- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. 2010a. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8: e1000412.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. 2010b. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577-1579.
- Kim HY, Kim HR, Lee SH. 2014. Advances in systems biology approaches for autoimmune diseases. *Immune Netw* 14: 73-80.
- Kim YK, Na KS, Shin KH, Jung HY, Choi SH, Kim JB. 2007. Cytokine imbalance in the pathophysiology of major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31: 1044-1053.
- Kong E, et al. 2015. STAT3 controls IL6-dependent regulation of serotonin transporter function and depression-like behavior. *Sci Rep* 5: 9009.
- Krauth D, Woodruff TJ, Bero L. 2013. Instruments for assessing risk of bias and other methodological criteria of published animal studies: a systematic review. *Environ Health Perspect* 121: 985-992.
- Kubera M, et al. 2013. A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months. *Brain Behav Immun* 31: 96-104.
- Kurosawa N, Shimizu K, Seki K. 2016. The development of depression-like behavior is consolidated by IL-6-induced activation of locus coeruleus neurons and IL-1beta-induced elevated leptin levels in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 233: 1725-1737.
- Lanquillon S, Krieg JC, Bening-Abu-Shach U, Vedder H. 2000. Cytokine production and treatment response in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 22: 370-379.
- Lebedeva KA, Caruncho HJ, Kalynchuk LE. 2017. Cyclical corticosterone administration sensitizes depression-like behavior in rats. *Neurosci Lett* 650: 45-51.
- Lee BH, Kim YK. 2010. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig* 7: 231-235.
- Liu XL, Luo L, Liu BB, Li J, Geng D, Liu Q, Yi LT. 2014. Ethanol extracts from *Hemerocallis citrina* attenuate the upregulation of proinflammatory cytokines and indoleamine 2,3-dioxygenase in rats. *J Ethnopharmacol* 153: 484-490.
- Liu Y, Ho RC, Mak A. 2012. Interleukin (IL)-6, tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. *J Affect Disord* 139: 230-239.
- Lopez-Munoz F, Alamo C. 2009. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des* 15: 1563-1586.

- Lu J, Shao RH, Hu L, Tu Y, Guo JY. 2016. Potential antiinflammatory effects of acupuncture in a chronic stress model of depression in rats. *Neurosci Lett* 618: 31-38.
- Lu M, Yang JZ, Geng F, Ding JH, Hu G. 2014. Iptakalim confers an antidepressant effect in a chronic mild stress model of depression through regulating neuro-inflammation and neurogenesis. *Int J Neuropsychopharmacol* 17: 1501-1510.
- Maes M, Meltzer HY, Bosmans E, Bergmans R, Vandoolaeghe E, Ranjan R, Desnyder R. 1995. Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J Affect Disord* 34: 301-309.
- Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. 1993. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 1690-1694.
- McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkenny C, Wainwright CL. 2010. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1573-1576.
- Medzhitov R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4196-4200.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. 2010. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Int J Surg* 8: 336-341.
- Moher D, Cook DJ, Eastwood S, Olkin I, Rennie D, Stroup DF. 1999. Improving the quality of reports of meta-analyses of randomised controlled trials: the QUOROM statement. *Quality of Reporting of Meta-analyses*. *Lancet* 354: 1896-1900.
- Moynihan JA, Ader R, Grota LJ, Schachtman TR, Cohen N. 1990. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain Behav Immun* 4: 1-12.
- Mutlu O, Gumuslu E, Ulak G, Celikyurt IK, Akar F, Bektas E, Demirtas T, Kir HM, Musul MM, Erden F. 2013. Antidepressant-Like Activity of Agomelatine in the Mouse Unpredictable Chronic Mild Stress Model. *Drug Development Research* 74: 203-215.
- Ohshima S, et al. 1998. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8222-8226.
- OMS. 2017. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/es/>
- Pan Y, Zhang WY, Xia X, Kong LD. 2006. Effects of icariin on hypothalamic-pituitary-adrenal axis action and cytokine levels in stressed Sprague-Dawley rats. *Biol Pharm Bull* 29: 2399-2403.
- Park HJ, Kim SK, Kang WS, Woo JM, Kim JW. 2014. Effects of essential oil from *Chamaecyparis obtusa* on cytokine genes in the hippocampus of maternal separation rats. *Can J Physiol Pharmacol* 92: 95-101.
- Pasco JA, Jacka FN, Williams LJ, Henry MJ, Nicholson GC, Kotowicz MA, Berk M. 2010. Clinical implications of the cytokine hypothesis of

- depression: the association between use of statins and aspirin and the risk of major depression. *Psychother Psychosom* 79: 323-325.
- Patki G, Solanki N, Atrooz F, Allam F, Salim S. 2013. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. *Brain Res* 1539: 73-86.
- Peroutka SJ, Snyder SH. 1980. Long-term antidepressant treatment decreases spiroperidol-labeled serotonin receptor binding. *Science* 210: 88-90.
- Peters JL, Sutton AJ, Jones DR, Abrams KR, Rushton L. 2008. Contour-enhanced meta-analysis funnel plots help distinguish publication bias from other causes of asymmetry. *J Clin Epidemiol* 61: 991-996.
- Price JL, Drevets WC. 2012. Neural circuits underlying the pathophysiology of mood disorders. *Trends Cogn Sci* 16: 61-71.
- Pruessner M, Hellhammer DH, Pruessner JC, Lupien SJ. 2003. Self-reported depressive symptoms and stress levels in healthy young men: associations with the cortisol response to awakening. *Psychosom Med* 65: 92-99.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org/>.
- Raber J, O'Shea RD, Bloom FE, Campbell IL. 1997. Modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function by transgenic expression of interleukin-6 in the CNS of mice. *J Neurosci* 17: 9473-9480.
- Raison CL, Miller AH. 2001. The neuroimmunology of stress and depression. *Semin Clin Neuropsychiatry* 6: 277-294.
- Ramesh G, MacLean AG, Philipp MT. 2013. Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators Inflamm* 2013: 480739.
- Ramirez K, Sheridan JF. 2016. Antidepressant imipramine diminishes stress-induced inflammation in the periphery and central nervous system and related anxiety- and depressive- like behaviors. *Brain Behav Immun* 57: 293-303.
- Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. 2015. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 74: 5-17.
- Reiche EM, Nunes SO, Morimoto HK. 2004. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 5: 617-625.
- Reus GZ, et al. 2015. Ketamine ameliorates depressive-like behaviors and immune alterations in adult rats following maternal deprivation. *Neurosci Lett* 584: 83-87.
- Riva MA, Creese I. 1989. Reevaluation of the regulation of beta-adrenergic receptor binding by desipramine treatment. *Mol Pharmacol* 36: 211-218.
- Robak T, Gladalska A, Stepień H, Robak E. 1998. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 7: 347-353.
- Sarkar S, Schaefer M. 2014. Antidepressant pretreatment for the prevention of interferon alfa-associated depression: a systematic review and meta-analysis. *Psychosomatics* 55: 221-234.

- Scheller J, Garbers C, Rose-John S. 2014. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol* 26: 2-12.
- Seidel A, Arolt V, Hunstiger M, Rink L, Behnisch A, Kirchner H. 1995. Cytokine production and serum proteins in depression. *Scand J Immunol* 41: 534-538.
- Selye H. 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Allergy* 17: 231; 289; 358.
- Shirazi SN, Friedman AR, Kaufer D, Sakhai SA. 2015. Glucocorticoids and the Brain: Neural Mechanisms Regulating the Stress Response. *Adv Exp Med Biol* 872: 235-252.
- Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Kanabrocki EL, Yager JG, Roodell MM, Weatherbee JA, Young MR, Nenchausky BM, Scheving LE. 1995. Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *J Allergy Clin Immunol* 95: 1029-1035.
- Stahl SM. 1998. Basic psychopharmacology of antidepressants, part 1: Antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *J Clin Psychiatry* 59 Suppl 4: 5-14.
- Sterling TD. 1959. Publication Decisions and their Possible Effects on Inferences Drawn from Tests of Significance—or Vice Versa. *Journal of the American Statistical Association* 54: 30-34.
- Straub RH, Buttgereit F, Cutolo M. 2011. Alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in systemic immune diseases - a role for misguided energy regulation. *Clin Exp Rheumatol* 29: S23-31.
- Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, Moher D, Becker BJ, Sipe TA, Thacker SB. 2000. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *Jama* 283: 2008-2012.
- Sulser F. 1983. Mode of action of antidepressant drugs. *J Clin Psychiatry* 44: 14-20.
- Tagliari B, Tagliari AP, Schmitz F, da Cunha AA, Dalmaz C, Wyse AT. 2011. Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochem Res* 36: 487-493.
- Tanaka T, Kishimoto T. 2012. Immunotherapeutic implication of IL-6 blockade. *Immunotherapy* 4: 87-105.
- Tanaka T, Kishimoto T. 2014. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res* 2: 288-294.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. 2012. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52: 199-219.
- Tao W, Dong Y, Su Q, Wang H, Chen Y, Xue W, Chen C, Xia B, Duan J, Chen G. 2016. Liquiritigenin reverses depression-like behavior in unpredictable chronic mild stress-induced mice by regulating PI3K/Akt/mTOR mediated BDNF/TrkB pathway. *Behav Brain Res* 308: 177-186.
- Thomas J, Khanam R, Vohora D. 2016. Augmentation of effect of venlafaxine by folic acid in behavioral paradigms of depression in mice: Evidence of serotonergic and pro-inflammatory cytokine pathways. *Pharmacol Rep* 68: 396-403.
- Thompson SG, Higgins JP. 2002. How should meta-regression analyses be undertaken and interpreted? *Stat Med* 21: 1559-1573.

- Tian R, Hou G, Li D, Yuan TF. 2014. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *ScientificWorldJournal* 2014: 780616.
- Tonelli LH, Holmes A, Postolache TT. 2008. Intranasal immune challenge induces sex-dependent depressive-like behavior and cytokine expression in the brain. *Neuropsychopharmacology* 33: 1038-1048.
- Udina M, Castellvi P, Moreno-Espana J, Navines R, Valdes M, Fornes X, Langohr K, Sola R, Vieta E, Martin-Santos R. 2012. Interferon-induced depression in chronic hepatitis C: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Psychiatry* 73: 1128-1138.
- Vandenbroucke JP, von Elm E, Altman DG, Gotzsche PC, Mulrow CD, Pocock SJ, Poole C, Schlesselman JJ, Egger M. 2014. Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Int J Surg* 12: 1500-1524.
- Vesterinen HM, Sena ES, Egan KJ, Hirst TC, Churolov L, Currie GL, Antonic A, Howells DW, Macleod MR. 2014. Meta-analysis of data from animal studies: a practical guide. *J Neurosci Methods* 221: 92-102.
- Vgontzas AN, Zoumakis M, Papanicolaou DA, Bixler EO, Prolo P, Lin HM, Vela-Bueno A, Kales A, Chrousos GP. 2002. Chronic insomnia is associated with a shift of interleukin-6 and tumor necrosis factor secretion from nighttime to daytime. *Metabolism* 51: 887-892.
- Vgontzas AN, et al. 1999. Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2603-2607.
- Von Werne Baes C, de Carvalho Tofoli SM, Martins CM, Juruena MF. 2012. Assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor function in depression with early life stress - a systematic review. *Acta Neuropsychiatr* 24: 4-15.
- Wei D, Tang K, Wang Q, Estill J, Yao L, Wang X, Chen Y, Yang K. 2016. The use of GRADE approach in systematic reviews of animal studies. *J Evid Based Med*.
- Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, Tugwell P. 2009. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality if nonrandomized studies in meta-analyses. http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.htm
- Wu J, Du J, Xu C, Le J, Xu Y, Liu B, Dong J. 2011. Icaritin attenuates social defeat-induced down-regulation of glucocorticoid receptor in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 98: 273-278.
- Wu S, Gao Q, Zhao P, Gao Y, Xi Y, Wang X, Liang Y, Shi H, Ma Y. 2016. Sulforaphane produces antidepressant- and anxiolytic-like effects in adult mice. *Behav Brain Res* 301: 55-62.
- Wu X, Wu J, Xia S, Li B, Dong J. 2013. Icaritin opposes the development of social aversion after defeat stress via increases of GR mRNA and BDNF mRNA in mice. *Behav Brain Res* 256: 602-608.
- Xia X, Pan Y, Zhang WY, Cheng G, Kong LD. 2006. Ethanolic extracts from *Curcuma longa* attenuates behavioral, immune, and neuroendocrine alterations in a rat chronic mild stress model. *Biol Pharm Bull* 29: 938-944.
- Yu H, Chen ZY. 2011. The role of BDNF in depression on the basis of its location in the neural circuitry. *Acta Pharmacol Sin* 32: 3-11.

Zhu X, Jing L, Chen C, Shao M, Fan Q, Diao J, Liu Y, Lv Z, Sun X. 2015. Danzhi Xiaoyao San ameliorates depressive-like behavior by shifting toward serotonin via the downregulation of hippocampal indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Ethnopharmacol* 160: 86-93.

Zhuang F, et al. 2016. Cytokines and glucocorticoid receptors are associated with the antidepressant-like effect of alarin. *Peptides* 76: 115-129.

ANEXO I: Listado de abreviaturas y siglas.**I.I. Abreviaturas y siglas que aparecen en el texto general**

- **5-HT:** Serotonina.
- **5-HT_{1A}:** Receptor de serotonina 1A.
- **ACTH:** Hormona adrenocorticotropina
- **AMPC:** Adenosín monofosfato cíclico.
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- **ARRIVE:** Animal Research: Reporting *In Vivo* Experiments.
- **ASS:** Estrés social agudo (Acute Social Stress).
- **ASS':** Síndrome de sabda anormal (Abnormal Sabda Syndrom).
- **BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor).
- **CAMARADES:** Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Snimal Data from Experimental Studies.
- **Célula NK:** Célula *Natural Killer*.
- **CFSS:** Estrés crónico por natación forzada (Chronic Forced Swimming Stress).
- **CIS:** Estrés crónico por inmovilización (Chronic Immobilization Stress).
- **CMS:** Estrés crónico de baja intensidad (Chronic Mild Stress).
- **Cold-dry:** Ambiente frío y seco (cold and dry environment).
- **CONSORT:** CONSolidated Standards Of Reporting Trials.
- **CREB:** Factor de transcripción de respuesta al AMPC (cAMP Response Element-Binding).
- **CRF:** Factor de liberación de corticotropina (Corticotropin Releasing Factor).
- **CRH:** hormona de liberación de corticotropina (Corticotropin Releasing Hormone).
- **CRS:** Estrés crónico por restricción (Chronic Restraint Stress).
- **CSD:** Estrés crónico por derrota social (Chronic Social Defeat).

- **CSS:** Estrés crónico por indefensión social (Chronic Social Stress).
- **CUMS:** Estrés crónico impredecible de baja intensidad (Chronic Unpredictable Mild Stress).
- **DA:** Dopamina.
- **DD:** Oscuridad total (total Darkness).
- **FSS:** Estrés por natación forzada (Forced Swimming Stress).
- **FST:** Test de natación forzada (Forced Swimming Test).
- **GC:** Glucocorticoide.
- **HPA, eje:** Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal
- **IDO:** Indoleamina 2,3-dioxigenasa.
- **IFN- γ :** Interferón γ
- **IL:** Interleuquina.
- **IMAO:** Inhibidor de la monoaminoxidasa.
- **IMC:** Índice de masa corporal.
- **IRDN:** Inhibidor de la Recaptación de Dopamina y Noradrenalina (inhibidores duales).
- **IRSN:** Inhibidor de la Recaptación de Serotonina y Noradrenalina (inhibidores duales).
- **ISRD:** Inhibidor Selectivo de la Recaptación de Dopamina.
- **ISRN:** Inhibidor Selectivo de la Recaptación de Noradrenalina.
- **ISRS:** Inhibidor Selectivo de la Recaptación de Serotonina.
- **KO, ratón:** Ratón *KnockOut*. Ratón modificado genéticamente con la delección total o parcial de algún gen.
- **L-DOPA:** Levodopa; 3,4-dihydroxyphenylalanina.
- **LPS:** Lipopolisacáridos de la pared celular de bacterias Gram +.
- **LTP:** Potenciación a largo plazo (Long Term Potentiation).
- **MAP-quinasa:** Proteína quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein kinase).
- **MOOSE:** Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology.
- **MS:** Separación materna (Maternal Separation).

-
- **NA:** Noradrenalina.
 - **NF- κ B:** Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).
 - **OB:** Bulbectomía olfatoria (Olfactory Bulbectomy).
 - **OFS:** Estrés de campo abierto (Open Field Stress).
 - **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
 - **PRISMA:** Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses.
 - **PTSD:** Trastorno de estrés postraumático (Post Traumatic Stress Disorder).
 - **PVN:** Núcleo paraventricular del hipotálamo (Paraventricular Nucleus of Hypothalamus).
 - **QUORUM:** QQuality Of Reporting of Meta-analyses.
 - **RA:** Receptor Adrenérgico.
 - **RG:** Receptor Glucocorticoide.
 - **RM:** Receptor Mineralocorticoide.
 - **SD:** Sprague Dawley.
 - **SERT:** Transportador de serotonina (Serotonin Reuptake Transporter).
 - **STROBE:** Strengthening The Reporting of OBservational studies in Epidemiology.
 - **SyRF:** CAMARADES-NC3Rs preclinical Systematic Review & meta-analysis Facility.
 - **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante beta (Transforming Growth Factor beta)
 - **TH:** Triptófano Hidrolasa.
 - **Th1:** Linfocito T *helper* 1.
 - **Th2:** Linfocito T *helper* 2.
 - **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha).
 - **VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana.
-

I.II. Abreviaturas y siglas que aparecen en los datos de estadística

- **DEM:** Diferencia estandarizada de medias.
- **eeTE:** Error estándar del tamaño del efecto estimado de cada uno de los estudios.
- **g** (g de Hedges): Estimación de la diferencia de medias estandarizada corregida para muestras pequeñas.
- **gráf.:** Datos de medias y error estándar extrapolados de gráficos.
- **H²:** Variabilidad no explicada de la variabilidad muestral.
- **I²:** Variabilidad entre estudios no explicada por el error aleatorio.
- **IC-95%:** Intervalo de confianza del 95%.
- **IL6c:** Media de la concentración de IL-6 en animales control.
- **IL6m:** Media de la concentración de IL-6 en el modelo animal.
- **k:** Número de datos en cada subgrupo.
- **nc:** Tamaño de la muestra de animales control.
- **nm:** Tamaño de la muestra de animales con fenotipo depresivo-like.
- **num.:** Datos de medias y error estándar tomados directamente de texto o tablas.
- **p:** Valor-p de las diferencias en los subgrupos.
- **R²:** Valor que representa la heterogeneidad explicada.
- **seg:** Error estándar estimado de la g de Hedges.
- **tau²:** Valor estimado de heterogeneidad.
- **TE:** Tamaño del efecto estimado de cada uno de los estudios.

I.III. Abreviaturas y siglas que aparecen en las tablas de resultados

- " - ": Dato no especificado en el estudio.
- **Agrupación:** Número de animales por jaula.
- **Ansiolítico:** Pruebas de eficacia ansiolítica.
- **Antidepresivo:** Pruebas de eficacia antidepresiva.
- **Área:** Área de la que se ha obtenido la muestra, diferenciando entre hipocampo, hipotálamo, corteza pre-frontal, plasma o suero.

-
- **Área'**: Área de la que se ha obtenido la muestra, tomando plasma y suero como sangre.
 - **Área''**: Área de la que se ha obtenido la muestra, diferenciando entre cerebro o sangre.
 - **Área'''**: Área de la que se ha obtenido la muestra, diferenciando entre cerebro, plasma y suero.
 - **ASS'**: Síndrome de Sabda anormal. Identificación de factores desencadenantes.
 - **CD (cold-dry) + Fsh (footshock)**: Ambiente frío y seco añadiendo electrochoque en la pata.
 - **CFSS**: Estrés crónico por natación forzada (CFSS; Chronic Forced Swimming Stress).
 - **CIS**: Estrés crónico por inmovilización o restricción (CIS o CRS; Chronic Immobilization Stress o Chronic Restraint Stress).
 - **CMS**: Estrés crónico de baja intensidad (CMS o CUMS; Chronic Mild Stress o Chronic Unpredictable Mild Stress).
 - **CSS**: Estrés crónico por derrota o indefensión social (CSS o CSD; Chronic Social Stress o Chronic Social Defeat).
 - **DD**: Oscuridad permanente (DD; total Darkness).
 - **Depleción de cél. T**: Evaluación de cambios fisiológicos resultantes del agotamiento de las células T.
 - **Efecto del estrés**: Efecto del modelo de depresión sobre la cantidad de citoquinas.
 - **Entorno enriquecido**: Efecto de un ambiente enriquecido en un modelo de depresión.
 - **g** (g de Hedges): Estimación de la diferencia de medias estandarizada corregida para muestras pequeñas.
 - **IL-6**: Si la cuantificación de la variación de la concentración de IL-6 en modelos animales de depresión es un resultado primario (1) o no (2).
 - **KO de IL-10**: Investigación sobre las alteraciones producidas por la ausencia de IL-10.
 - **Modelo**: Tipo de modelo animal de depresión.
 - **Molécula**: Molécula cuantificada (Proteína o ARNm).

- **MS:** Separación materna (MS; Maternal Separation).
- **nc:** Tamaño de la muestra de animales control.
- **nm:** Tamaño de la muestra de animales con fenotipo depresivo-like.
- **Objetivo:** Propósito de la cuantificación de IL-6.
- **Pretratamiento:** Efecto de la electroacupuntura en animales con un fenotipo de tipo depresivo.
- **PTSD:** Trastorno de estrés postraumático (PTSD; Post Traumatic Stress Disorder).
- **seg:** Error estándar estimado de la g de Hedges
- **Tumor:** Caracterización de alteraciones en citoquinas en un modelo animal de depresión tras la inducción de un tumor.
- **Validar modelo:** Modelo animal de la validez de la depresión.

ANEXO II: Algoritmo de búsqueda en MEDLINE/PubMed.

#38 Search #37 AND #36

#37 Search ("animal experimentation"[MeSH Terms] OR "models, animal"[MeSH Terms] OR "invertebrates"[MeSH Terms] OR "Animals"[Mesh:noexp] OR "animal population groups"[MeSH Terms] OR "chordata"[MeSH Terms:noexp] OR "chordata, nonvertebrate"[MeSH Terms] OR "vertebrates"[MeSH Terms:noexp] OR "amphibians"[MeSH Terms] OR "birds"[MeSH Terms] OR "fishes"[MeSH Terms] OR "reptiles"[MeSH Terms] OR "mammals"[MeSH Terms:noexp] OR "primates"[MeSH Terms:noexp] OR "artiiodactyla"[MeSH Terms] OR "carnivora"[MeSH Terms] OR "cetacea"[MeSH Terms] OR "chiroptera"[MeSH Terms] OR "elephants"[MeSH Terms] OR "hyraxes"[MeSH Terms] OR "insectivora"[MeSH Terms] OR "lagomorpha"[MeSH Terms] OR "marsupialia"[MeSH Terms] OR "monotremata"[MeSH Terms] OR "perissodactyla"[MeSH Terms] OR "rodentia"[MeSH Terms] OR "scandentia"[MeSH Terms] OR "sirenia" [MeSH Terms] OR "xenarthra"[MeSH Terms] OR "haplorhini"[MeSH Terms:noexp] OR "strepsirhini"[MeSH Terms] OR "platyrrhini"[MeSH Terms] OR "tarsii"[MeSH Terms] OR "catarrhini"[MeSH Terms:noexp] OR "cercopithecidae"[MeSH Terms] OR "hylobatidae"[MeSH Terms] OR "hominidae"[MeSH Terms:noexp] OR "gorilla gorilla"[MeSH Terms] OR "pan paniscus"[MeSH Terms] OR "pan troglodytes"[MeSH Terms] OR "pongo pygmaeus"[MeSH Terms]) OR ((animals[tiab] OR animal[tiab] OR mice[Tiab] OR mus[Tiab] OR mouse[Tiab] OR murine[Tiab] OR woodmouse[tiab] OR rats[Tiab] OR rat[Tiab] OR murinae[Tiab] OR muridae[Tiab] OR cottonrat[tiab] OR cottonrats[tiab] OR hamster[tiab] OR hamsters[tiab] OR cricetinae[tiab] OR rodentia[Tiab] OR rodent[Tiab] OR rodents[Tiab] OR pigs[Tiab] OR pig[Tiab] OR swine[tiab] OR swines[tiab OR piglets[tiab] OR piglet[tiab] OR boar[tiab] OR boars[tiab] OR "sus scrofa"[tiab] OR ferrets[tiab] OR ferret[tiab] OR polecat[tiab] OR polecats[tiab] OR "mustela putorius"[tiab] OR "guinea pigs"[Tiab] OR "guinea pig"[Tiab] OR cavia[Tiab] OR callithrix[Tiab] OR marmoset[Tiab] OR marmosets[Tiab] OR cebuella[Tiab] OR hapale[Tiab] OR octodon[Tiab] OR chinchilla[Tiab] OR chinchillas[Tiab] OR gerbillinae[Tiab] OR gerbil[Tiab] OR gerbils[Tiab] OR jird[Tiab] OR jirds[Tiab] OR merione[Tiab] OR meriones[Tiab] OR rabbits[Tiab] OR rabbit[Tiab] OR hares[Tiab] OR hare[Tiab] OR diptera[Tiab] OR flies[Tiab] OR fly[Tiab] OR dipteral[Tiab] OR drosophila[Tiab] OR drosophilidae[Tiab] OR cats[Tiab] OR cat[Tiab] OR carus[Tiab] OR felis[Tiab] OR nematoda[Tiab] OR nematode[Tiab] OR nematoda[Tiab] OR nematode[Tiab] OR nematodes[Tiab] OR sipunculida[Tiab] OR dogs[Tiab] OR dog[Tiab] OR canine[Tiab] OR canines[Tiab] OR canis[Tiab] OR sheep[Tiab] OR sheeps[Tiab] OR mouflon[Tiab] OR mouflons[Tiab] OR ovis[Tiab] OR goats[Tiab] OR goat[Tiab] OR capra[Tiab] OR capras[Tiab] OR rupicapra[Tiab] OR chamois[Tiab] OR haplorhini[Tiab] OR monkey[Tiab] OR monkeys[Tiab] OR anthropoidea[Tiab] OR anthropoids[Tiab] OR saguinus[Tiab] OR tamarin[Tiab] OR tamarins[Tiab] OR leontopithecus[Tiab] OR hominidae[Tiab] OR ape[Tiab] OR apes[Tiab] OR pan[Tiab] OR paniscus[Tiab] OR "pan paniscus"[Tiab] OR bonobo[Tiab] OR bonobos[Tiab] OR troglodytes[Tiab] OR "pan troglodytes"[Tiab] OR gibbon[Tiab] OR gibbons[Tiab] OR siamang[Tiab] OR siamangs[Tiab] OR nomascus[Tiab] OR symphalangus[Tiab] OR chimpanzee[Tiab] OR chimpanzees[Tiab] OR prosimians[Tiab] OR "bush baby" [Tiab] OR prosimian[Tiab] OR bush babies[Tiab] OR galagos[Tiab] OR galago[Tiab] OR pongidae[Tiab] OR gorilla[Tiab] OR gorillas[Tiab] OR pongo[Tiab] OR pygmaeus[Tiab] OR "pongo pygmaeus"[Tiab] OR orangutans[Tiab] OR pygmaeus[Tiab] OR lemur[Tiab] OR lemurs[Tiab] OR lemuridae[Tiab] OR horse[Tiab] OR horses[Tiab] OR pongo[Tiab] OR equus[Tiab] OR cow[Tiab] OR calf[Tiab] OR bull[Tiab] OR chicken[Tiab] OR chickens[Tiab] OR gallus[Tiab] OR quail[Tiab] OR bird[Tiab] OR birds[Tiab] OR quails[Tiab] OR poultry[Tiab] OR poultries[Tiab] OR fowl[Tiab] OR fowls[Tiab] OR reptile[Tiab] OR reptilia[Tiab] OR reptiles[Tiab] OR snakes[Tiab] OR snake[Tiab]

OR lizard[Tiab] OR lizards[Tiab] OR alligator[Tiab] OR alligators[Tiab] OR crocodile[Tiab] OR crocodiles[Tiab] OR turtle[Tiab] OR turtles[Tiab] OR amphibian[Tiab] OR amphibians[Tiab] OR amphibia[Tiab] OR frog[Tiab] OR frogs[Tiab] OR bombina[Tiab] OR salientia[Tiab] OR toad[Tiab] OR toads[Tiab] OR "epidalea calamita"[Tiab] OR salamander[Tiab] OR salamanders[Tiab] OR eel[Tiab] OR eels[Tiab] OR fish[Tiab] OR fishes[Tiab] OR pisces[Tiab] OR catfish[Tiab] OR catfishes[Tiab] OR siluriformes[Tiab] OR arius[Tiab] OR heteropneustes[Tiab] OR sheatfish[Tiab] OR perch[Tiab] OR perches[Tiab] OR percidae[Tiab] OR perca[Tiab] OR trout[Tiab] OR trouts[Tiab] OR char[Tiab] OR chars[Tiab] OR salvelinus[Tiab] OR "fathead minnow"[Tiab] OR minnow[Tiab] OR cyprinidae[Tiab] OR carps[Tiab] OR carp[Tiab] OR zbrafish[Tiab] OR zbrafishes[Tiab] OR goldfish[Tiab] OR goldfishes[Tiab] OR guppy[Tiab] OR guppies[Tiab] OR chub[Tiab] OR chubs[Tiab] OR tinca[Tiab] OR barbels[Tiab] OR barbus[Tiab] OR pimephales[Tiab] OR promelas[Tiab] OR "poecilia reticulata"[Tiab] OR mullet[Tiab] OR mullets[Tiab] OR seahorse[Tiab] OR seahorses[Tiab] OR mugil curema[Tiab] OR atlantic cod[Tiab] OR shark[Tiab] OR sharks[Tiab] OR catshark[Tiab] OR anguilla[Tiab] OR salmonid[Tiab] OR salmonids[Tiab] OR whitefish[Tiab] OR whitefishes[Tiab] OR salmon[Tiab] OR salmons[Tiab] OR sole[Tiab] OR solea[Tiab] OR "sea lamprey"[Tiab] OR lamprey[Tiab] OR lampreys[Tiab] OR pumpkinseed[Tiab] OR sunfish[Tiab] OR sunfishes[Tiab] OR tilapia[Tiab] OR tilapias[Tiab] OR turbot[Tiab] OR turbot[Tiab] OR flatfish[Tiab] OR flatfishes[Tiab] OR sciuridae[Tiab] OR squirrel[Tiab] OR squirrels[Tiab] OR chipmunk[Tiab] OR chipmunks[Tiab] OR suslik[Tiab] OR susliks[Tiab] OR vole[Tiab] OR voles[Tiab] OR lemming[Tiab] OR lemmings[Tiab] OR muskrat[Tiab] OR muskrats[Tiab] OR lemmus[Tiab] OR otter[Tiab] OR otters[Tiab] OR marten[Tiab] OR martens[Tiab] OR martes[Tiab] OR weasel[Tiab] OR badger[Tiab] OR badgers[Tiab] OR ermine[Tiab] OR mink[Tiab] OR minks[Tiab] OR sable[Tiab] OR sables[Tiab] OR gulo[Tiab] OR gulos[Tiab] OR wolverine[Tiab] OR wolverines[Tiab] OR minks[Tiab] OR mustela[Tiab] OR llama[Tiab] OR llamas[Tiab] OR alpaca[Tiab] OR alpacas[Tiab] OR camelid[Tiab] OR camelids[Tiab] OR guanaco[Tiab] OR guanacos[Tiab] OR chiroptera[Tiab] OR chiropteras[Tiab] OR bat[Tiab] OR bats[Tiab] OR fox[Tiab] OR foxes[Tiab] OR iguana[Tiab] OR iguanas[Tiab] OR xenopus laevis[Tiab] OR parakeet[Tiab] OR parakeets[Tiab] OR parrot[Tiab] OR parrots[Tiab] OR donkey[Tiab] OR donkeys[Tiab] OR mule[Tiab] OR mules[Tiab] OR zebra[Tiab] OR zebras[Tiab] OR shrew[Tiab] OR shrews[Tiab] OR bison[Tiab] OR bisons[Tiab] OR buffalo[Tiab] OR buffaloes[Tiab] OR deer[Tiab] OR deers[Tiab] OR bear[Tiab] OR bears[Tiab] OR panda[Tiab] OR pandas[Tiab] OR "wild hog"[Tiab] OR "wild boar"[Tiab] OR fitchew[Tiab] OR fitch[Tiab] OR beaver[Tiab] OR beavers[Tiab] OR jerboa[Tiab] OR jerboas[Tiab] OR capybara[Tiab] OR capybaras[Tiab]) NOT medline[subset])

#36 Search #17 AND #35

#35 Search #18 OR #19 OR #20 OR #21 OR #22 OR #23 OR #24 OR #25 OR #26 OR #27 OR #28 OR #29 OR #30 OR #31 OR #32 OR #33 OR #34

#34 Search emotion*[tiab]

#33 Search "Emotions"[Mesh]

#32 Search mood[tiab]

#31 Search "Mood Disorders"[Mesh]

#30 Search affecti*[tiab]

#29 Search "Affective Symptoms"[Mesh]

#28 Search adjustment disorder*[tiab]

#27 Search "Adjustment Disorders"[Mesh]

#26 Search dysthymi*[tiab]

#25 Search "Dysthymic Disorder"[Mesh]

#24 Search anti-depress*[tiab]

#23 Search antidepress*[tiab]

#22 Search "Antidepressive Agents"[Mesh]

#21 Search depress*[tiab]

#20 Search "Depression, Chemical"[Mesh]

#19 Search "Depressive Disorder"[Mesh]
#18 Search "Depression"[Mesh]
#17 Search #1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #6 OR #7 OR #8 OR #9 OR #10 OR #11 OR
#12 OR #13 OR #14 OR #15 OR #16
#16 Search Interferon beta 2[tiab]
#15 Search B-Cell Differentiation Factor[tiab]
#14 Search CDF[tiab]
#13 Search HSF[tiab]
#12 Search IFNB2[tiab]
#11 Search HGF[tiab]
#10 Search BSF-2[tiab]
#9 Search BSF2[tiab]
#8 Search Hybridoma Growth Factor[tiab]
#7 Search CTL Differentiation Factor[tiab]
#6 Search B-Cell Stimulatory Factor 2 [tiab]
#5 Search il6[tiab]
#4 Search il 6[tiab]
#3 Search interleukin6[tiab]
#2 Search interleukin 6[tiab]
#1 Search "Interleukin-6"[Mesh]

ANEXO III: Script utilizado en RStudio para la elaboración de los análisis.

```

library(meta)
library(compute.es)

il6 <- metagen(g, seg, studlab = trial, data =IL6R, sm = "SMD", comb.fixed =
F, comb.random = T, prediction=T)

print.meta(il6)

#Forest plot IL6 efectos aleatorios
forest(il6, xlim=c(-4, 6), comb.random = T,col.square =
"lightblue",col.square.lines = "blue", col.diamond = "red", col.predict =
"green", col.diamond.lines = "darkred", col.predict.lines = "darkgreen",
col.i= "black", col.i.inside.square="white", text.predict = "Intervalo de
predicción", text.random = "Modelo efectos aleatorios", smlab="Tamaño del
efecto
(Variación de IL-6)",colgap.right = grid::unit (8, "mm"),colgap.left =
grid::unit (5, "mm"), colgap.forest.right = grid::unit(12,"mm"),
colgap.forest.left = grid::unit(6,"mm"),leftlabs = c("Estudio","TE","eeTE"),
rightlabs = c("DEM","IC-95%","Peso"), just = "center",just.studlab = "left",
fs.lr=9, text.fixed = "Modelo efectos fijos", text.I2= "I^2",
text.tau2="tau^2", hetlab = "Heterogeneidad: ")

#Forest plot IL6 efectos fijos
il6F <- metagen(g, seg, studlab = trial, data =IL6R, sm = "SMD", comb.fixed =
T, comb.random = T, prediction=T)
forest(il6F, xlim=c(-4, 6),comb.fixed = T, comb.random = T,col.square =
"lightblue",col.square.lines = "blue", col.diamond = "red", col.predict =
"green", col.diamond.lines = "darkred", col.predict.lines = "darkgreen",
col.i= "black", col.i.inside.square="white", text.predict = "Intervalo de
predicción", text.random = "Modelo efectos aleatorios", smlab="Tamaño del
efecto
(Variación de IL-6)",colgap.right = grid::unit (8, "mm"),colgap.left =
grid::unit (5, "mm"), colgap.forest.right = grid::unit(12,"mm"),
colgap.forest.left = grid::unit(6,"mm"),leftlabs = c("Estudio","TE","eeTE"),
rightlabs = c("DEM","IC-95%","Peso (fijos)","Peso (aleat.)"), just =
"center",just.studlab = "left",
fs.lr=9, text.fixed = "Modelo efectos fijos", text.I2= "I^2",
text.tau2="tau^2", hetlab = "Heterogeneidad: ")

#Enhanced funnel
cc<- funnel(il6, lwd=2, col.random = "red",col = "blue", col.fixed =
"darkgreen",bg="lightblue",xlab="Diferencia estandarizada de medias",
ylab="Error estándar", comb.fixed=TRUE,level=0.95, contour=c(0.9, 0.95,
0.99),col.contour=c("purple", "lightpink", "lightgrey"), xlim=c(-5.5, 15),
ylim = c(7.5,-0.5))
legend(-5,2.5, cex=.8,box.col=FALSE, c("0.1 > p > 0.05", "0.05 > p > 0.01", "p
< 0.01"), fill=c("purple", "lightpink", "lightgrey"), yjust=4, xjust=0)
legend(-5,2, cex=.8,box.col=FALSE, c("Efectos fijos","Efectos aleatorios"),lty
= c(2,3), lwd = c(2,2), col= c("darkgreen","red"),yjust=4, xjust=0)

```

```

title(main="Funnel plot aumentado")
#Egger's test con rma
library(metafor)
chronic <- rma(g, seg, data =IL6R)
regtest(chronic,model="rma",predictor="sei")

#Baujat plot
baujat(il6,col = "blue",bg="lightblue", xlab="Contribución a la heterogeneidad
total", ylab="Influencia en el resultado combinado", studlab = FALSE)
title(main="Baujat plot")

#Análisis de influencia
metainf(il6)
forest(metainf(il6), xlim=c(-0.5, 2), col.square =
"lightblue",col.square.lines = "blue", col.diamond = "red", col.predict =
"green", col.diamond.lines = "darkred", col.predict.lines = "darkgreen",
col.i= "black", col.i.inside.square="white",
text.predict = "Intervalo de predicción", text.random = "Modelo
efectos aleatorios", smlab="Tamaño del efecto (Variación de IL-6)",
colgap.right = grid::unit (8, "mm"),colgap.left = grid::unit (5, "mm"),
colgap.forest.right = grid::unit(15,"mm"), colgap.forest.left =
grid::unit(15,"mm"),
leftlabs = "Estudio omitido",print.I2 = TRUE, print.tau2 = TRUE,
rightlabs = c("DEM","IC-95%","tau^2","I^2"),
just = "center", just.studlab = "left")

#Meta-análisis acumulativo por fecha
metacum(il6)
forest(metacum(il6), xlim=c(-1, 2), col.square = "lightblue",col.square.lines
= "blue", col.diamond = "red", col.predict = "green", col.diamond.lines =
"darkred", col.predict.lines = "darkgreen", col.i= "black",
col.i.inside.square="white",
text.predict = "Intervalo de predicción", text.random = "Modelo
efectos aleatorios", smlab="Tamaño del efecto (Variación de IL-6)",
colgap.right = grid::unit (8, "mm"),colgap.left = grid::unit (5, "mm"),
colgap.forest.right = grid::unit(15,"mm"), colgap.forest.left =
grid::unit(1,"cm"),
leftlabs = "Estudio añadido", rightlabs = c("DEM","IC-95%"),
just = "center", just.studlab = "left")

#Trim and fill efectos aleatorios
trimfill(il6)

funnel(trimfill(il6),col = "blue",bg="lightblue",xlab="Diferencia
estandarizada de medias", ylab="Error estándar",xlim=c(-15, 15))
title(main="Funnel plot ajustado por el método de Trim and fill")

forest(trimfill(il6), xlim=c(-10, 10), col.square =
"lightblue",col.square.lines = "blue", col.diamond = "red", col.predict =
"green", col.diamond.lines = "darkred", col.predict.lines = "darkgreen",
col.i= "black", col.i.inside.square="white",
text.predict = "Intervalo de predicción", text.random = "Modelo
efectos aleatorios", smlab="Tamaño del efecto (Variación de IL-6)", hetstat =
TRUE, text.I2= "I^2", text.tau2="tau^2", hetlab = "Heterogeneidad: ",

```

```
    colgap.right = grid::unit (15, "mm"),colgap.left = grid::unit (15,
"mm"), colgap.forest.right = grid::unit(15,"mm"), colgap.forest.left =
grid::unit(15,"mm"),
    leftlabs = c("Estudio","TE","eeTE"), rightlabs = c("DEM","IC-
95%","Peso"),
    just = "center", just.studlab = "left")
```

#Trim and fill efectos fijos

```
il6F <- metagen(g, seg, studlab = trial, data =IL6R, sm = "SMD", comb.fixed =
T, comb.random = T, prediction=T)
forest(trimfill(il6), xlim=c(-10, 10),comb.fixed = T, comb.random = T,
col.square = "lightblue",col.square.lines = "blue", col.diamond = "red",
col.predict = "green", col.diamond.lines = "darkred", col.predict.lines =
"darkgreen", col.i= "black", col.i.inside.square="white",
    text.predict = "Intervalo de predicción", text.random = "Modelo
efectos aleatorios", smlab="Tamaño del efecto (Variación de IL-6)", hetstat =
TRUE, text.I2= "I^2", text.tau2="tau^2", hetlab = "Heterogeneidad: ",
    colgap.right = grid::unit (15, "mm"),colgap.left = grid::unit (15,
"mm"), colgap.forest.right = grid::unit(15,"mm"), colgap.forest.left =
grid::unit(15,"mm"),leftlabs = c("Estudio","TE","eeTE"), rightlabs =
c("DEM","IC-95%","Peso(fijos)","Peso(aleat.)"), just = "center",just.studlab =
"left")
```

##Subgrupos (análisis de subgrupos y meta-regresión)

```
year <- metagen(g, seg, studlab = trial, byvar = X2013, data =IL6R, sm =
"SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)
print.meta(year)
metareg(year)
```

```
il6molec <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = molec, data =IL6R, sm =
"SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)
print.meta(il6molec)
metareg(il6molec)
```

```
il6area <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = area, data =IL6R, sm =
"SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)
print.meta(il6area)
metareg(il6area)
```

```
il6area2 <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = area2, data =IL6R, sm =
"SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)
print.meta(il6area2)
metareg(il6area2)
```

```
il6area3 <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = area3, data =IL6R, sm =
"SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)
print.meta(il6area3)
metareg(il6area3)
```

```
il6aim2 <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = aim2, data =IL6R, sm =
"SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)
print.meta(il6aim2)
metareg(il6aim2)
```

```
il6outcome <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = outcome, data =IL6R,  
sm = "SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)  
print.meta(il6outcome)  
metareg(il6outcome)
```

```
il6model <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = model, data =IL6R, sm =  
"SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)  
print.meta(il6model)  
metareg(il6model)
```

```
il6species <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = species, data =IL6R,  
sm = "SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)  
print.meta(il6species)  
metareg(il6species)
```

```
il6strain2 <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = strain2, data =IL6R,  
sm = "SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)  
print.meta(il6strain2)  
metareg(il6strain2)
```

```
il6grouping2 <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = grouping2, data  
=IL6R, sm = "SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)  
print.meta(il6grouping2)  
metareg(il6grouping2)
```

```
il6age2 <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = age2, data =IL6R, sm =  
"SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)  
print.meta(il6age2)  
metareg(il6age2)
```

```
il6gender <- metagen(g, seg, studlab = trial, , byvar = gender, data =IL6R, sm  
= "SMD", comb.fixed = F, comb.random = T, prediction=T)  
print.meta(il6gender)  
metareg(il6gender)
```

ANEXO IV: Coordenadas en el gráfico de Baujat.

	(x)	(y)
Mormede 2002	0.32	0.01
Bartolomucci 2003a	39.74	1.99
Bartolomucci 2003b	8.27	0.41
Xia 2006	18.29	0.05
Pan 2006	5.10	0.05
Li 2008	15.92	0.26
Xiu 2010	1.42	0.02
Grundmann 2010	25.73	0.02
Tagliari 2010	10.00	0.24
Wann 2010	37.16	2.17
Tagliari 2011	9.89	0.02
Wu 2011	3.49	0.12
Monje 2011a	0.05	0.00
Monje 2011b	12.33	0.22
Farooq 2012	2.49	0.03
Kim 2012	0.03	0.00
Della 2012a	0.09	0.00
Della 2012b	66.81	0.48
McQuaid 2013a	2.68	0.06
McQuaid 2013b	2.85	0.07
Girotti 2013	2.70	0.02
Mutlu 2013	5.75	0.07
Burke 2013a	77.08	2.57
Burke 2013b	50.17	2.17
Mackos 2013	17.21	0.16
Jiang 2013a	14.23	0.26
Jiang 2013b	16.59	0.27
Peng 2013	13.56	0.19
Ablimit 2013	24.05	0.07
Wu 2013	20.86	0.29
Patki 2013a	2.08	0.01
Patki 2013b	6.88	0.01
Park 2014	17.90	0.03
Lu 2014	6.05	0.00
Guo 2014	12.76	0.13
Liu 2014a	13.14	0.09
Liu 2014b	10.88	0.08
Aga-Mizrachi 2014	54.24	0.89
Jiang 2014	24.17	0.31
Stewart 2015	3.19	0.08
Reus 2015	2.40	0.02
Zhu 2015	0.98	0.02
Guan 2015a	98.64	8.24
Guan 2015b	30.00	2.51
Mahanti 2015	51.96	1.54
Bollinger 2016	39.06	2.28
Thomas 2016	23.92	0.10
Wu 2016	5.03	0.03
Zhuang 2016a	8.96	0.05
Zhuang 2016b	11.64	0.05
Zhuang 2016c	6.09	0.04
Lu 2016a	24.17	0.09
Lu 2016b	23.45	0.10
Lu 2016c	12.61	0.00
Lu 2016d	22.95	0.05
Lu 2016e	23.62	0.05
Tao 2016a	30.35	0.04
Tao 2016b	35.93	0.20
Ramirez 2016	2.66	0.00

ANEXO V: Análisis de influencia o sensibilidad.

	DEM	IC-95%	valor-p	tau ²	I ²
Eliminando Mormede 2002	1,4068	[1,12; 1,69]	< 0,0001	1,0475	94,9%
Eliminando Bartolomucci 2003a	1,4243	[1,14; 1,71]	< 0,0001	1,0293	94,7%
Eliminando Bartolomucci 2003b	1,4193	[1,13; 1,71]	< 0,0001	1,0629	94,8%
Eliminando Xia 2006	1,3616	[1,08; 1,64]	< 0,0001	1,0048	94,8%
Eliminando Pan 2006	1,3923	[1,11; 1,68]	< 0,0001	1,0258	94,8%
Eliminando Li 2008	1,3864	[1,10; 1,67]	< 0,0001	1,0213	94,8%
Eliminando Xiu 2010	1,4009	[1,12; 1,69]	< 0,0001	1,0344	94,9%
Eliminando Grundmann 2010	1,3416	[1,06; 1,62]	< 0,0001	0,9954	94,7%
Eliminando Tagliari 2010	1,4195	[1,13; 1,71]	< 0,0001	1,0349	94,8%
Eliminando Wann 2010	1,4240	[1,14; 1,71]	< 0,0001	1,0397	94,7%
Eliminando Tagliari 2011	1,3676	[1,09; 1,65]	< 0,0001	1,0117	94,8%
Eliminando Wu 2011	1,4032	[1,12; 1,69]	< 0,0001	1,0513	94,9%
Eliminando Monje 2011a	1,4097	[1,12; 1,69]	< 0,0001	1,0478	94,9%
Eliminando Monje 2011b	1,3900	[1,11; 1,67]	< 0,0001	1,0265	94,8%
Eliminando Farooq 2012	1,3970	[1,11; 1,68]	< 0,0001	1,0292	94,9%
Eliminando Kim 2012	1,4101	[1,12; 1,70]	< 0,0001	1,0511	94,9%
Eliminando Della 2012a	1,4093	[1,12; 1,70]	< 0,0001	1,0426	94,9%
Eliminando Della 2012b	1,4484	[1,17; 1,72]	< 0,0001	0,9617	94,5%
Eliminando McQuaid 2013a	1,4017	[1,12; 1,69]	< 0,0001	1,0424	94,9%
Eliminando McQuaid 2013b	1,4014	[1,12; 1,69]	< 0,0001	1,0422	94,9%
Eliminando Girotti 2013	1,3921	[1,11; 1,68]	< 0,0001	1,0232	94,9%
Eliminando Mutlu 2013	1,3932	[1,11; 1,68]	< 0,0001	1,0278	94,8%
Eliminando Burke 2013a	1,4285	[1,15; 1,71]	< 0,0001	0,9752	94,5%
Eliminando Burke 2013b	1,4255	[1,14; 1,71]	< 0,0001	1,0121	94,6%
Eliminando Mackos 2013	1,3783	[1,10; 1,66]	< 0,0001	1,0125	94,8%
Eliminando Jiang 2013a	1,3886	[1,11; 1,67]	< 0,0001	1,0246	94,8%
Eliminando Jiang 2013b	1,3859	[1,11; 1,67]	< 0,0001	1,0207	94,8%
Eliminando Peng 2013	1,3864	[1,10; 1,67]	< 0,0001	1,0211	94,8%
Eliminando Ablimit 2013	1,3564	[1,08; 1,64]	< 0,0001	0,9994	94,8%
Eliminando Wu 2013	1,3809	[1,10; 1,66]	< 0,0001	1,0138	94,8%
Eliminando Patki 2013a	1,3915	[1,11; 1,68]	< 0,0001	1,0221	94,9%
Eliminando Patki 2013b	1,3697	[1,09; 1,65]	< 0,0001	1,0139	94,8%
Eliminando Park 2014	1,3552	[1,08; 1,64]	< 0,0001	1,0038	94,8%
Eliminando Lu 2014	1,3697	[1,09; 1,65]	< 0,0001	1,0141	94,8%
Eliminando Guo 2014	1,3831	[1,10; 1,67]	< 0,0001	1,0175	94,8%
Eliminando Liu 2014a	1,3779	[1,10; 1,66]	< 0,0001	1,0137	94,8%
Eliminando Liu 2014b	1,3817	[1,10; 1,67]	< 0,0001	1,0167	94,8%
Eliminando Aga-Mizrachi 2014	1,3651	[1,09; 1,64]	< 0,0001	0,983	94,6%
Eliminando Jiang 2014	1,3777	[1,10; 1,66]	< 0,0001	1,0095	94,8%
Eliminando Stewart 2015	1,4010	[1,12; 1,69]	< 0,0001	1,0418	94,9%
Eliminando Reus 2015	1,3943	[1,11; 1,68]	< 0,0001	1,025	94,9%
Eliminando Zhu 2015	1,4045	[1,12; 1,69]	< 0,0001	1,0441	94,9%
Eliminando Guan 2015a	1,4236	[1,14; 1,70]	< 0,0001	0,9918	94,3%
Eliminando Guan 2015b	1,4244	[1,14; 1,71]	< 0,0001	1,0697	94,7%
Eliminando Mahanti 2015	1,3762	[1,10; 1,66]	< 0,0001	0,9977	94,6%
Eliminando Bollinger 2016	1,4242	[1,14; 1,71]	< 0,0001	1,0377	94,7%
Eliminando Thomas 2016	1,3606	[1,08; 1,64]	< 0,0001	1,0006	94,8%
Eliminando Wu 2016	1,3876	[1,11; 1,67]	< 0,0001	1,0209	94,8%
Eliminando Zhuang 2016a	1,3807	[1,10; 1,66]	< 0,0001	1,0165	94,8%
Eliminando Zhuang 2016b	1,3741	[1,09; 1,66]	< 0,0001	1,0126	94,8%
Eliminando Zhuang 2016c	1,3868	[1,10; 1,67]	< 0,0001	1,0206	94,8%
Eliminando Lu 2016a	1,3585	[1,08; 1,64]	< 0,0001	0,9998	94,8%
Eliminando Lu 2016b	1,3624	[1,08; 1,64]	< 0,0001	1,0014	94,8%
Eliminando Lu 2016c	1,3607	[1,08; 1,64]	< 0,0001	1,0076	94,8%
Eliminando Lu 2016d	1,3518	[1,07; 1,63]	< 0,0001	0,9994	94,8%
Eliminando Lu 2016e	1,3518	[1,07; 1,63]	< 0,0001	0,9989	94,8%
Eliminando Tao 2016a	1,3402	[1,06; 1,62]	< 0,0001	0,9916	94,7%
Eliminando Tao 2016b	1,3559	[1,08; 1,64]	< 0,0001	0,9904	94,7%
Eliminando Ramirez 2016	1,3837	[1,10; 1,66]	< 0,0001	1,0169	94,9%
Estimación combinada	1,3881	[1,11; 1,67]	< 0,0001	1,0185	94,8%

ANEXO VI: Resultados del meta-análisis acumulativo.

Añadiendo	DEM	IC-95%	valor-p	tau ²	I ²
Mormede 2002 (k=1)	0,65	[0,2776; 1,0224]	0,0006	0	
Bartolomucci 2003a (k=2)	0,15	[-0,8234; 1,1167]	0,767	0,4622	94,3%
Bartolomucci 2003b (k=3)	0,14	[-0,3901; 0,6655]	0,6092	0,1927	89,0%
Xia 2006 (k=4)	0,63	[-0,0905; 1,3508]	0,0866	0,4644	93,1%
Pan 2006 (k=5)	0,76	[0,0831; 1,4324]	0,0277	0,5123	92,9%
Li 2008 (k=6)	0,91	[0,2311; 1,5788]	0,0085	0,6309	93,9%
Xiu 2010 (k=7)	0,89	[0,2936; 1,4807]	0,0034	0,5667	93,0%
Grundmann 2010 (k=8)	1,21	[0,5518; 1,8572]	0,0003	0,7473	93,8%
Tagliari 2010 (k=9)	1,02	[0,4425; 1,5969]	0,0005	0,6572	93,2%
Wann 2010 (k=10)	0,85	[0,3387; 1,3580]	0,0011	0,5694	93,3%
Tagliari 2011 (k=11)	0,98	[0,4686; 1,4932]	0,0002	0,6165	93,2%
Wu 2011 (k=12)	0,96	[0,4832; 1,4274]	< 0,0001	0,5739	93,1%
Monje 2011a (k=13)	0,90	[0,4658; 1,3270]	< 0,0001	0,5161	92,5%
Monje 2011b (k=14)	0,94	[0,5177; 1,3612]	< 0,0001	0,54	92,7%
Farooq 2012 (k=15)	0,94	[0,5372; 1,3437]	< 0,0001	0,529	92,4%
Kim 2012 (k=16)	0,90	[0,5234; 1,2685]	< 0,0001	0,4799	91,8%
Della 2012a (k=17)	0,86	[0,5100; 1,2089]	< 0,0001	0,4474	91,3%
Della 2012b (k=18)	0,72	[0,3373; 1,1067]	0,0002	0,592	93,0%
McQuaid 2013a (k=19)	0,73	[0,3593; 1,0923]	0,0001	0,5673	92,8%
McQuaid 2013b (k=20)	0,73	[0,3800; 1,0799]	< 0,0001	0,5445	92,6%
Girotti 2013 (k=21)	0,75	[0,4082; 1,0917]	< 0,0001	0,5426	92,3%
Mutlu 2013 (k=22)	0,77	[0,4372; 1,1032]	< 0,0001	0,5404	92,1%
Burke 2013a (k=23)	0,70	[0,3544; 1,0499]	< 0,0001	0,6297	93,3%
Burke 2013b (k=24)	0,65	[0,3057; 0,9879]	0,0002	0,6356	93,6%
Mackos 2013 (k=25)	0,70	[0,3580; 1,0408]	< 0,0001	0,666	93,8%
Jiang 2013a (k=26)	0,73	[0,3925; 1,0677]	< 0,0001	0,6802	93,9%
Jiang 2013b (k=27)	0,76	[0,4280; 1,0975]	< 0,0001	0,6973	94,0%
Peng 2013 (k=28)	0,79	[0,4603; 1,1220]	< 0,0001	0,708	94,0%
Ablimit 2013 (k=29)	0,86	[0,5291; 1,1973]	< 0,0001	0,7462	94,1%
Wu 2013 (k=30)	0,90	[0,5631; 1,2276]	< 0,0001	0,7662	94,2%
Patki 2013a (k=31)	0,90	[0,5773; 1,2311]	< 0,0001	0,763	94,0%
Patki 2013b (k=32)	0,94	[0,6145; 1,2663]	< 0,0001	0,7718	93,9%
Park 2014 (k=33)	1,00	[0,6736; 1,3286]	< 0,0001	0,7981	93,9%
Lu 2014 (k=34)	1,03	[0,7041; 1,3591]	< 0,0001	0,806	93,8%
Guo 2014 (k=35)	1,05	[0,7275; 1,3751]	< 0,0001	0,813	93,8%
Liu 2014a (k=36)	1,08	[0,7559; 1,3983]	< 0,0001	0,8241	93,8%
Liu 2014b (k=37)	1,10	[0,7781; 1,4136]	< 0,0001	0,83	93,7%
Aga-Mizrachi 2014 (k=38)	1,14	[0,8160; 1,4613]	< 0,0001	0,8877	94,1%
Jiang 2014 (k=39)	1,16	[0,8401; 1,4809]	< 0,0001	0,9014	94,2%
Stewart 2015 (k=40)	1,15	[0,8384; 1,4606]	< 0,0001	0,8711	94,0%
Reus 2015 (k=41)	1,15	[0,8413; 1,4532]	< 0,0001	0,8626	93,9%
Zhu 2015 (k=42)	1,13	[0,8356; 1,4299]	< 0,0001	0,8325	93,7%
Guan 2015a (k=43)	1,09	[0,7937; 1,3935]	< 0,0001	0,8757	94,4%
Guan 2015b (k=44)	1,06	[0,7694; 1,3455]	< 0,0001	0,8242	94,5%
Mahanti 2015 (k=45)	1,08	[0,7912; 1,3705]	< 0,0001	0,8578	94,7%
Bollinger 2016 (k=46)	1,05	[0,7624; 1,3290]	< 0,0001	0,8393	94,8%
Thomas 2016 (k=47)	1,08	[0,7999; 1,3674]	< 0,0001	0,8605	94,9%
Wu 2016 (k=48)	1,10	[0,8099; 1,3715]	< 0,0001	0,8599	94,8%
Zhuang 2016a (k=49)	1,11	[0,8264; 1,3836]	< 0,0001	0,8639	94,7%
Zhuang 2016b (k=50)	1,13	[0,8482; 1,4026]	< 0,0001	0,8716	94,7%
Zhuang 2016c (k=51)	1,13	[0,8577; 1,4067]	< 0,0001	0,8712	94,6%
Lu 2016a (k=52)	1,17	[0,8923; 1,4422]	< 0,0001	0,8916	94,7%
Lu 2016b (k=53)	1,20	[0,9224; 1,4725]	< 0,0001	0,9102	94,7%
Lu 2016c (k=54)	1,23	[0,9492; 1,5012]	< 0,0001	0,9214	94,7%
Lu 2016d (k=55)	1,26	[0,9876; 1,5409]	< 0,0001	0,9413	94,7%
Lu 2016e (k=56)	1,30	[1,0252; 1,5798]	< 0,0001	0,9615	94,7%
Tao 2016a (k=57)	1,35	[1,0725; 1,6305]	< 0,0001	0,9888	94,8%
Tao 2016b (k=58)	1,38	[1,1037; 1,6638]	< 0,0001	1,0169	94,9%
Ramirez 2016 (k=59)	1,39	[1,1080; 1,6683]	< 0,0001	1,0185	94,8%
Estimación combinada	1,3881	[1,1080; 1,6683]	< 0,0001	1,0185	94,8%

ANEXO VII: Ejemplo de tabla de riesgo de sesgos y calidad de los estudios.

A continuación se muestra un ejemplo de la valoración del riesgo de sesgos utilizando los criterios que se comentan en la discusión de este trabajo como más importantes en este tipo de estudios, en aquellos estudios que utilizan el modelo de derrota o indefensión social.

Estudio	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL
Bartolomucci 2003	sí	sí	sí	sí	sí	no	sí	-	6
Wu 2011	no	no	sí	no	sí	no	sí	sí	4
McQuaid 2013	-	no	sí	no	-	no	sí	-	2
Wu 2013	no	no	sí	no	sí	no	sí	sí	4
Patki 2013	no	no	-	no	-	no	sí	sí	2
Stewart 2015	sí	sí	no	no	sí	no	sí	sí	5
Ramirez 2016	no	no	sí	-	sí	no	sí	sí	4

- (1) Objetivo: Que no se utilice el hecho de que haya un aumento de IL-6 en el modelo como verificación de éste o su disminución como prueba del efecto antidepressivo de una sustancia.
- (2) Prioridad del Resultado: Que los datos de concentración de IL-6 sean un objetivo primario.
- (3) Agrupación: Animales estabulados individualmente pueden mostrar cierta tendencia a manifestar fenotipos *depresivo-like*, lo que puede enmascarar el efecto del modelo o alterar los controles.
- (4) Washout: Tiempo suficiente tras cualquier estrés (incluyendo tests de conducta) para observar exclusivamente efectos crónicos del modelo.
- (5) Datos de todos los animales incluidos en el estudio: Se indica el número de animales en cada grupo antes y después del experimento. En el caso en el que no se muestren los datos de todos los animales iniciales, se indica la causa.

- (6) Datos numéricos de resultados: Los datos de las medias y sus desviaciones estándar se encuentran expresados numéricamente en el texto.
- (7) Descripción del modelo: Se explica con claridad el protocolo de inducción del modelo utilizado.
- (8) Corroboración de los modelos de forma objetiva (programas para conducta): En el caso de este trabajo las mediciones de los niveles de IL-6 son objetivas, ya que se obtienen datos numéricos, pero los tests de conducta que se llevan a cabo para afirmar el fenotipo *depresivo-like* pueden medirse manualmente (por observación) o mediante programas de ordenador conectados a las cámaras de video.

Se puede observar que el rango de calidad de estos estudios se encuentra entre 2 y 6 sobre 8, de los 7 estudios, sólo dos obtienen una puntuación mayor de 4, por lo que, teniendo en cuenta estas dimensiones de riesgo de sesgos, la mayoría de los estudios para este modelo en concreto poseen una calidad baja o muy baja.