

DEPARTAMENT D'ANATOMIA I EMBRIOLOGIA
HUMANA

PAPEL DEL NUCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EN LOS
CIRCUITOS TANTO NOCICEPTIVO COMO
ANTINOCICEPTIVO DE LA RATA

M^a CARMEN BLASCO AUSINA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 27 de març de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Francisco Martínez Soriano
- Dra. Verónica Piera Lluch
- Dr. Alberto Prats Galino
- Dra. Aurora Bilbao Soto
- Dr. Luís Estañ Yago

Va ser dirigida per:

Dr. Tomás Hernández Gil de Tejada

Dr. Alfonso Amador Valverde Navarro

©Copyright: Servei de Publicacions
M^a Carmen Blasco Ausina

Dipòsit legal: V-1032-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7567-9

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

VNIVERSITAT (Ò†) DE VALÈNCIA
Facultat de Medicina i Odontologia



**PAPEL DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL
EN LOS CIRCUITOS TANTO
NOCICEPTIVO COMO ANTINOCICEPTIVO
DE LA RATA**

TESIS DOCTORAL

presentada por:

M^aCarmen Blasco Ausina

dirigida por:

Prof. Dr. Tomás Hernández Gil de Tejada

Prof. Dr. Alfonso A. Valverde Navarro

Valencia, 2008

UNIVERSIDAD DE VALENCIA
Facultad de Medicina y Odontología



**“PAPEL DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL
EN LOS CIRCUITOS TANTO
NOCICEPTIVO COMO ANTINOCICEPTIVO
DE LA RATA”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por

M^aCarmen Blasco Ausina

Dirigida por

Dr. Tomás Hernández Gil de Tejada
Dr. Alfonso Amador Valverde Navarro

2008

**“PAPEL DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL
EN LOS CIRCUITOS TANTO
NOCICEPTIVO COMO ANTINOCICEPTIVO
DE LA RATA”**

Trabajo de investigación que presenta

M^aCARMEN BLASCO AUSINA

Para optar al grado de

**Doctora
por la Universidad de Valencia.**

Dirigido por los doctores

Tomás Hernández Gil de Tejada
Profesor Titular de Universidad

y

Alfonso Amador Valverde Navarro
Profesor Titular de Universidad

Realizado en el:

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

Septiembre 2008

VALENCIA



Tomás Hernández Gil de Tejada y Alfonso Amador Valverde Navarro, Profesores Titulares de Universidad, ambos del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Valencia.

HACEMOS CONSTAR:

Que M^aCarmen Blasco Ausina ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral “Papel del Núcleo Parabraquial Lateral en los Circuitos tanto Nociceptivo como Antinociceptivo de la Rata”

Y para que así conste y surta efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia a 10 de Septiembre de 2008.

Tomás Hernández Gil de Tejada Alfonso Amador Valverde Navarro

A Alfonso
A Mireia, Irene y Alfonso

Agradecimientos

La costumbre “literaria” de expresar agradecimientos al terminar la Tesis Doctoral cobra sentido cuando el trabajo escrito ha sido finalizado. Pero la felicidad es un estado de ánimo efímero y se podrían arrojar dudas sobre la “durabilidad” del estado de gratitud que generan. No se dude del mío. La deuda que tengo con las personas que enumeraré a continuación rebasa sobradamente su relación puntual con esta tesis doctoral.

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

A los Directores de la Tesis, los Dres. Tomas Hernández Gil de Tejada, quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo, y Alfonso Amador Valverde Navarro, quien tanto me ha ayudado y me ha enseñado. Quiero agradecerles su dedicación, ya que he podido contar con ellos en todo momento para aconsejarme y apoyarme.

Al Dr. Francisco Martínez Soriano, Director del Departamento, y a la Dra. Amparo Ruiz Torner, por la ayuda, la colaboración y los ánimos prestados para la realización de este trabajo.

Al Dr. Vicent Teruel Martí y a Ana Cervera Ferri, también por su desinteresada y siempre disponible colaboración.

También expresar mi agradecimiento por su ayuda en el laboratorio al Dr. Francisco Olucha Bordonau, así como a Rocío Muñoz Izquierdo y María del Castillo Calatayud Sarthou.

Una mención especial, por su ayuda para aplicar y descifrar la estadística, al Dr. Francisco Montes Suay, del Dpto. de Estadística e Investigación Operativa de la Facultad de Ciencias Matemáticas.

ÍNDICE

01.-INTRODUCCIÓN	1
1.-Importancia del dolor	3
1.1.-Tipos de dolor	8
2.-Sustrato anatómico de la transmisión nociceptiva	10
2.1.-Receptores	11
2.2.-Fibras nerviosas	14
2.3.-Asta posterior o dorsal de la médula	15
2.4.-Vías ascendentes	18
3.-Sistema de control endógeno de la transmisión nociceptiva	21
3.1.-Sustancia gris periacueductal (PAG)	24
3.2.-La Región rostral y ventromedial del bulbo raquídeo (RVM)	28
3.3.-Núcleo parabraquial (PB)	30
4.-El proto-oncogén <i>c-fos</i>	36
4.1.-Oncogenes y proto-oncogenes	36
4.2.-Proto-oncogén <i>c-fos</i>	39
4.3.-Empleo del proto-oncogén <i>c-fos</i> como marcador celular de actividad neuronal	42
5.-Analgésia Preventiva	43
5.1.-Dolor post-quirúrgico	44
6.-El metamizol	46
6.1.-Farmacocinética	46
6.2.-Farmacodinámia	47
6.3.-Acciones farmacológicas	51
6.4.-Efectos secundarios	51
6.5.-Interacciones farmacológicas	52
6.6.-Indicaciones terapéuticas	52
7.-La Morfina	53
7.1.-Farmacocinética	53
7.2.-Farmacodinámia	55
7.3.-Acciones farmacológicas	55
7.4.-Efectos secundarios	55
7.5.-Interacciones farmacológicas	56
02.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	59
1.-Justificación	61
2.-Objetivos	65
03.-MATERIAL Y METODOS	69
1.-Animal de experimentación	71
2.-Grupos experimentales	72
3.-Anestesia y perfusión	75
4.-Obtención de los cortes	77

5.-Revelado inmunocitoquímico del proto-oncogén <i>c-fos</i>	78
6.-Montaje de cortes	79
7.-Selección de los niveles de estudio	80
8.-Protocolo para la tinción de los cortes con violeta de cresilo (tinción de Nissl)	82
9.-Protocolos para el estudio histoquímico del PB	84
9.1.- Protocolo para la detección histoquímica de la NADPH-diaforasa (NADPHd)	84
9.2.- Protocolo para la detección histoquímica de la Acetilcolinesterasa (AchE)	85
10.-Obtención de los patrones de distribución de las neuronas Fos-positivas	86
11.-Obtención de imágenes digitalizadas de las preparaciones	86
12.-Análisis estadístico de los datos	87
12.1.-Análisis global	87
12.2.-Análisis parciales	88
04.-RESULTADOS	91
1.-Consideraciones generales	91
2.-Estudio descriptivo	94
2.1.-Subdivisiones de la porción lateral del núcleo parabraquial	94
2.2.-Grupo control simulado (CS)	99
2.3.-Grupo control morfina (CM)	106
2.4.-Grupo control metamizol (CN)	114
2.5.-Grupo dolor somático (DS)	123
2.6.-Grupo dolor visceral (DV)	143
2.7.-Grupo morfina+dolor somático(MS)	154
2.8.-Grupo metamizo+dolor somático (NS)	163
2.9.-Grupo morfina +dolor visceral (MV)	172
2.10.-Grupo metamizol+dolor visceral(NV)	180
3.-Estudio estadístico	189
3.1.-Análisis global	189
3.2.-Análisis parciales	195
3.2.1.-Análisis parcial dolor: CS, DS y DV	196
3.2.2.-Análisis parcial analgesia: CS, CM y CN	200
3.2.3.-Análisis parcial analgesia+dolor somático: DS, MS y NS	204
3.2.4.-Análisis parcial analgesia+dolor visceral: DV, MV y NV	208
3.2.5.-Anexo I: Análisis parcial dolor	212
3.2.6.-Anexo II: Análisis parcial analgesia	214
3.2.7.-Anexo III: Análisis parcial analgesia+dolor somático superficial	214
3.2.8.-Anexo III: Análisis parcial analgesia+dolor visceral	215
0.5.-DISCUSIÓN	217
1.-Consideraciones metodológicas	219
2.-Expresión basal de <i>c-fos</i> en la porción lateral de PB	222

3.-Respecto al papel de la porción lateral del PB en el circuito nociceptivo	225
4.-Respecto al papel de la porción lateral de PB en el circuito antinociceptivo	235
5.-Respecto al papel de la porción lateral del PB en el mecanismo de acción del metamizol	241
6.- Respecto al papel de la porción lateral del PB en el mecanismo de acción de la morfina	245
06.-CONCLUSIONES	249
07.-BIBLIOGRAFÍA	253

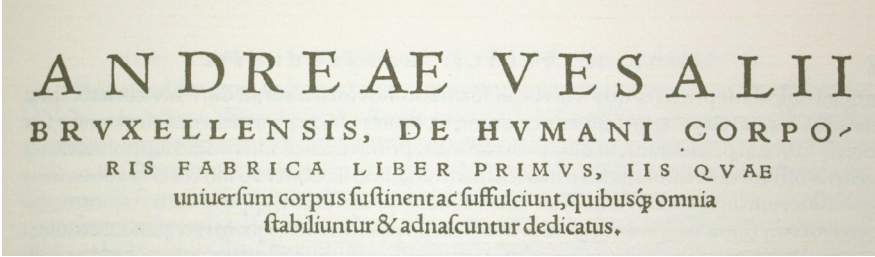


ANDREAE VESALII
BRUXELLENSIS, SCHOLAE
medicorum Patavinæ professoris, de
Humani corporis fabrica
Libri septem.

CUM CAESAREAE
Majest. Galliarum Regis, ac Senatus Veneti gratia
et privilegio, ut in diplomatis eorundem continetur.

B A S I L E A E .

01 INTRODUCCIÓN



ANDREAE VESALII
BRUXELLENSIS, DE HUMANI CORPO-
RIS FABRICA LIBER PRIMVS, IIS QVAE
uniuersum corpus sustinent ac suffulciunt, quibusq̄ omnia
stabiliantur & adhaerentur dedicatus.

1.-IMPORTANCIA DEL DOLOR



lo largo de la historia de la humanidad, no encontramos ninguna época en la que el hombre no se haya enfrentado al problema del dolor, intentando darle una explicación y, sobretodo, aliviarlo.

El tratamiento del dolor se ha visto influenciado, inevitablemente, por el pensamiento filosófico y científico de cada época. En la Grecia clásica, Aristóteles definió el dolor como "pasión del alma". La medicina aristotélica veía al hombre como un "Único Complejo", y sugería como remedio terapéutico, por falta de conocimientos anátomo-fisiológicos, la curación global de la "Entidad Hombre", más que el estudio analítico del órgano o aparato por separado. Del mismo modo, Platón en el s. IV a. de C. planteó que era un error muy difundido entre los seres humanos aquél de querer iniciar la curación del cuerpo y del espíritu de forma separada. Este concepto estuvo en auge hasta la gran revolución cultural del renacimiento, durante la cual se instauró la racionalización de la interpretación según el método de Descartes. De ella deriva directamente

la medicina moderna, mecanicista y rica en estudios experimentales, en la cual cobra importancia ya no el órgano individual, sino los procesos biológicos, pudiendo actualmente operar sobre ellos incluso a nivel molecular.

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), definió el dolor como “*una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a una lesión real o potencial de algún tejido, o descrita en función de dicho daño*”.

El dolor es un fenómeno que posee **cuatro componentes**:

- a) *sensoriales y discriminativos*, gracias a los mecanismos neurofisiológicos de percepción del dolor;
- b) *afectivos*, que unen la emoción a la percepción sensorial;
- c) *cognitivos*, que elaboran la comprensión de la experiencia dolorosa en sí;
- d) *comportamentales*, que se manifiestan por los gestos y las actitudes frente al dolor.

El dolor, además de tener una dimensión individual tiene una importante **repercusión social y económica**, olvidada en ocasiones por la opinión pública pero que, sin embargo, genera elevados costes tanto directos (gastos por asistencia sanitaria, por compensación económica por enfermedad, incapacidades, etc.) como indirectos (por falta de ganancias para el trabajador autónomo, por daño económico por incapacidad en el trabajo del hogar, por falta de ganancias del estado por la disminución o cese de la actividad en el trabajo, etc.), siendo estos últimos el doble de los directos.

En las sociedades occidentales la demanda de medicamentos o técnicas antiálgicas no ha dejado de incrementarse. Se han producido

algunos avances en la terapia del dolor pero la lista de medicamentos analgésicos, tanto mayores como menores, no han experimentado ninguna modificación relevante desde hace muchos años.

La atención al dolor de los enfermos paliativos ha mejorado mucho y los médicos de atención primaria dedican cada vez más esfuerzos a que sus pacientes terminales no sufran dolor.

Los pacientes acuden a nuestras consultas presentando dolor por muy diversas causas: dolor post-operatorio, oncológico, neuropático, post-traumático, músculo-esquelético, visceral, dental, cefaleas, psíquico, etc. Los pacientes con algias crónicas y terminales son remitidos a su domicilio donde son seguidos por su médico de cabecera.

Las consultas de los médicos de familia están llenas de pacientes con diversas enfermedades cuyo único síntoma es el dolor y el reto planteado a la medicina de atención primaria es encontrarles solución.

Más de la mitad de la población Española (el 54,9%) ha padecido algún tipo de dolor reumático, traumatológico, otorrinolaringológico, dental o menstrual en los últimos meses. Este porcentaje se eleva al 61,5% si incluimos las cefaleas y otros tipos de dolores (oncológicos, postoperatorios, terminales, etc.). La prevalencia del dolor es significativamente más alta en las mujeres y en las edades avanzadas (Rabasa Asenjo, 1998).

El 80% de las personas que padecen algún tipo de dolor toman medicación, y la mayoría de las prescripciones de analgésicos se realizan en Atención Primaria (72% aproximadamente) (Aliaga, 1996).

El dolor crónico y dentro de éste, el dolor articular tiene gran relevancia social. Según Baños y Bosch (1994), en 1990 la prevalencia de

raquialgias fue del 23% y de artralgias del 14% de todos aquellos pacientes con dolor. La localización preferente fue en las extremidades (31%), espalda (25%) y cabeza (15%). Todas estas circunstancias conllevan un aumento de las consultas de Atención Primaria en busca de remedios inmediatos que mitiguen el dolor, así como un elevado número de bajas laborales e incapacidades. Sin embargo, no todos los tipos de dolor generan una visita médica; así las personas con dolores de tipo traumatológico (60%) y reumático (59%) son las que más acuden al médico, mientras que el dolor menstrual tan sólo lo hace en un 24% de las ocasiones.

Desde un punto de vista personal es muy importante la interferencia en la vida familiar, social y laboral que generan los dolores crónicos así como sus repercusiones psicológicas en los que sufren dolor. En nuestro país, el dolor reumático y el traumatológico son los más invalidantes, siendo los menos invalidantes los dolores dentales. El tipo de dolor que más requiere guardar cama (hasta en un 26% de los casos) es el producido por infecciones, mientras que los que más absentismo laboral generan son los dolores originados por traumatismos.

En 1980 Bonica revisó la incidencia y características de las enfermedades en las cuales el dolor severo es el síntoma predominante. Si combinamos estos hallazgos con los obtenidos por el Instituto Nacional de Salud (EE.UU.), se concluye que una tercera parte de los americanos presentaron en 1980 dolor que requirió terapéutica farmacológica. De hecho, más de 50 millones de personas en Estados Unidos sufrieron incapacidad parcial o total por este motivo con períodos que oscilaron entre días, semanas o meses. Se calcula que el coste social por estos conceptos fue en 1983 de 90 millones de dólares (Chapman y Bonica, 1983).

La Bristol-Myers Company financió un estudio, que se publicó como “Nuprin Pain Report” en 1985 y estos fueron los tipos de dolor que sufrieron los americanos 1 ó más días al año: cefaleas (73%), lumbalgias (56%), dolores musculares (53%), dolores articulares (51%), dolor de estómago (46%), dolores pre o menstruales (40%), dolor dental (27%), otros (6%).

En el estudio realizado en 1985 por Esternbach sobre la prevalencia y el coste del dolor en EE.UU. se calculó que los gastos originados por esta causa suponían un 2,8% del PIB. En otros trabajos se acepta como cifra adecuada para valorar el coste del dolor en los países industrializados el 2,2% del PIB (Vidal, 1987).

La incidencia y duración del dolor agudo son difíciles de establecer. Múltiples revisiones y observaciones clínicas indican que en un solo año un 40% de la población mundial experimenta dolor severo en un período de tiempo que oscila entre horas o varias semanas (Benedetti y Chapman, 1990).

Resumiendo, desde el punto de vista epidemiológico, dos de cada tres personas que acuden al médico es por dolor; un tercio de la población de países industrializados padece dolor; en el mundo occidental 50.000.000 de visitas médicas son por dolor de espalda y 25.000.000 por cefaleas; y el 60 a 80% de pacientes oncológicos avanzados presentan dolor (Romero, 1992). Asimismo, desde el punto de vista económico, en España, el coste en productividad se calculó (utilizando datos de 1980) en un 2,5% del PIB, lo que podría representar unos 4.560 millones de euros (760.000 millones de pesetas) al año, destacando el dato de que los días perdidos por baja laboral a causa del dolor son más que por huelgas y, sin embargo, no llama tanto la atención (Vidal, 1987).

Para concluir y como muestra de la repercusión socio-económica del

dolor en nuestro país, en el Libro Blanco sobre el Dolor, publicado en 1998, con el objeto de conocer y describir la situación actual del dolor en la practica diaria del médico en Atención Primaria se destacaban como conclusiones:

- El alto porcentaje de personas con dolor en los dos últimos meses: era del 55% de los entrevistados.
- El 80% de los entrevistados que padecían dolor tomaban medicinas, siendo sólo el 56% prescritas por el médico.
- Había un 43% de automedicación, 41% de incumplimiento terapéutico y otro 41% de abandono del tratamiento.
- Los encuestados se manifestaban altamente afectados en su calidad de vida por el dolor, sobre todo las mujeres.

1.1.-Tipos de Dolor.

Existen multitud de clasificaciones del dolor según el criterio utilizado para tal fin. El dolor puede ser **agudo** (menos de 6 meses de evolución) o **crónico** (más de 6 meses evolución). Este último presenta un manejo dificultoso, ya que, su origen no sólo es orgánico sino que esta influenciado en muchas ocasiones por factores psicológicos que hacen que su abordaje no sólo se trate con analgésicos, sino que también tengamos que utilizar fármacos psicotropos así como ayuda psicológica.

Nosotros, sin embargo, queremos destacar aquélla que emplea como criterio de clasificación del dolor el origen o procedencia de la información nociceptiva, es decir, la localización anatómica de los nociceptores activados, lo cual nos permite hablar de tres tipos de dolor (Montrone *y cols.*, 1992):

1) **El dolor somático superficial o cutáneo:** es la sensación dolorosa advertida a nivel de la piel. Puede ser provocado por estímulos

térmicos, mecánicos, eléctricos o químicos. Es un dolor de localización muy precisa. Cuando el estímulo tiene una duración corta, la sensación que se percibe suele ser punzante, mientras que, si la estimulación es larga, determina una sensación sorda, urente, independientemente de la causa etiológica.

2) **El dolor somático profundo:** tiene su origen a nivel de estructuras del sistema músculo-esquelético, como son los tendones, ligamentos, articulaciones y periostio. Este tipo de dolor, más difuso y peor localizado que el dolor somático superficial o cutáneo, es de características intermedias entre el dolor somático superficial y el dolor visceral, siendo más sordo e indefinido cuanto más profunda se halla la estructura anatómica afectada, y de características más próximas al dolor somático cutáneo cuanto más superficial se encuentre.

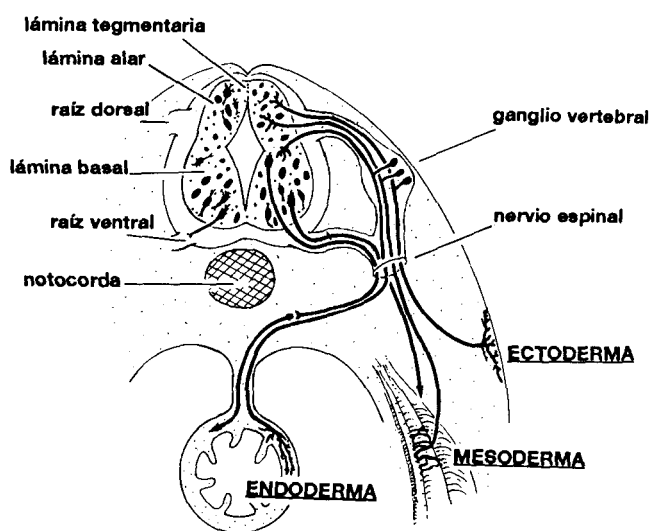


Fig. 1.1.- Esquema de un embrión de 5 semanas en el que se muestra la distinta procedencia de las estructuras inervadas por las fibras sensitivas encargadas de recoger el dolor somático superficial (ectodérmica), el dolor somático profundo (mesodérmica) y el dolor visceral (endodérmica). Tomado de Montrone y cols. (1992).

3) **El dolor visceral:** se origina en las vísceras y órganos internos cuando éstos son irritados. Es el dolor de localización más vaga e indeterminada de los tres. Se describe, por tanto, como profundo, mal localizado, no bien definido, que suele irradiarse y acompañarse de reflejos

autónomos (sudoración, variación de la presión arterial y la frecuencia cardiaca, náuseas...). Es típicamente mordiente o cólico cuando se debe a la obstrucción de una víscera hueca y sordo, agudo o pulsátil cuando se debe a la afectación de las cápsulas de los órganos o del mesenterio. Aparece como producto de la compresión, falta de riego vascular o el estiramiento de estructuras viscerales.

2.-Sustrato Anatómico de la Transmisión

Nociceptiva.



ualquier tipo de sensibilidad requiere unos receptores que capten los estímulos originales, unas fibras nerviosas que trasladen la señal recibida en forma de impulso nervioso hasta la médula, y unas vías ascendentes que conduzcan esta información hasta centros supraespinales y desde éstos hasta la corteza cerebral, donde la sensación dolorosa se hará consciente y, en consecuencia, será integrada como tal.

Esta sistematización nos lleva a considerar, en primer lugar, los receptores sensoriales, para luego describir las fibras nerviosas aferentes primarias, la organización del asta posterior de la médula, los fascículos ascendentes y, por último, los centros nerviosos superiores.

Los datos aportados han sido obtenidos por diversos autores en diferentes especies de mamíferos tales como la rata, el gato o el mono, coincidiendo prácticamente con los resultados observados en el hombre. De este modo, y aunque con las reservas evidentes, vamos a considerar los datos siguientes como representativos de la organización anatómica de la transmisión nociceptiva de los mamíferos.

2.1.- Receptores.

Básicamente existen cinco tipos de **receptores sensoriales** (Muriel y Madrid, 1993): los *termorreceptores*, capaces de reconocer cambios de temperatura; los *mecanorreceptores*, capaces de responder ante deformaciones mecánicas del receptor; los *quimiorreceptores*, encargados de reconocer las sensaciones gustativas y olfatorias, así como los niveles de oxígeno o dióxido de carbono en la sangre; los *receptores electromagnéticos*, capaces de responder a la luz que llega a la retina; y los *nociceptores*, capaces de reconocer el daño tisular, ya sea por una lesión física o química. Cada tipo de receptor es sumamente sensible a un tipo de estímulo específico, a la vez que prácticamente insensible al resto de estímulos. Por ejemplo, los receptores nociceptivos de la piel casi nunca se estimulan con el tacto o la presión habituales, pero sí se activan cuando los estímulos táctiles se vuelven lo bastante intensos como para lesionar los tejidos. Otra característica especial de todos los receptores sensoriales es que, después de cierto tiempo, se adaptan parcial o totalmente a los estímulos. Los receptores de adaptación parcial o receptores tónicos son aquellos que se adaptan poco o se adaptan muy lentamente al estímulo. Dentro de esta categoría estarían incluidos los nociceptores.

Los **nociceptores** o receptores encargados de recoger la información de naturaleza dolorosa, fueron definidos por Sherrington (1906) como aquellos receptores sensoriales capaces de informar sobre la existencia de un daño o sobre la amenaza de que éste se fuera a producir. Son, del mismo modo que los termorreceptores, *terminaciones nerviosas libres* que no parecen tener una estructura de receptor específico como en el caso de otros tipos de receptores (Besson y Chaouch, 1987; Montrone *y cols.*, 1992; Adams y Victor, 1992; Muriel y Madrid, 1993; Willis *y cols.*, 1995).

<i>Categoría</i>	<i>Nombre</i>	<i>Función</i>
Mecanorreceptores	Corpúsculos de Meissner	Táctil (piel sin pelo)
	Receptores foliculopilosos	Táctil (piel con pelo)
	Receptores de Merkel	Presión
	Corpúsculos de Pacini	Vibración
	Husos musculares	Posición y movimiento de las extremidades (cinestesia)
Nociceptores	A-delta mecánicos (terminaciones nerviosas libres)	Dolor a un pinchazo
	C-polimodales (terminaciones nerviosas libres)	Lesión tisular
Termorreceptores	Corpúsculos de Ruffini	Calor
	Corpúsculos de Krause	Frío

Tabla 1.1.- Clasificación de los receptores somatosensoriales.

Estas terminaciones corresponden a fibras nerviosas de *tipo A δ* , escasamente mielinizadas, o de *tipo C*, amielínicas. Ambos tipos de nociceptores se han encontrado en las capas superficiales de la piel (encargados de recoger el dolor somático superficial), en músculos, periostio y superficies articulares (donde recogerían el dolor somático profundo) y en diferentes estructuras anatómicas como la hoz y tienda del cerebelo, corazón, pleura, cavidad abdominal, vesícula biliar y testículos (origen del dolor visceral) (Muriel y Madrid, 1993).

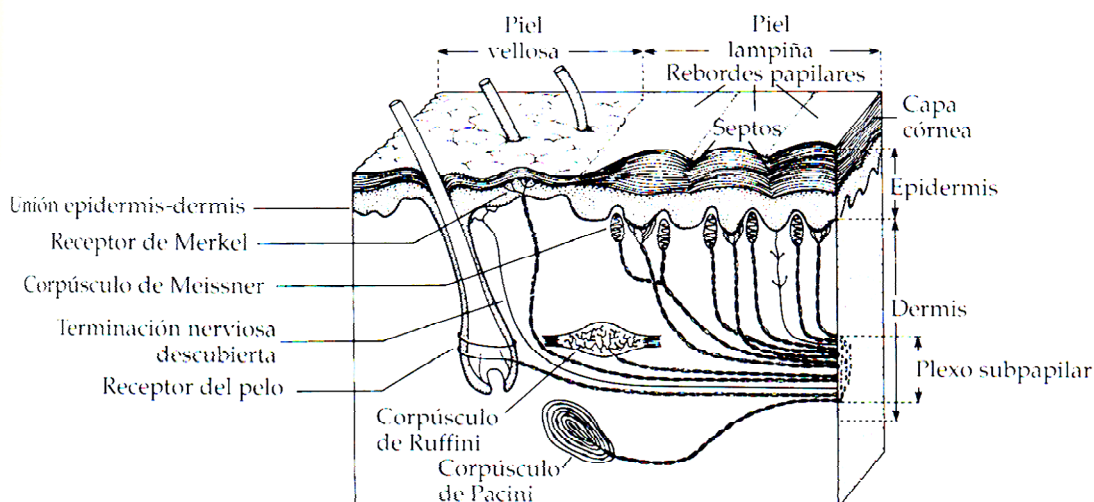


Fig. 1.2.- La morfología de los receptores sensoriales somáticos periféricos en la piel pilosa (izquierda) y en la piel sin pelos o lampiña (derecha). Adaptado de Light y Perl, 1984.

El mecanismo por el cual se estimulan las terminaciones nerviosas libres nociceptoras no se conoce con exactitud, pero parece ser que varía según el tejido afectado. Mientras que los estímulos dolorosos que suelen actuar sobre la piel son, generalmente, pinchazos, cortes, pellizcos, aplastamientos, quemaduras o congelaciones, en el tracto gastrointestinal el estímulo algésico suele ser de tipo inflamatorio o por distensión o espasmo de la musculatura lisa. En la musculatura estriada (esquelética o cardíaca) son la isquemia o la contracción prolongada las causantes del estímulo doloroso, mientras que en las articulaciones lo son la inflamación o las inyecciones salinas hipertónicas (Besson y Chaouch, 1987; Muriel y Madrid, 1993). Por todo ello, actualmente se tiende a aceptar la existencia de tres tipos de nociceptores, según la naturaleza del estímulo algésico (Muriel y Madrid, 1993): los *mecanonociceptores de alto umbral*, activados preferentemente por pellizcos o pinchazos; los *nociceptores térmicos*, que responden ante temperaturas que podrían resultar lesivas; y los *nociceptores polimodales*, capaces de responder a la presión, la temperatura, estímulos químicos, etc...

En circunstancias normales estos receptores están inactivos, pero si la cantidad de energía que perciben es lo suficientemente intensa se despolarizan y transmiten la sensación de dolor (Muriel y Madrid, 1993).

2.2.- Fibras Nerviosas.

Como ya hemos señalado anteriormente, el estímulo originado en los nociceptores, se transmite hasta la médula a través de dos tipos de fibras nerviosas: las *fibras A δ* , escasamente mielinizadas, de entre 2-5 μm de diámetro y una velocidad de conducción de 12-30 m/s; y las *fibras C*, amielínicas, con un diámetro que varía entre las 0,2-1,4 μm y una velocidad de conducción de 0,5-2 m/s (Besson y Chaouch, 1987; Montrone *y cols.*, 1992; Adams y Victor, 1992; Muriel y Madrid, 1993).

Clase numérica	Mielinizadas	Diámetro (μm)	Velocidad conducción (m/seg)	Clase de letra	Tipos de sensibilidades
I	Sí	12-20	75-120	A	Posición y movimiento de las extremidades
II	Sí	6-12	30-75	A	Táctil, presión, vibración
III	Sí	1-6	2-30	A	Dolor rápido, frío
IV	No	<1,5	0,5-2	C	Dolor lento, calor

Tabla 1.2.- Clasificación de la Fibras nerviosas somatosensoriales.

Estas fibras nerviosas son axones cuyo soma neuronal se encuentra localizado en el ganglio raquídeo. Forman parte de los nervios periféricos e ingresan en el interior de la médula espinal por las raíces posteriores.

No obstante, hemos de señalar que el 30% de las fibras amielínicas que acceden a la médula por las raíces anteriores o ventrales son aferencias nociceptivas, las cuales acabarán, de igual modo, alcanzando el asta posterior de la médula (Muriel y Madrid, 1993).

2.3.- Asta Posterior o Dorsal de la Médula.

La sustancia gris medular está formada por una gran cantidad de elementos celulares agrupados en una serie de núcleos o láminas, más o menos superponibles, según la clasificación clásica o la de Rexed, respectivamente.

<i>Región</i>	<i>Láminas de Rexed</i>	<i>Núcleos</i>
Asta dorsal	1	Zona marginal
Asta dorsal	2	Sustancia gelatinosa
Asta dorsal	3,4	Núcleo propio o en cabeza
Asta dorsal	5,6	Núcleos de Clarke y de Bechterew
Zona intermedia	7	Núcleos intermediomedial e intermediolateral
Asta ventral	8,9	Núcleos motores
Zona periependimaria	10	Núcleo periependimario

Tabla 1.3.- Núcleos y láminas de la médula espinal.

Las fibras que conducen la información nociceptiva al entrar en la médula forman parte del fascículo o tracto de Lissauer (Besson y Chaouch, 1987; Adams y Victor, 1992; Muriel y Madrid, 1993). En este punto se dividen en una rama ascendente y otra descendente que, tras recorrer varios segmentos medulares en ambos sentidos, penetran siempre en el interior del asta posterior medular.

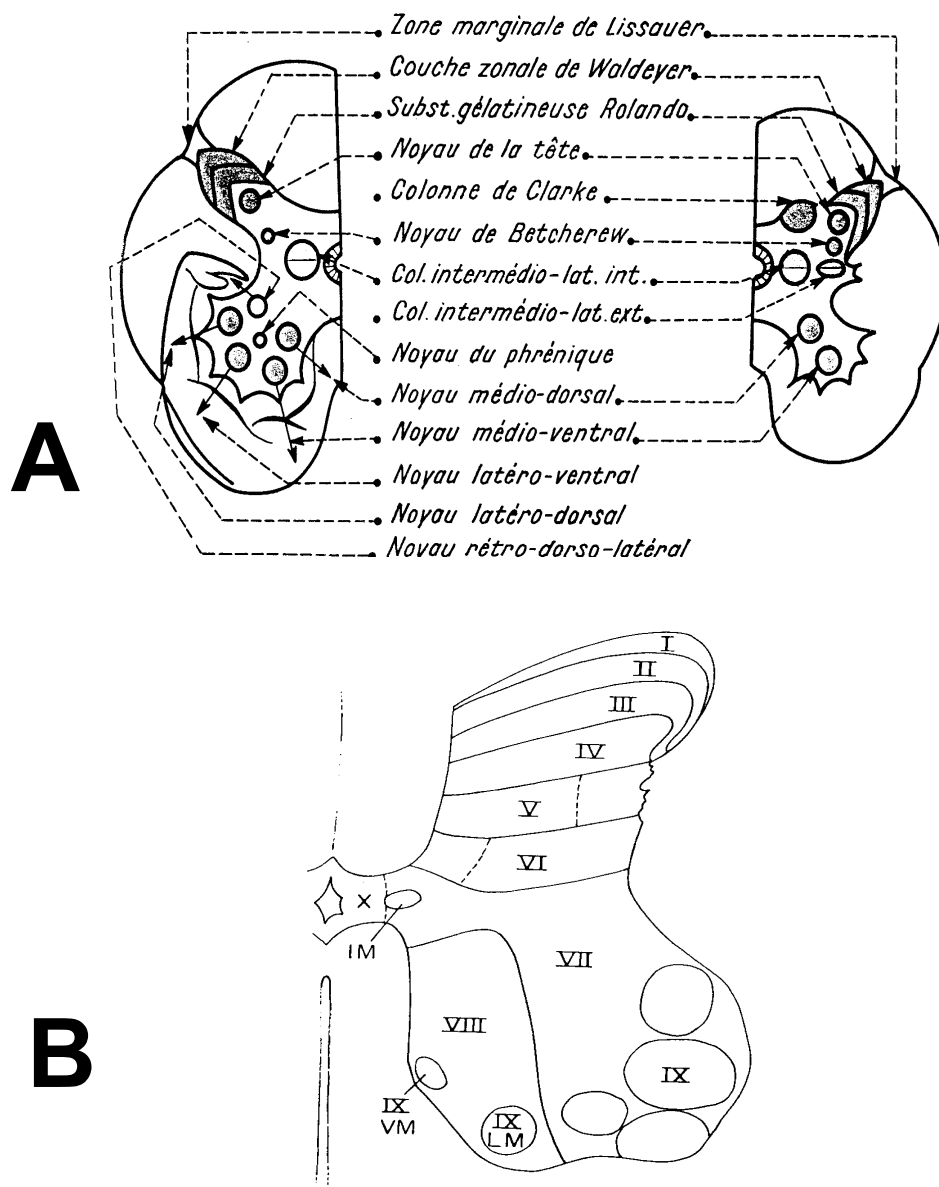


Fig. 1.3.- (A) Esquema de una sección transversal de la médula espinal a nivel lumbar en el que se hallan representados los distintos núcleos identificados a ese nivel. Tomado de Bourret y Louis (1971). **(B)** Esquema de una sección de la médula espinal en el que se hallan representadas las diferentes láminas según la clasificación de Rexed (1954). Tomado de Adams y Victor (1992).

Las fibras conductoras del dolor somático superficial, procedentes de la piel, van a hacer sinapsis con neuronas de la lámina I y parte externa de la lámina II (Ilo), mientras que las conductoras de dolor somático

profundo, procedentes de músculos, articulaciones y periostio, van a contactar con células de las láminas I y V. Finalmente, las fibras visceronociceptivas, procedentes de los órganos internos, van a terminar en el espesor de las láminas I, V y X (Besson y Chaouch, 1987).

Plate 117 L5



Fig 1.4. Microfotografía (4x) correspondiente a una sección horizontal de la médula espinal de rata a nivel del mielómero L5 (tomada de Paxinos y Watson, 1986).

Las neuronas de la *lámina I* son, en su mayor parte, grandes y constituyen el principal punto de origen de los axones que forman el haz espinotalámico lateral. La sustancia gelatinosa de Rolando o *lámina II* puede ser dividida en dos partes: la *lámina Ili*, que recibe información de tipo no dolorosa, y la *lámina Ilo*, que recibe información de naturaleza nociceptiva. En la *lámina Ilo* encontramos dos tipos de neuronas, descritas en 1909 por Cajal, las células en tallo (stalk cells) y las células isletas (islets cells) (Gobel, 1978). Estas células reciben aferencias primarias

nociceptivas y envían proyecciones, principalmente, a las neuronas de la lámina I (Price *y cols.*, 1979). En relación al primer tipo se sugiere que son interneuronas excitadoras de las neuronas de proyección nociceptoras, mientras que el segundo tipo serían inhibitoras. La *lámina V* contiene grandes neuronas denominadas de amplio margen dinámico o WDR debido a que responden a una gran variedad de estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Algunas de ellas reciben estímulos nociceptivos de origen visceral, transmitidos por fibras A δ y C. Junto con las de la lámina I, las neuronas de la lámina V constituyen el grupo celular más importante en la transmisión ascendente de la información nociceptiva hacia centros supraespinales. Señalar, por último, que las células de la *lámina X* de Rexed, correspondiente al centro desfleado viscerosensible, reciben la información nociceptiva de origen visceral (Molander y Grant, 1995).

2.4.- Vías Ascendentes.

La transmisión de la información nociceptiva y la modificación afectivo-emocional que pueda experimentar en su recorrido ascendente, requieren unas vías de conducción que pongan en contacto los lugares de origen del impulso nervioso nociceptivo con determinados centros superiores. Estas vías son, fundamentalmente, el haz espinotalámico lateral, incorporado actualmente dentro del sistema anterolateral (SAL) y el haz espinoreticular, aunque intervienen también en la transmisión nociceptiva los haces espinomesencefálico y espinocervical (Besson y Chaouch, 1987; Montrone *y cols.*, 1992; Adams y Victor, 1992; Muriel y Madrid, 1993; Willis *y cols.*, 1995).

Las neuronas nociceptivas cuyos axones contribuyen a formar el *haz espinotalámico lateral* tiene su ubicación, principalmente, en las láminas I y V medulares, junto con la lámina X (Besson y Chaouch, 1987). Desde aquí, las fibras cruzan por la comisura gris anterior de la médula, en una

decusación que tiene lugar a través de varios segmentos medulares, y alcanzan el cordón lateral de la hemimédula opuesta, en una posición ventral con relación al haz piramidal cruzado. En este momento las fibras se acodan en ángulo recto para hacerse ascendentes, recorriendo la médula, el bulbo, la protuberancia y el pedúnculo cerebral, formando parte del sistema anterolateral (SAL), hasta el tálamo donde hacen relevo en la neurona tálamo-cortical nociceptiva, situada en el *núcleo ventral posterolateral del tálamo* y los *núcleos talámicos intralaminares* (Besson y Chaouch, 1987; Muriel y Madrid, 1993; Willis *y cols.*, 1995).

Del mismo modo, las fibras algésicas del *haz espinorreticular* se dirigen hacia diversos núcleos reticulares bulbo-pontinos tales como, el *núcleo gigantocelular*, el *paragigantocelular* y los *núcleos reticulares oral y caudal del puente* (Besson y Chaouch, 1987; Muriel y Madrid, 1993; Willis *y cols.*, 1995). Parte de las fibras dolorosas de este haz continúan hasta el mesencéfalo, concretamente, hasta la *sustancia gris periacueductal*, el *núcleo cuneiforme* y las *capas profundas del colículo superior* (Besson y Chaouch, 1987; Muriel y Madrid, 1993; Willis *y cols.*, 1995), así como al *núcleo parabraquial* y *área pretectal anterior* (Willis *y cols.*, 1995). La importancia de estas proyecciones mesencefálicas ha hecho que algunos autores las hayan considerado como un haz independiente del espinorreticular, denominándolo *haz espinomesencefálico* o *espinotectal*. En cualquier caso, la información algésica asciende desde el tronco de encéfalo hasta los *núcleos talámicos intralaminares*. Así mismo, las fibras de estos haces van a ser, gracias a las conexiones que establecen con el *cuerpo amigdalino*, esenciales en el componente afectivo-emocional del dolor (Willis *y cols.*, 1995).

Por último, se ha descrito, también, un *haz espinocervical* (Besson y Chaouch, 1987; Muriel y Madrid, 1993; Willis *y cols.*, 1995), cuyo origen y destino permanecen aún oscuros en el ser humano, pero cuyo estudio en

otros mamíferos, incluidos los primates, ha aportado suficientes datos para no cuestionar su participación en la conducción ascendente del impulso nervioso nocivo. En los animales estudiados, las neuronas de origen se situarían, principalmente, en la lámina IV (Besson y Chaouch, 1987) y V (Willis *y cols.*, 1995), dirigiendo sus axones ipsilateralmente por el cordón lateral de la médula hasta el *núcleo cervical lateral*, localizado a nivel del cordón lateral de los dos primeros mielómeros cervicales. Tras hacer sinapsis a este nivel, las fibras se cruzan y ascienden formando parte del lemnisco medial hasta el *núcleo ventral posterolateral* del tálamo contralateral (Besson y Chaouch, 1987).

Desde los núcleos talámicos analíticos nociceptivos (ventral posterolateral e intralaminares) la información va a seguir su camino ascendente, dirigiéndose hacia los núcleos talámicos asociativos (principalmente al *núcleo dorsomedial*) y hacia la *corteza somatosensorial analítica* situada en la circunvolución parietal ascendente o región postrolándica o áreas SmI (Muriel y Madrid, 1993; Willis *y cols.*, 1995) y SmII (Muriel y Madrid, 1993). Parte de la información nociceptiva, en concreto la vísceronociceptiva, va a llegar también a las neuronas de la corteza de la ínsula de Reil (Muriel y Madrid, 1993).

De igual modo, la información dolorosa también va a alcanzar una serie de áreas y centros que se van a encargar de situar al impulso nociceptivo dentro de un contexto y de dotarlo de un significado más amplio que el meramente sensorial. La información algésica alcanzará el *lóbulo frontal* para que sea registrada la experiencia en nuestra memoria (Muriel y Madrid, 1993), la *amígdala* para dotarla de un significado emocional (Muriel y Madrid, 1993; Willis *y cols.*, 1995) y el hipotálamo para desencadenar las respuestas vegetativas correspondientes (Muriel y Madrid, 1993).

Habría que subrayar una vez más que todos los datos precedentes derivan de estudios realizados en animales. En el hombre, la información sobre esta vía deriva de material de estudio postmortem y, fundamentalmente, del examen de pacientes sometidos a cordotomía anterolateral como tratamiento del dolor.

3.- Sistema de Control Endógeno de la Transmisión Nociceptiva.



El avance más importante producido en los últimos años para la comprensión del dolor ha sido el descubrimiento de un sistema neuronal endógeno de analgesia que puede ser activado por la administración bien de opiáceos o bien de sustancias naturales que existen en el sistema nervioso central con las propiedades farmacológicas de los opiáceos.

Los primeros autores que sugirieron la existencia de un mecanismo de control de la información nociceptiva aferente a la médula espinal fueron Melzack y Wall (1965). Estos autores propusieron la teoría de la puerta de control para el dolor. La esencia de esta teoría es que un estímulo (aplicado, por ejemplo, a la piel) activa a las fibras tanto de diámetro grande ($A\beta$, mielínicas, no nociceptivas) como a fibras finas ($A\delta$ y C, escasamente mielínicas o amielínicas, nociceptivas). Las fibras de mayor diámetro excitarían a unas interneuronas inhibitoras (células I) situadas en el asta posterior medular, las cuales provocarían una inhibición presináptica de las neuronas de transmisión secundarias (células T o neuronas espinotalámicas). Por el contrario, las fibras de menor diámetro inhibirían a las células I, lo cual supondría una excitación de las células T, con la consiguiente facilitación de la transmisión nociceptiva. Así, si el estímulo es discreto predominaría la aferencia por las fibras de mayor diámetro bloqueándose la transmisión dolorosa, mientras

que, si el estímulo es suficientemente intenso predominarían las aferencias por las fibras más finas facilitándose la transmisión nociceptiva. Según Melzack y Wall, este sistema debería estar también bajo el control de un sistema descendente de fibras, procedente del tronco cerebral, que sería sensible a factores ambientales.

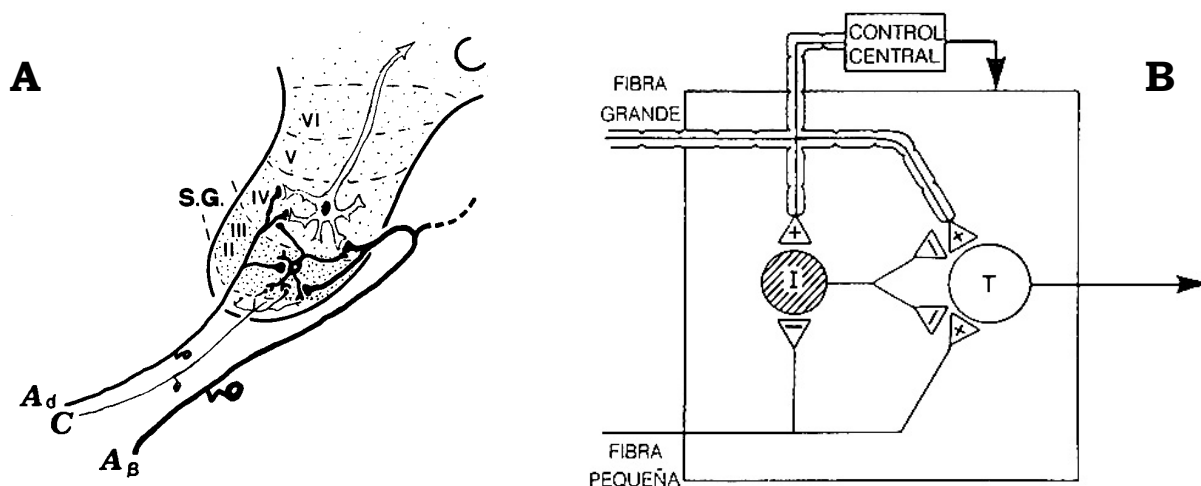


Fig. 1.5.- Esquema del sistema de control de la transmisión nociceptiva según la teoría de la puerta de control para el dolor de Melzack y Wall (1965). Tomado **(A)** de Montrone y cols. (1992) y **(B)** de Adams y Victor (1992).

Sin embargo, las pruebas de la existencia de este sistema de analgesia endógeno fueron presentadas por primera vez por Reynolds (1969), quien descubrió que la estimulación eléctrica de la *sustancia gris periacueductal* (PAG) de la rata producía una analgesia profunda (denominada SPA o analgesia producida por estimulación) sin afectar la conducta ni la actividad motora. En humanos, la estimulación de la PAG mediante electrodos implantados estereotáxicamente también ha demostrado que produce un estado de analgesia, aunque no de forma permanente (Hosobuchi y cols., 1977).

Basados en estos datos, Basbaum y Fields (1978, 1979 y 1984) elaboraron una hipótesis acerca de cuál sería la estructura de este circuito

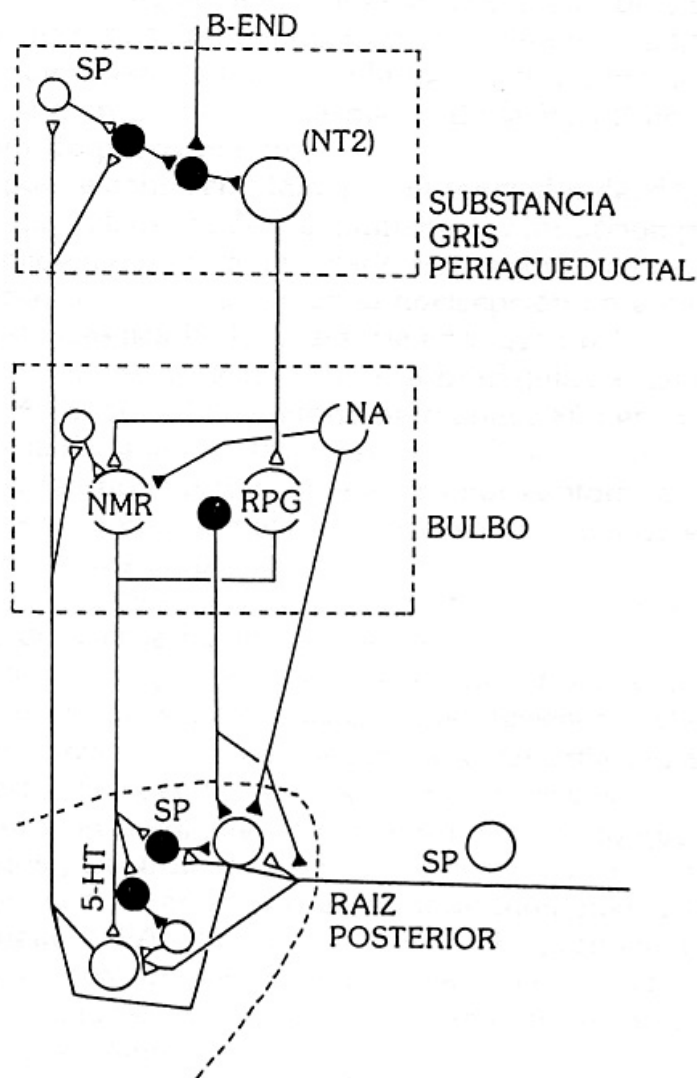


Fig. 1-6.- Esquema que ilustra el modelo de circuito de control descendente de la información nociceptiva propuesto por Basbaum y Fields (1984).

endógeno de modulación de la información nociceptiva (Fig. I-6). Según ellos, este circuito estaría formado por la PAG, varios núcleos de la porción rostral y ventromedial del bulbo (entre los que destacaría el *núcleo del rafe magno*, RMg), y el asta posterior de la médula espinal. En él jugarían un papel destacado los opiáceos endógenos (las β-endorfinas, encefalinas y dinorfinas), apoyado este supuesto por el hecho de que la microinyección de morfina en la PAG produce analgesia, mientras que la inyección de un antagonista de los

opiáceos, como es la naloxona, en el interior de la PAG o en el tercer ventrículo revierte dicho efecto analgésico de los opiáceos. Sin embargo, los factores que activarían de forma natural este sistema no están nada claros.

A nivel de la PAG, proponen que la neurona de proyección sobre el RMg o núcleos adyacentes (como el *núcleo reticular paragigantocelular*

lateral, LPGi) sería neurotensinérgica (excitadora). Sobre ella actuaría una interneurona inhibitoria, que a su vez, recibiría impulsos inhibidores de interneuronas productoras de opiáceos endógenos o de neuronas hipotalámicas β -endorfinérgicas. Los impulsos sobre la interneurona productora de opiáceos endógenos procederían de la vía ascendente nociceptiva directamente, o bien a través de otra interneurona (en este caso excitador, productora de sustancia P).

A nivel de la porción rostral y ventromedial del bulbo, las neuronas de proyección sobre el asta posterior de la médula (productoras de serotonina) recibirían, además de la información excitadora neurotensinérgica procedente de la PAG, aferencias inhibitorias de naturaleza norepinefrinérgica (que, así mismo, podrían verse controladas por interneuronas endorfinérgicas). A este nivel también llegaría información por la vía nociceptiva ascendente que alcanzaría a las neuronas de proyección bulbo-espinales a través de una interneurona excitadora.

Por último, las neuronas de proyección serotoninérgicas bulbo-espinales inhibirían, a nivel del asta posterior de la médula, a las neuronas de origen de la vía ascendente nociceptiva, por dos mecanismos: uno por contacto directo y otro por medio de varias interneuronas inhibitorias (endorfinérgicas y gabaérgicas).

3.1.- La Sustancia Gris Periacueductal.

La sustancia gris periacueductal (PAG), tanto en el ser humano (Testut y Latarjet, 1973; Latarjet y Ruiz Liard, 1990) como en el resto de los mamíferos (Beitz, 1995, en rata) es la porción del sistema nervioso central que se halla situada alrededor del acueducto de Silvio, a nivel del mesencéfalo.

Los estudios basados en la técnica de Nissl (Mantyh, 1982; Beitz, 1985) han revelado que la PAG de la rata está formada por dos poblaciones celulares: neuronas de tamaño pequeño y células gliales, mientras que los estudios con las técnicas de Golgi (Beitz y Shepard, 1985) han permitido clasificar las neuronas que forman la PAG en tres tipos diferentes: fusiformes o bipolares, triangulares y estrelladas o multipolares.

Al igual que en el hombre (Nieuwenhuys *y cols.*, 1988), la PAG de la rata recibe y proyecta a todos los niveles del sistema nervioso central (Van Bockstaele *y cols.*, 1991; Beitz, 1995; Cameron *y cols.*, 1995a y b).

Son muchas las sustancias químicas que se han detectado en la PAG de los diferentes mamíferos estudiados. Centrándonos en las halladas en la PAG de la rata, las clasificaremos en cuatro grupos (Beitz, 1995): 1) Las monoaminas (adrenalina, noradrenalina, histamina y serotonina) y la acetilcolina; 2) Los aminoácidos simples (glutamato, aspartato y ácido γ -aminobutírico o GABA); 3) Los neuropéptidos (neurotensina, sustancia P, enkefalina, β -endorfina,...) y 4) Los gases simples (óxido nítrico y monóxido de carbono).

La PAG ha sido implicada en una amplia variedad de funciones, tales como reacciones agresivas o defensivas (Bandler y Carrive, 1988; Bandler y Depaulis, 1991), repuestas autonómicas (Carrive y Bandler, 1991; Harper *y cols.*, 1991; Lovick, 1993), vocalización (Jurgens, 1991; Larson, 1991), comportamientos sexuales (Ogawa *y cols.*, 1991; Schwartz-Giblin y McCarthy, 1995) o modulación del dolor (Basbaum y Fields, 1984; Fields *y cols.*, 1991; Keay y Bandler, 1993; Lovick, 1993; Keay *y cols.*, 1994). Esta última es quizás una de las primeras y más estudiadas funciones atribuidas a la PAG. Diferentes estudios han ido aportando datos que apoyan la hipótesis de la capacidad antinociceptiva o analgésica de la PAG (Basbaum y Fields, 1984; Fields *y cols.*, 1991; Keay y Bandler, 1993;

Lovick, 1993; Keay *y cols.*, 1994). Actualmente, sin embargo, se está llegando a la conclusión de que la PAG es un centro integrador de todas estas funciones, como expresión de toda la serie de respuestas y comportamientos que se desencadenan ante una situación de miedo, temor o ansiedad (Fanselow, 1991; Lovick, 1993).

Desde los primeros estudios citoarquitectónicos, se ha propuesto la existencia de diferentes subregiones o subnúcleos dentro de la PAG. La mayoría de estudios en la última década han aportado importantes evidencias que apoyan la existencia de diferentes subdivisiones anatómicas dentro de la PAG, discrepando, sin embargo, en el número y situación de tales subdivisiones (Hamilton, 1973; Beitz, 1985; Conti, 1988; Meller y Dennis, 1990b; Gundlach, 1991; Valverde-Navarro *y cols.*, 1996).

A los datos aportados por estos trabajos citoarquitectónicos, hay que sumar las evidencias encontradas por otros autores acerca de que no toda la PAG se comporta igual desde el punto de vista funcional (Reynolds, 1969; Sakuma y Pfaff, 1979; Cannon *y cols.*, 1982; Prieto *y cols.*, 1983; Bandler y Depaulis, 1991; Carrive, 1991; Larson, 1991; McCarthy *y cols.*, 1991; Morgan, 1991).

Son muchos, como vemos, los estudios tanto anatómicos como fisiológicos que apuntan la posibilidad de subdivisión de la PAG según unos ejes dorsoventral y mediolateral en diferentes subdivisiones: medial, dorsal, dorsolateral, lateral y ventrolateral.

Actualmente, sin embargo, se va más allá y se postula la teoría de que la organización estructural y funcional de la PAG no se limita a seguir los ejes dorsoventral y mediolateral, sino también el eje rostrocaudal. De tal forma que la PAG quedaría organizada en columnas longitudinales de diferente extensión, cada una de ellas correspondiente a una de las

subdivisiones anatómicas identificadas.

Los principios de esta teoría fueron expuestos por Bandler *y cols.* (1991) en el NATO Advanced Research Workshop, que tuvo lugar en Château de Bonas (Francia). En esta reunión se aportaron evidencias de la existencia de, al menos, cuatro columnas longitudinales en la PAG de los mamíferos: 1) Columna neuronal dorsomedial; 2) Columna neuronal dorsolateral; 3) Columna neuronal lateral; y 4) Columna neuronal ventrolateral. Una revisión de esta teoría ha sido recientemente publicada (Bandler y Shipley, 1994).

Sin embargo, desde que surgió la hipótesis de la organización de la PAG en columna longitudinales, han sido varios los estudios que han intentado aportar datos para verificarla. A la luz de estos trabajos, se han propuesto modificaciones a la teoría inicial, con aparición de nuevas columnas en unos casos (Onstott *y cols.*, 1993), o fusión de dos columnas en una en otros (Beitz, 1995), siendo clave en todos los estudios la herramienta utilizada para identificar las diferentes columnas (Valverde-Navarro *y cols.*, 1996). Tales estudios han perseguido también definir conexiones intrínsecas en la PAG que servirían para unir las diferentes columnas longitudinales propuestas (Sandküler, 1991; Sandküler y Herdegen, 1995).

Ante el número creciente de evidencias, tanto citoarquitectónicas como funcionales, de la organización en columnas longitudinales de la PAG de los mamíferos, uno de los primeros objetivos que se plantearon los investigadores fue intentar correlacionar entre sí ambos tipos de hallazgos, con la idea de comprobar si a cada tipo neuronal correspondía una determinada función.

Poder demostrar dicha relación entre los datos anatómicos y los fisiológicos ha sido difícil. Sin embargo, el empleo de c-fos como marcador

de actividad neuronal se ha convertido en una de las herramientas más usadas para solucionar este problema (Keay y Bandler, 1993; Keay, *y cols.*, 1994; Li y Dampney, 1994; Murphy *y cols.*, 1995; Clement *y cols.*, 1996). Esta técnica proporciona registros anatómicos de un fenómeno funcional, con dos ventajas adicionales, por un lado su resolución a nivel celular y, por otro su compatibilidad con otras técnicas neuroanatómicas.

3.2.- La Región Rostral y Ventromedial del Bulbo Raquídeo.

La región más rostral y ventromedial del bulbo raquídeo (RVM) incluye al núcleo del rafe magno (RMg) y la formación reticular adyacente. Esta región es, junto con la PAG, el otro de los componentes principales del circuito modulador del dolor propuesto por Basbaum y Fields (1984) y Fields *y cols.* (1991). La RVM serviría de relevo para los impulsos moduladores de la información nociceptiva procedentes de la PAG con dirección a la médula espinal. Esta aseveración se apoya en el hecho de que el efecto analgésico, obtenido por la activación eléctrica o química de la PAG, puede ser bloqueado por lesión o inyección de anestésicos en la RVM (Gebhart *y cols.*, 1983; Chung *y cols.*, 1987).

Las principales aferencias a los núcleos de esta región troncoencefálica las reciben de la PAG y el núcleo cuneiforme (Beitz, 1982; Fields *y cols.*, 1991), así como de la formación reticular bulbar dorsal adyacente y el tegmento pontino dorsolateral (Fields *y cols.*, 1991). Otras aferencias a la RVM tienen su origen en estructuras diencefálicas y telencefálicas, incluidas el hipotálamo, cortex frontal, la amígdala, y el núcleo de la stria terminalis (Fields *y cols.*, 1991; Meng *y cols.*, 1997).

En cuanto a las eferencias de la RVM, estas se dirigen mayoritariamente hacia el asta posterior de la médula (Martin *y cols.*, 1985; Mason y Fields, 1989), especialmente a las láminas I, II, V, VI y VII

(Fields *y cols.*, 1991). Aunque, también, proyectarán hacia diferentes estructuras diencefálicas (Martin *y cols.*, 1985).

Los estudios citoquímicos han demostrado la existencia de una gran cantidad de neuropéptidos en las neuronas de la RVM. El más importante, por el papel que se le ha asignado en la modulación de la información nociceptiva, es la serotonina (Basbaum y Fields, 1984; Martin *y cols.*, 1985; Fields *y cols.*, 1991). Las neuronas de la RVM son la principal fuente de serotonina que llega al asta posterior de la médula espinal (Fields *y cols.*, 1991). La eliminación de la serotonina a nivel de la RVM o del asta posterior de la médula reduce, o incluso bloquea, el efecto analgésico de la morfina (Fields *y cols.*, 1991). Así mismo, la administración de morfina aumenta la liberación de serotonina a nivel del asta posterior de la médula y aumenta los metabolitos de la serotonina a nivel de la RVM (Fields *y cols.*, 1991). También desempeñan una función importante el GABA y la encefalina (Beitz, 1982; Fields *y cols.*, 1991). La primera tendrá un efecto neto de facilitar la transmisión de la información nociceptiva, mientras que la segunda bloqueará dicha transmisión por activación del circuito antinociceptivo. Posteriores estudios han identificado otros neurotransmisores, tanto en el interior de los somas neuronales (sustancia P, somatostatina, hormona liberadora de tirotrópina o TRH y colecistoquinina), como en los terminales aferentes a estos centros (norepinefrina, neurotensina, glutamato, aspartato y acetilcolina) (Beitz, 1982; Basbaum y Fields, 1984; Fields *y cols.*, 1991; Willis *y cols.*, 1995).

La principal función que se ha atribuido a estos tres núcleos de la RVM ha sido la participación en el circuito endógeno de modulación de la transmisión nociceptiva (Basbaum y Fields, 1984; Fields *y cols.*, 1991; Willis *y cols.*, 1995).

Desde un punto de vista fisiológico han podido ser identificadas en la

RVM tres clases de neuronas, atendiendo a los cambios en la frecuencia de descarga inmediatamente antes de producirse el reflejo nociceptivo como consecuencia de un estímulo doloroso (Fields *y cols.*, 1991; Skinner *y cols.*, 1997):

1) Células ON: Sufren un súbito incremento en la frecuencia de descarga justo antes de producirse el reflejo de retirada. Las células ON serán activadas al máximo cuando el estímulo sea lo suficientemente intenso como para provocar el reflejo de retirada, aunque un número significativo de células ON pueden ser activadas por estímulos mecánicos inocuos. La administración de morfina provoca en las células ON una disminución de la frecuencia de descarga (Fields *y cols.*, 1991). Por tanto, la activación de las células ON facilitaría la transmisión de la información nociceptiva a nivel del asta posterior de la médula espinal (Fields *y cols.*, 1991; Skinner *y cols.*, 1997).

2) Células OFF: Se caracterizan por una brusca pausa en las descargas que comienza aproximadamente 400 ms antes del reflejo. Sólo los estímulos nociceptivos son capaces de provocar esta pausa en las células OFF. La administración de morfina, sin embargo, elimina esta pausa y provoca una activación constante y específica de las células OFF (Fields *y cols.*, 1991). Por tanto, su activación dificultaría la transmisión de la información dolorosa a nivel del asta posterior de la médula espinal (Fields *y cols.*, 1991; Skinner *y cols.*, 1997).

3) Células NEUTRAS: Son aquellas que no experimentan ningún cambio en la frecuencia de sus descargas previo al reflejo de retirada que aparece tras una estimulación dolorosa (Fields *y cols.*, 1991).

3.3.- Núcleo Parabraquial.

Desde que Basbaum y Fields postularon su teoría de la existencia de un circuito analgésico endógeno, han sido numerosos los estudios aparecidos en la literatura que han confirmado dicha hipótesis,

aunque con matices. Matices casi siempre relacionados con la participación, directa o indirecta, de nuevos centros troncoencefálicos en el circuito antinociceptivo original, dependiendo, básicamente, del tipo de estímulo doloroso aplicado (somático superficial, somático profundo o visceral). Señalaremos de entre ellos el **núcleo del rafe dorsal** (Wang y Nakai, 1994), **locus coeruleus** (Aston-Jones *y cols.*, 1995; Willis *y cols.*, 1995), **núcleo cuneiforme** (Andrezik y Beitz, 1985), y el **núcleo del tracto solitario** (Ammons *y cols.*, 1983; Palkovits *y cols.*, 1987; Randich *y cols.*, 1988; Morgan *y cols.*, 1989; Yew *y cols.*, 1990; Hammond *y cols.*, 1992; Wiertelak *y cols.*, 1997).

Asimismo, también se encuentra entre ellos el núcleo parabraquial que ha sido elegido como centro de nuestro estudio en el presente trabajo.

Con el nombre de núcleo parabraquial (PB) se designa a un grupo de neuronas situadas alrededor del pedúnculo cerebeloso superior o *brachium conjunctivum*, tanto en el encéfalo humano (Olszewski y Baxter, 1954), como en el de rata (Fulwiler y Saper, 1984), así como en el de mono (Kitamura *y cols.*, 2001). Dado que nuestro trabajo se ha llevado a cabo en ratas, nosotros aquí vamos a describir las características del PB de la rata, aunque las similitudes citoarquitectónicas puestas de manifiesto entre los PB de rata y mono, permiten, desde un punto de vista filogenético, establecer una estructura similar para el PB del ser humano.

Como ya hemos señalado, Olszewski y Baxter, en 1954, fueron los primeros en utilizar el término PB para referirse, en el ser humano, a la zona del tronco del encéfalo que rodeaba el pedúnculo cerebeloso superior, dividiéndola ya entonces en una porción medial, localizada ventromedialmente al pedúnculo cerebeloso superior, y una porción lateral, localizada dorsolateralmente al pedúnculo cerebeloso superior. Esta terminología ha sido aplicada sistemáticamente a estudios posteriores

en animales de experimentación, y continúa siendo empleada en la actualidad, a pesar de que en algunas especies, como la rata, al ser el pedúnculo cerebeloso superior más horizontal, la porción lateral es realmente más dorsal que lateral y la porción medial es más ventral que medial.

Treinta años después de la publicación de Olszewski y Baxter (1954), Fulwiler y Saper (1984) diferenciaron hasta 10 subnúcleos en el PB de la rata basándose no sólo en las distintas características citoarquitectónicas de sus neuronas sino también en su conectividad tanto aferente como eferente, incluyendo al núcleo de Kölliker-Fuse como una tercera porción del PB, situado ventrolateralmente al pedúnculo cerebeloso superior (Fulwiler y Saper, 1984; Bystrzycka y Nail, 1985).

Fulwiler y Saper (1984) diferenciaron hasta 7 subnúcleos en la porción lateral del PB: el superior (slPB), el central (clPB), el interno (ilPB), el dorsal (dlPB), el ventral (vlPB), el externo (elPB) y el extremo (exlPB). En la porción medial del PB se diferenciaron 2 subnúcleos: el medial (mPB) y el extremo (exmPB). A estos 9 subnúcleos añadieron un décimo: el núcleo de Kölliker-Fuse (KF).

Esta organización estructural del PB en subnúcleos ha sido validada y adoptada por posteriores estudios (Fulwiler y Saper, 1984; Feil y Herbert, 1995; Hermanson y Blomqvist, 1996; Li y cols., 2006), incluido el presente.

El diámetro medio de las células del PB es de aproximadamente 16 μm , existiendo ciertas variaciones dependiendo del subnúcleo analizado. En la porción medial, el subnúcleo mPB presenta un tamaño celular heterogéneo pudiéndose identificar hasta 3 poblaciones celulares en su interior con un diámetro celular medio de 12, 14 y 17 μm , respectivamente.

El subnúcleo exmPB, sin embargo, lo conforma una población homogénea de neurona de tamaño más grande.

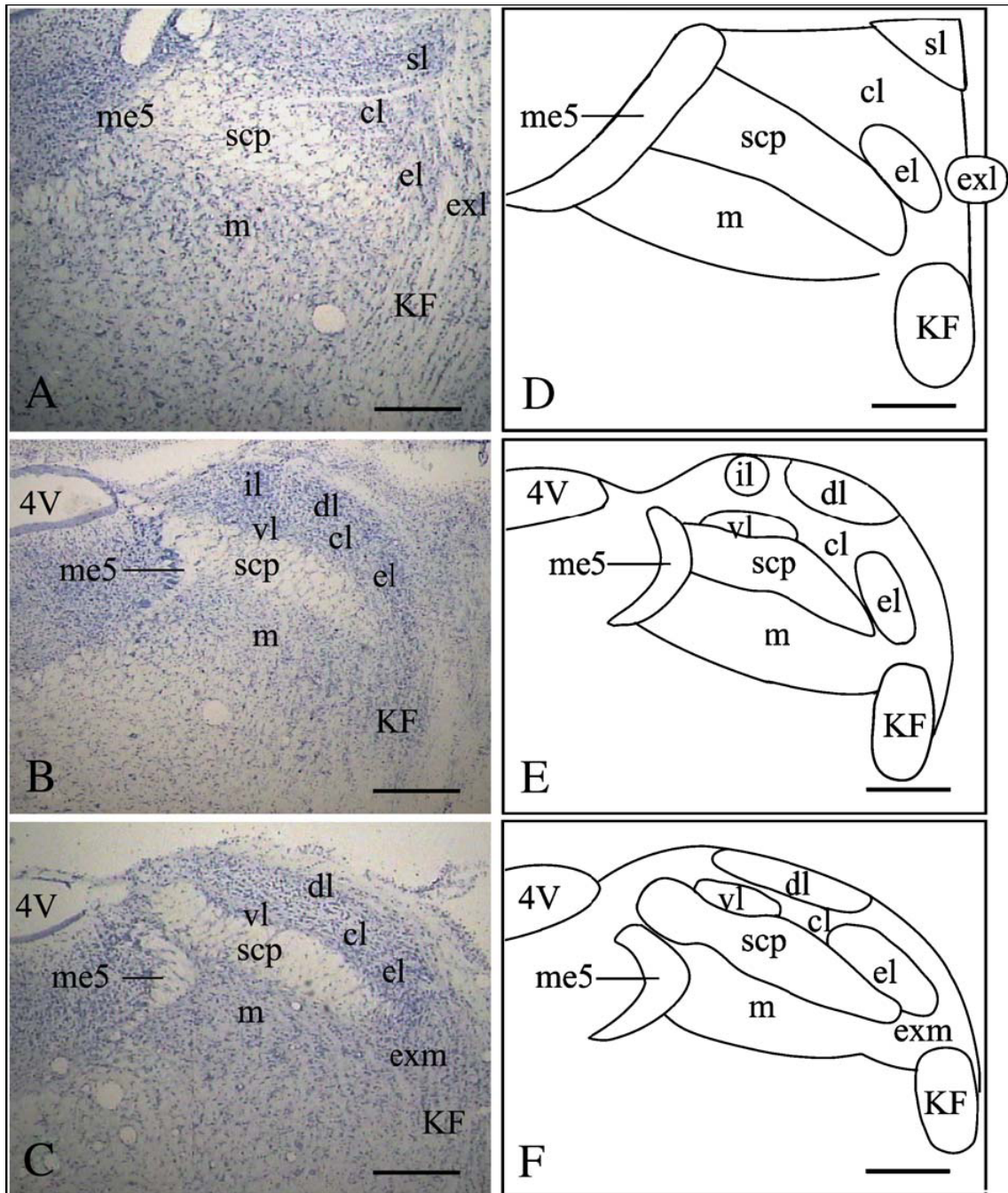


Fig. 1.7.- Microfotografías que muestran el PB con la técnica de Nissl, y esquemas correspondientes, en los que se identifican los diferentes subnúcleos del PB, a nivel rostral (A y D), intermedio (B y E) y caudal (C y F). Tomado de Li y cols. (2006).

En la porción lateral, los subnúcleos están formados por poblaciones celulares homogéneas entre sí, predominando las neuronas de tamaño

pequeño-medio: 12,2 μm en el clPB, el vlPB y el dlPB; 12,5 μm en el elPB y el exlPB; 14,5 μm en el slPB y 16,3 μm en el ilPB. Finalmente, el KF se muestra como un grupo de células homogéneas de un tamaño medio de unas 16,5 μm (Fulwiler y Saper, 1984).

En cuanto a la morfología de las células del PB esta es variada: multipolares (en los subnúcleos mPB, exmPB, slPB, elPB y exlPB), redondeadas (en los subnúcleos mPB e ilPB), ovaladas o fusiformes (en los subnúcleos mPB, clPB, vlPB y dlPB), piramidales (en los subnúcleos slPB y KF) y poligonales (en el subnúcleo mPB) (Fulwiler y Saper, 1984; Bystrzycka y Nail, 1985).

El PB recibe aferencias fundamentalmente del núcleo del tracto solitario (Sol): la porción medial del PB de la mitad rostral del Sol o gustativa, y la porción lateral del PB de la mitad caudal o viscerosensible. También recibe proyecciones de la médula espinal, concretamente de las láminas I y II, del área posterma y de la región ventrolateral del bulbo raquídeo, del hipotálamo, de la amígdala y de la corteza cerebral (Fulwiler y Saper, 1984; Bystrzycka y Nail, 1985).

A su vez, el PB envía proyecciones ascendentes hasta el hipotálamo, hacia el área lateral hipotalámica y los núcleos paraventricular, preóptico mediano, dorsomedial y ventromedial del hipotálamo, hasta el tálamo, hacia los núcleos paraventricular, ventromedial basal e intralaminares del tálamo, y hasta el núcleo central de la amígdala, el núcleo en lecho de la *stria terminalis*, la sustancia innominada, la zona incerta y la corteza cerebral. También posee eferencias descendentes hacia la porción rostral y lateral del bulbo raquídeo, el núcleo del tracto solitario y la médula espinal (Fulwiler y Saper, 1984; Bystrzycka y Nail, 1985).

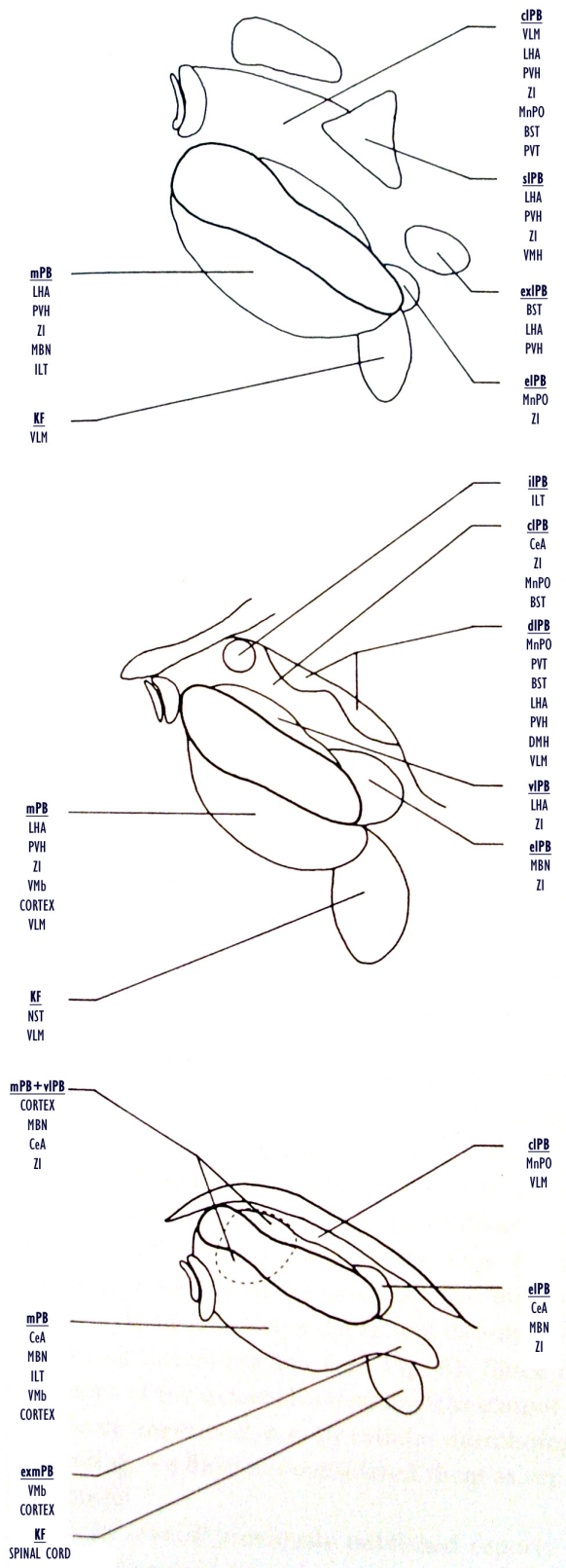


Fig. 1.8.- Esquema que muestra de forma resumida las proyecciones de los diferentes subnúcleos del PB en los tres niveles rostrocaudales. Tomado de Fulwiler y Saper, 1984).

Entre los neurotransmisores identificados en las neuronas del PB se incluyen la neurotensina, la enkefalina y la sustancia P (Bystrzycka y Nail, 1985).

El PB ha sido asociado con la regulación cardiovascular, el sistema gustativo, la respiración, el balance de los fluidos corporales, el sueño y los mecanismos tanto nociceptivos como analgésicos (para revisión ver Hermanson y Blomqvist, 1996). Dado que el PB recibe información ascendente nociceptiva tanto del núcleo del tracto solitario como de las neuronas nociceptivas de las láminas I y V del asta posterior de la médula espinal, y establece, a su vez, conexiones eferentes con un gran número de regiones del telencéfalo, del diencefalo, del tronco del encéfalo y de la médula espinal, y dado también que unos de los péptidos más abundantes en las neuronas del PB son los opiáceos endógenos como la enkefalina y la dinorfina, el PB

podría ser una fuente importante de inervación opiácea a aquellas regiones. Sin embargo, además de esta forma opioide de analgesia, también se ha descrito que la estimulación eléctrica del PB, así como la microinyección en el PB de un agonista colinérgico como el carbacol son capaces de provocar una supresión del dolor de forma no opioide. Teniendo en cuenta que esta forma de analgesia parece no emplear los circuitos neurales que utiliza la morfina, la estimulación del PB podría ser potencialmente útil en el tratamiento en el ser humano del dolor resistente o tolerante a la terapia con opiáceos.

4.- El Proto-oncogén *c-fos*.

4.1.- *Oncogenes y Proto-oncogenes.*

En un principio los oncogenes fueron descritos como la información genética responsable de la inducción de tumores por los virus de la clase *Retroviridae* (Morgan y Curran, 1991). Recordemos que los retrovirus tienen una doble cadena de RNA, que contiene tres genes indispensables para ellos: *gag* (gen del antígeno de grupo, codifica las proteínas del nucleoide), *pol* (polimerasa, codifica la transcriptasa reversa), y *env* (envoltura, que codifica las glucoproteínas de la capa exterior). Los retrovirus oncogénicos poseen además un oncogén, que no es indispensable para ellos, y que les confiere la capacidad de inducir tumores (Etienne-Decant, 1990).

Estos oncogenes se denominan con la letra "v" seguida, tras un guión, de las tres letras que caracterizan a cada uno. En 1989, Bishop y Varmus recibieron el Premio Nobel por su descubrimiento del origen celular de los oncogenes retrovíricos, es decir, que los genes transformantes de los

retrovirus proceden del genoma celular (Morgan y Curran, 1991).

Actualmente se sabe que el origen de estos oncogenes es, efectivamente, celular, a partir de unos genes que todos poseemos en nuestro DNA, incluidos los demás mamíferos y otros eucariotas, y que llamaremos proto-oncogenes (Sambucetti y Curran, 1986; Curran *y cols.*, 1990; Distel y Spiegelman, 1990; Morgan y Curran, 1991).

Cuando estos genes celulares normales son capturados accidentalmente por el virus, sufren una transformación. Existen varias hipótesis acerca de la naturaleza de dicha transformación: podría tratarse de una mutación, por un accidente de copia en el momento de la transcripción o en un momento posterior, o bien de una sobreexpresión, cuando hay una síntesis de cantidades excesivas de la proteína normal (Etienne-Decant, 1990).

Un hecho que merece ser destacado es que no se ha podido demostrar en tumores humanos la transformación de un proto-oncogén en oncogén por la presencia de retrovirus, aunque sí se pueden transformar por exposición a una radiación, o por un agente químico cancerígeno. Sin embargo, en los ratones o las ratas, no sólo las radiaciones o los productos cancerígenos, sino también los virus pueden ser responsables de la aparición de oncogenes en el DNA de la célula huésped, provocando así un tumor (Etienne-Decant, 1990).

Los proto-oncogenes, por tanto, son genes celulares normales a partir de los cuales derivan los oncogenes retrovéricos (Sambucetti y Curran, 1986; Curran *y cols.*, 1990; Distel y Spiegelman, 1990; Etienne-Decant, 1990; Morgan y Curran, 1991).

Estos proto-oncogenes se denominan con la letra "c" seguida, tras un guión, de las tres mismas letras que caracterizan al oncogén

correspondiente (Etienne-Decant, 1990). Codifican proteínas que poseen una función fisiológica muy importante tanto a nivel del crecimiento celular como de la diferenciación. Algunos retrovirus, cuando parasitan las células de su huésped natural (gallina, ratón, rata,...) pueden captar accidentalmente un proto-oncogén, el cual podrá, por mecanismos aún no aclarados del todo (mutación, sobreexpresión,...), convertirse en un oncogén que el virus transmitirá posteriormente a un huésped animal sano (Etienne-Decant, 1990).

Los productos que codifican estos proto-oncogenes funcionarán como mensajeros extracelulares polipeptídicos, receptores de superficie celular, proteinquinasas, proteínas G, factores de transcripción nucleares,... (Etienne-Decant, 1990).

Los proto-oncogenes conocidos hasta el momento se pueden agrupar en 5 familias (Etienne-Decant, 1990):

1) Familia del proto-oncogén **ras** : codifica una proteína de membrana de la familia de las proteínas G.

2) Familia de los proto-oncogenes **src, abl, yes, fes, fps, fgr, ros** : codifican proteínas de membrana con actividad tirosincinasa.

3) Familia de los proto-oncogenes **erb-B, fms, raf, ml, mos** : codifican proteínas de membrana similares a las de la familia anterior pero sin actividad tirosincinasa.

4) Familia de los proto-oncogenes **myc, myb, fos, jun** : codifican proteínas nucleares.

5) Familia del proto-oncogén **sis** : codifica una proteína que se segrega.

Gen	Localización cromosómica	Comentario
c-sis	22q12-q13	Factor de crecimiento derivado de (plaquetas PDGF).
c-erb	7q11	Receptor de hormona tiroidea.
c-erbB	7p12-p14	Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
n-ras	1p-22	Proteína G (con actividad GTPasa)
c-abl	9q34	Tirosina-Kinasa implicada en la traslocación 9:22 del cromosoma philadelphia.
c-fos	11q24-q31	Proteína nuclear.
c-myc	8q24	Proteína nuclear.
rb	13q14	Proteína nuclear. La pérdida de su función se asocia a la aparición de retinoblastomas y otros tumores, funciona como anti-oncogén.
p-53	17p13	Proteína nuclear alterada o ausente en múltiples neoplasias, por lo que puede funcionar como oncogén o anti-oncogén.

Tabla 1.4.- Algunos proto-oncogenes humanos relacionados con el control de la proliferación celular.

4.2.- Proto-oncogén c-fos.

Como hemos visto anteriormente, es un gen que codifica una proteína nuclear, en concreto un factor de transcripción general.

Además, se caracteriza por el hecho de que es inducido por señales del medio ambiente (Morgan y Curran, 1989; Curran *y cols.*, 1990; Distel y Spiegelman, 1990; Morgan y Curran, 1991).

El proto-oncogén *c-fos* es el gen celular normal del cual procede el oncogén (*v-fos*) que contiene el virus del sarcoma osteogénico murino de Finkel-Biskis-Jenkins (FBJ-MSV) (Morgan y Curran, 1989; Curran *y cols.*, 1990; Distel y Spiegelman, 1990; Etienne-Decant, 1990; Morgan y Curran, 1991).

En la mayoría de tipos celulares existen niveles basales de expresión de *c-fos* relativamente bajos. Sin embargo, se ha observado que son muchos los estímulos que pueden inducir la expresión de *c-fos* en mayores cantidades, algunos relacionados con procesos de diferenciación y otros con la excitación neuronal, provocando un aumento transitorio del m-RNA de *c-fos* y de la proteína Fos. La transcripción se activa a los 5 minutos postestímulo, y continúa durante 15-20 minutos. El m-RNA producido se va acumulando hasta alcanzar un máximo a los 30-45 minutos postestimulación (Morgan y Curran, 1989; Curran *y cols.*, 1990; Distel y Spiegelman, 1990; Etienne-Decant, 1990; Morgan y Curran, 1991).

Tabla 1. Sumario de los genes prototipo, precoces e inmediatos.	
Gen y genes inmediatos	Características funcionales y estructurales.
familia fos	Los miembros forman complejos heterodiméricos de transcripción con miembros de la familia jun; la dimerización ocurre a través del dominio de la Leucina; el complejo reconoce la secuencia AP1: -TGACTCA-
<i>c-fos</i>	Funciona como un activador de mayor dependiente del jun asociado.
<i>fos-1</i>	Función reguladora desconocida.
<i>fos-B</i>	Función reguladora desconocida.
<i>fos-B</i>	Función reguladora desconocida.
familia jun	Los miembros forman dímeros o heterodímeros con otros miembros de la familia fos o jun; la dimerización ocurre a través del dominio Leucina; todos los complejos reconocen la secuencia de DNA: -TGACTCA-
<i>c-jun</i>	El dímero <i>c-fos/c-jun</i> funciona como un activador transcripcional.
<i>Jun-B</i>	<i>Fos/Jun-B</i> tiene una función reguladora transcripcional.
<i>Jun-D</i>	Miembro de la familia jun expresado constitutivamente.
otros	
<i>sis/248</i>	Lasada de sínc con protoma; unido a la secuencia de DNA: GCGGGGGGCG
<i>nm/77</i>	Miembro de la familia de los factores de transcripción del receptor de la hormona tiroidea; aligando a la secuencia de unión de DNA con desconocidas.
<i>c-myc</i>	Función desconocida contiene un dominio de secuencia similar al helix-loop-helix de la familia de factores de transcripción y asociación MycD, E (Muzo et al, 1989).

Fig. 1.10.- Familias de proto-oncogenes de expresión inmediata (IEGs). Tomado de Sheng y Greenberg (1990).

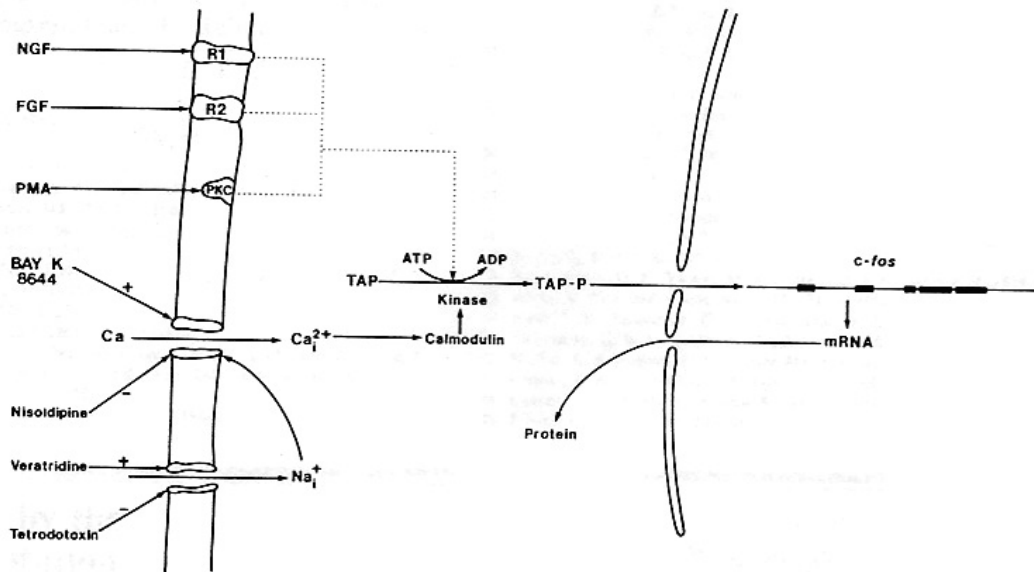


Fig. 1.11.- Esquemas que representan los sucesos moleculares que se hallan involucrados en la inducción del proto-oncogen *c-fos*. Tomado de Sheng y Greenberg (1990).

En el control de la transcripción intervienen varios elementos reguladores, localizados en la región no traducible 5' de *c-fos*: SRE, CaRE,... A estos elementos se unen diversas proteínas formando complejos que conectan diversas señales de segundos mensajeros con esta región 5'. Además de este control en el inicio de la transcripción, parecen existir evidencias acerca de la existencia de un control en la continuación de la elongación (Morgan y Curran, 1991).

El *c-fos* codifica una proteína nuclear denominada Fos, que participa en un complejo proteico nuclear junto a otra proteína celular llamada p39 (ya identificada como Jun). Este complejo proteico se denomina activador-proteico-1 (AP-1), y se une a la cromatina, en el sitio de unión AP-1 del DNA, funcionando como factor de transcripción y activador génico (Sambucetti y Curran, 1986; Curran y Franza, 1988; Morgan y Curran, 1989; Curran *y cols.*, 1990; Distel y Spiegelman, 1990; Morgan y Curran, 1991).

4.3.- Empleo del Proto-oncogén *c-fos* como Marcador Celular de Actividad Neuronal.

La característica del proto-oncogén *c-fos* de ser expresado de forma rápida y transitoria después de distintos estímulos externos, ha encontrado aplicación dentro de la investigación en la neurociencia, ya que la expresión de *c-fos* ha sido considerada como marcador de actividad neuronal (Sagar *y cols.*, 1988; Menétrey *y cols.*, 1989; Dragunow y Faull, 1989; Bullit, 1990; Sandkühler, 1991; Munglani y Hunt, 1993).

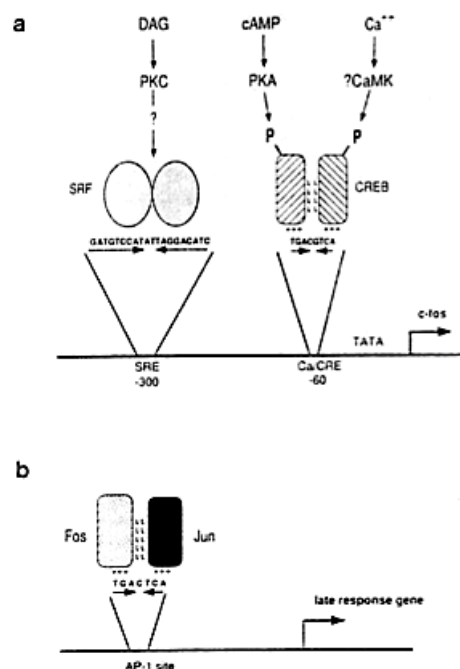


Fig. 1.12.- Esquema que representa los sucesos moleculares involucrados en la formación del complejo AP-1. Tomado de Morqan y Curran (1986).

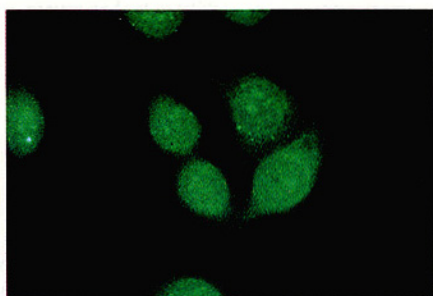
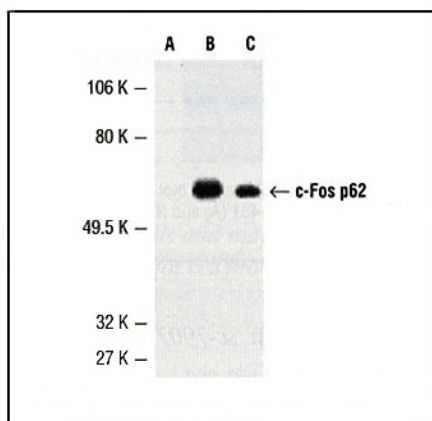


Fig. 1.13.- Expresión del proto-oncogén *c-fos*.

Este hecho ha proporcionado a los neurocientíficos una nueva herramienta de trabajo: el revelado mediante técnicas inmunohistoquímicas de Fos. Esta técnica proporciona registros anatómicos de un fenómeno funcional.

Ante el número creciente de evidencias, tanto citoarquitectónicas como funcionales, de la organización en

columnas longitudinales de la PAG de los mamíferos, uno de los primeros objetivos que se plantearon los investigadores fue intentar correlacionar entre sí ambos tipos de hallazgos, con la idea de comprobar si a cada tipo neuronal correspondía una determinada función.

Poder demostrar dicha relación entre los datos anatómicos y los fisiológicos ha sido difícil. Sin embargo, el empleo de *c-fos* como marcador de actividad neuronal se ha convertido en una de las herramientas más usadas para solucionar este problema (Keay y Bandler, 1993; Keay, *y cols.*, 1994; Li y Dampney, 1994; Murphy *y cols.*, 1995; Clement *y cols.*, 1996).

5.-Analgesia Preventiva



El estudio del sustrato anatómico de los circuitos nociceptivos y antinociceptivos ha posibilitado la aparición de nuevas estrategias terapéuticas. Una de las que recientemente ha surgido con mayor fuerza y a la que se abre un futuro más prometedor es la analgesia preventiva. Esta técnica consiste en administrar analgésicos previamente a la realización de una actuación que sabemos de antemano va a causar dolor en el paciente (por ejemplo, previamente a una intervención quirúrgica) con el fin de minimizar estos efectos desagradables en el momento de su aparición.

En un primer momento surgieron trabajos en los que se señalaba que la mayoría de intentos de lograr una analgesia preventiva en el hombre no mostraban una eficacia clínica del todo convincente, por lo que recomendaban una mayor investigación (Dahl y Kehlet, 1993).

Puestos de acuerdo en este punto, surgió la polémica al proponer algunos autores que sólo la investigación en el ser humano permitiría

avances en este capítulo (Hardy, 1993), lo cual fue rápidamente contestado por numerosos y prestigiosos investigadores que defendían no sólo la necesidad de la experimentación en animales de laboratorio, sino que calificaban como muy valiosos los datos que el estudio de la expresión del proto-oncogén c-fos en la médula espinal tras estimulación nociceptiva podría ofrecer sobre la eficacia o no de muchos de los fármacos usados actualmente en la analgesia preventiva (Munglani y cols., 1993; Munglani y Hunt, 1995; Munglani y cols., 1995; Munglani y cols., 1996).

Tan sólo hemos encontrado un trabajo en la literatura que ha estudiado los efectos, en la rata, de la administración conjunta de dosis subanalgésicas de metamizol y morfina, destacando en sus resultados que sí aparecía potenciación de los efectos analgésicos de la morfina cuando se probaba en un modelo de dolor visceral (no alterable por la naloxona), pero no cuando lo hacían en un modelo de dolor somático (Taylor y cols., 1998).

5.1.- *El Dolor Postquirúrgico*

El dolor postquirúrgico sería una de las mayores indicaciones de la analgesia preventiva. El dolor agudo postoperatorio es la suma de experiencias no placenteras, de tipo perceptivo y emocional, asociadas a reflejos autonómicos (simpático) y a reacciones de comportamiento. El dolor postoperatorio y su reactividad orgánica no sólo van ligados al acto quirúrgico en sí, sino que perduran al finalizar éste, ya que la agresión todavía continua. Este dolor postquirúrgico se genera tanto por mecanismos directos (sección de terminaciones nerviosas) como indirectos (liberación de sustancias algógenas capaces de activar y/o sensibilizar los receptores encargados de procesar la sensación nociceptiva). Los impulsos nociceptivos dan lugar a la aparición de una serie de respuestas que definen la reacción del organismo frente a la agresión y constituyen la base que explica los problemas postquirúrgicos ligados a la presencia del dolor

(Pflug y Bonica, 1977).

En el tratamiento del dolor postquirúrgico se han utilizado anestésicos locales, AINE y opioides, solos ó en combinación, pre, intra ó postquirúrgicamente, consiguiendo la disminución del dolor y una más temprana movilidad de los pacientes, aunque los estudios efectuados han presentado dificultades en su diseño y en sus conclusiones definitivas (Wall, 1988).

Actualmente, el pilar fundamental sobre el que se asienta el tratamiento del dolor postoperatorio son los opiáceos. A este respecto, la mayor parte de autores coinciden en señalar la imposibilidad práctica de lograr un alivio total del dolor si no es a expensas de unos efectos secundarios, casi siempre inaceptables bajo un punto de vista clínico. Precisamente estos efectos secundarios (principalmente la depresión respiratoria), son los que suscitan la controversia acerca de la utilización rutinaria de su empleo en el dolor postquirúrgico.

Toda esta problemática ha contribuido a que se potencie la utilización de fármacos y terapias alternativas en el tratamiento del dolor postquirúrgico como son los anestésicos locales, los AINE y otros analgésicos menores. Las indicaciones fundamentales de estos fármacos serían la cirugía ambulatoria, como únicos agentes, y la cirugía mayor, en este caso como ahorradores de opiáceos (The Lancet 1991).

No se ha investigado suficientemente, sin embargo, el sustrato anatómico que participa en el efecto analgésico central de otras sustancias no opiáceas, como el metamizol, empleado en el presente estudio. Es lógico asegurar que la investigación en este terreno aportará datos necesarios para poder avanzar en el campo de la analgesia preventiva.

6.-El Metamizol.



El *metamizol* pertenece al grupo de analgésicos derivados de la pirazolona, (primer escalon de la escala analgésica de la OMS). El término metamizol es la denominación común internacional adoptada por la OMS para el principio activo denominado anteriormente dipirona (Rull Bartomeu, 1993).

Se presenta en forma de sal magnésica, siendo su aspecto el de un polvo blanco soluble en agua y en alcohol. Su pH en solución acuosa es neutro y su pK es de 2,1 (Rull Bartomeu, 1993).



Fig. 1.14.- Presentación comercial del metamizol.

Según la clasificación para los analgésicos no mórficos, pertenecería al primer grupo de analgésicos antipiréticos o analgésicos no ácidos.

6.1.- Farmacocinética.

Se puede administrar tanto por vía oral como por vía parenteral. La concentración máxima plasmática se alcanza a los 60 minutos en el

primer caso y a los 30 minutos si la administración es intramuscular, siendo equiparables al cabo de una hora (Rull Bartomeu, 1993).

No se acumula en los tejidos al no ser un analgésico ácido, lo que explica su menor toxicidad local, y tiene un porcentaje bajo de unión a proteínas plasmáticas (15%), lo que explica su mínima interacción con otros fármacos. Atraviesa las barreras placentaria y hematoencefálica (Rull Bartomeu, 1993).

Tiene metabolismo hepático, dando como metabolitos más importantes la 4-metil-amino-antipirina y la 4-amino-antipirina responsables directos de la acción farmacológica (Rull Bartomeu, 1993).

La eliminación de los metabolitos es renal (el 72% en las primeras 24 horas) pudiendo colorear de rojo-naranja la orina sin significado patológico. También se elimina por la leche materna (Rull Bartomeu, 1993).

6.2.- Farmacodinamia.

El mecanismo de acción por el que el metamizol consigue un efecto analgésico no está del todo aclarado. Como el resto de AINEs (Anti-Inflamatorios No Esteroideos) tiene una acción a nivel periférico, pero, a diferencia de estos, se ha constatado una acción a nivel central, aunque por mecanismos que todavía están siendo dilucidados.

A nivel periférico tiene una doble acción: por una lado disminuye la síntesis de prostaglandinas mediante el bloqueo de la ciclooxigenasa y, por otro lado, bloquea el inicio de la transmisión del dolor por acción directa sobre los nociceptores, a los que retorna a la situación de reposo (Ferreira *y cols.*, 1978; Abbate *y cols.*, 1990; Rull Bartomeu, 1993; Shimada *y cols.*,

1994).

Los primeros datos sobre los efectos a nivel central del metamizol se publicaron a partir de la segunda mitad de la década de los 80. La administración tanto intraperitoneal como intravenosa de metamizol en ratas con la médula espinal y el sistema nervioso central supraespinal intactos provocó una depresión de la actividad en la mayoría de los axones medulares estudiados debido a la activación de la inhibición por parte de la PAG (Carlsson *y cols.*, 1986). La microinyección de metamizol directamente a nivel de la PAG potenció los efectos analgésicos de la morfina inyectada intratecalmente a nivel medular (Carlsson y Jurna, 1987). Así mismo, la administración intravenosa de metamizol produjo, en la actividad neuronal inducida por estimulación eléctrica de las aferencias nociceptivas, una depresión a nivel de las neuronas de la parte dorsomedial del núcleo ventral del tálamo, encargado de conducir los impulsos dolorosos hacia la corteza (Carlsson *y cols.*, 1988).

Ya en la década de los 90, nuevos estudios sobre el posible efecto central antinociceptivo del metamizol han sido realizados. Algunos han señalado a la médula espinal como la principal diana del metamizol (Neugebauer *y cols.*, 1994; Selve *y cols.*, 1996). Mientras que otros han apuntado a niveles supraespinales (Tortorici y Vanegas, 1994; Jones, 1996; Akman *y cols.*, 1996; Tortorici *y cols.*, 1996; Vanegas *y cols.*, 1997; Beirith *y cols.*, 1998).

Neugebauer *y cols.* (1994) demostraron que la administración intravenosa de metamizol reducía de forma intensa la actividad de las neuronas del asta posterior de la médula, mientras que la de las fibras amielínicas (de tipo C) apenas se veía afectada, lo que señalaba a la médula espinal como el principal sitio de acción del metamizol.

Selve *y cols.* (1996) no consiguieron efectos analgésicos tras la inyección intratecal de metamizol, mientras que sí los observaron tras su administración sistémica vía intraperitoneal. De ahí dedujeron que el metamizol actuaría a nivel central, directa o indirectamente, a nivel de médula espinal, pero sólo si es administrado sistémicamente o en combinación con otras drogas de activación supraespinal. En su estudio también se demostró que en dicho efecto analgésico participaría, al menos en parte, la galanina.

Akman *y cols.* (1996) señalaron el efecto analgésico del metamizol administrado tanto por vía intraventricular, intratecal o subcutánea, antes de la aplicación del test de contracción abdominal, consistente en una inyección intraperitoneal de ácido acético, pero no previo al test de sacudida de la cola (tail-flick test) ni al test de la plancha caliente (hot-plate test). Según estos autores, la aparición más rápida de los efectos antinociceptivos cuando la administración del fármaco era intraventricular o intratecal frente a la aparición más lenta cuando la vía era subcutánea, sugeriría que este efecto analgésico sería de origen central, apuntando, además, que estarían involucrados mecanismos opioides con liberación de endorfinas y/o enkefalinas endógenas.

Los resultados obtenidos a finales de los 80 que apuntaban que el metamizol ponía en marcha el circuito supraespinal de analgesia endógena descrito por Basbaum y Fields (1984), fueron ratificados por los trabajos de Tortorici y Vanegas (1994), Tortorici *y cols.* (1996) y Jones (1996). En ellos se observaban efectos analgésicos tras microinyectar metamizol directamente tanto en la PAG (Tortorici y Vanegas, 1994; Tortorici *y cols.*, 1996) como en el núcleo del rafe magno (Jones, 1996), señalando, además, que este efecto era parcialmente revertido por la naloxona.

De nuevo, los efectos antinociceptivos de la microinyección de

metamizol en la PAG fueron puestos de manifiesto, en este caso concreto, por la constatación a nivel medular de una disminución de la respuesta a estímulos dolorosos naturales de las neuronas de amplio margen dinámico o WDR (Wide Dynamic Range), unas de las más importantes en la transmisión ascendente de la información nociceptiva (Vanegas *y cols.*, 1997), añadiendo en un estudio mucho más reciente el dato de que este efecto era revertido por la microinyección de naloxona en la RVM (Vasquez *y Vanegas*, 2000).

En un amplio estudio sobre el mecanismo de acción del metamizol (Beirith *y cols.*, 1998), se ha constatado que el metamizol provoca una analgesia a nivel tanto espinal como supraespinal, frente al dolor neuropático inducido tanto por la formalina como por la capsaicina y frente a la hiperalgesia inducida por el glutamato, al parecer, relacionada con su capacidad de modular la acción y/o liberación de aminoácidos excitadores a nivel de médula espinal, así como de interaccionar de forma directa sobre la unión del glutamato a sus receptores. En este mismo trabajo se considera poco probable que en los mecanismos subyacentes a la acción antinociceptiva del metamizol participen péptidos opiáceos, receptores GABAB, el sistema serotoninérgico, los canales de potasio sensibles al ATP, la vía del óxido nítrico y su precursor la L-arginina, el complejo proteico Gi/Go sensible a la toxina tosferínica administrada intraventricularmente ni una modulación de las hormonas adrenales.

Finalmente, en un reciente estudio en el que se investigó el efecto de la combinación de morfina y metamizol a dosis subanalgésicas, se constató que dicha combinación sí conseguía potenciar los efectos analgésicos de la morfina cuando se empleaba un modelo de dolor visceral (la inyección de ácido acético intraperitoneal o test de las contracciones abdominales), pero no cuando se probaba en un modelo de dolor somático (dolor térmico en la planta de las patas). Asimismo, el efecto analgésico

observado en el modelo de dolor visceral no se veía alterado por la administración previa de naloxona (Taylor *y cols.*, 1998).

6.3.- Acciones Farmacológicas.

Los principales efectos del metamizol son (Rull Bartomeu, 1993):

1) **Acción analgésica:** superior a la de los salicilatos y los derivados del paraminofenol, reforzada por una débil acción antiinflamatoria.

2) **Acción antipirética:** superior a la del paracetamol.

3) **Acción antiagregante:** observada a dosis superiores a los 500 mg, debida a su efecto sobre la cicloxigenasa.

4) **Acción espasmolítica:** por relajación de la fibra muscular lisa, similar o superior a la conseguida por el diclofenaco o la indometacina.

6.4.- Efectos Secundarios.

Los principales efectos secundarios observados han sido la sedación, la sequedad de boca, la euforia, la sudoración, reacciones alérgicas (exantema, prurito, urticaria, broncoespasmo,...), fiebre medicamentosa, shock anafiláctico, epidermolisis necrótica, pancreatitis aguda, coagulopatía de consumo, agranulocitosis,... (Rull Bartomeu, 1993).

El metamizol tiene una buena tolerancia gástrica por la ausencia de efecto sobre la ciclooxigenasa gástrica, siendo comparable su gastrolesividad con la del paracetamol. Así mismo, los tratamientos prolongados con metamizol no han demostrado hepatotoxicidad ni nefrotoxicidad (Rull Bartomeu, 1993).

Se recomienda precaución durante los tres primeros meses de gestación porque no existe información suficiente sobre su teratogénesis. Tampoco existe sobre sus efectos en el recién nacido (Rull Bartomeu, 1993).

La intoxicación aguda por sobredosis de metamizol es poco frecuente, no habiendo sido publicado ningún caso mortal (Rull Bartomeu, 1993).

6.5.- Interacciones Farmacológicas.

Son escasas por la baja unión del metamizol a proteínas plasmáticas. Entre las publicadas encontramos que potencia la acción depresora del sistema nervioso central de la clorpromacina y acelera la eliminación de los barbitúricos (Rull Bartomeu, 1993).

6.6.- Indicaciones Terapéuticas.

El metamizol es un analgésico indicado tanto en el tratamiento del dolor agudo como del dolor crónico (Rull Bartomeu, 1993):

1) Está indicado **en el dolor agudo** de origen cólico, postoperatorio u odontológico, preferentemente por vía parenteral (intramuscular o endovenosa lenta), y por vía oral en el dolor agudo que no responde al paracetamol. En ambos casos, las dosis oscilan entre los 500 mg y los 2 g cada 6 u 8 horas, según la edad y la intensidad del dolor.

2) **En el dolor crónico**, el metamizol ha sido empleado en el tratamiento del dolor oncológico a dosis de 2 g cada 8 horas por vía oral, demostrando igual eficacia que 10 mg de morfina cada 4 horas.

7.-La Morfina.



Es un narcótico potente estándar para el dolor agudo intenso y el dolor canceroso crónico (American Pain Society, 1987).

La morfina, (tercer escalón de la escala analgésica del dolor, OMS), el principal alcaloide del opio. Fue aislada, en 1803, por un farmacéutico alemán, Sertürner, y determinó el procedimiento general para la extracción de los alcaloides. Pasaron varios años hasta que Robiquet, en 1832, descubrió la codeína y Merck, en 1848, descubrió la papaverina, también alcaloides naturales del opio.

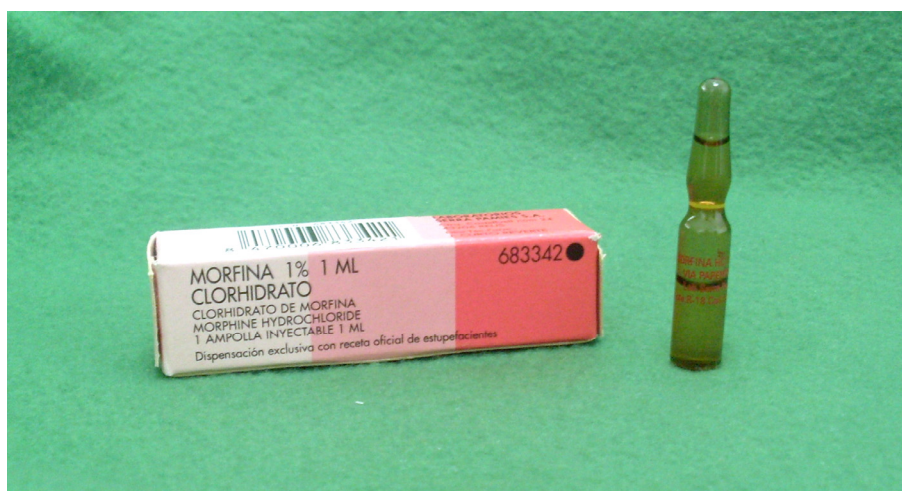


Fig. 1.15.- Presentación comercial de la morfina.

Pese a ser un fármaco utilizado desde la antigüedad, el conocimiento preciso de la estructura química de la morfina no fue propuesta por Gulland y Robinson hasta 1925 y comprobada años más tarde.

7.1.-Farmacocinética.

La absorción de la morfina es amplia y, por tanto, es útil para ser administrada por distintas vías (oral, subcutánea, intravenosa,

intramuscular, epidural, intraventricular y rectal). Para cada vía hay que elegir la presentación farmacéutica más adecuada y modificar la dosis según la potencia relativa.

Oral:rectal	1:1
Oral:subcutánea	1:2
Oral:intravenosa	1:3
Oral:espinal	1:10

Tabla 1.5.- Índice de la potencia relativa de la morfina según la vía de administración

La dosis efectiva para controlar el dolor hay que determinarla para cada persona en función de los tratamientos previos, la intensidad del dolor, el estado físico y neurológico y la idiosincrasia del enfermo.

Las dosis habituales medias, de inicio, oscilar entre 30 y 60 mg diarios, tanto de solución acuosa de morfina como de comprimidos de liberación inmediata o retardada. Las dosis medias se sitúan en 120-240 mg diarios (Gómez Sancho, 1999).

La morfina no se acumula en los tejidos y a las 24 h de haber administrado la última dosis las concentraciones son muy bajas.

La absorción de la morfina es amplia y, por tanto, es útil para ser administrada por distintas vías.

El metabolismo de la morfina es hepático. La vida media plasmática, si se ha administrado por vía oral, es de entre 2-3 h para una dosis única, pero si se administra de forma regular, la analgesia que produce dura hasta 5 h. La concentración máxima se alcanza aproximadamente al cabo

de una hora, con una variabilidad de entre 20 min y 2 h. La principal vía de eliminación de metabolitos es urinaria. El aclaramiento plasmático es muy variable y está relacionado con el metabolismo hepático.

7.2.-Farmacodinamia.

El mecanismo de acción se produce a través de los receptores específicos del sistema nervioso central, aunque también los hay en los tejidos periféricos.

7.3.-Acciones farmacológicas.

1. **Tratamiento del dolor**, sobre todo del dolor nociceptivo, aunque en el dolor neuropático la morfina también puede tener un papel.

2. **Tratamiento de la disnea** por su acción sobre el centro respiratorio cerebral. Las dosis administradas han de ser bajas: 2,5-5 mg cada 4 h, o bien 10-20 mg cada 12 h por vía oral. Si ya tomaba morfina se hará un aumento de entre el 30 y el 50 %.

3. **Antitusígeno**, por efecto sobre el centro tusígeno del bulbo raquídeo, deprimiendo el reflejo de la tos.

4. **Antidiarreico**, aunque para este uso, actualmente se considera de elección la loperamida, que tiene menos efectos centrales.

7.4.-Efectos secundarios.

1) **Depresión respiratoria** dependiente de la dosis por un efecto directo sobre los centros respiratorios del tronco cerebral.

2) **Somnolencia**, al inicio del tratamiento, que suele ceder en pocos días.

3) **Sensación de bienestar**, cambios en el estado anímico e incluso euforia.

- 4) **Mioclónías multifocales.**
- 5) **Desorientación** y alteraciones del pensamiento.
- 6) Alteración de la **temperatura corporal.**
- 7) **Sudación** más o menos profusa.
- 8) **Miosis** de la pupila.
- 9) **Náuseas y vómitos** por actuación sobre la zona de gatillo del bulbo raquídeo, que suelen responder bien al tratamiento y se limitan al cabo de pocos días.
- 10) **Sequedad de boca.**
- 11) **Estreñimiento** causado por la disminución de la motilidad intestinal.
- 12) **Cólico biliar** provocado por la elevación de la presión en el tracto biliar (esfínter de Oddi).
- 13) **Retención urinaria** provocada por el aumento de las contracciones del uréter y del tono del músculo detrusor de la vejiga y del esfínter vesical.
- 14) **Prurito.** La intoxicación aguda tiene como finalidad evitar que se produzca la depresión respiratoria.

Se utilizan los antagonistas opiodes. La naloxona es el fármaco de elección. Se administra por vía intravenosa lenta en dosis de 0,4 mg que pueden repetirse, o bien en infusión continua.

7.5.-Interacciones Farmacológicas.

Los inhibidores de la monoaminooxidasa, los neurolepticos, los hipnóticos, el alcohol y los relajantes musculares intensifican los efectos depresores de la morfina y aumentan sus efectos adversos.



02 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

ANDREAE VESALII
BRUXELLENSIS, DE HUMANI CORPO-
RIS FABRICA LIBER SECVNDVS, LIGAMENTIS OMNIBVS,
& Musculis, uoluntarij atque e nostro arbitrato pendentis motus instrumentis
dedicatus, ac propemodum figuras omnes ipsi proprias, ante Caput
contextum, uti nunc subijcitur, spectandas offerens.

1.- Justificación.



a exhaustiva revisión de la bibliografía llevada a cabo nos ha permitido constatar el gran interés que, en los últimos años, ha despertado el estudio de las estructuras descritas por Basbaum y Fields (1984) en su circuito de control endógeno del dolor: la sustancia gris periaqueductal (PAG) y la región más rostral y ventromedial del bulbo (RVM). Este interés se ha traducido en numerosas publicaciones científicas que han abordado el tema desde diferentes puntos de vista, aportando abundante y variada información que ha contribuido a un mayor y mejor conocimiento del papel que tanto la PAG como la RVM juegan en los mecanismos de control y modulación de la transmisión nociceptiva (Basbaum y Fields, 1984; Fields y cols., 1991; Keay y Bandler, 1993; Lovick, 1993; Keay y cols., 1994).

Sin embargo, como también ha quedado patente tras la revisión bibliográfica, cada vez son más los estudios que implican a otros centros nerviosos supraespinales en este control de la transmisión nociceptiva: el núcleo central de la amígdala, el núcleo dorsal del rafe (Wang y Nakai, 1994 y 1995), el núcleo cuneiforme, el locus coeruleus, el núcleo

parabraquial, el área A7, el núcleo del tracto solitario (Ammons y cols., 1983; Palkovits y cols., 1987; Randich y cols., 1988; Morgan y cols., 1989; Yew y cols., 1990; Hammond y cols., 1992; Wiertelak y cols., 1997), etc. De entre todos ellos, hemos elegido como objeto de estudio de la presente tesis doctoral la porción lateral del núcleo parabraquial (PB), por ser la estructura central de los denominados “circuitos parabraquiales” (Gauriau y Bernard, 2002), responsables de los componentes emocional, autonómico y neuroendocrino del dolor.

Aunque actualmente se ha avanzado significativamente en el estudio de esta estructura pontina, quedan todavía numerosos aspectos por analizar en relación al papel que el PB puede desempeñar en el control del dolor, en concreto, en el papel que puede jugar en el mecanismo de acción de los diferentes fármacos analgésicos, y más específicamente, en el mecanismo de acción del metamizol, el cual permanece, en gran medida, sin clarificar.

Esta situación se ha visto favorecida por el hecho de que la mayoría de estudios han sido llevados a cabo en animales anestesiados. Bajo estas condiciones, tanto los impulsos excitadores o inhibidores como las respuestas neuronales, pueden verse afectados de forma importante dependiendo del anestésico empleado así como de la dosis administrada.

Para evitar el problema de la anestesia se han propuesto distintas técnicas que permiten detectar los cambios metabólicos en el sistema nervioso central inducidos por estímulos nociceptivos.

Una de estas técnicas es el método de la 2-desoxiglucosa (2-DG) (Sokoloff *y cols.*, 1977), basado en la medición de la glucosa utilizada localmente en el encéfalo (para revisión ver Porro y Cavazzuti, 1993). Porro *y cols.* (1991a y b) estudiaron con esta técnica las variaciones en el consumo de glucosa, en 35 estructuras a lo largo de todo el sistema

nervioso central, producidas por la aplicación de un estímulo nociceptivo como es el test de la formalina.

Este método de la 2-DG, tiene la ventaja de que puede ser aplicado en animales no anestesiados pero, tiene también algunos inconvenientes como son la falta de resolución celular y la incompatibilidad con otras técnicas neuroanatómicas.

Estos problemas se solventan con una de las últimas técnicas desarrollada con el fin de describir el patrón de células que responden ante determinados estímulos: el estudio de genes de expresión inmediata, y más concretamente, el estudio de la expresión del proto-oncogen *c-fos* (Morgan y Curran, 1991).

Como ya se ha comentado en la introducción de este trabajo, son numerosos los estudios que confirman la validez de esta técnica como marcador de actividad neuronal (Hunt *y cols.*, 1987; Sagar *y cols.*, 1988; Menétrey *y cols.*, 1989; Dragunow y Faull, 1989; Bullit, 1990; Sandkühler, 1991; Munglani y Hunt, 1993).

En base a todo lo mencionado anteriormente, evidenciamos la falta de un estudio completo de la expresión de *c-fos* en la porción lateral del PB, en ratas no anestesiadas, tras un estímulo tanto nociceptivo como antinociceptivo.

Asimismo, también nos propusimos evaluar las posibles alteraciones que sobre esta expresión pudiera ejercer la administración previa de una sustancia analgésica. Los dos analgésicos que decidimos utilizar fueron la *morfina*, (tercer escalón analgésico de la OMS) y el *metamizol o dipirona*, (primer escalon analgésico de la OMS). La primera, es el principal alcaloide del opio, ha sido utilizada clásicamente como sustancia analgésica patrón

con la que comparar el efecto analgésico de otras drogas con supuestas propiedades terapéuticas antinociceptivas (Presley *y cols.*, 1990; Abbadie y Besson, 1993; Abram y Olson, 1994; Tölle *y cols.*, 1994a y b; Traub *y cols.*, 1995; Tseng y Collins, 1995; Jourdan *y cols.*, 1997). El metamizol, anteriormente llamado dipirona, es una de las sustancias con propiedades analgésicas más utilizada en nuestro país. Es un analgésico de probada eficacia clínica y escasos efectos indeseables, perteneciente al grupo de derivados de la pirazolona (Rull Bartomeu, 1993), cuyo mecanismo de acción a nivel central sigue sin aclararse.

Primer escalón Analgésicos periféricos	Segundo escalón Opiáceos débiles	Tercer escalón Opiáceos potentes
AINE, paracetamol, metamizol	Codeína, dihidrocodeína, tramadol	Morfina, fentanilo, metadona

Tabla 2.1.- Escala analgésica de la OMS

Estudios previos han intentado profundizar en esta cuestión encontrando evidencias de la actividad del metamizol tanto a nivel periférico (Ferreira *y cols.*, 1978; Abbate *y cols.*, 1990; Rull Bartomeu, 1993; Shimada *y cols.*, 1994) como a nivel central, ya sea medular (Neugebauer *y cols.*, 1994; Selve *y cols.*, 1996) o supraespinal (Carlsson *y cols.*, 1986; Carlsson y Jurna, 1987; Carlsson *y cols.*, 1988; Tortorici y Vanegas, 1994; Jones, 1996; Akman *y cols.*, 1996; Tortorici *y cols.*, 1996; Vanegas *y cols.*, 1997; Beirith *y cols.*, 1998). Ninguno de ellos, sin embargo, ha centrado su estudio en el PB, por lo que el papel específico que el metamizol podría desempeñar en este centro troncoencefálico permanece actualmente sin haber sido suficientemente estudiado.

2.- Objetivos.



la vista de los antecedentes expuestos, los objetivos que nos planteamos fueron los siguientes:

- 1) Evaluar el efecto que sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB tendría la aplicación de un estímulo nociceptivo tanto somático superficial como visceral.** Como modelo de dolor somático superficial emplearemos el *test de la formalina*, consistente en la inyección subcutánea en la planta trasera de 0,05 ml de formalina al 5% (Dubisson y Dennis, 1977), mientras que como modelo nociceptivo visceral usaremos el *test de las contracciones abdominales*, consistente en una inyección de ácido acético al 3,5% intraperitoneal (Taber y cols., 1969). De esta manera podríamos obtener información acerca de la participación de la porción lateral del PB en los circuitos de transmisión nociceptiva, tanto somática superficial como visceral.

- 2) Evaluar el efecto que sobre la expresión de Fos en el PB tendría la aplicación de un estímulo antinociceptivo.** Para ello, se optó por la administración por vía parenteral (intraperitoneal) tanto de morfina (10 mg/kg) como de metamizol (500 mg/kg), dos de los analgésicos más usados en la actualidad. De esta manera podríamos obtener información acerca de la participación directa del PB en el circuito analgésico endógeno.

- 3) Evaluar el efecto que tendría la aplicación de un estímulo antinociceptivo de forma previa a la aplicación de un estímulo nociceptivo sobre la expresión de Fos en el PB.** Para ello, se optó por la administración por vía parenteral tanto de morfina como de metamizol de forma previa a la aplicación del estímulo nociceptivo (somático superficial

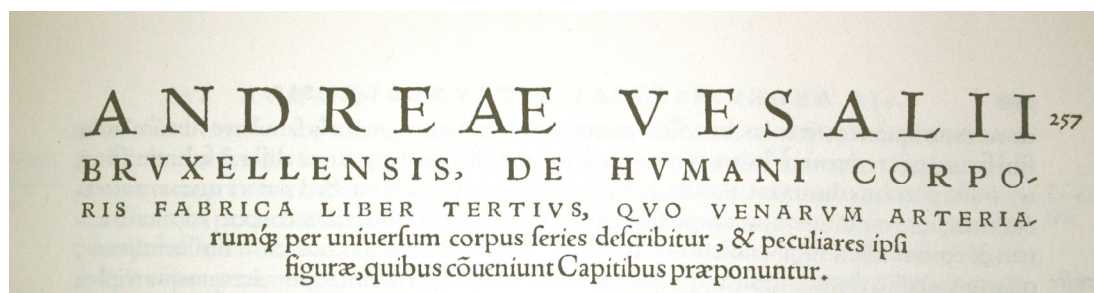
o visceral). De esta manera podríamos obtener información acerca de la participación indirecta del PB en el circuito analgésico endógeno.

Este trabajo de experimentación pretende profundizar, por tanto, en el *papel que la porción lateral del PB puede ejercer tanto en el circuito nociceptivo como en el analgésico*, así como en el conocimiento de las bases anatómicas sobre las que se asienta el *efecto analgésico producido por el metamizol*, con el objetivo de aportar nuevos datos que puedan ser de utilidad en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas como la analgesia preventiva o las combinaciones farmacológicas a base de morfina y metamizol.

SECUNDA
MUSCULO.
RUM TA
BULA.



03 MATERIAL Y MÉTODOS



1.- Animal de Experimentación.



l presente trabajo se llevó a cabo en 45 ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley, machos, de peso aproximado de 250g (Fig. III-1).

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio durante al menos una semana antes del comienzo de la experimentación: ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad (la luz se encendía a las 8:00 a.m. y se apagaba a las 8:00 p.m.), temperatura (15°C) y humedad constantes, dieta estándar y libre acceso a la comida y el agua.



Fig. 3.1.- Rata macho de la cepa Sprague-Dawley procedente de la Unidad Mixta de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

2.-Grupos Experimentales.



os 45 animales se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales:

1) **Grupo Control Simulado** (CS) (n=5): Los animales de este grupo fueron acostumbrados a las maniobras de manipulación que posteriormente pudieran ser necesarias durante el experimento. Estas manipulaciones fueron las siguientes:

- Sacar de la jaula al animal y pesarlo.
- Inmovilizar al animal, durante 5 segundos, abrazándolo con una mano por debajo de las patas delanteras al tiempo que se le cruzaban en aspa por delante de la cara, y con la otra sujetándole de la cola.

Esta maniobra de inmovilización se le practicó dos veces a cada animal: la primera al terminar de pesarlo, y la segunda media hora después. Durante la primera inmovilización se inyectaría intraperitonealmente (i.p.) 1 ml de suero salino. Entre una inmovilización y otra los animales permanecieron en sus respectivas jaulas. Los animales fueron sacrificados a las 2 horas y media de la inyección i.p. de suero salino, es decir, a las 2 horas de la segunda inmovilización.

La finalidad de este grupo fue descartar que ni el estrés por la inmovilización, ni el posible dolor derivado de la inyección i.p., ni tan siquiera la distensión abdominal por la introducción de un volumen de 1 ml i.p., diesen un patrón de expresión de Fos en el PB que pudiera enmascarar la expresión de Fos inducida por el estímulo aplicado, ya fuera éste analgésico o doloroso.

2) **Grupo Control Morfina** (CM) (n=5): Además de las maniobras de manipulación, las ratas de este grupo recibieron, el día del

experimento, una inyección i.p. de 1 ml, correspondiente a una dosis de morfina de 10 mg/kg (Presley *y cols.*, 1990) durante la primera inmovilización, es decir, 2 horas y media antes del sacrificio.

3) **Grupo Control Metamizol** (CN) (n=5): Idéntico al anterior a excepción del estímulo farmacológico que en este grupo consistió en una inyección i.p. de 1 ml, correspondiente a una dosis de 500 mg/kg de metamizol. Al igual que en el grupo CM los animales fueron sacrificados 2 horas y media después del estímulo analgésico.

4) **Grupo Dolor Somático** (DS) (n=5): Los animales de este grupo recibieron, al igual que los del grupo CS 1 ml de suero salino i.p. durante la primera inmovilización. Pero, a diferencia de éstos, les fue aplicado, además, un estímulo doloroso somático superficial durante la segunda inmovilización, es decir, a los 30 minutos de la inyección i.p. de suero salino. Los animales fueron sacrificados a las 2 horas del estímulo doloroso.

En este grupo, el estímulo nociceptivo somático superficial se consiguió aplicando a los animales el **test de la formalina** (Dubuisson y Dennis, 1977) que consiste en administrar 0,05 ml s.c. de formalina al 5% en la planta de la pata trasera derecha.

5) **Grupo Dolor Visceral** (DV) (n=5): Similar al grupo DS, con la única diferencia del tipo de estímulo doloroso aplicado durante la segunda inmovilización. Mientras que en el grupo DS se aplicó un estímulo nociceptivo somático superficial, a los animales de este grupo DV el estímulo nociceptivo que se les aplicó fue visceral.

Ello se consiguió mediante el **test de las contracciones abdominales** (Taber *y cols.*, 1969; Hammond *y cols.*, 1992; Keay *y cols.*, 1994; Clement *y cols.*, 1996; Rodella *y cols.*, 1998)

consistente en una inyección i.p. de 0,5 ml de ácido acético diluido al 3,5%. Al igual que en el grupo DS los animales fueron sacrificados 2 horas y media después del estímulo analgésico.

6) Grupo Morfina+Dolor Somático (MS) (n=5): Los animales de este grupo recibieron 1 ml de analgésico i.p. durante la primera inmovilización (10 mg/kg de morfina) y un estímulo doloroso somático superficial durante la segunda inmovilización (test de la formalina), es decir, a los 30 minutos de la inyección i.p. del analgésico. Los animales fueron sacrificados a las 2 horas del estímulo doloroso.

7) Grupo Metamizol+Dolor Somático (NS) (n=5): Los animales de este grupo recibieron 1 ml de analgésico i.p. durante la primera inmovilización (500 mg/kg de metamizol) y un estímulo doloroso somático superficial durante la segunda inmovilización (test de la formalina), es decir, a los 30 minutos de la inyección i.p. del analgésico. Los animales fueron sacrificados a las 2 horas del estímulo doloroso.

8) Grupo Morfina+Dolor Visceral (MV) (n=5): Los animales de este grupo recibieron 1 ml de analgésico i.p. durante la primera inmovilización (10 mg/kg de morfina) y un estímulo doloroso visceral durante la segunda inmovilización (test de las contracciones abdominales), es decir, a los 30 minutos de la inyección i.p. del analgésico. Los animales fueron sacrificados a las 2 horas del estímulo doloroso.

9) Grupo Metamizol+Dolor Visceral (NV) (n=5): Los animales de este grupo recibieron 1 ml de analgésico i.p. durante la primera inmovilización (500 mg/kg de metamizol) y un estímulo doloroso visceral durante la segunda inmovilización (test de las

contracciones abdominales), es decir, a los 30 minutos de la inyección i.p. del analgésico. Los animales fueron sacrificados a las 2 horas del estímulo doloroso.

La manipulación de los animales se hizo siguiendo las recomendaciones éticas para la investigación sobre dolor experimental en animales conscientes (Zimmermann, 1983), siendo todo el procedimiento aprobado por el Comité Ético de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

Grupo Experimental	Clave	Número de Animales	Manipulaciones	Estímulo Analgésico		Estímulo Doloroso	
				Morfina (mg/kg)	Metamizol (mg/kg)	Somático (test de formalina)	Visceral (test de formalina)
Control Simulado	CS	5	SÍ	NO	NO	NO	NO
Analgesia Morfina	CM	5	SÍ	10	NO	NO	NO
Analgesia Metamizol	CN	5	SÍ	NO	500	NO	NO
Dolor Somático	DS	5	SÍ	NO	NO	0,05 ml (s.c.)	NO
Dolor Visceral	DV	5	SÍ	NO	NO	NO	0,5 ml (i.p.)
Morfina Dolor Somático	MS	5	SÍ	10	NO	SÍ	NO
Metamizol Dolor Somático	NS	5	SÍ	NO	500	SÍ	NO
Morfina Dolor Visceral	MV	5	SÍ	10	NO	NO	SÍ
Metamizol Dolor Visceral	NV	5	SÍ	NO	500	NO	SÍ

Tabla 3.1.- Resumen global de la casuística.

3.- Anestesia y Perfusión.



odos los animales fueron sacrificados a las 2 horas de la segunda inmovilización, lo que siempre ocurrió dentro de la franja horaria de las 16:30 h y las 17:30 h. Llegada la hora del sacrificio el animal recibía una sobredosis i.p. de *pentobarbital* (120

mg/kg), comenzándose con las maniobras propias del proceso de perfusión una vez se comprobaba que el animal estaba profundamente anestesiado (ausencia de reflejo corneal), y con el corazón todavía latiendo.

Todo el proceso de anestesia y perfusión en ningún caso sobrepasó los 15 minutos de duración, para evitar la inducción iatrogénica de *c-fos* por efecto de la manipulación o de la propia anestesia (Herdegen *y cols.*, 1991; Takayama *y cols.*, 1994).

La perfusión se inició en todos los casos con un lavado del árbol vascular con *suero salino isotónico heparinizado* (15.000 UI/litro), para, seguidamente introducir la solución fijadora. El acceso se logró mediante una incisión cutánea en forma de T invertida, formada por un corte longitudinal en la línea media de la cara ventral del tórax y otro perpendicular y tangencial al borde inferior del peto costal anterior, de forma que la piel fue rechazada hacia los lados de la línea media. A continuación, se seccionó transversalmente la pared abdominal anterior para acceder, a través de la cavidad peritoneal, a la cara inferior del diafragma. Posteriormente, se seccionó también el diafragma y el peto costal anterior, siguiendo en este último proceder, las dos líneas medioclaviculares y el colgajo esternocostal resultante fue rechazado en dirección superior. De esta forma, quedaron expuestos el corazón y los grandes vasos. Por último, se colocó la punta de la cánula en la salida de la aorta, accediendo a través del ventrículo izquierdo.

A continuación se procedió al lavado del árbol vascular con suero salino heparinizado. La pared de la aurícula derecha se cortó para permitir la salida del retorno venoso. El lavado se prolongó hasta que las venas yugulares externas, previamente expuestas, se observaron limpias y el hígado suficientemente pálido, para lo que fue necesaria la utilización de 100-200 ml de suero. La perfusión se realizó utilizando

una *solución fijadora* formada por tampón fosfato (PB, Panreac) y paraformaldehído (Panreac) al 4%.

Tanto el suero salino como la solución fijadora fueron introducidos en el árbol vascular a velocidad constante con ayuda de una bomba de perfusión.

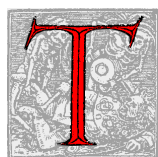
Finalizado el proceso de perfusión, los animales fueron decapitados, y se procedió al descalote y extracción del cerebro. Para ello, se incidió y se retiró la piel y periostio que cubre el cráneo mediante una incisión longitudinal en la línea media. Una vez expuesta toda la superficie del cráneo correspondiente al hueso occipital y los dos parietales, se retiraron los elementos óseos en pequeños fragmentos mediante unas pinzas, con cuidado de no lesionar el cerebro.

4.- Obtención de los Cortes.



Los cerebros se conservaron a 4°C en la misma solución fijadora hasta el día siguiente. Transcurrido ese tiempo, se pasaron a una solución crioprotectora formada por PB con cloruro sódico (Panreac) al 0,9% (PBS) 0,01M (pH 7.4) y sacarosa (Panreac) al 30%, en la cual permanecieron 24 horas. Una vez crioprotegidas, las piezas fueron congeladas y seccionadas con un *criostato* en cortes coronales de 40µm de grosor recogidos en seis series equivalentes que permanecieron congeladas en solución crioprotectora hasta que fueron empleadas.

5.- Revelado Inmunocitoquímico del Proto-oncogén c-fos.



Tras tres lavados con PBS para eliminar la sacarosa, procedimos a la *detección inmunocitoquímica* de la proteína codificada por el proto-oncogén objeto de nuestro estudio, c-fos, por el *método del ABC* (Hsu y cols., 1981). Los cortes pasarán por sucesivas soluciones (Valverde-Navarro y cols., 1996), que resumimos a continuación:

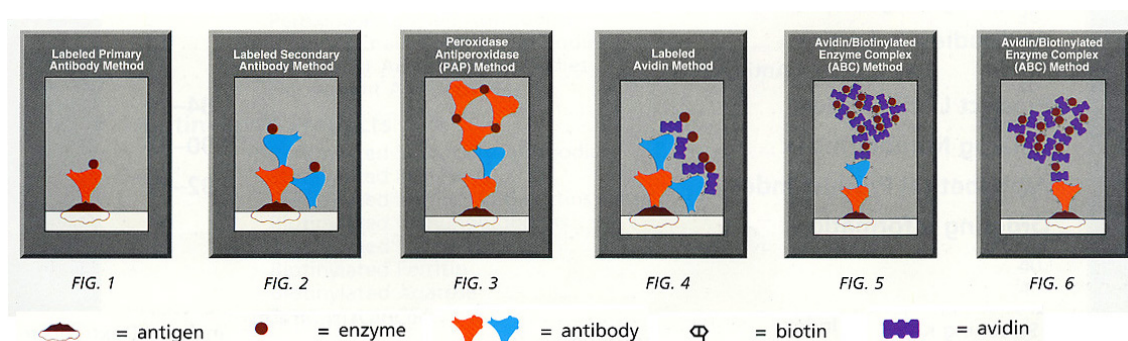


Fig. 3.2.- Esquema que recoge los principales métodos de detección inmunocitoquímica de antígenos.

1) 30 minutos en PBS con 1% de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , Sigma), para reducir o inhibir las peroxidasas endógenas.

2) 2 horas en PBS con un 0,1% de tritón X-100 (PBS-T, Sigma), para facilitar la penetración de los anticuerpos a través de las membranas celulares, y con un 3% de suero normal de conejo (NRS, Vector) para evitar el marcaje inespecífico.

3) 48-72 horas en PBS-T con el anticuerpo primario anti-c-Fos (en dilución 1:2000, Sigma-Genosys) y un 1,5% de NRS.

4) 2 horas en PBS con anticuerpo de conejo biotinizado anti-IgG de oveja (en dilución 1:200, Vector).

5) 90 minutos en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector)

6) el proceso de revelado se llevó a cabo con una solución en tampón Tris 0,05M (pH 8.00, Sigma) con diaminobenzidina al 0,025%

(Sigma), sulfato de amonio y níquel (NiNH_4SO_4 , Aldrich) al 0,1%, para intensificar la reacción y 0,01% de H_2O_2 . Los cortes se dejaron flotar en esta solución hasta que la inmunorreacción se hizo visible al microscopio óptico (2-3 minutos). El proceso se detuvo añadiendo un exceso de tampón Tris a la solución y, a continuación, lavando con PBS un par de veces. Los cortes se lavaron tres veces con PBS entre cada uno de los pasos.

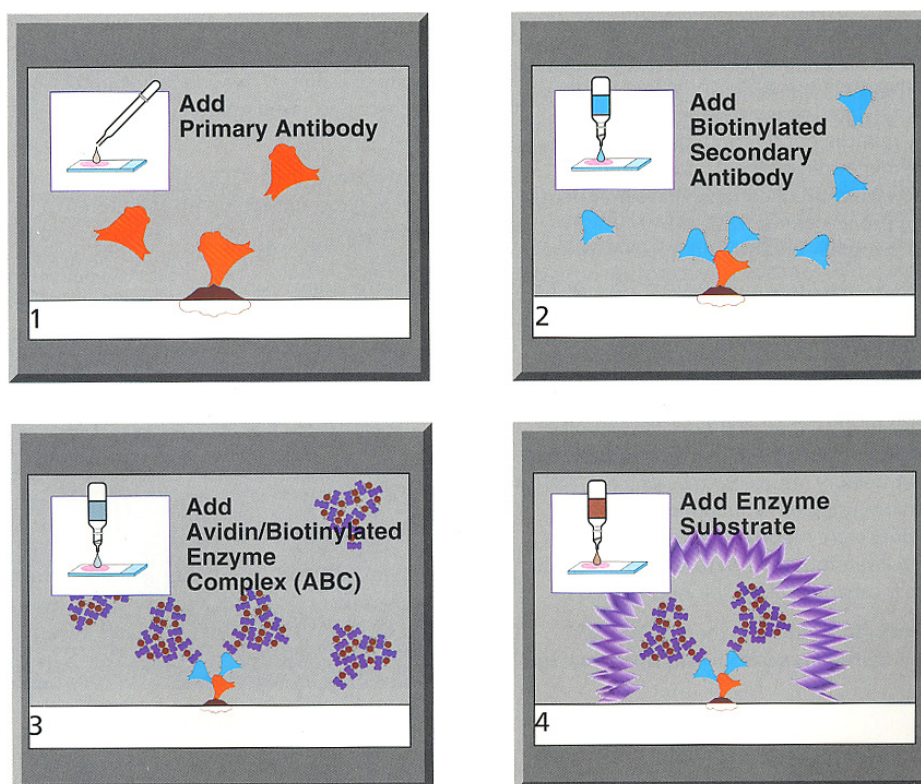


Fig. 3.3.- Esquema que reproduce la secuencia de pasos necesarios para la detección inmunocitoquímica de una proteína mediante el método del ABC.

6.- Montaje de los Cortes.



El montaje de los cortes se llevó a cabo sobre portas gelatinizados con una solución de gelatina al 0,5% (Panreac) y alumbre de cromo al 0,05% (Panreac). Se dejaron secar durante toda la noche a temperatura ambiente, y al día siguiente,

fueron deshidratados en diluciones crecientes de etanol (70°, 96° y 100°, Panreac), aclarados con xilol (Panreac) y cubiertos con Merckoglas (Merck).

7.- Selección de los Niveles de Estudio.



se seleccionaron cortes correspondientes a los niveles rostral, intermedio y caudal del PB. La selección se hizo con ayuda del atlas de Paxinos y Watson (2005). Los tres niveles del PB escogidos en nuestro estudio se localizaron a nivel del tronco de encéfalo: a -8.76, -9.00 y -9.24 mm de Bregma.

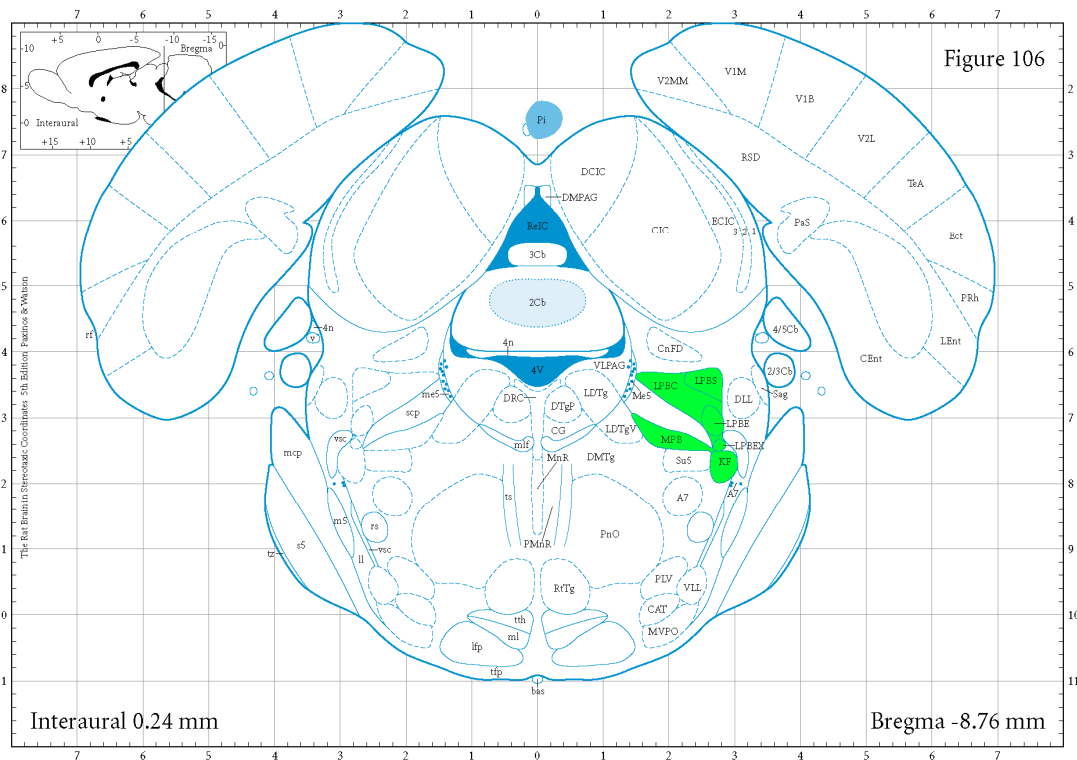


Fig. 3.4.- Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -8.76 mm, en el que se puede localizar el tercio ROSTRAL del núcleo parabraquial (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson, 2005).

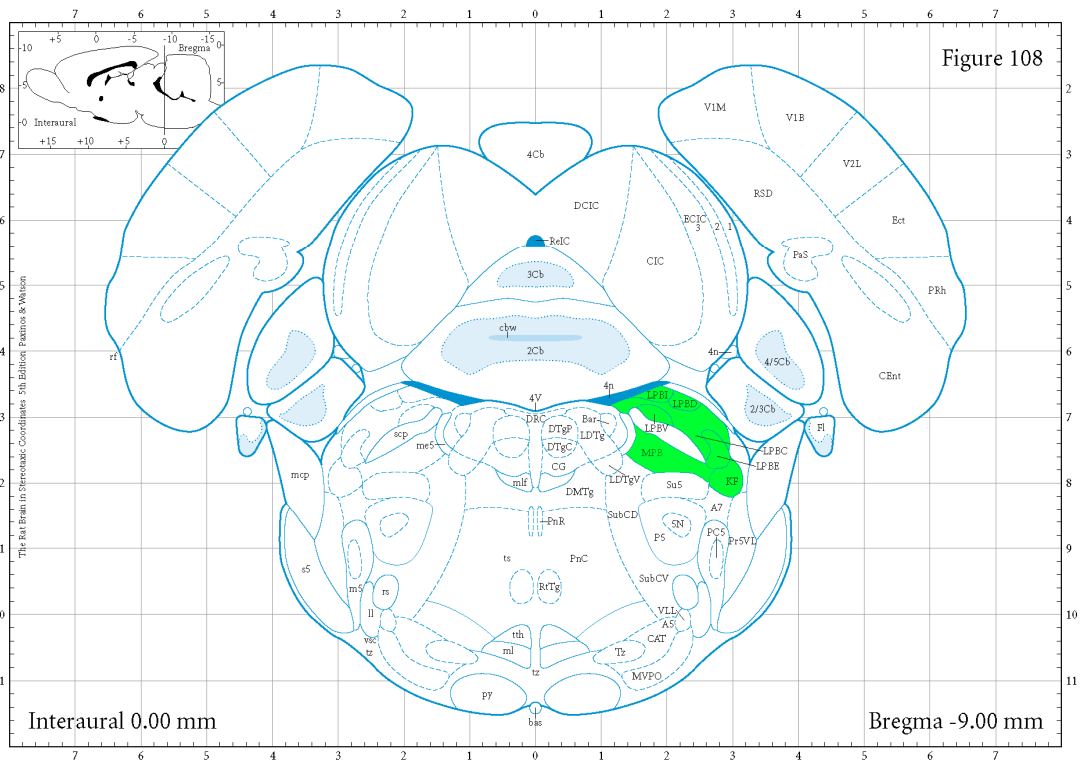


Fig. 3.5.- Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -9.00 mm, en el que se puede localizar el tercio INTERMEDIO del núcleo parabraquial (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson, 2005).

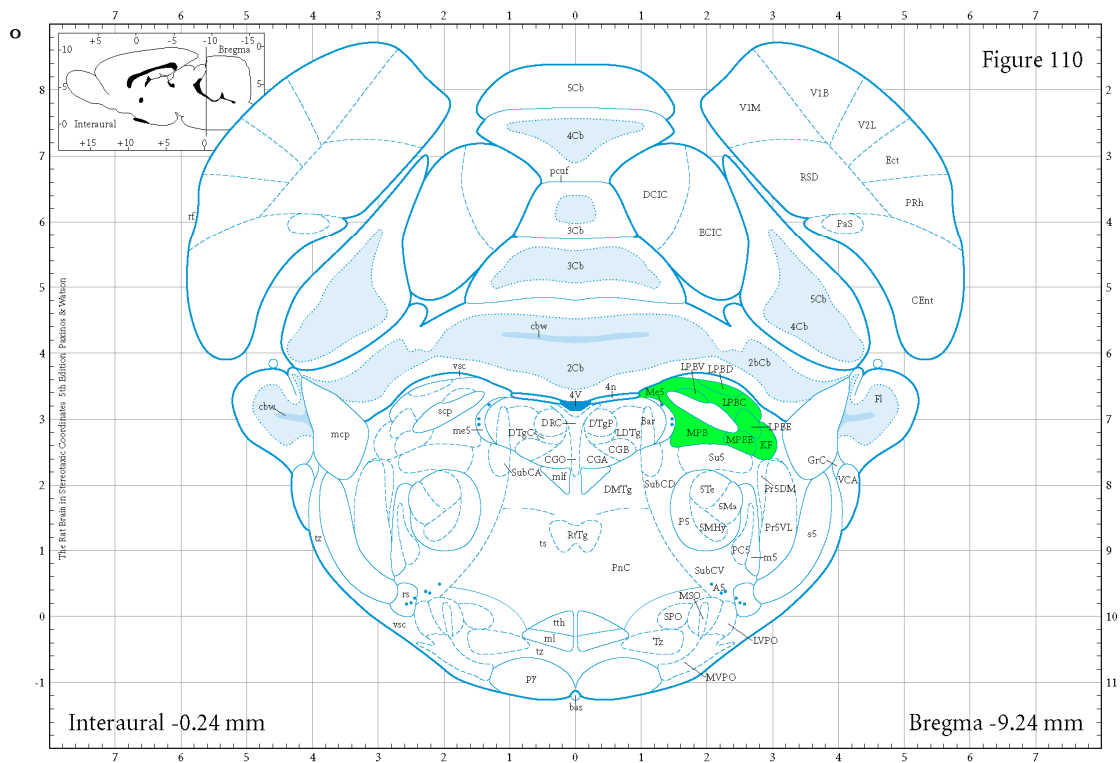


Fig. 3.6.- Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -8.76 mm, en el que se puede localizar el tercio CAUDAL del núcleo parabraquial (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson, 2005).

8.- Protocolo para la Tinción de los Cortes con Violeta de Cresilo (Tinción de Nissl).



ado que en el estudio posterior de los dibujos obtenidos, correspondientes al PB, uno de los parámetros a tener en cuenta será la obtención del patrón de distribución de las neuronas Fos-positivas en relación a los subnúcleos descritos previamente en la literatura (Fulwiler y Saper,1984; Hermanson y Blomqvist, 1996), deberemos poder delimitar, previamente, cada uno de los subnúcleos en los cortes empleados para la detección inmunocitoquímica de Fos.

Para ello, una serie de cortes, paralela a la empleada para la detección inmunohistoquímica de Fos, se tiñó con violeta de cresilo (tinción de Nissl). Esta tinción permite apreciar las características citoarquitectónicas de las neuronas (forma, tamaño, patrón de tinción citoplasmática y nuclear,...), y de esta forma delimitar los diferentes subnúcleos en que se organiza el PB a lo largo de su extensión rostrocaudal.

Tras tres lavados con PBS para eliminar la sacarosa, los pasos a seguir son los siguientes:

- 1) Hidratar los cortes en diluciones decrecientes de etanol (100°, 96° y 70°).
- 2) Incubar los cortes en una solución de violeta de cresilo al 0,016% (16 mg/100 ml) en tampón acetato 0,1M, pH 3,6, durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Parar la reacción con un lavado breve en alcohol de 70°.
- 4) Deshidratar los cortes en diluciones crecientes de etanol (70°, 96° y 100°).

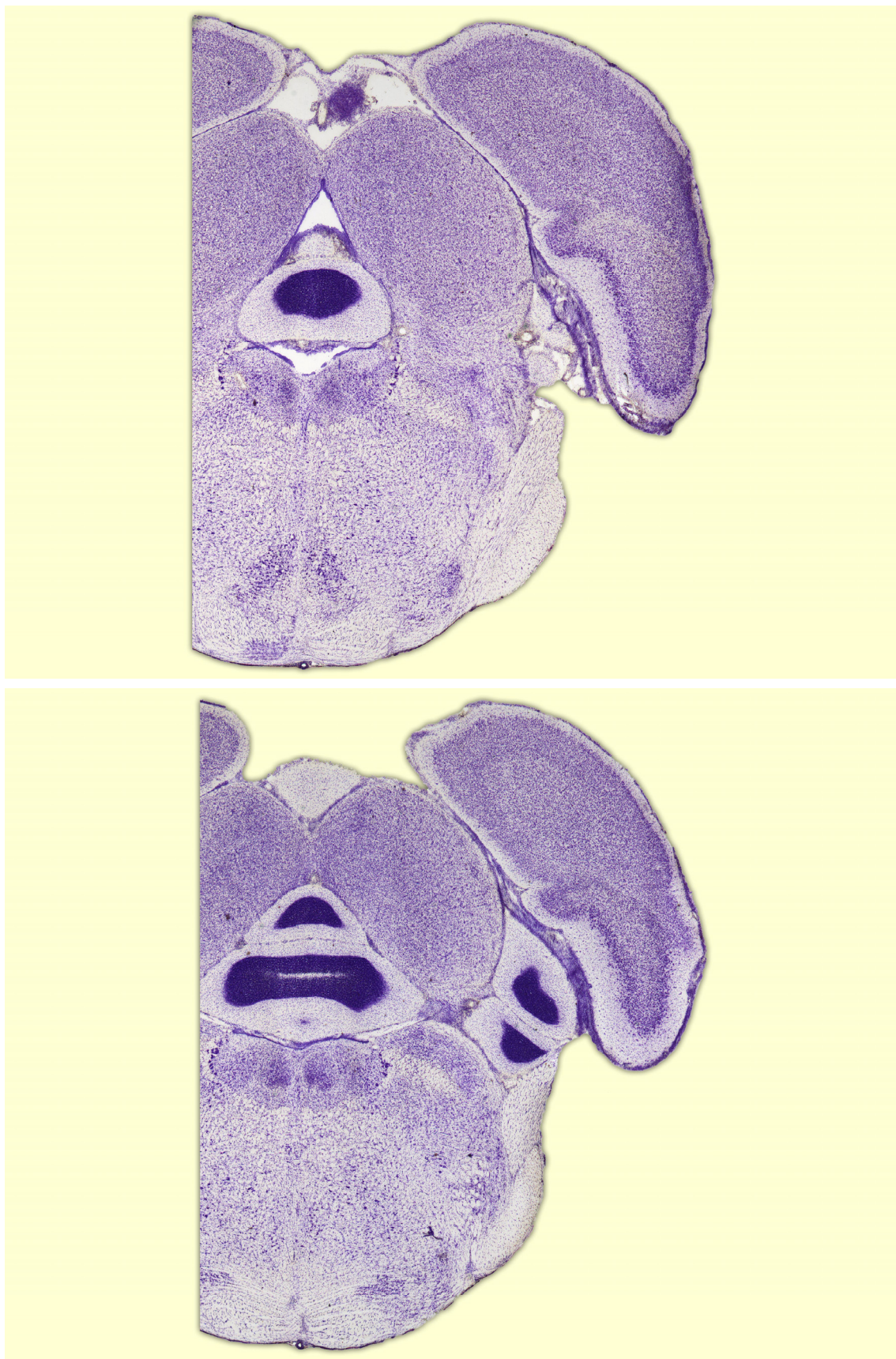


Fig. 3.7.- Microfotografías que muestran el PB con la técnica de Nissl en A) a nivel de 8.76 mm por detrás de Bregma y B) a nivel de 9.00 mm por detrás de Bregma (tomado del atlas de Paxinos y Watson, 2005).

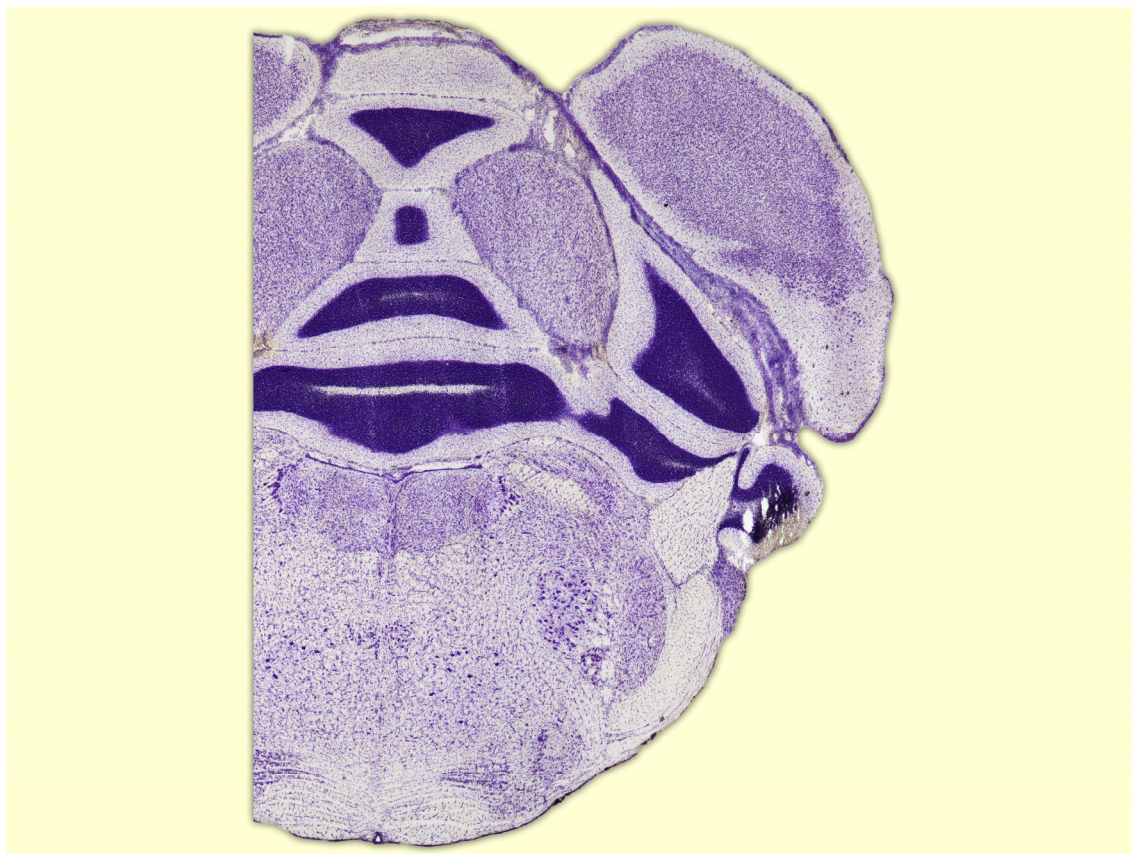
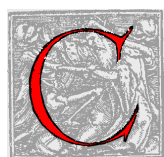


Fig. 3.8.- Microfotografías que muestran el PB con la técnica de Nissl a nivel de 9.24 mm por detrás de Bregma (tomado del atlas de Paxinos y Watson, 2005).

9.-Protocolos para el Estudio Histoquímico del PB.



Con el fin de obtener más datos acerca de la subdivisión del PB en subnúcleos, completamos un estudio citoarquitectónico con un estudio histoquímico que incluyó la detección de la NADPH-diaforasa y la acetilcolinesterasa.

9.1.- Protocolo para la detección histoquímica de la NADPH-diaforasa (NADPHd).

Tras tres lavados con PBS para eliminar la sacarosa, los pasos a seguir son los siguientes:

- 1) Lavar los cortes con PBS 0.01 M con Triton X-100 al 0.1% (PBS-T)
- 2) Incubar los cortes en una solución de PBS-T con β -NADPH (1 mg/ml) y con nitro blue tetrazolium (NBT, 0.2 mg/ml), durante 2-4 horas a 37°C.
- 3) Parar la reacción, tras control bajo microscopio, mediante lavados con PBS.

9.2.- Protocolo para la detección histoquímica de la Acetilcolinesterasa (AChE).

Tras tres lavados con PBS para eliminar la sacarosa, los pasos a seguir son los siguientes:

- 1) Lavar los cortes con una solución tampón de acetato sódico 0.05 M, pH 5.0.
- 2) Incubar los cortes en una solución tampón de acetato sódico 0.05 M, pH 5.0, con un 0.10 % de sulfato de cobre, un 0,12 % de glicina, un 0.116 % de ioduro de S-acetiltiocolina y un 0.003 % de etopropazina.
- 3) Lavar los cortes 3 veces con agua destilada.
- 4) Revelar la reacción incubando los cortes en una solución de ferricianuro potásico al 10 % en agua destilada, durante 10 minutos.
- 3) Parar la reacción, tras control bajo microscopio, mediante lavados abundantes con agua destilada.

10.-Obtención de los Patrones de Distribución de las Neuronas Fos-positivas.



El patrón de distribución de las células inmurreactivas frente a Fos en el PB fue obtenido a partir de dibujos en los que se puntaron manualmente las neuronas Fos-positivas con ayuda de una cámara clara Zeiss acoplada a un microscopio Axioskopp de Zeiss con un objetivo de 20x. Dichos dibujos fueron elaborados por un experimentador desconocedor del grupo experimental al que pertenecían las preparaciones al puntarlas.



Fig. 3.9.- Microscopio Axioskopp de Zeiss con cámara clara acopada.

11.-Obtención de imágenes digitalizadas de las preparaciones.



Las imágenes para el estudio fotográfico fueron capturadas mediante una cámara de vídeo NIKON (Dxm 1200) acoplada un microscopio Nikon Eclipse e600 con luz directa.



Fig. 3.10.- Microscopio Nikon Eclipse e600 con cámara digital Nikon Dxm1200.

12.-Análisis Estadístico de los Datos.



El análisis estadístico de los datos se efectuó con ayuda del programa SPSS versión 15.

12.1.-Análisis Global

El estudio estadístico consistió, en primer lugar, en un *análisis global* de los 9 grupos experimentales.

El análisis global se inició con una *descriptiva* que incluía la media, el número de casos y la desviación típica para las variables originales (los tres niveles, ROSTRAL, INTERMEDIO Y CAUDAL, del PB en los que se realizaron las mediciones). El análisis descriptivo se acompañó con una gráfica de las medias estimadas para cada variable original dentro de cada uno de los 9 grupos experimentales.

A continuación, se efectuó un *análisis de la varianza (ANOVA) de un factor* para las variables, siendo el factor el diferente tratamiento que ha recibido cada uno de los 9 grupos experimentales.

En el caso de que el análisis detectase diferencias entre los grupos, tendría sentido realizar comparaciones múltiples para determinar conjuntos homogéneos de grupos experimentales que compartirían la misma media. Como es sabido, no existe una única técnica para llevar a cabo estas comparaciones, dependiendo el resultado final de la que hayamos empleado. Por esta razón, decidimos utilizar los *métodos de Tukey y Scheffé* que producen situaciones extremas, particularmente este último que, siendo el más conservador, conduce siempre a un menor número de conjuntos homogéneos (Sokal y Rholf, 1995).

12.2.-Análisis Parciales

El análisis estadístico de los datos se completó con varios *análisis parciales* en los que se compararon los resultados de unos grupos concretos y específicos reunidos en base a los diferentes objetivos planteados en la hipótesis de trabajo:

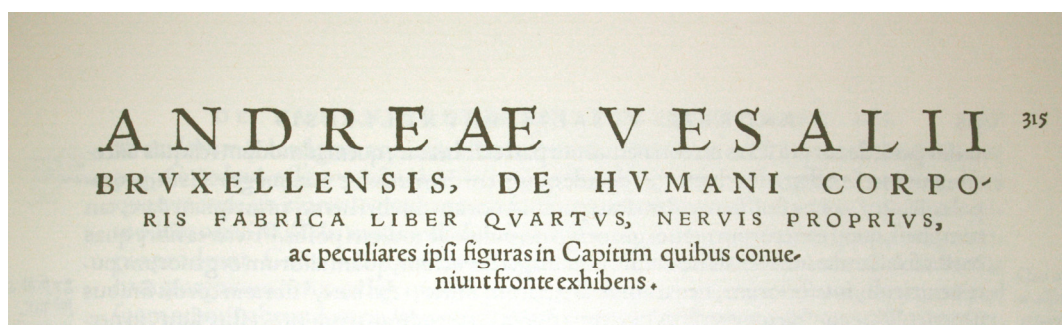
- Análisis Parcial Analgesia: CS, AM y AN.
- Análisis Parcial Dolor: CS, DS y DV.
- Análisis Parcial Analgesia+Dolor Somático: DS, MS y NS.
- Análisis Parcial Analgesia+Dolor Visceral: DV, MV y NV.

Al igual que en el análisis global, en cada uno de los análisis parciales presentamos la descriptiva y el análisis de las varianzas (ANOVA), para finalizar con una representación gráfica de los resultados.

Del mismo modo, en el caso de que el análisis detectase diferencias entre los grupos, realizaríamos comparaciones múltiples para determinar conjuntos homogéneos de grupos experimentales que compartirían la misma media, empleando los *métodos de Tukey y Scheffé* (Sokal y Rholf, 1995).



04 RESULTADOS



1.- Consideraciones Generales.



Antes de pasar a la descripción de los resultados creemos necesario hacer mención de algunos aspectos de carácter técnico y general.

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

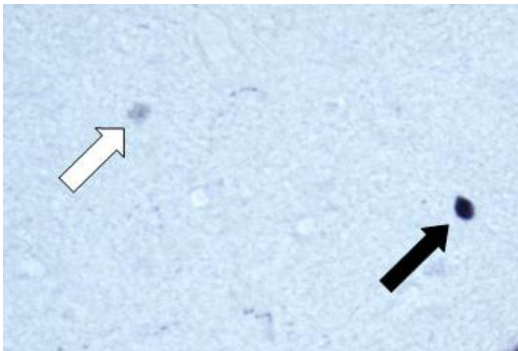


Fig. 4.1.- Microfotografía (40x) de un corte coronal de la SGP de la rata, subregión dorsolateral, a nivel del Bregma -7.64 donde se aprecia células que muestran una fuerte inmunoreactividad frente a fos (flecha negra) y células que muestran una débil inmunoreactividad frente a fos (flecha blanca).

Para nuestro estudio sólo se consideraron aquellas células claramente marcadas. La decisión fue tomada por un investigador que desconocía a qué grupo pertenecían las preparaciones y que mantuvo el mismo criterio de exclusión o inclusión con todos los ejemplares del experimento.

2.- Estudio Descriptivo.

2.1.-Subdivisiones de la porción Lateral del Núcleo Parabraquial



La porción lateral del PB se subdividió para su estudio de acuerdo a criterios citoarquitectónicos, siguiendo la subdivisión propuesta por Fulwiler y Saper (1984). Según estos autores se diferencian hasta 7 subnúcleos en la porción lateral del PB, a lo largo de toda su extensión rostrocaudal. Como no todos los subnúcleos se extienden a lo largo de todo el PB, el estudio se llevó a cabo en secciones coronales representativas del tercio rostral, intermedio y caudal del PB, con el doble objetivo de asegurarnos la inclusión en el estudio de todos los subnúcleos de la porción lateral del PB y de detectar las posibles diferencias rostrocaudales, si las hubiera, en aquellos subnúcleos que se extienden a lo largo de todo el PB. En nuestro estudio, se incluyó, además, en núcleo de Kölliker-Fuse (KF), considerado por numerosos autores como un subnúcleo más del PB y se dejó fuera el subnúcleo extremo lateral por no poder ser identificado con las técnicas empleadas.

De esta forma los subnúcleos a delimitar fueron, según el tercio correspondiente:

1) *En el tercio Rostral:* los subnúcleos superior (slPB), central (clPB), dorsal (dlPB), externo (elPB) y núcleo de Kölliker-Fuse (KF).

2) *En el tercio Intermedio:* los subnúcleos interno (ilPB), central (clPB), dorsal (dlPB), ventral (vlPB), externo (elPB) y núcleo de Kölliker-Fuse (KF).

3) *En el tercio Caudal:* los subnúcleos central (clPB), dorsal (dlPB), ventral (vlPB), externo (elPB) y núcleo de Kölliker-Fuse (KF).

En base a estas premisas procedimos a la realización de estas tres técnicas cito y quimioarquitectónicas (Nissl, NADPHd y AChE) en cortes seriados consecutivos a los procesados para la detección inmunohistoquímica de la proteína Fos, cuyos resultados ofrecemos en las siguientes tres figuras.

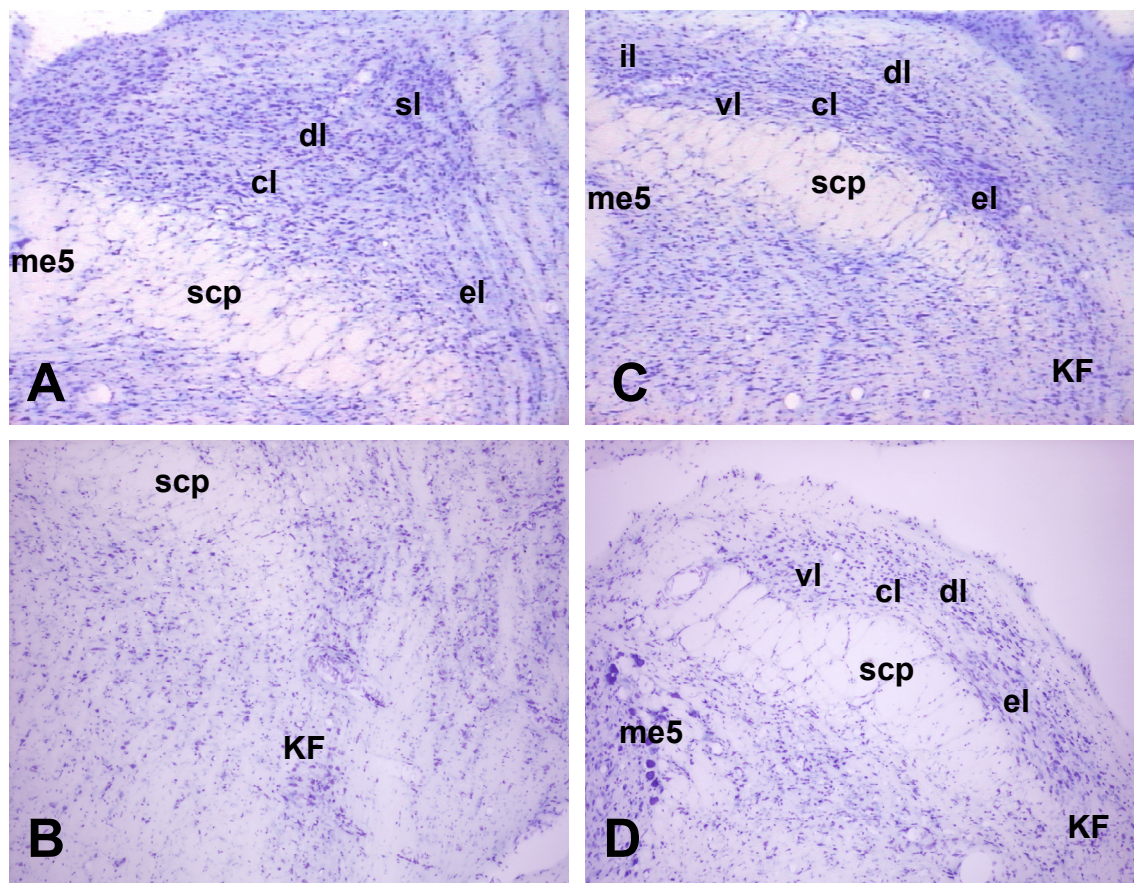


Fig. 4.2.- Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel de la porción lateral del PB de rata, procesados con la técnica de Nissl, en 3 niveles rostrocaudales diferentes: (A) y (B) nivel ROSTRAL; (C) nivel INTERMEDIO; (D) nivel CAUDAL. Subnúcleos superior (sl), interno (il), central (cl), dorsal (dl), ventral (vl) y externo (el) de la porción lateral del PB; núcleo de Kölliker-Fuse (KF); núcleo mesencefálico del trigémino (me5); pedúnculo cerebeloso superior (scp).

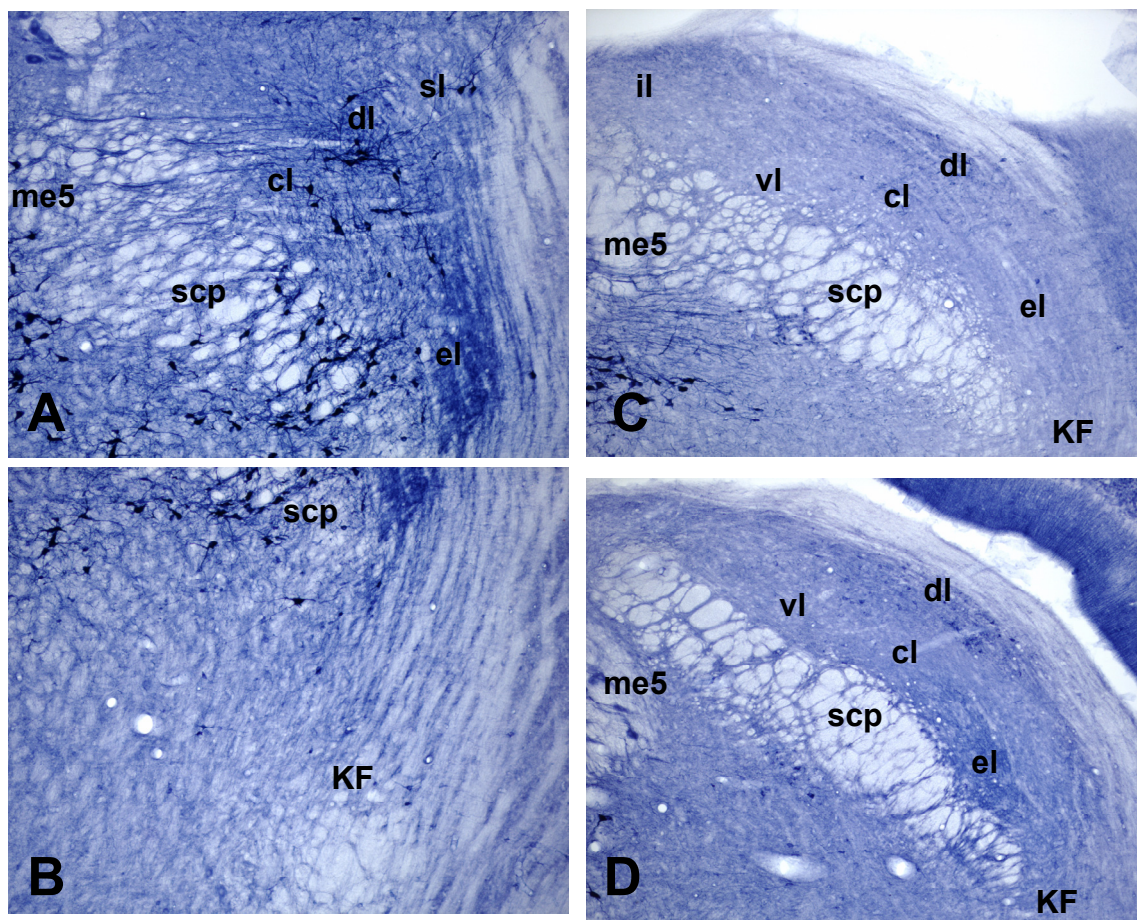


Fig. 4.3.- Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel de la porción lateral del PB de rata, procesados para la detección histoquímica de la enzima NADPH-diaforasa (NADPHd), en 3 niveles rostrocaudales diferentes: (A) y (B) nivel ROSTRAL; (C) nivel INTERMEDIO; (D) nivel CAUDAL. Subnúcleos superior (sl), interno (il), central (cl), dorsal (dl), ventral (vl) y externo (el) de la porción lateral del PB; núcleo de Kölliker-Fuse (KF); núcleo mesencefálico del trigémino (me5); pedúnculo cerebeloso superior (scp).

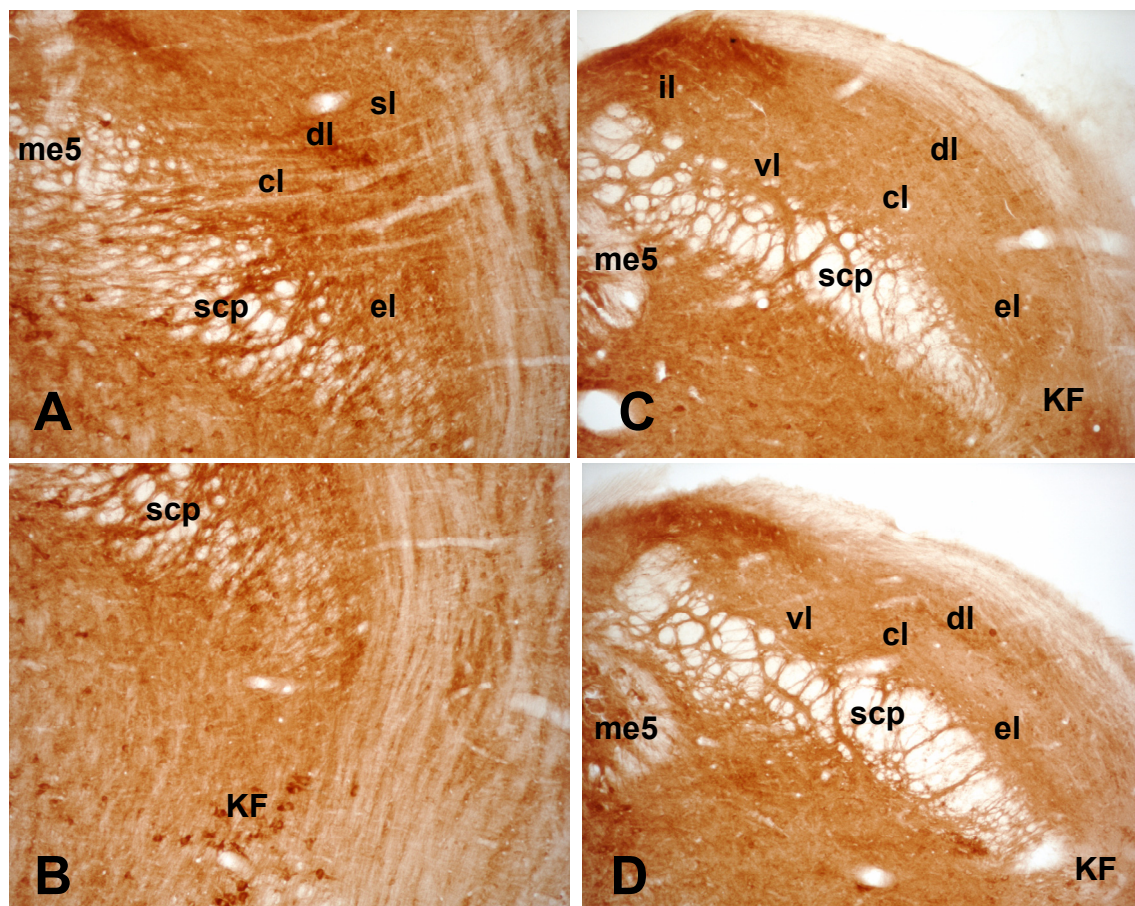


Fig. 4.4.- Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel de la porción lateral del PB de rata, procesados para la detección histoquímica de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), en 3 niveles rostrocaudales diferentes: (A) y (B) nivel ROSTRAL; (C) nivel INTERMEDIO; (D) nivel CAUDAL. Subnúcleos superior (sl), interno (il), central (cl), dorsal (dl), ventral (vl) y externo (el) de la porción lateral del PB; núcleo de Kölliker-Fuse (KF); núcleo mesencefálico del trigémino (me5); pedúnculo cerebeloso superior (scp).

2.2.- Grupo Control Simulado (CS).

Las ratas del grupo control simulado (CS) mostraron escasa inmunorreactividad frente a Fos en la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales estudiados. El discreto marcaje se apreció bilateralmente, sin diferencias entre ambas hemisecciones coronales, fundamentalmente en los subnúcleos superior (slPB), dorsal (dlPB) y externo (elPB) de la porción lateral del PB.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm) las escasas células inmunorreactivas se repartieron de forma uniforme por los subnúcleos slPB, dlPB y elPB de la porción lateral del PB, siendo prácticamente inexistente en el subnúcleo central (clPB) y núcleo de Kölliker-Fuse (KF).

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) las pocas células marcadas también se observaron en los subnúcleos dlPB y elPB, siendo inexistente en los subnúcleos interno (ilPB) y ventral (vlPB), contabilizándose también alguna célula aislada a nivel del KF.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) apenas se contabilizaron elementos Fos-positivos, siendo los subnúcleos dlPB y KF en los únicos que se detectó inmunorreactividad.

	NIVEL ROSTRAL	NIVEL INTERMEDIO	NIVEL CAUDAL
Grupo CS	14±5	10±4	8±3

Tabla 4.1.- Media (\pm Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 μ m de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo control simulado (CS).

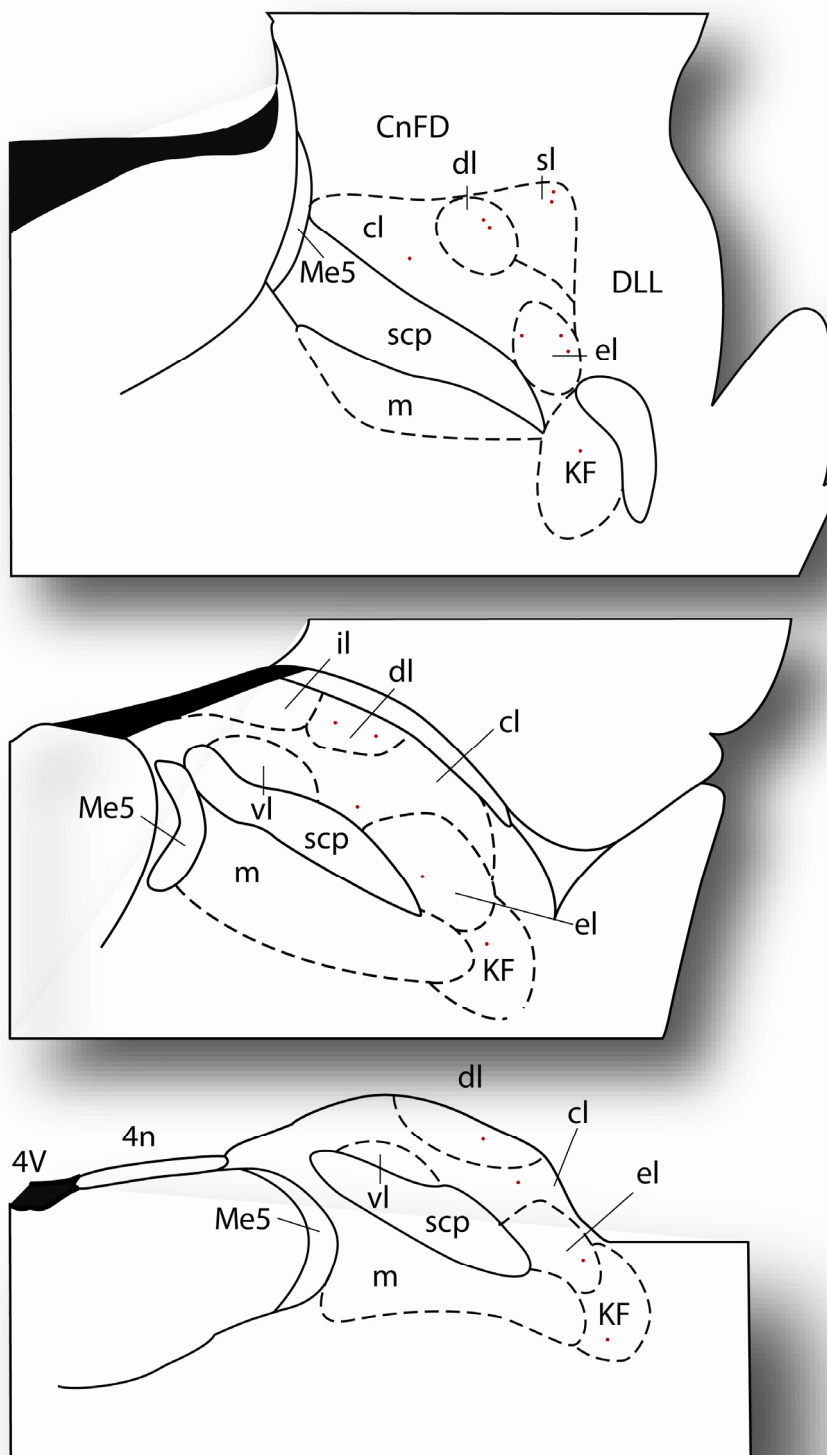


Fig. 4.5.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupo control simulado (CS) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB de rata. (Cada punto equivale a 2 células Fos-positivas).

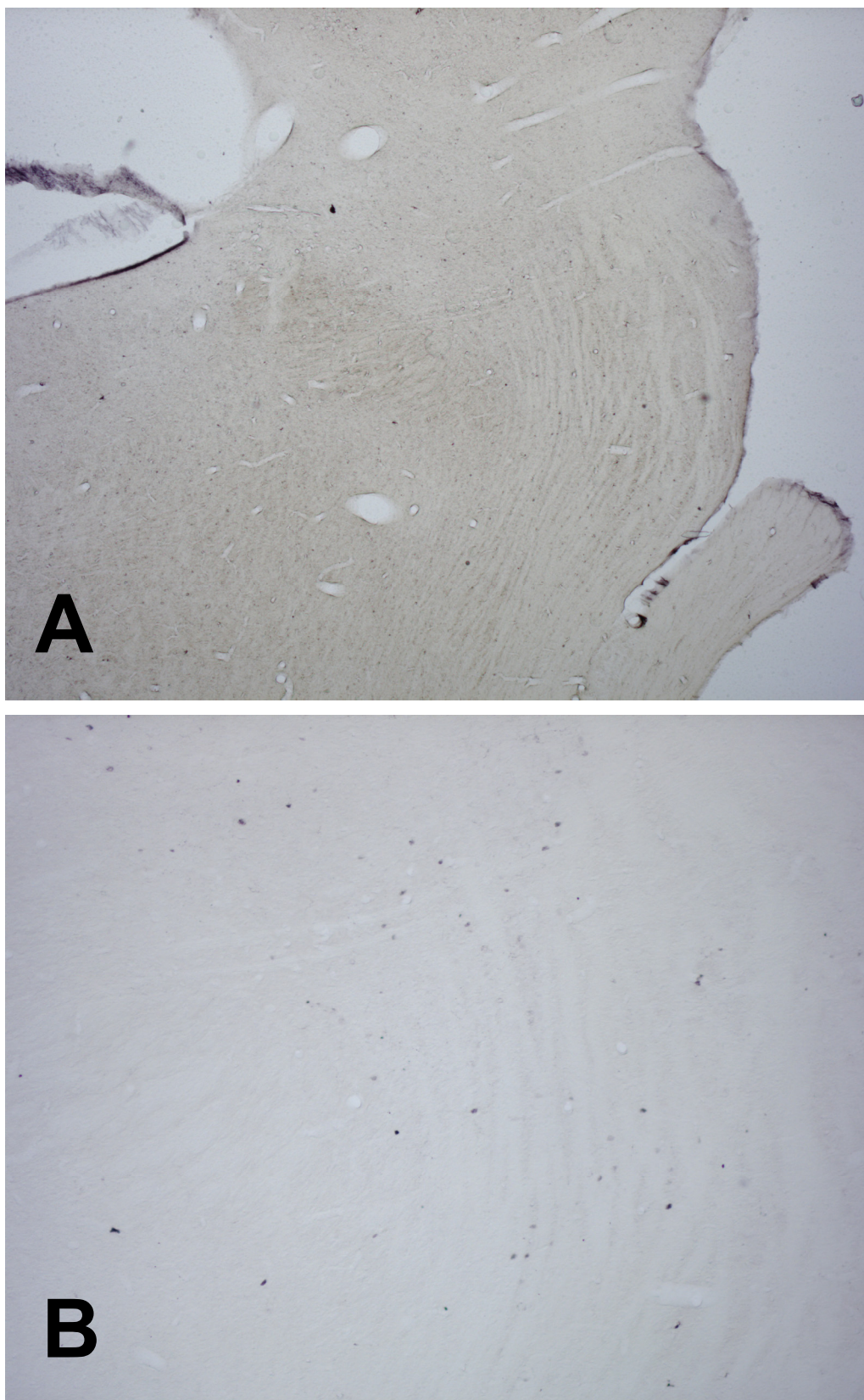


Fig. 4.6.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control simulado (CS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

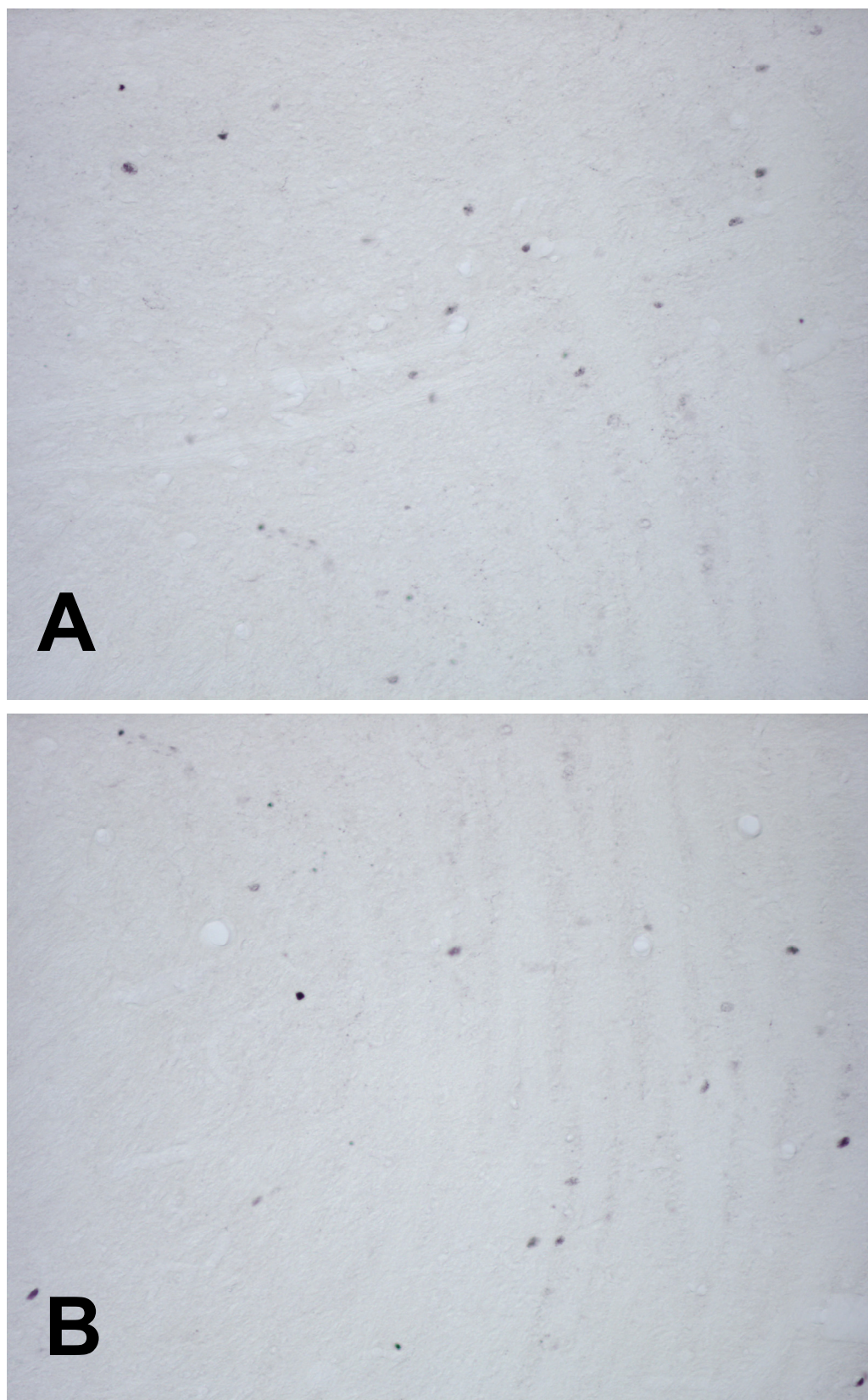


Fig. 4.7.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control simulado (CS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en **(A)** los subnúcleos sIPB y dIPB y en **(B)** el subnúcleo eIPB.

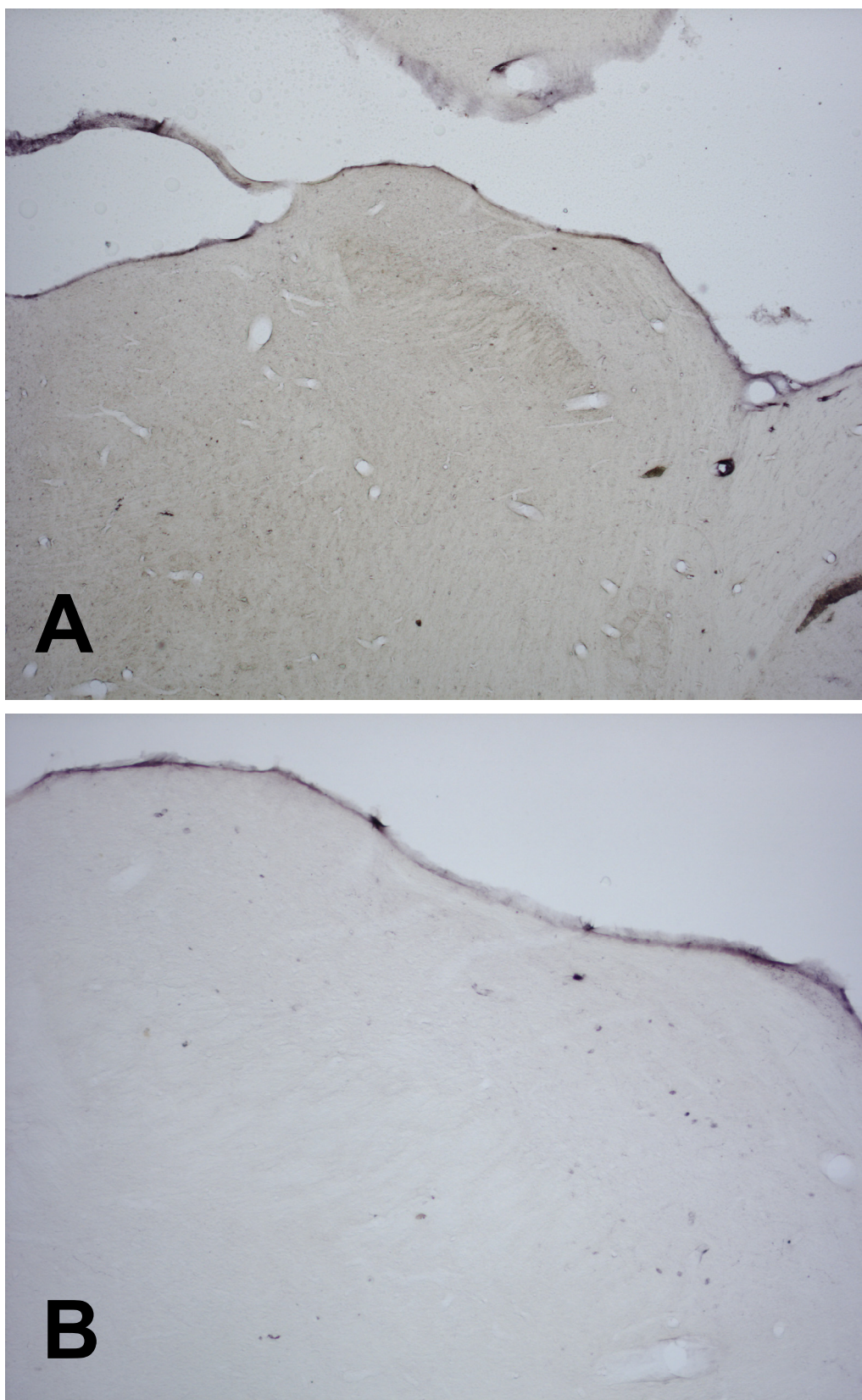


Fig. 4.8.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control simulado (CS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



Fig. 4.9.- *Microfotografía (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control simulado (CS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en el subnúcleo eIPB.*

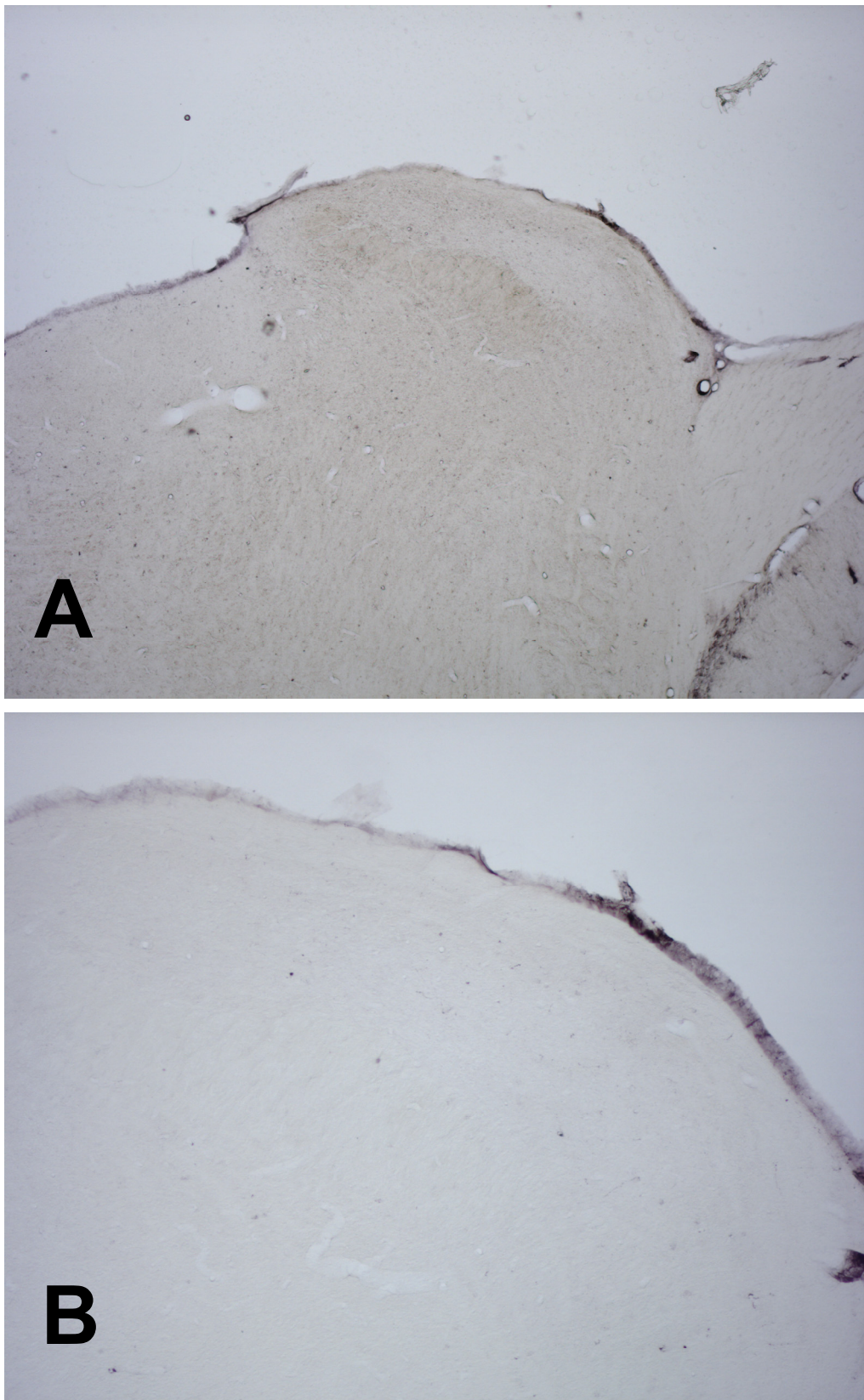


Fig. 4.10.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control simulado (CS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

2.3.- Grupo Control Morfina (CM).

La administración de 10 mg/kg de morfina por vía i.p. provocó una aparente disminución del número de células inmunorreactivas, estadísticamente no significativa, en el nivel rostral de la porción lateral del PB de rata, con respecto a los ejemplares del grupo CS. Al igual que en el grupo CS, no se apreciaron diferencias entre las hemisecciones derechas y sus correspondientes contralaterales.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm) las aisladas células inmunorreactivas se observaron en los subnúcleos slPB y dlPB de la porción lateral del PB, siendo prácticamente inexistente en el resto.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) el patrón fue similar al observado en el grupo CS, encontrando las pocas células marcadas distribuidas por los subnúcleos dlPB y elPB, siendo como en el grupo CS inexistente en los subnúcleos interno (ilPB) y ventral (vlPB).

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) los elementos Fos-positivos volvieron a situarse en los subnúcleos dlPB y, sobretudo, elPB, que mostró un aparente incremento de la inmunoreactividad frente a Fos con respecto al grupo CS, estadísticamente no significativo.

	NIVEL ROSTRAL	NIVEL INTERMEDIO	NIVEL CAUDAL
Grupo CM	12±4	11±3	12±3

Tabla 4.2.- Media (\pm Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 μ m de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo control simulado (CM).

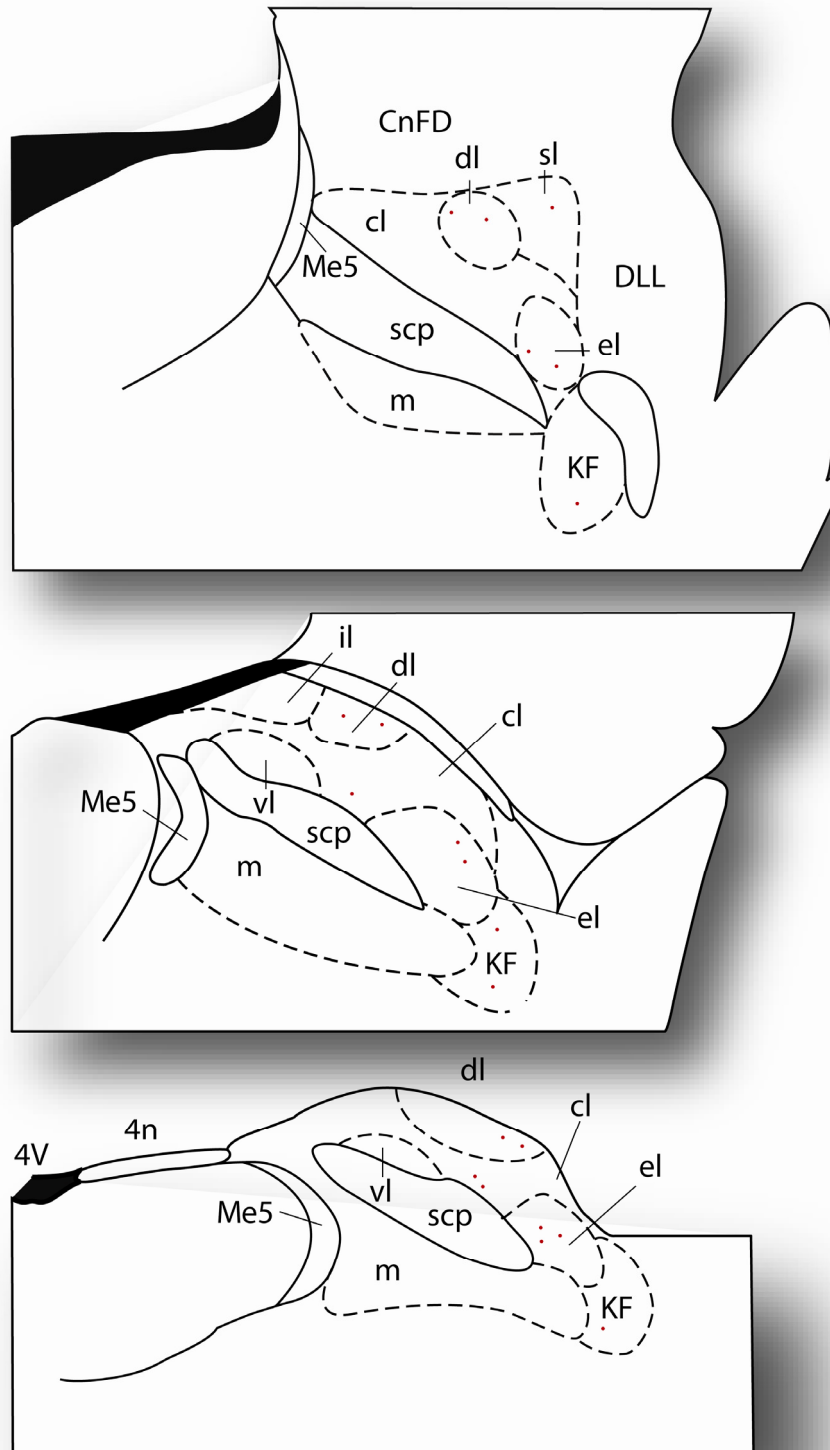


Fig. 4.11.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupo control morfina (CM) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB de rata. (Cada punto equivale a 2 células Fos-positivas).

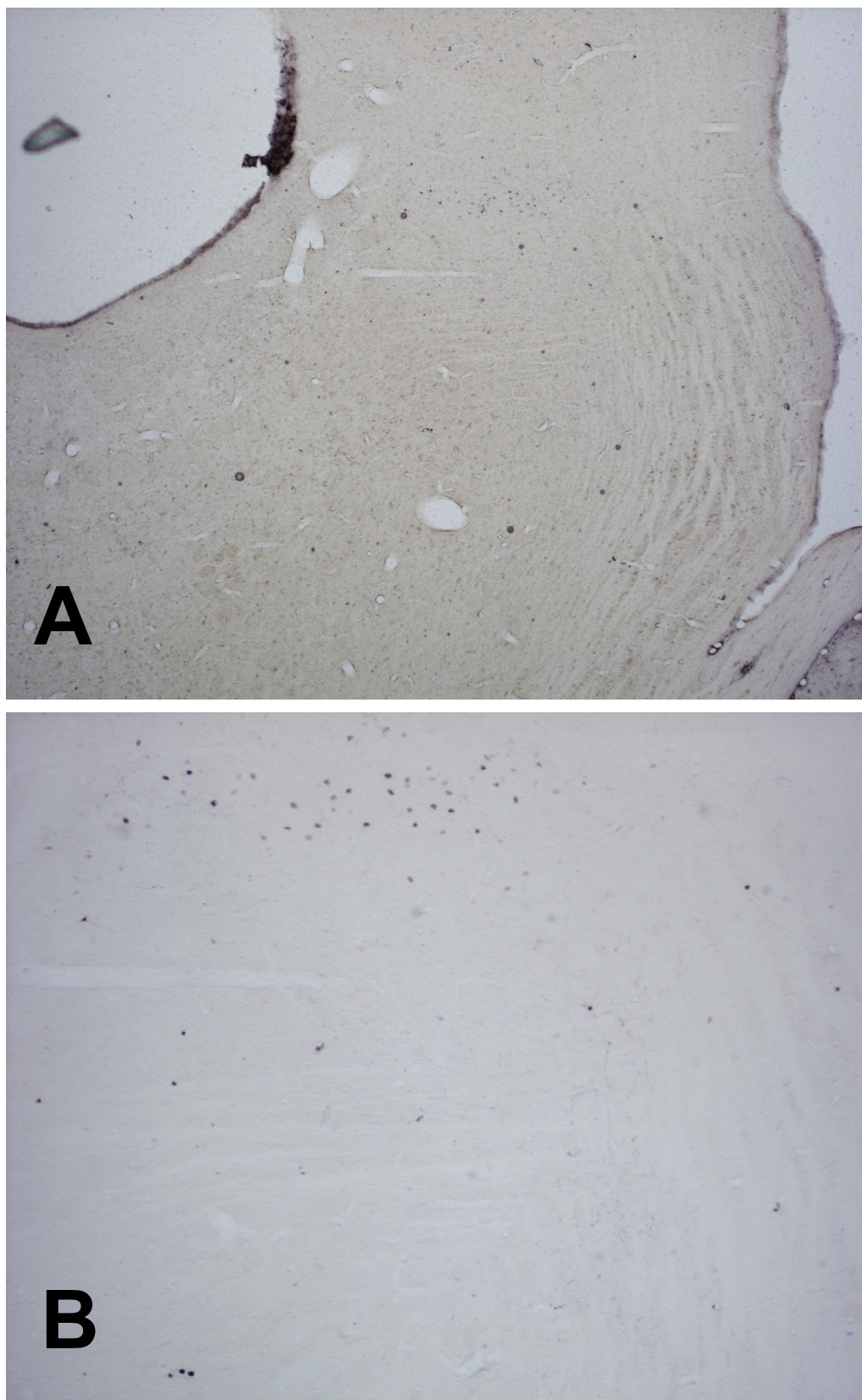


Fig. 4.12.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control morfina (CM), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

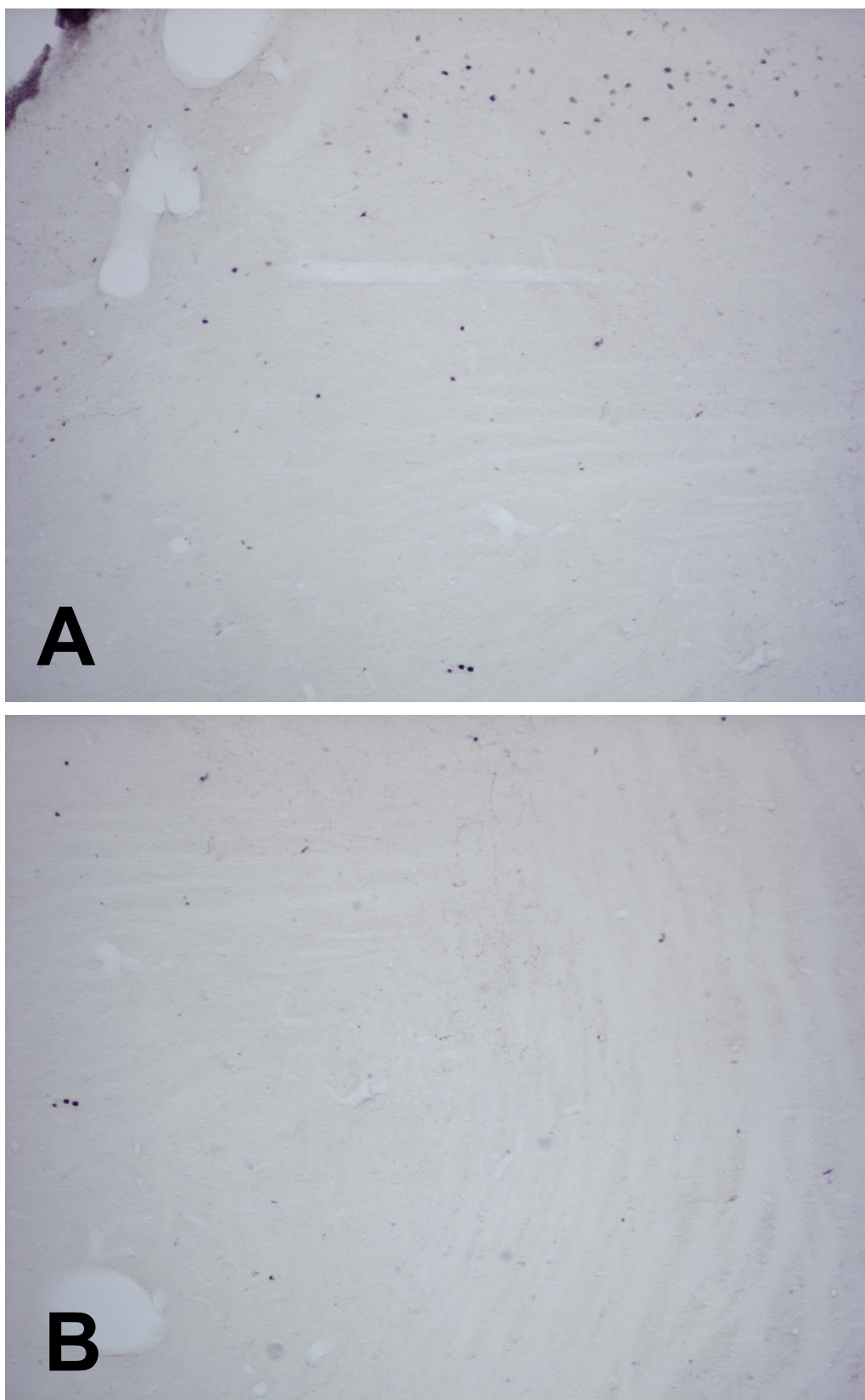


Fig. 4.13.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control morfina (CM), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en **(A)** los subnúcleos slPB y dlPB y en **(B)** el subnúcleo elPB.

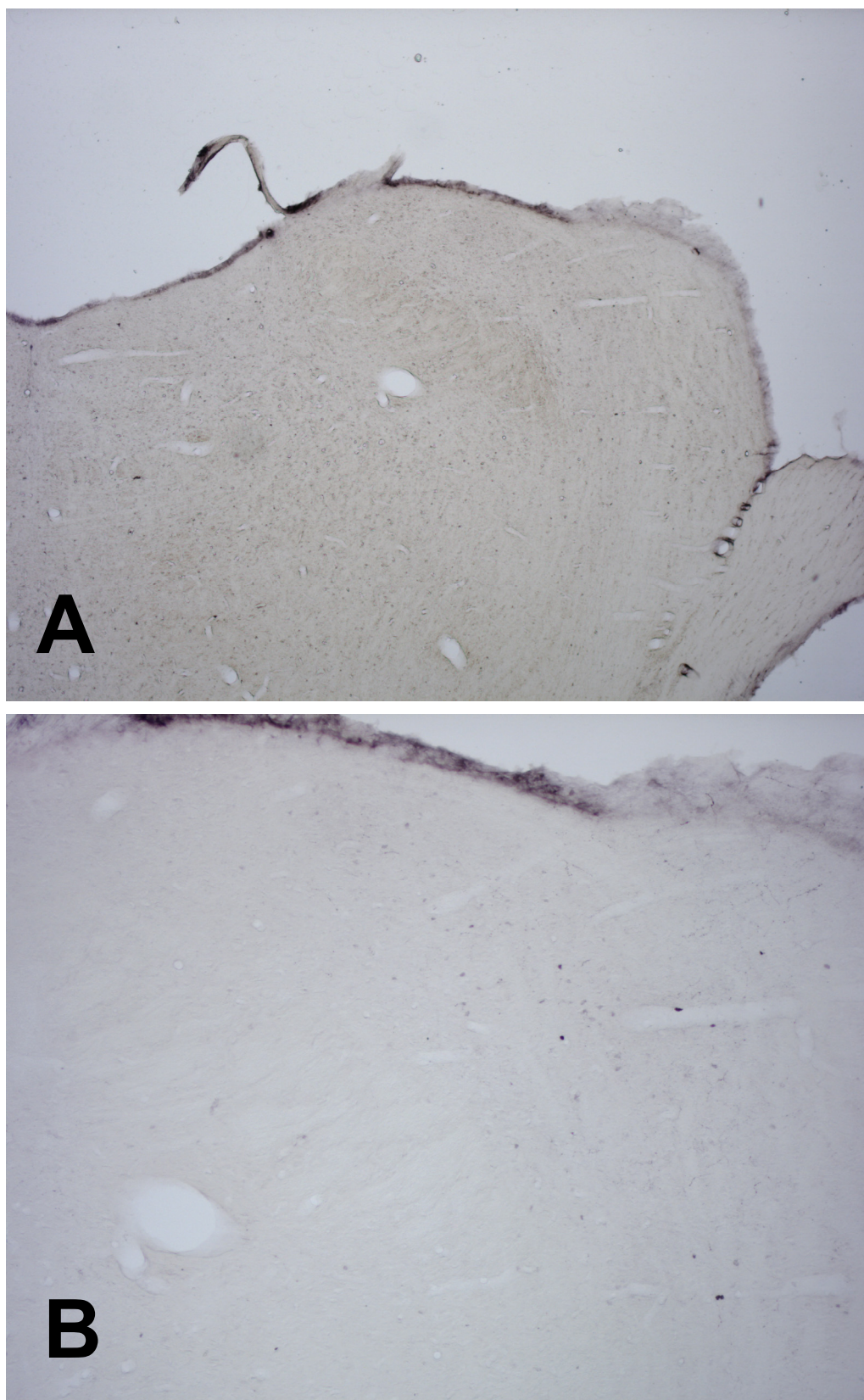


Fig. 4.14.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control morfina (CM), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



Fig. 4.15.- *Microfotografía (20x) de un corte coronal a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control morfina (CM), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en los subnúcleos dlPB y ePB.*

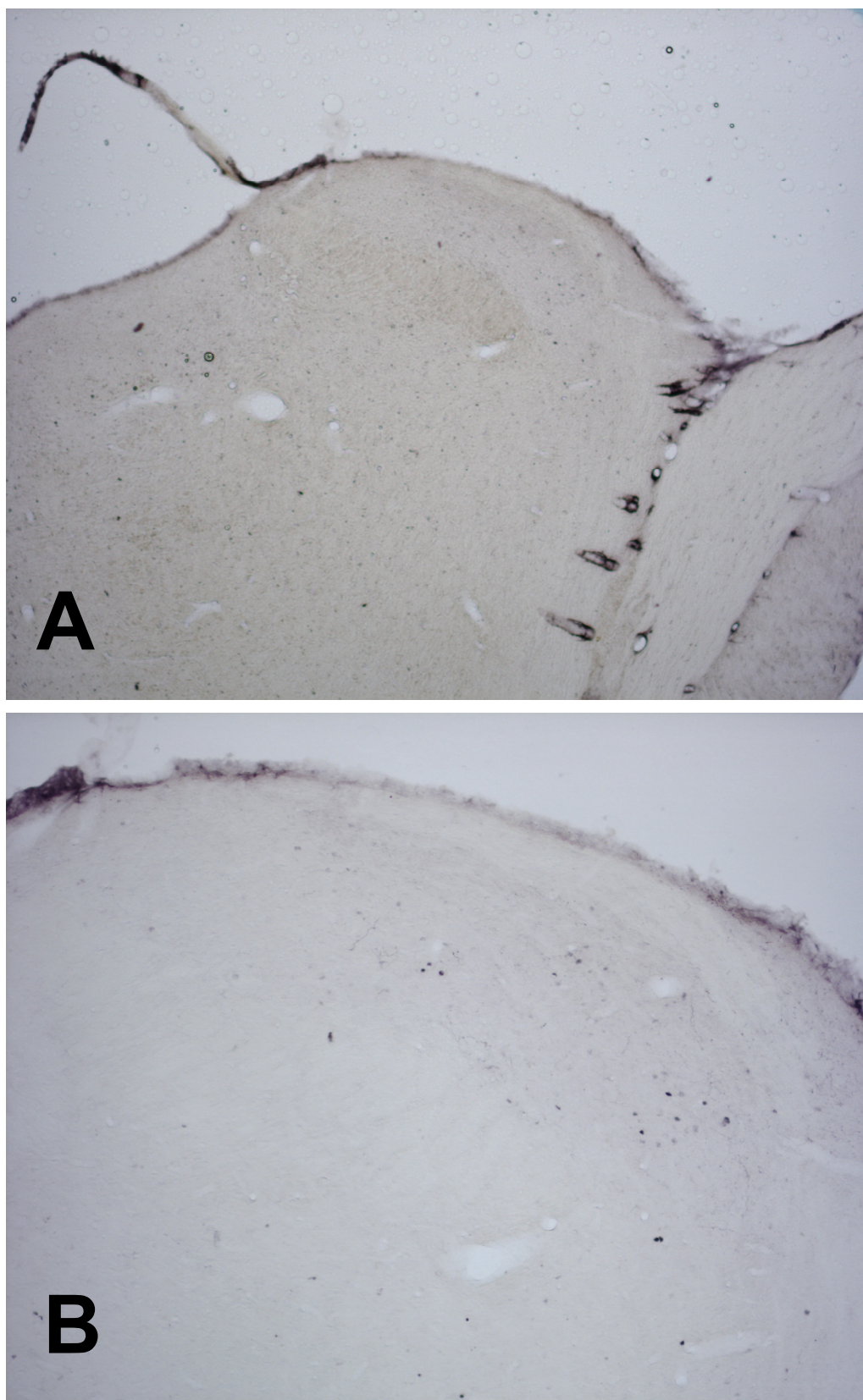


Fig. 4.16.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control morfina (CM), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

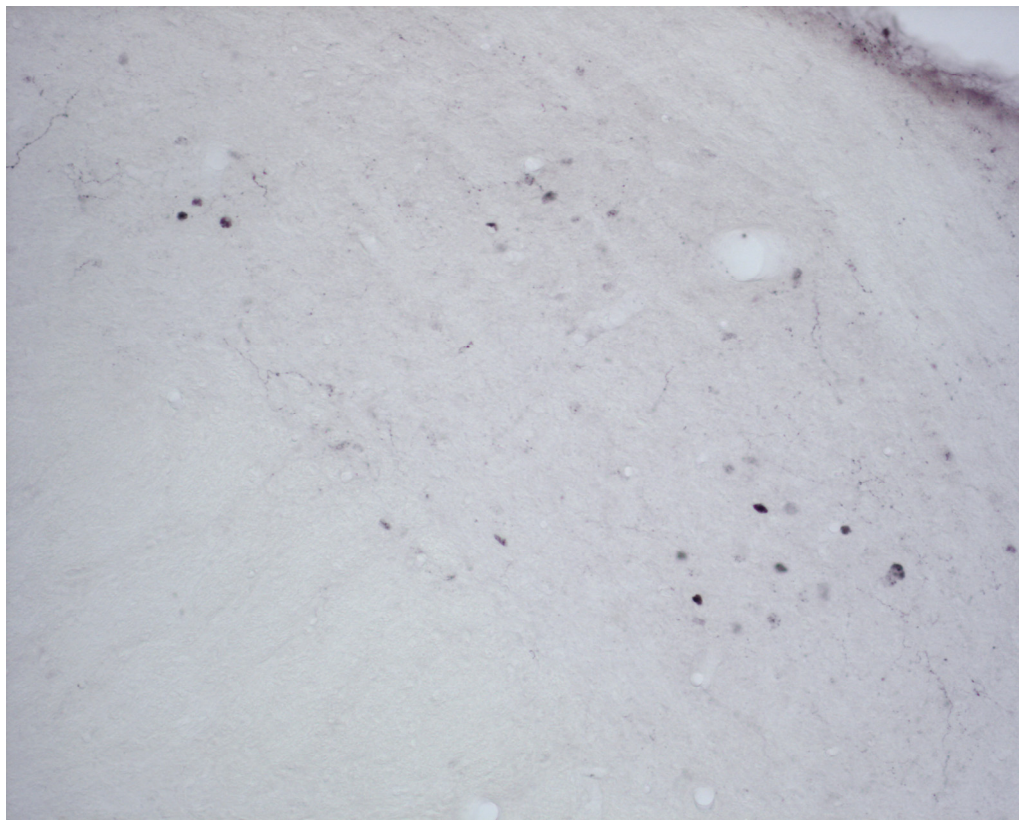


Fig. 4.17.- *Microfotografía (20x) de un corte coronal a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control morfina (CM), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en los subnúcleos clPB, dlPB y elPB.*

2.4.- Grupo Control Metamizol.

La administración de 500 mg/kg de metamizol por vía intraperitoneal indujo un gran incremento prácticamente generalizado en el número de células inmunopositivas en todos los niveles estudiados, pero muy significativamente en los niveles intermedio y caudal, debido al extraordinario aumento de la inmunorreactividad observada en los subnúcleos clPB y elPB, con respecto a los grupos CS y CM. El marcaje fue bilateral y sin diferencias estadísticamente significativas entre la hemisección derecha y la izquierda.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm) el mayor incremento de neuronas marcadas con respecto a los grupos CS y CM se produjo, fundamentalmente, en el subnúcleo slPB de la porción lateral del PB. Del resto de subnúcleos, destacaremos el significativo incremento de marcaje en el KF con respecto a los grupos CS y CM.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) encontramos una masiva expresión de *c-fos* en los subnúcleos clPB y elPB, manteniéndose la presencia de células marcadas en el KF y la ausencia de marcaje en los subnúcleos interno (ilPB) y ventral (vlPB). También destacó que el gran incremento de inmunorreactividad dejó fuera al subnúcleo dlPB, que mostró unos niveles de expresión de *c-fos* característicos del grupo CS.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) se mantuvo el gran aumento de inmunorreactividad, constatado en el nivel intermedio, en los subnúcleos clPB y elPB en relación a los grupos CS y CM. En el resto de subnúcleos también se repitió el patrón apuntado en el nivel intermedio.

	NIVEL ROSTRAL	NIVEL INTERMEDIO	NIVEL CAUDAL
Grupo CN	59±8	113±12	121±16

Tabla 4.3.- *Media (±Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 µm de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo control metamizol (CN).*

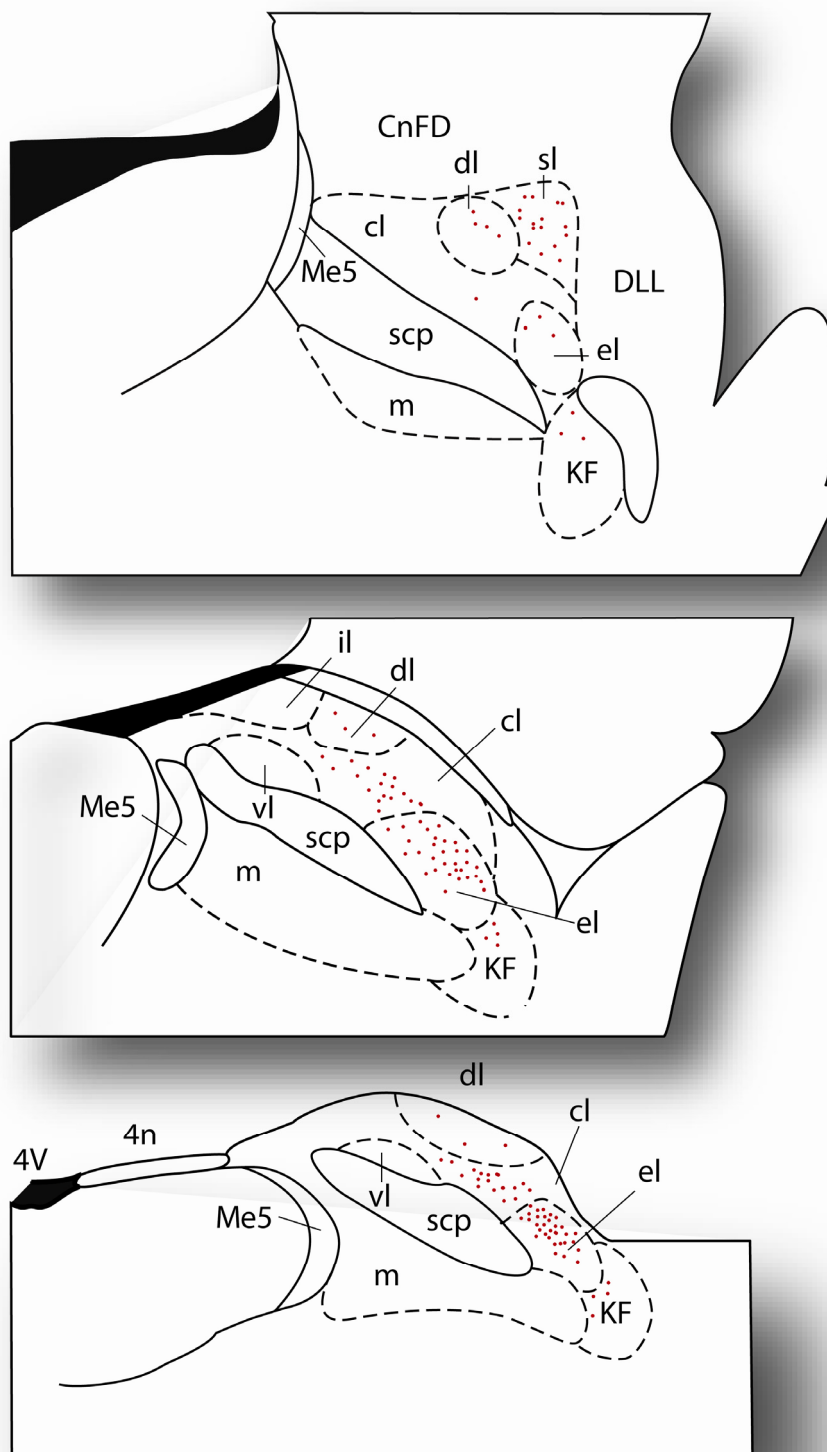


Fig. 4.18.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupo control metamizol (CN) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB de rata. (Cada punto equivale a 2 células Fos-positivas).

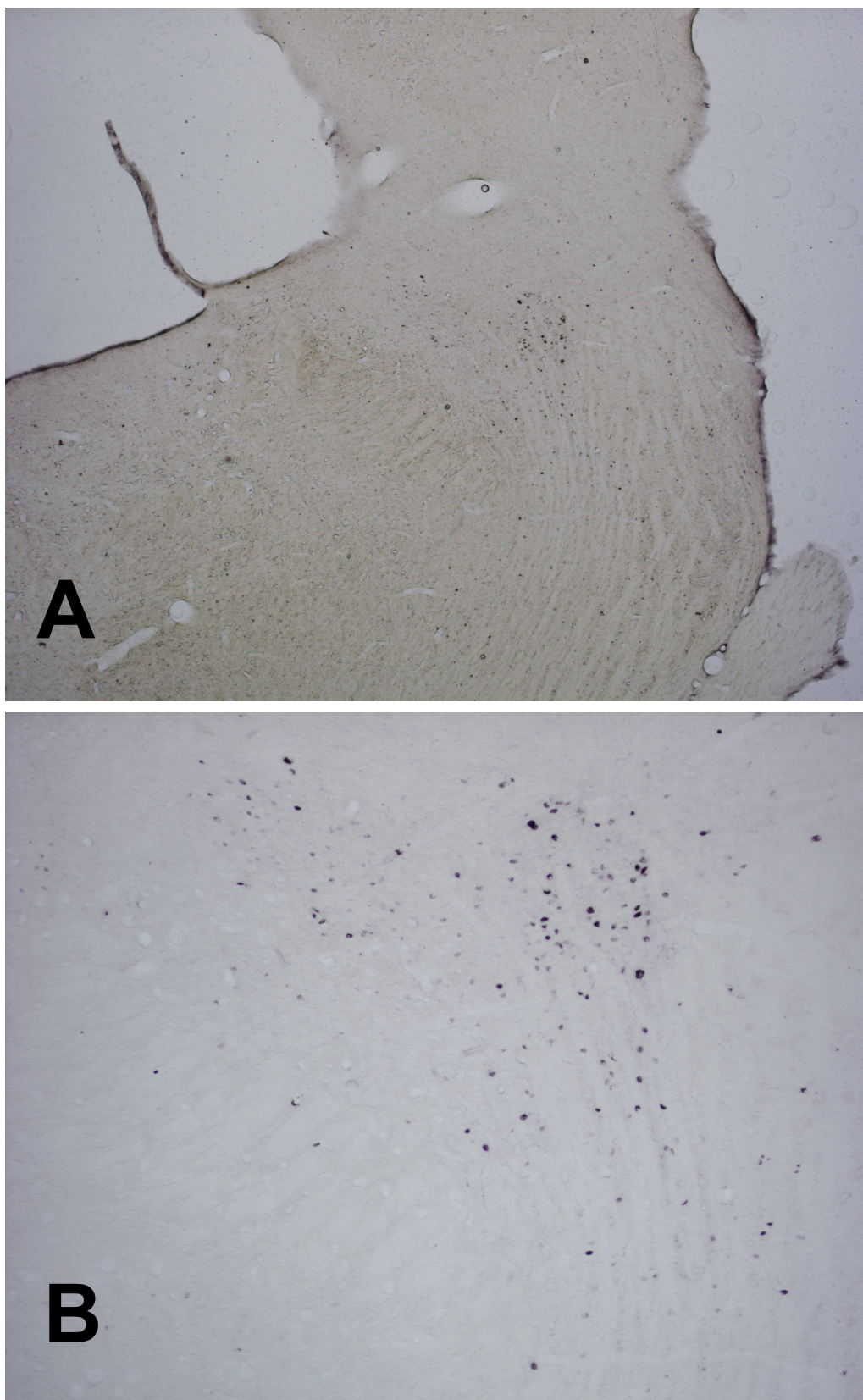


Fig. 4.19.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control metamizol (CN), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

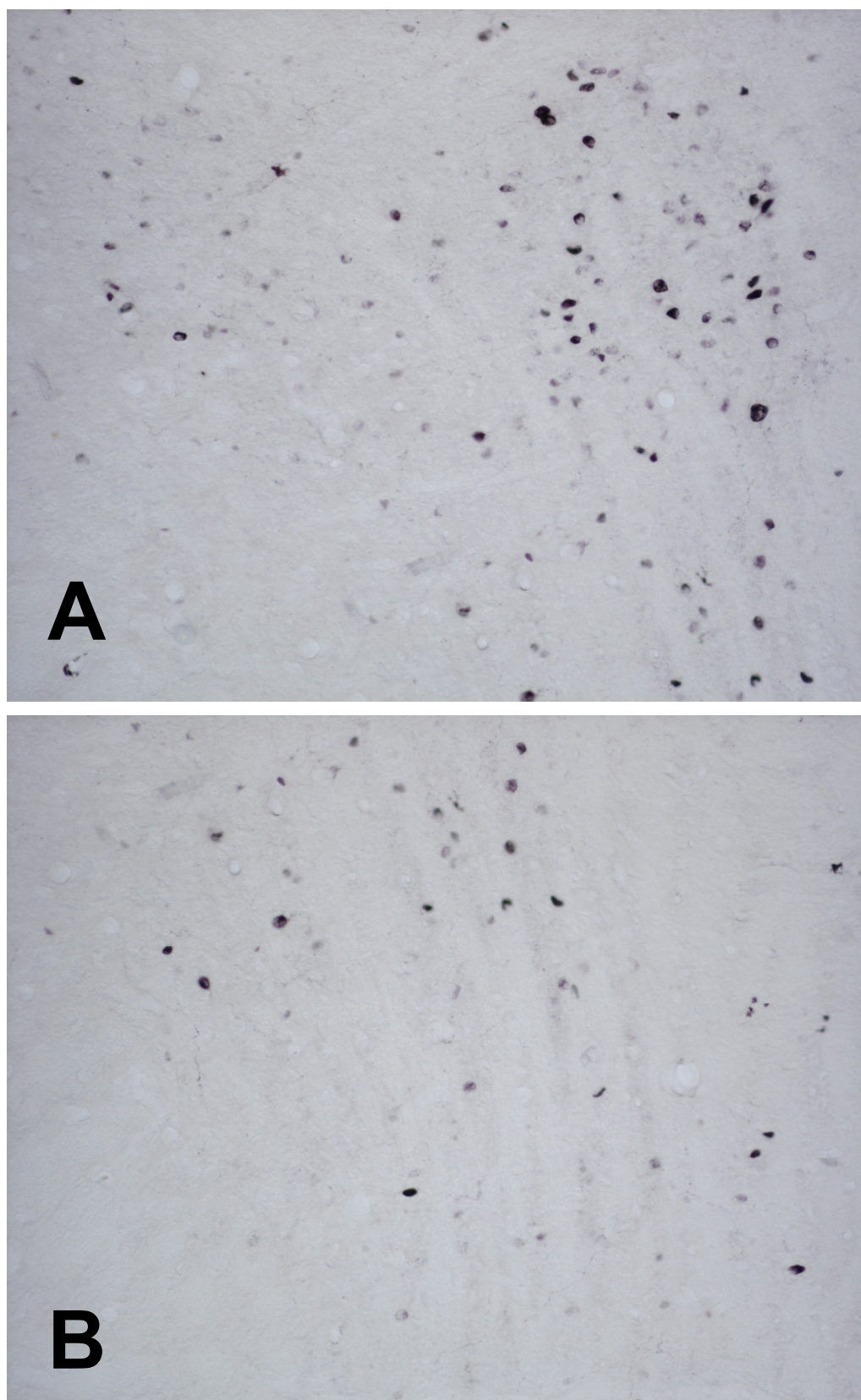


Fig. 4.20.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control metamizol (CN), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en **(A)** los subnúcleos sLPB y dLPB y en **(B)** el subnúcleo eLPB.

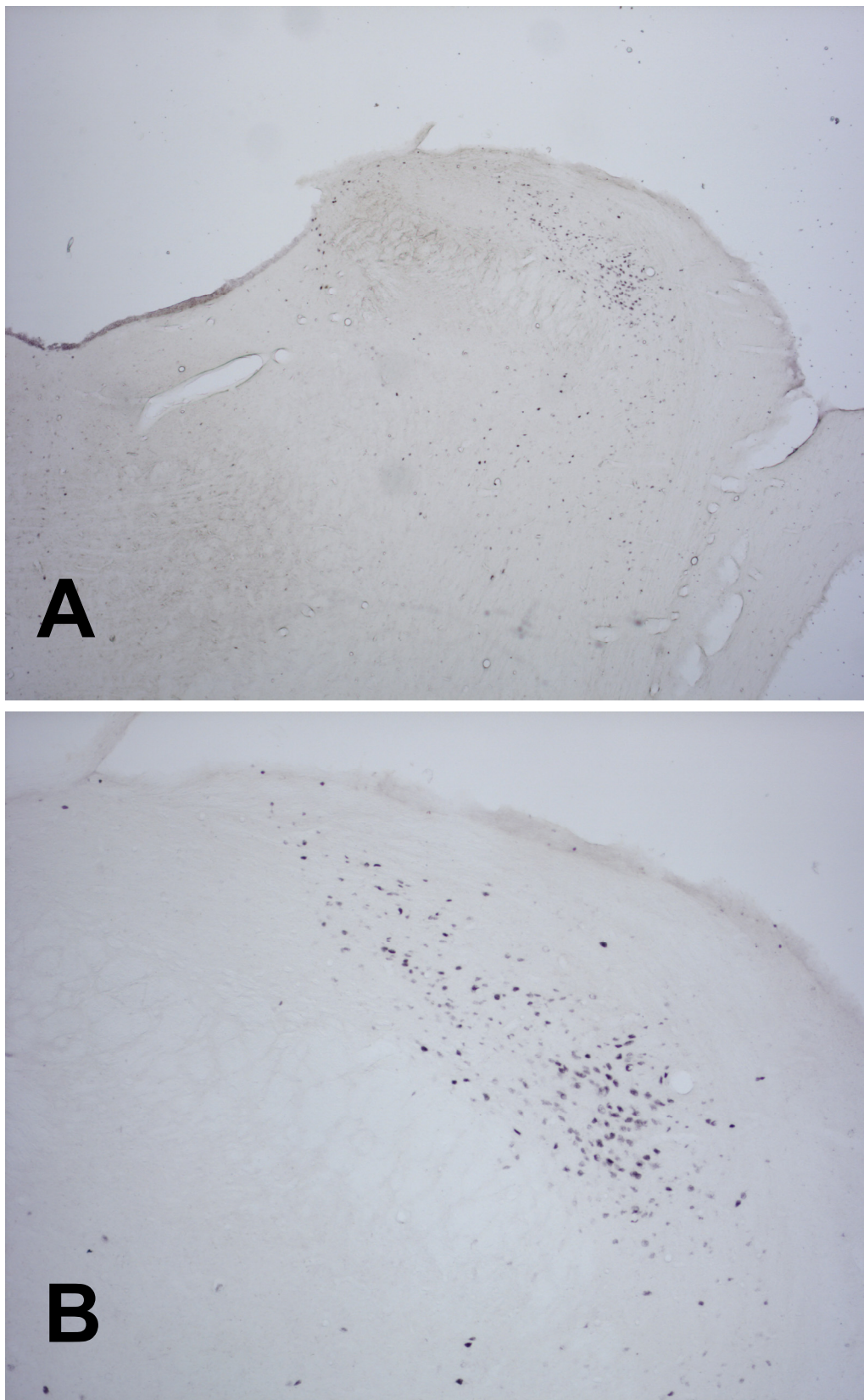


Fig. 4.21.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control metamizol (CN), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

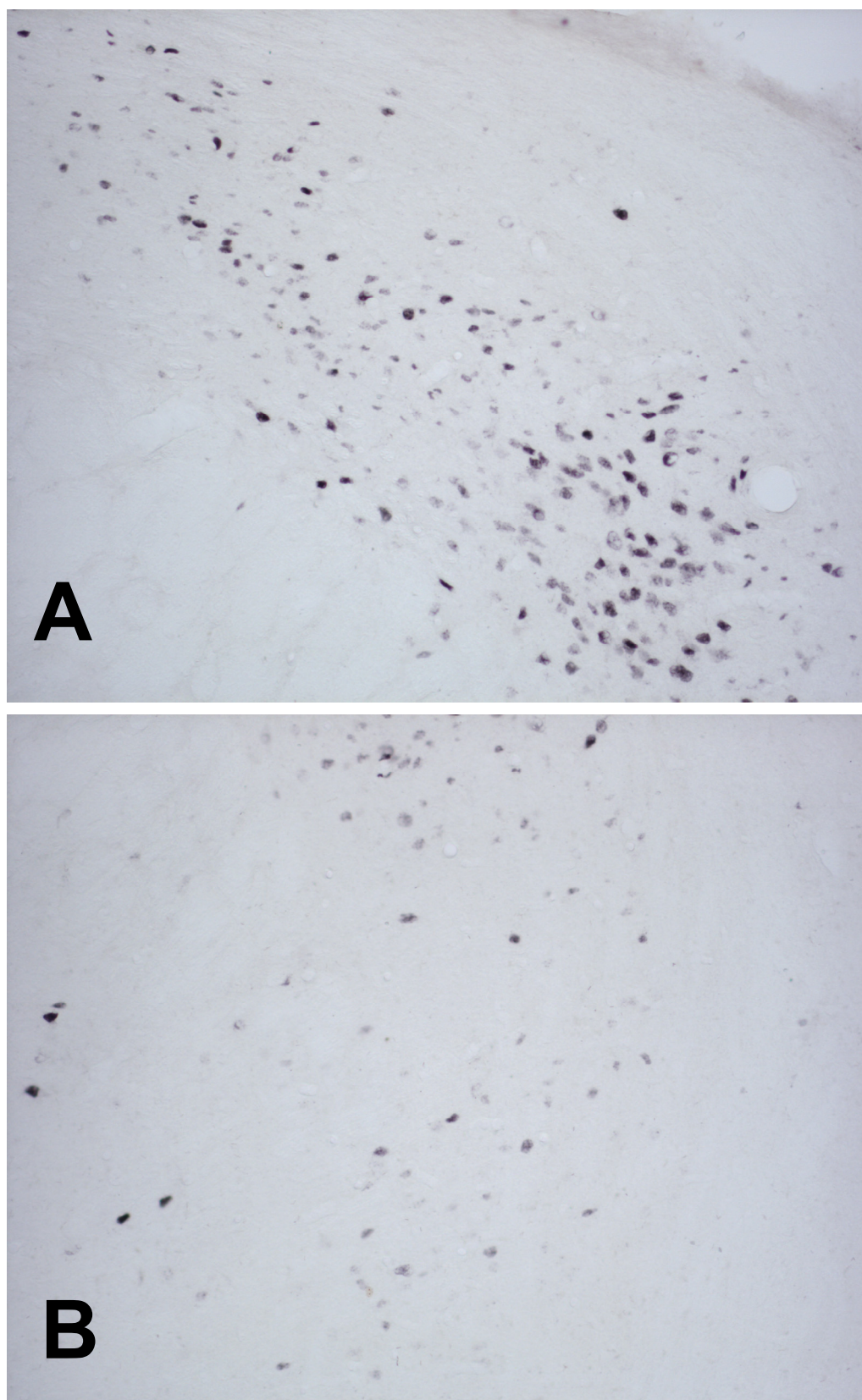


Fig. 4.22.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control metamizol (CN), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en **(A)** los subnúcleos clPB y elPB y en **(B)** el KF.

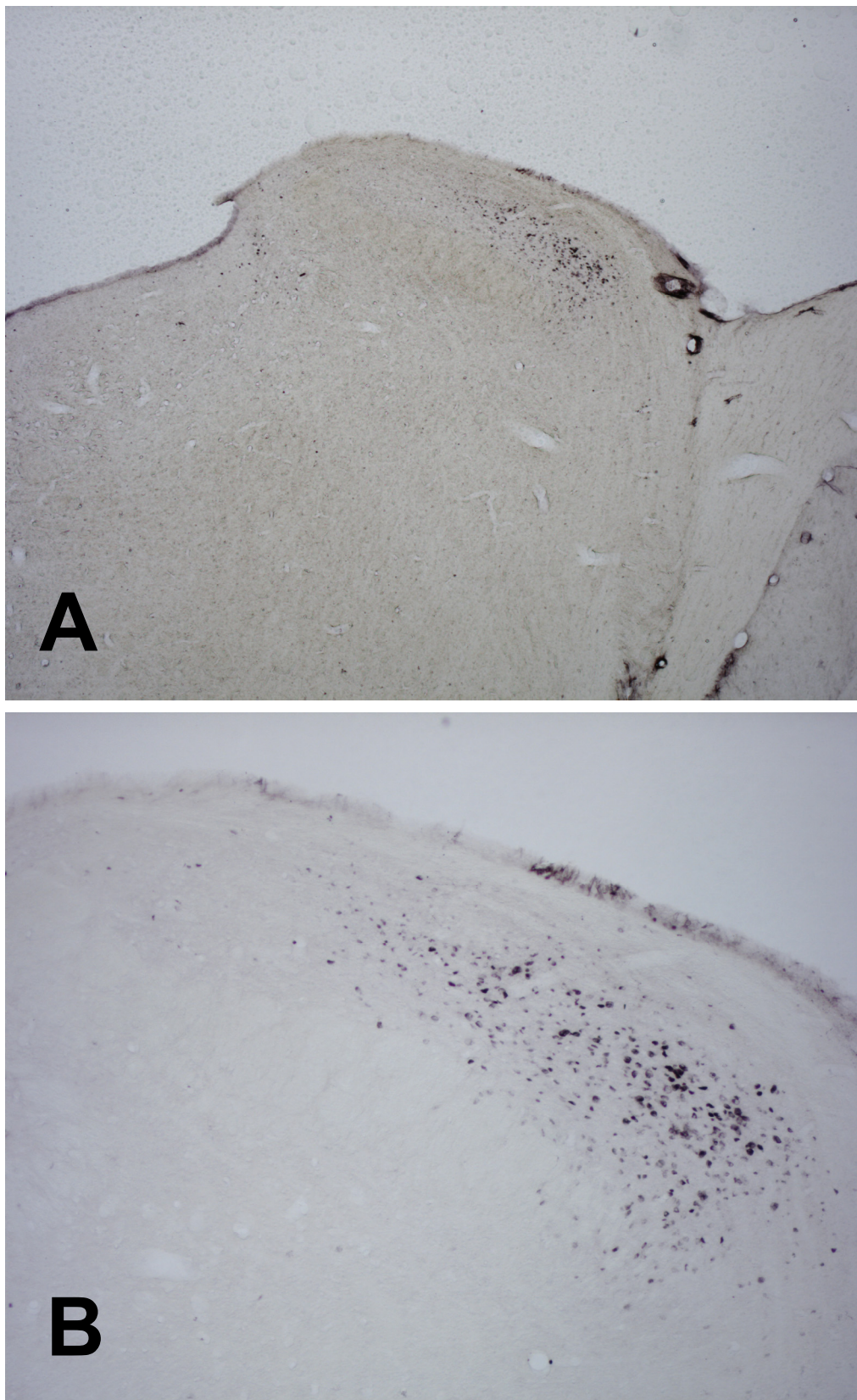


Fig. 4.23.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control metamizol (CN), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

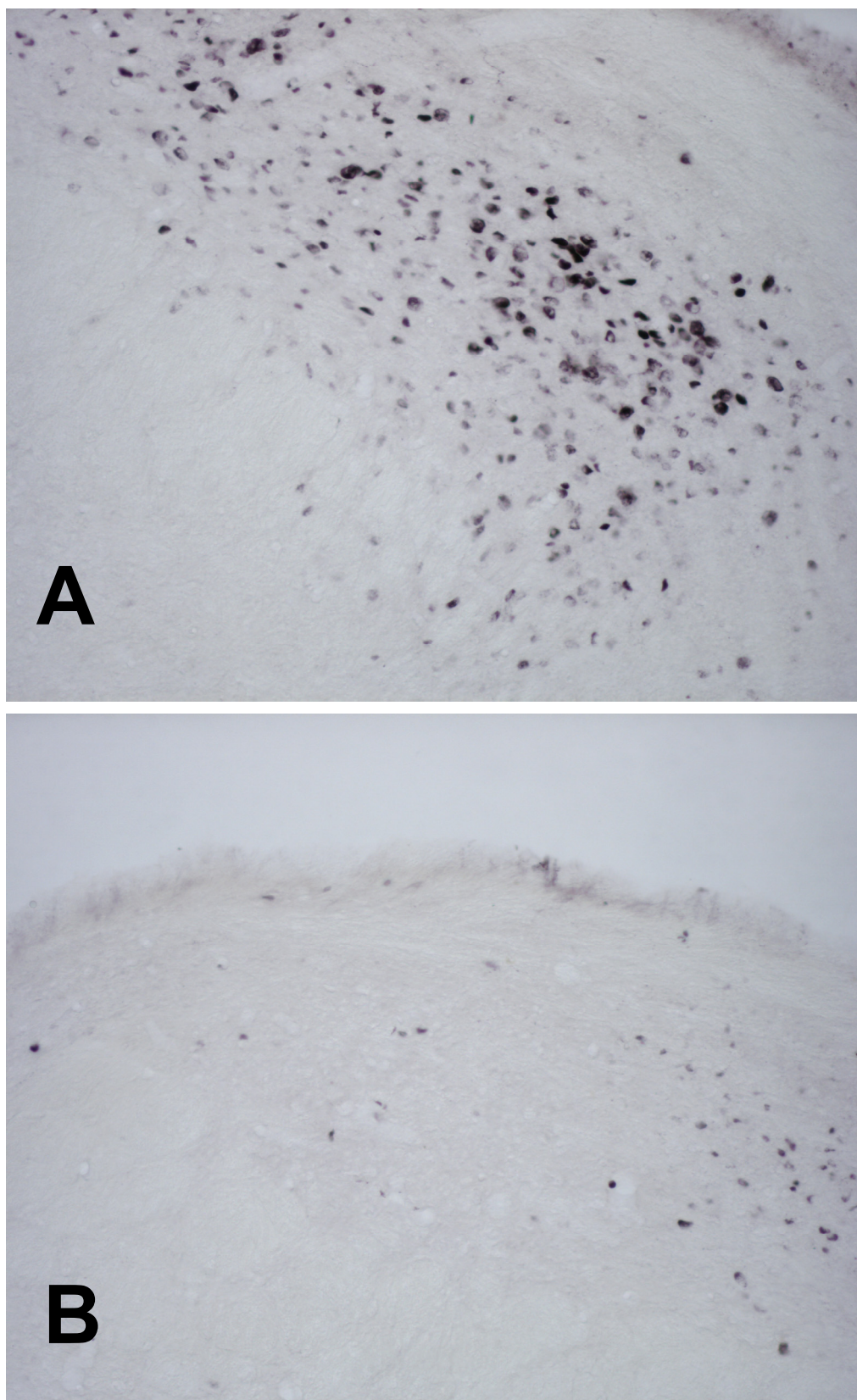


Fig. 4.24.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control metamizol (CN), que muestran **(A)** la inmunorreactividad frente a Fos en los subnúcleos clPB y elPB y **(B)** la ausencia de marcaje en ilPB y vlPB.

2.5.- Grupo Dolor Somático.

La aplicación del *test de la formalina* en la planta de la pata trasera derecha de los animales de este grupo provocó un incremento del marcaje frente a Fos bilateral, pero con un claro predominio contralateral respecto del lado en el que se aplicó el estímulo algésico. Los subnúcleos afectados por el aumento de la inmunoreactividad fueron los mismos con independencia de que estudiáramos la hemisección ipsilateral o la contralateral. Nuestra descripción se referirá a la hemisección con mayores valores en el número de neuronas Fos-positivas, que como hemos indicado fue la izquierda, la contralateral a la aplicación del estímulo doloroso somático superficial. También mostraremos unas imágenes transversales de la médula espinal entre L4-L5 donde observamos un incremento ipsilateral de la expresión de *c-fos* fundamentalmente en las láminas I y II, que demuestran la eficacia del *test de la formalina* en activar las neuronas nociceptoras del asta posterior de la médula.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm) destacó frente al grupo CS el incremento de células inmunorreactivas en los subnúcleos slPB, dlPB, elPB y KF de la porción lateral del PB.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) lo más interesante fue que, no sólo se mantuvo sino que, se incrementó el número de células marcadas en el subnúcleo dlPB, manteniéndose valores estadísticamente más altos que en el grupo CS en los subnúcleos elPB y KF, y siendo, una vez más, inexistente en los subnúcleos ilPB y vlPB.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) el único subnúcleo que siguió ofreciendo valores altos respecto del grupo CS fue el dlPB, volviendo el resto de subnúcleos a valores prácticamente basales.

	NIVEL ROSTRAL		NIVEL INTERMEDIO		NIVEL CAUDAL	
	I	C	I	C	I	C
Grupo DS	38±6	65±7	28±5	49±8	22±5	31±5

Tabla 4.4.- Media (\pm Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 μ m de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo dolor somático (DS). I:ipsilateral; C:contralateral.

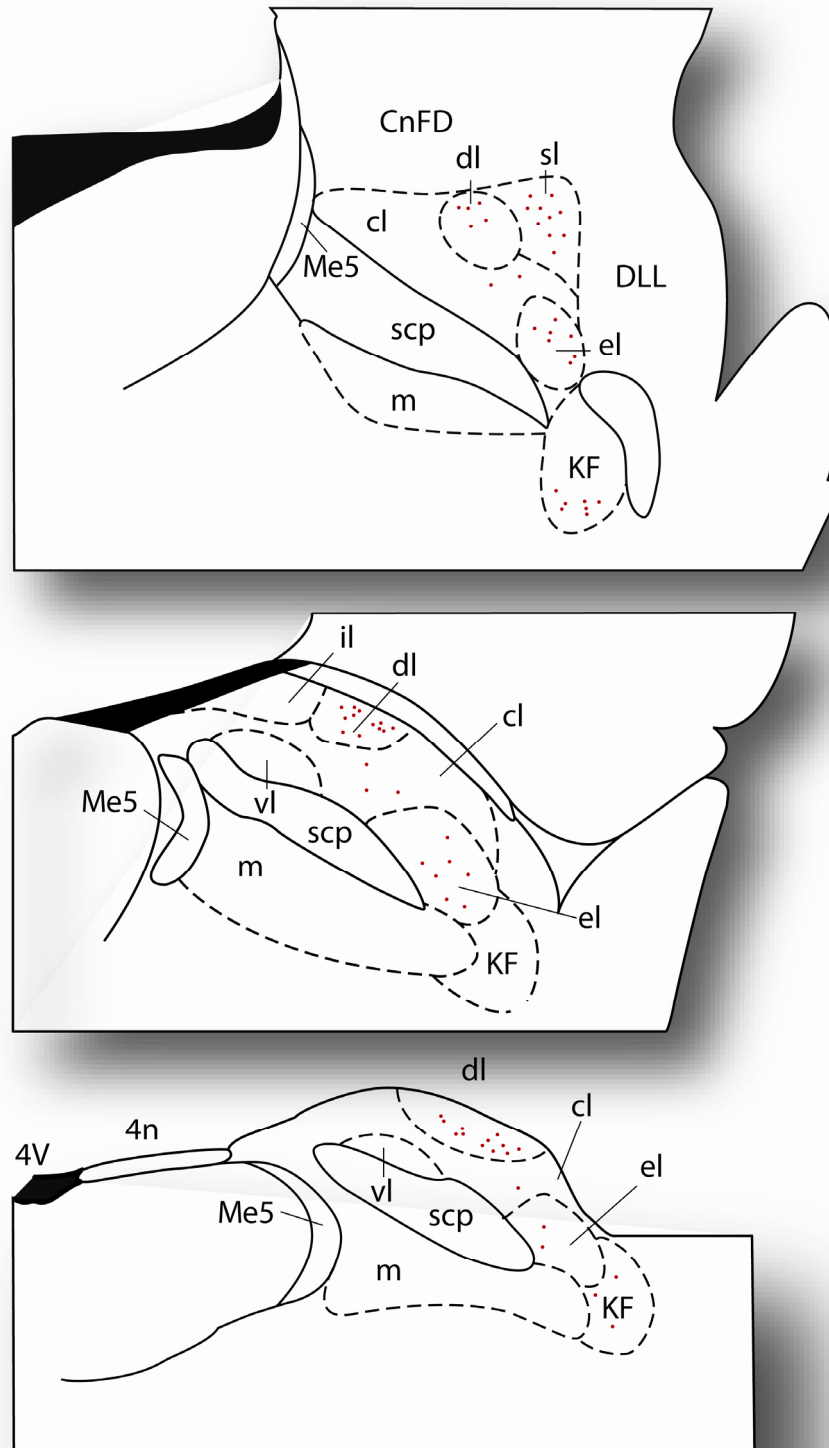


Fig. 4.25.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupo dolor somático (DS) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB contralateral al estímulo doloroso de rata. (Cada punto equivale a 2 neuronas Fos-positivas).

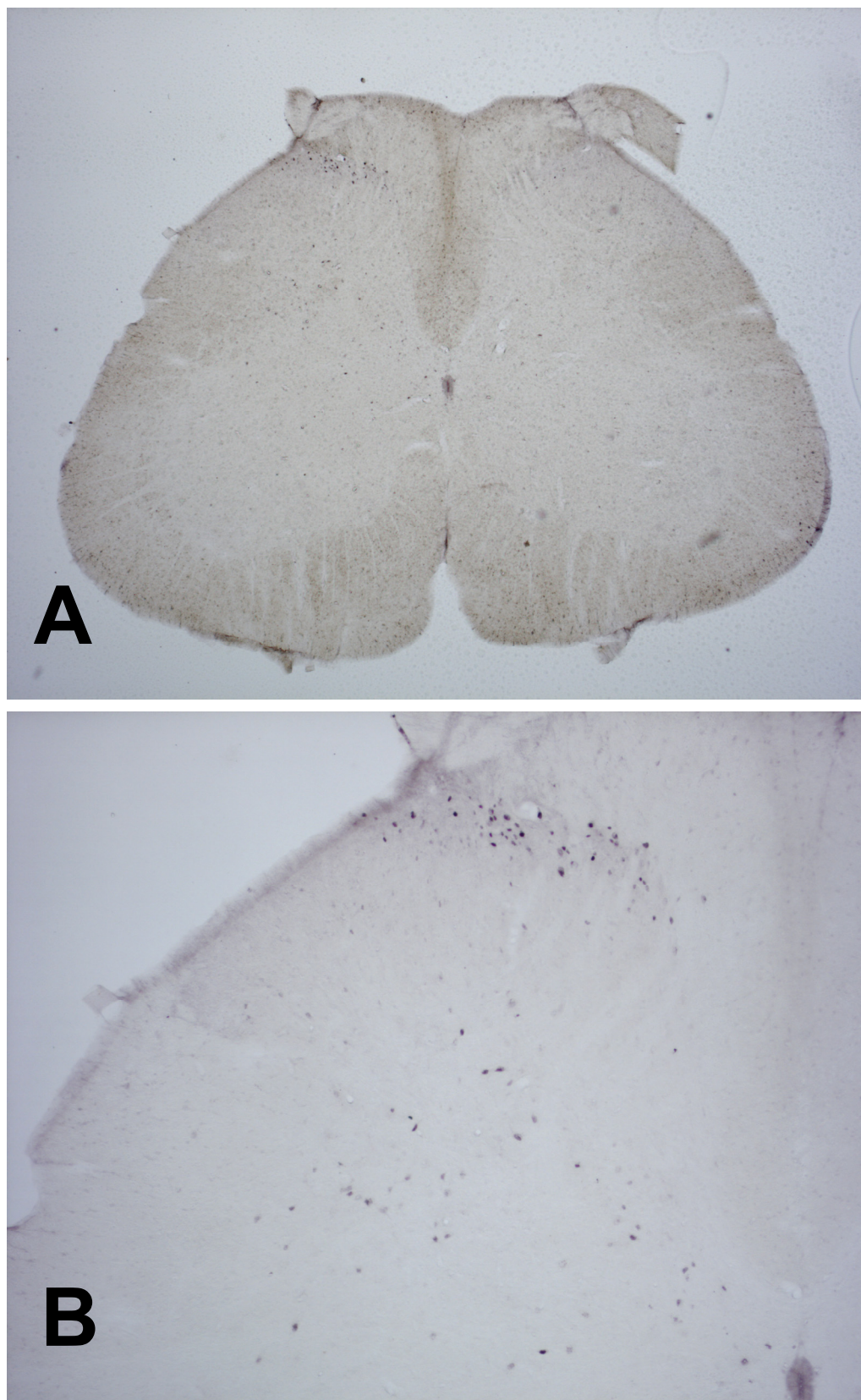


Fig. 4.26.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de un corte coronal de la médula espinal a nivel lumbar (L4) de una rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

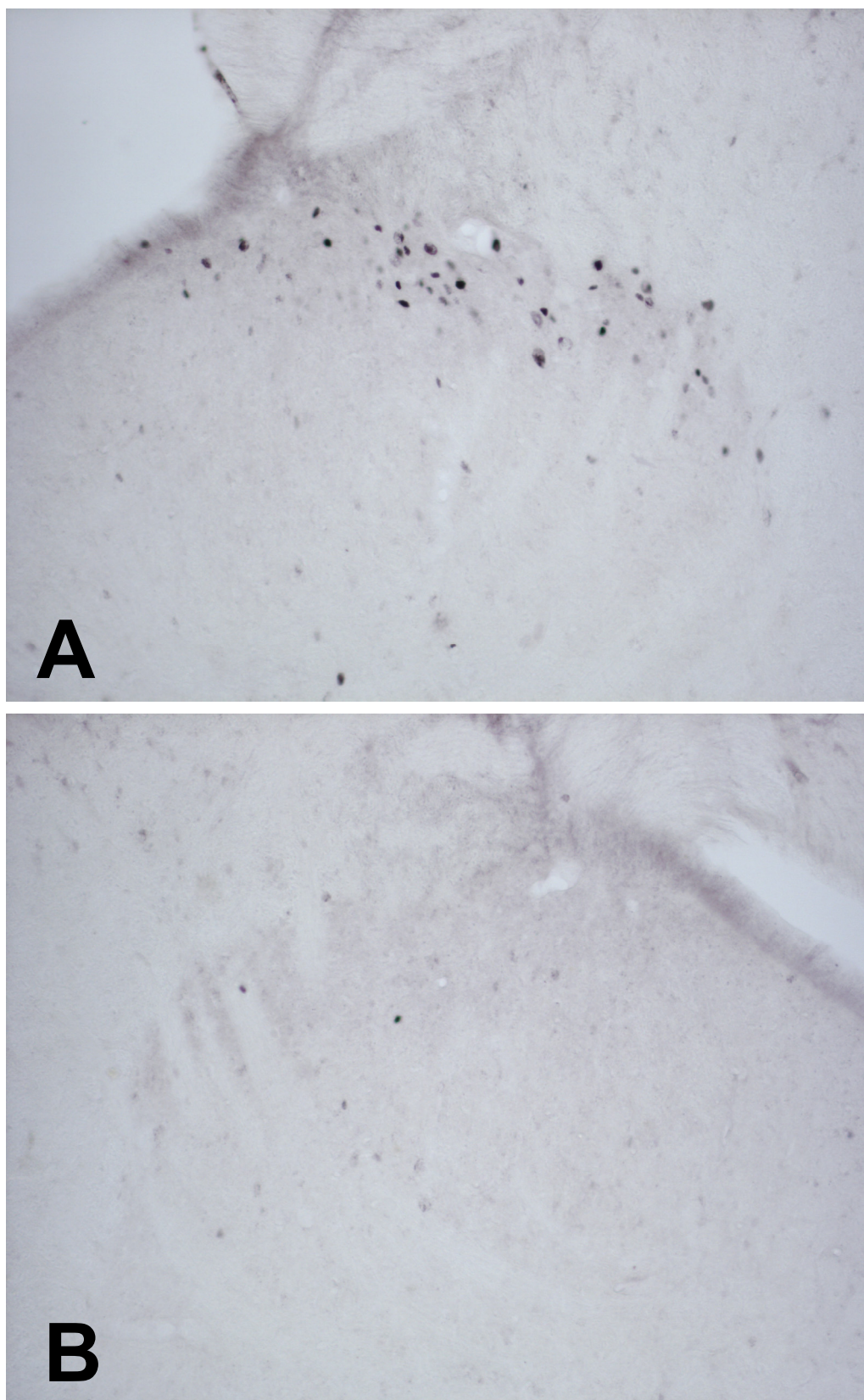


Fig. 4.27.- Microfotografías (20x) de cortes coronales de la médula espinal a nivel lumbar (L4) de una rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en el asta posterior **(A)** ipsilateral y **(B)** contralateral a la aplicación del estímulo doloroso.



Fig. 4.28.- Microfotografía (2,5x) de un corte coronal a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestra la inmunorreactividad frente a Fos.

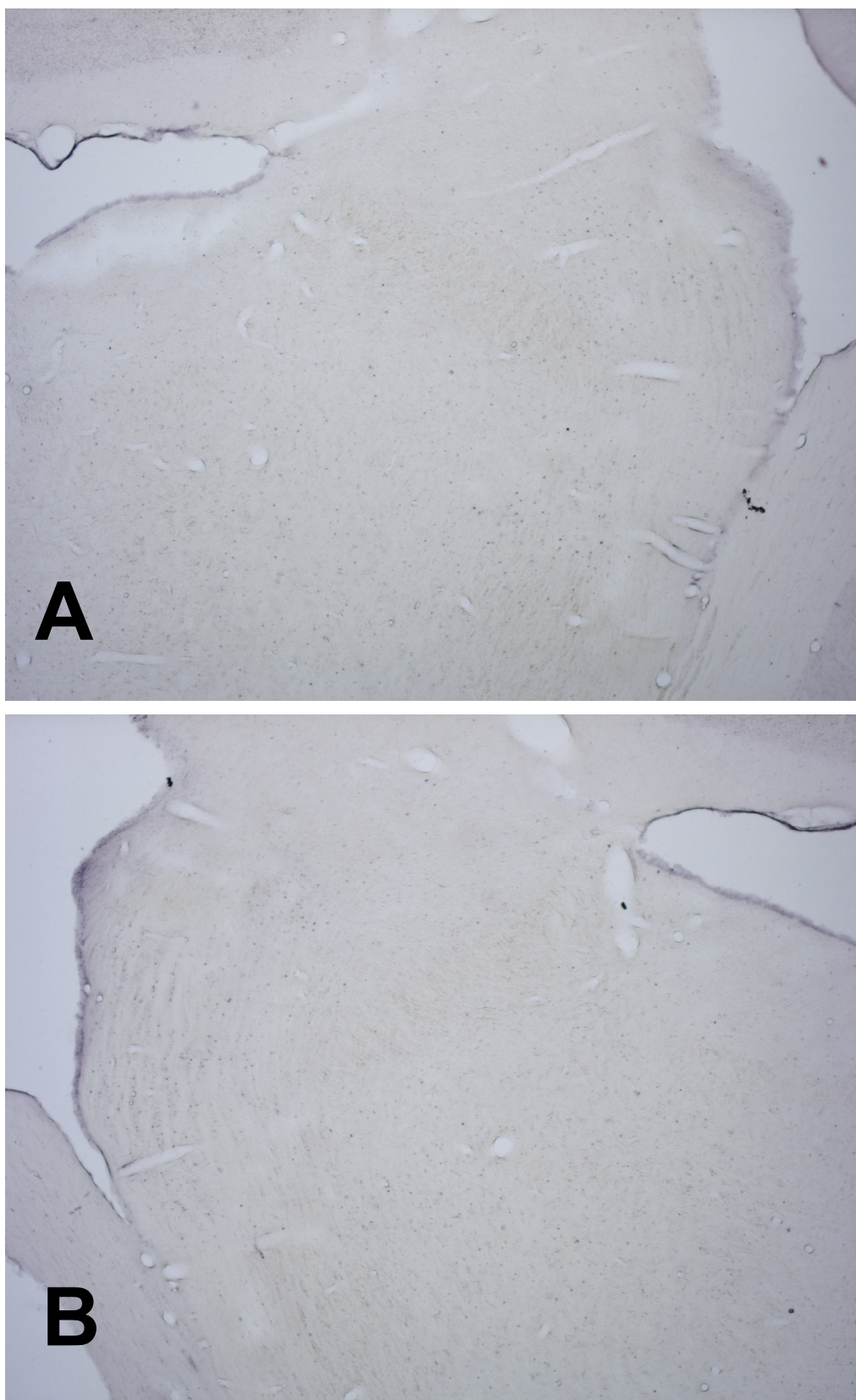


Fig. 4.29.- Microfotografías (4x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección **(A)** contralateral y **(B)** ipsilateral a la aplicación del estímulo doloroso.

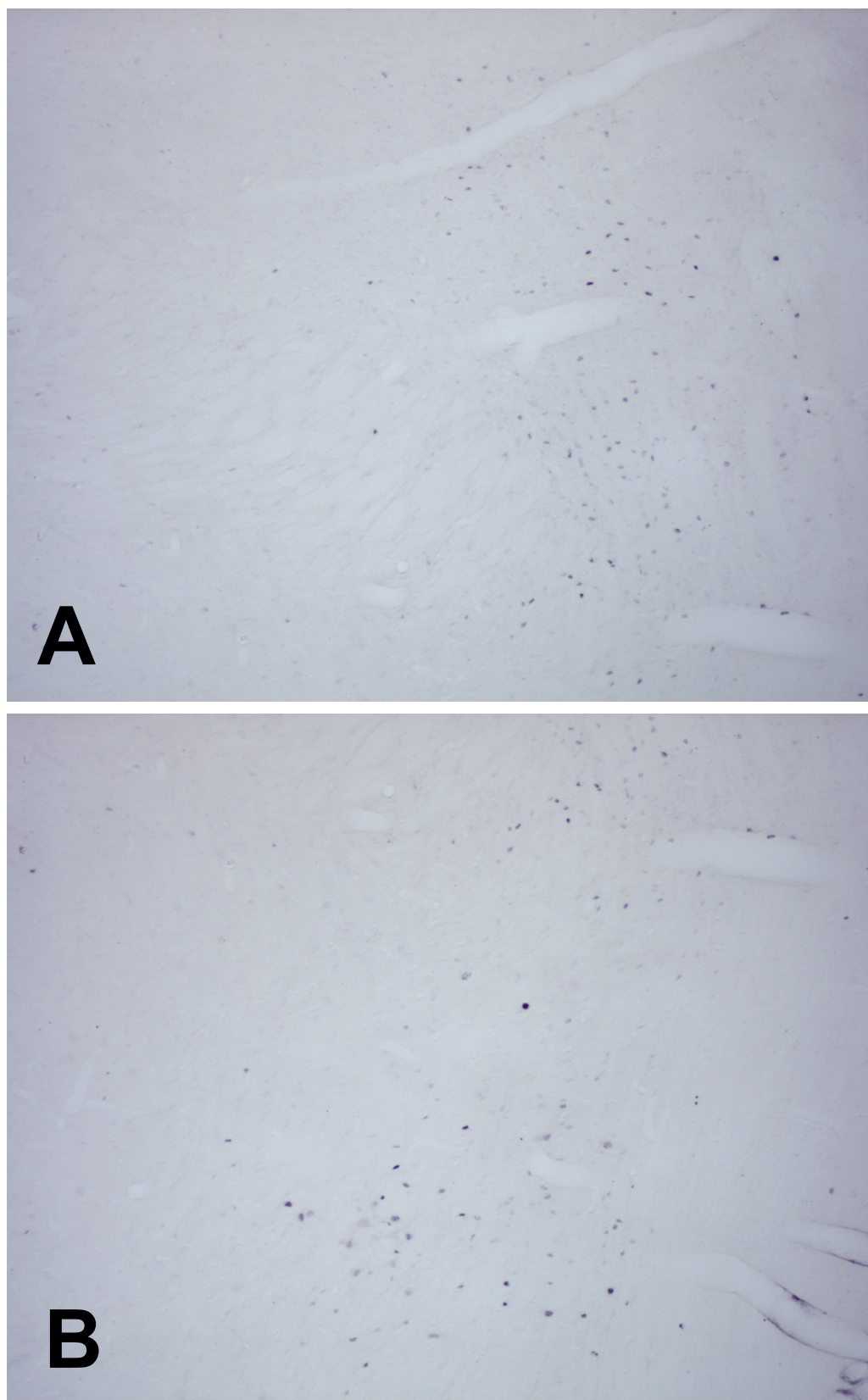


Fig. 4.30.- Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en una hemisección contralateral a la aplicación del estímulo doloroso, **(A)** en los subnúcleos sIPB, dlPB, clPB y elPB y **(B)** en KF.

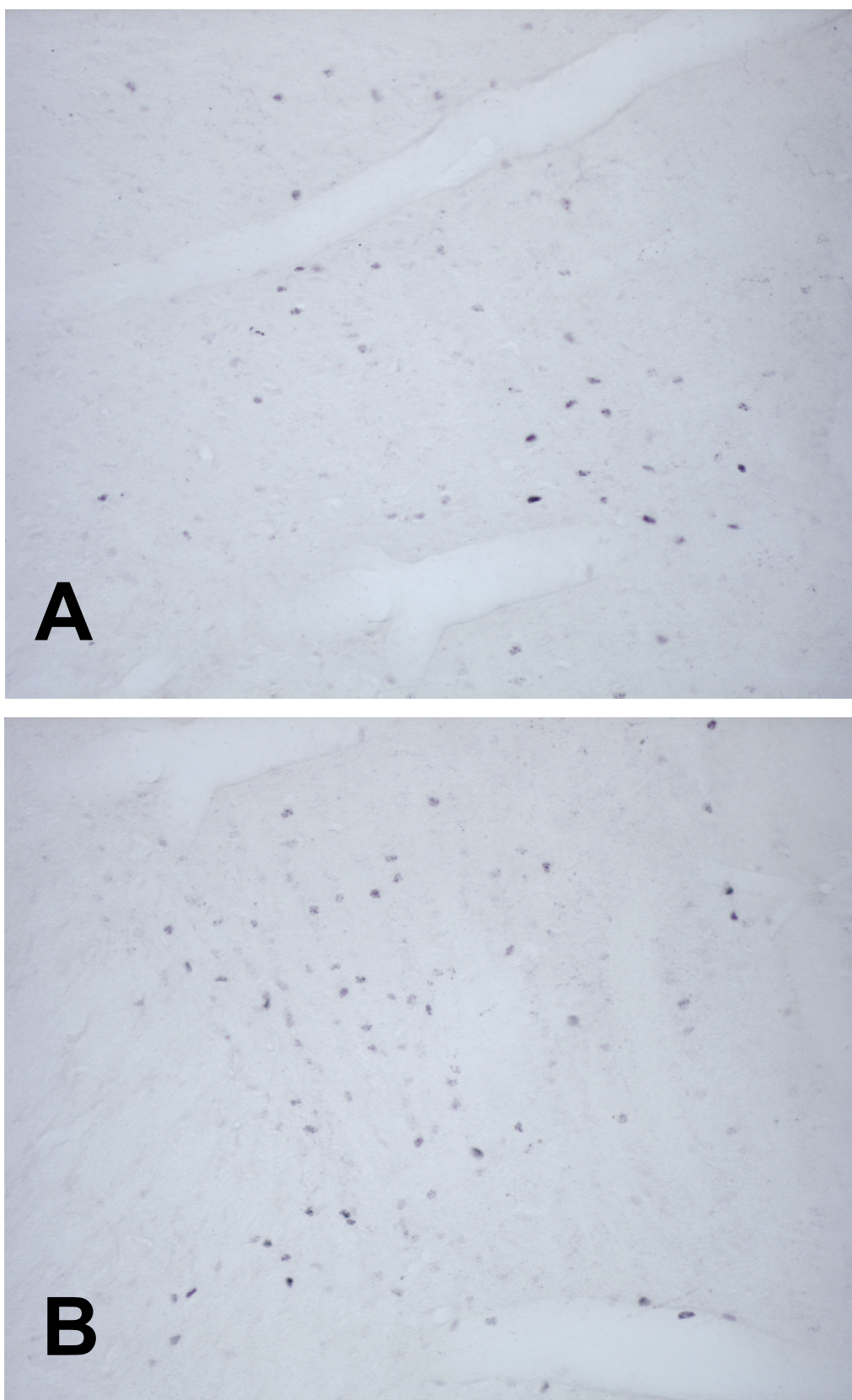


Fig. 4.31.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección contralateral a la aplicación del estímulo doloroso, **(A)** en los subnúcleos sIPB y dIPB y **(B)** en el subnúcleo eIPB.



Fig. 4.32.- Microfotografía (20x) de un corte coronal a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestra la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección contralateral a la aplicación del estímulo doloroso en KF.

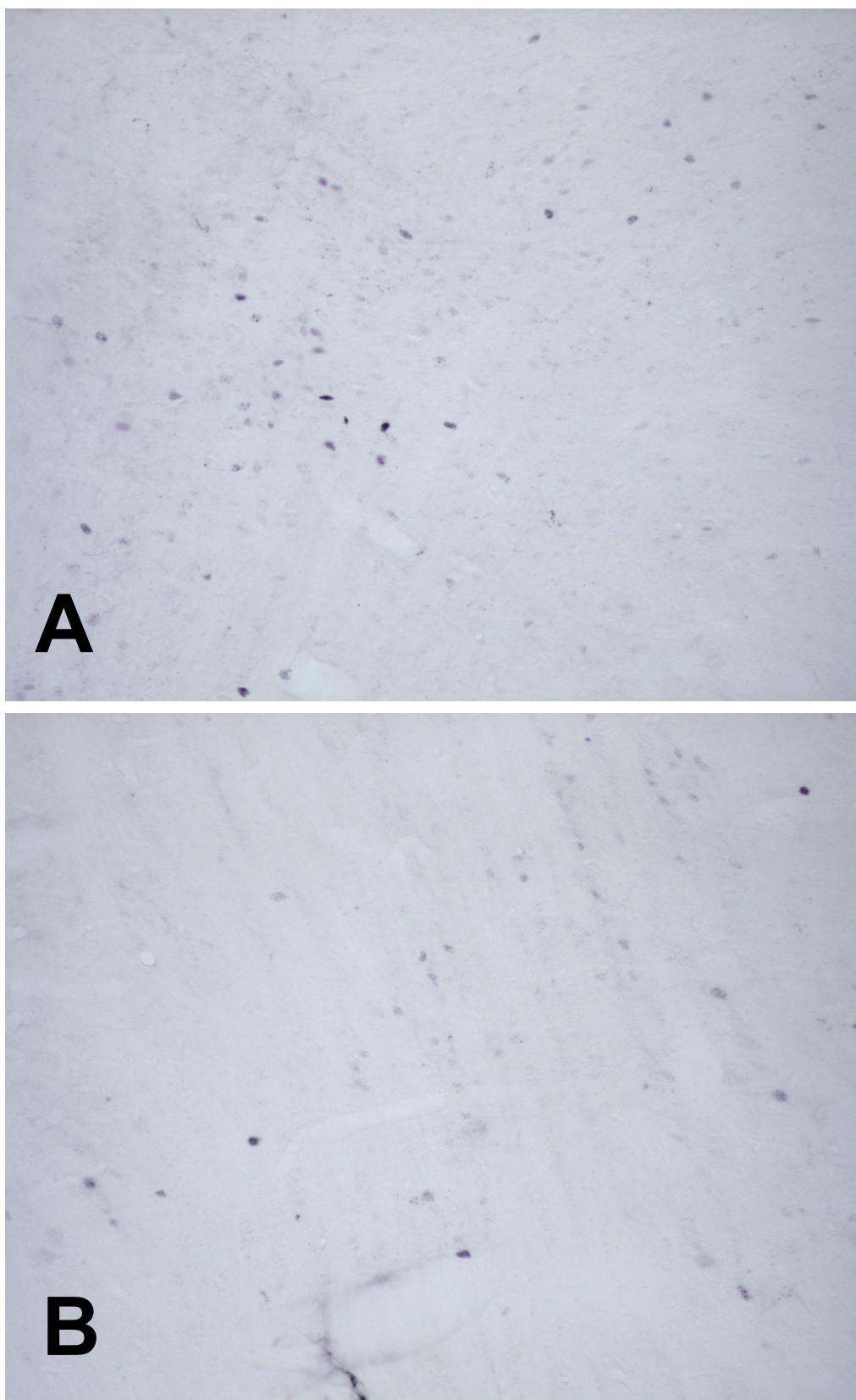


Fig. 4.33.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección ipsilateral a la aplicación del estímulo doloroso, **(A)** en los subnúcleos slPB y dlPB y **(B)** en KF.



Fig. 4.34.- *Microfotografía (2,5x) de un corte coronal a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestra la inmunorreactividad frente a Fos.*

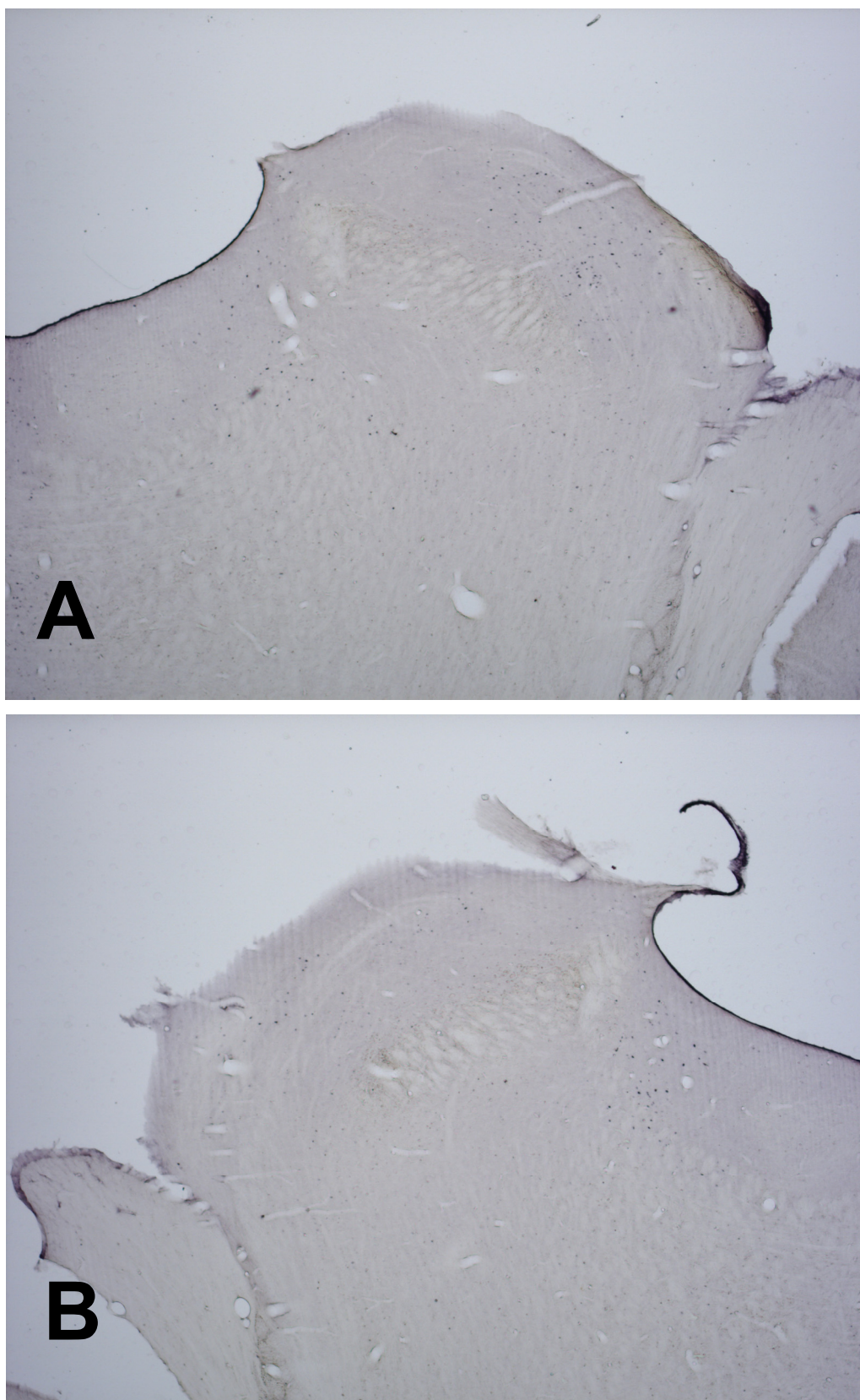


Fig. 4.35.- Microfotografías (4x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección **(A)** contralateral y **(B)** ipsilateral a la aplicación del estímulo doloroso.

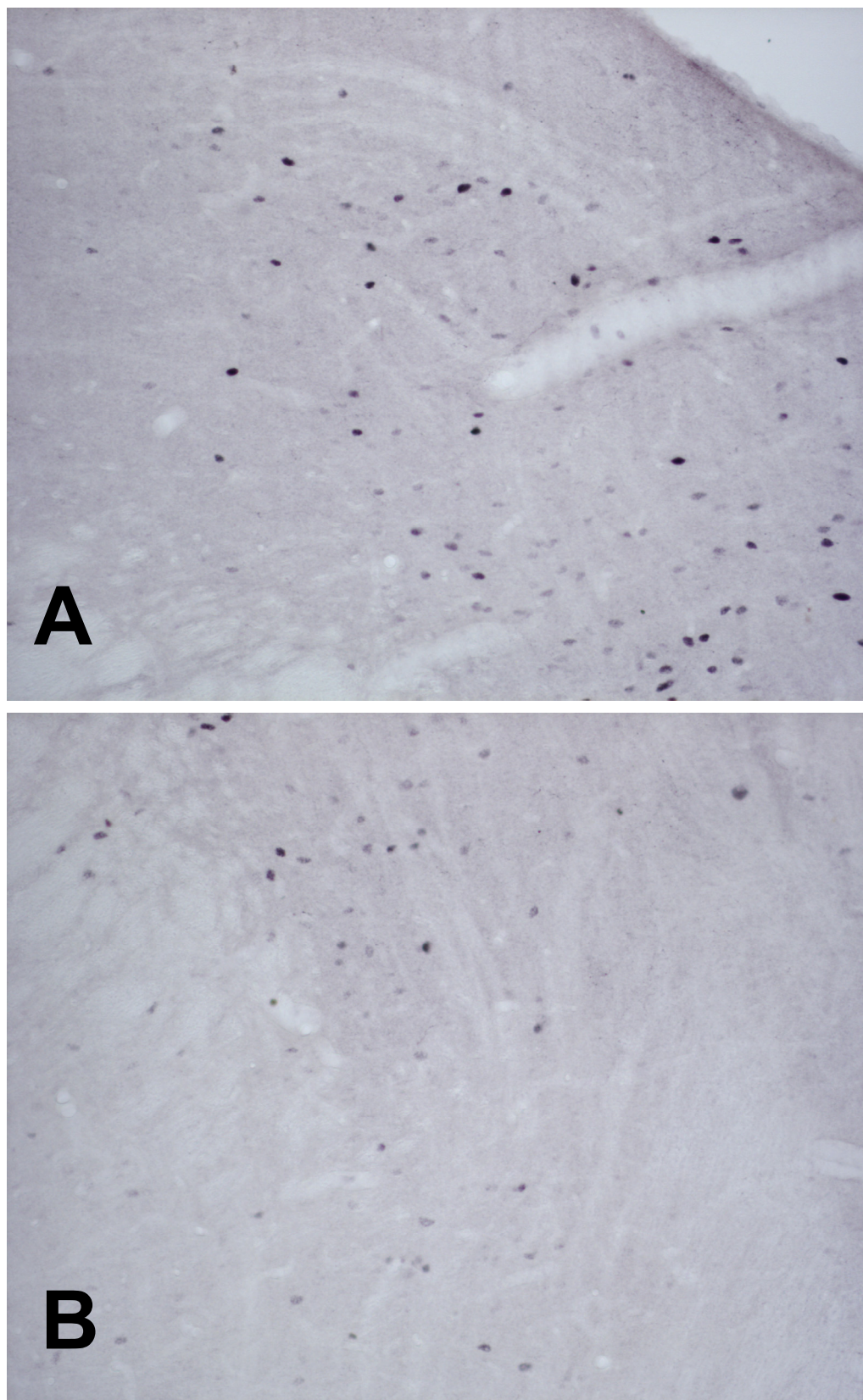


Fig. 4.36.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección contralateral a la aplicación del estímulo doloroso, **(A)** en el subnúcleo dlPB y **(B)** en el subnúcleo elPB.

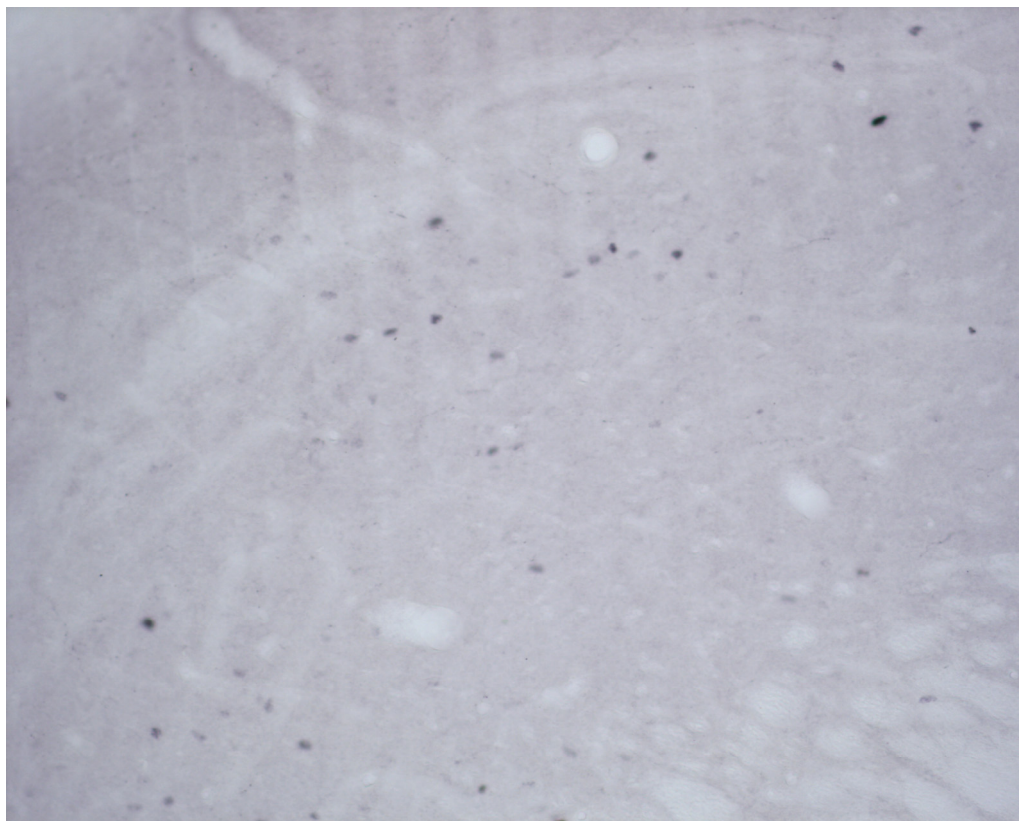


Fig. 4.37.- Microfotografía (20x) de un corte coronal a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestra la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección ipsilateral a la aplicación del estímulo doloroso en el subnúcleo dIPB.



Fig. 4.38.- Microfotografía (2,5x) de un corte coronal a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestra la inmunorreactividad frente a Fos.

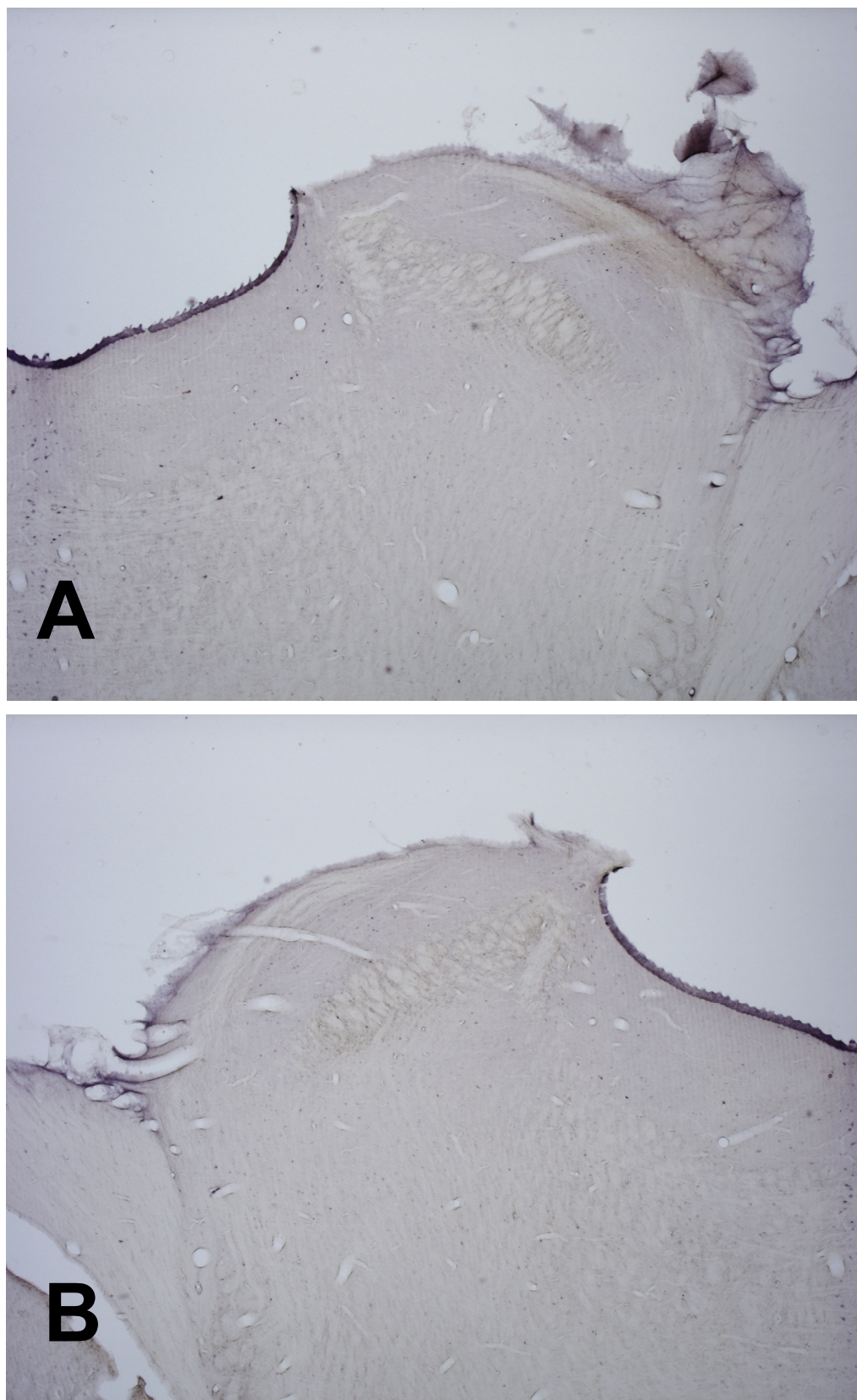


Fig. 4.39.- Microfotografías (4x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección **(A)** contralateral y **(B)** ipsilateral a la aplicación del estímulo doloroso.

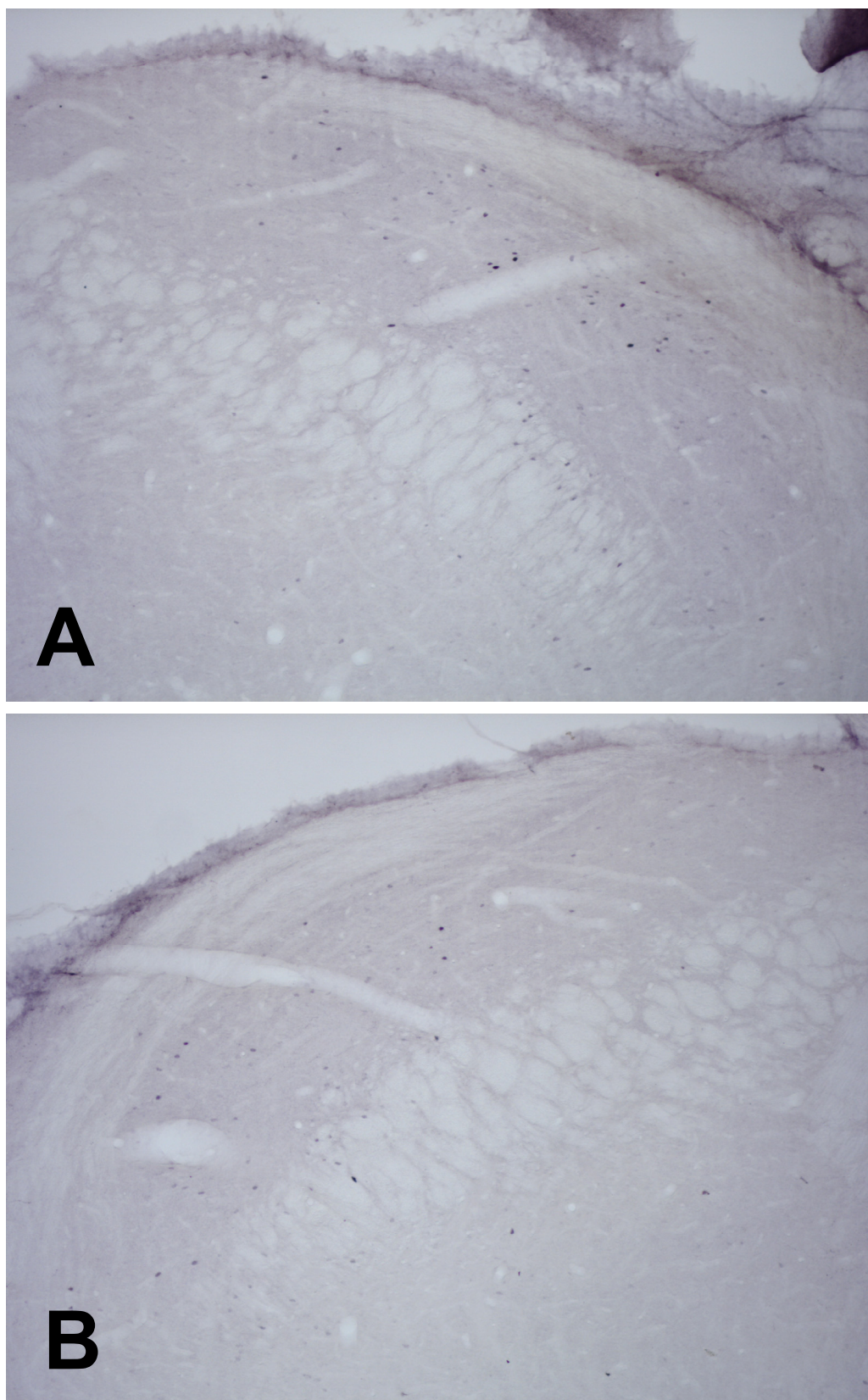


Fig. 4.40.- Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección **(A)** contralateral y **(B)** ipsilateral a la aplicación del estímulo doloroso.

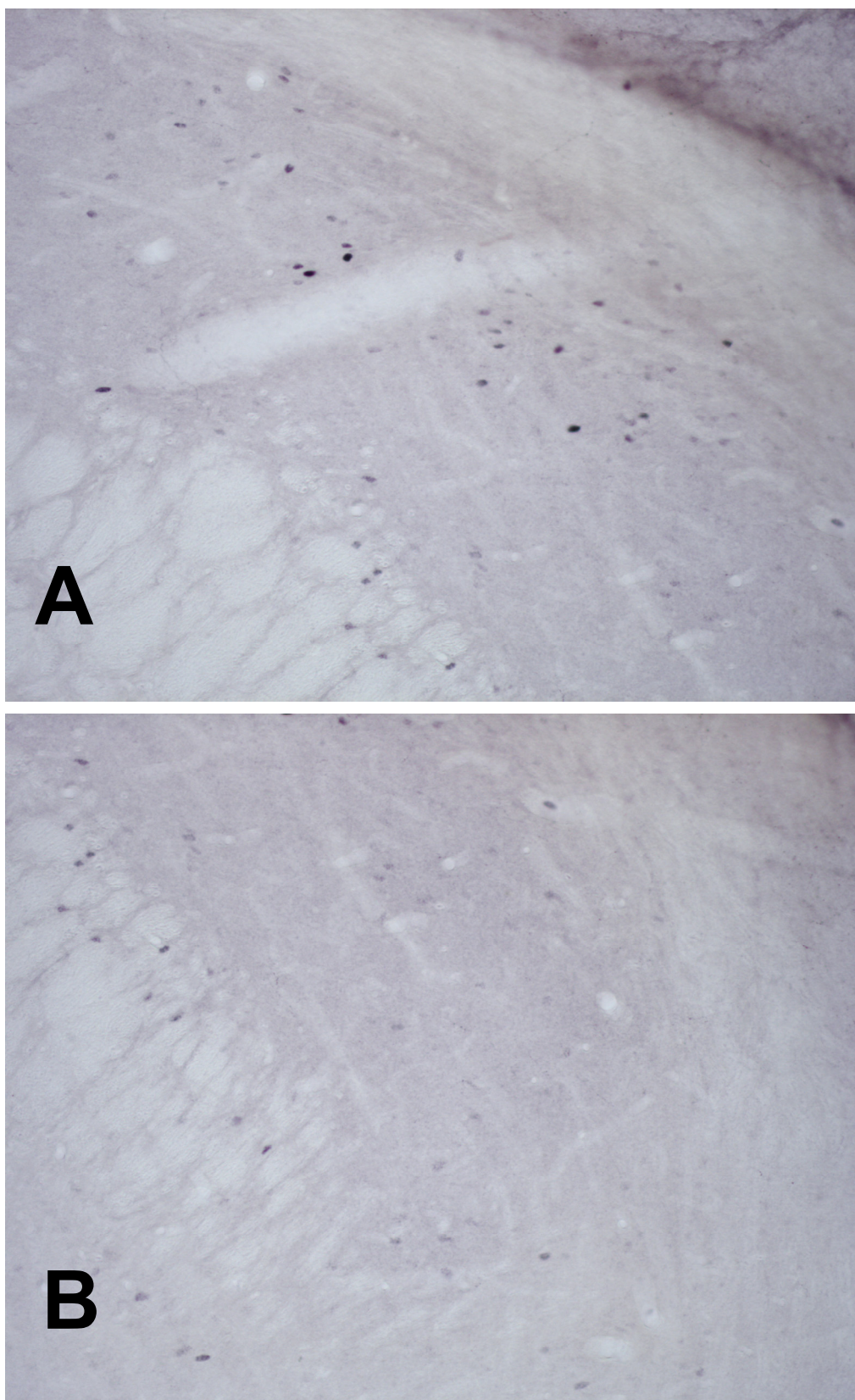


Fig. 4.41.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección contralateral a la aplicación del estímulo doloroso, **(A)** en el subnúcleo dIPB y **(B)** en el subnúcleo eIPB.

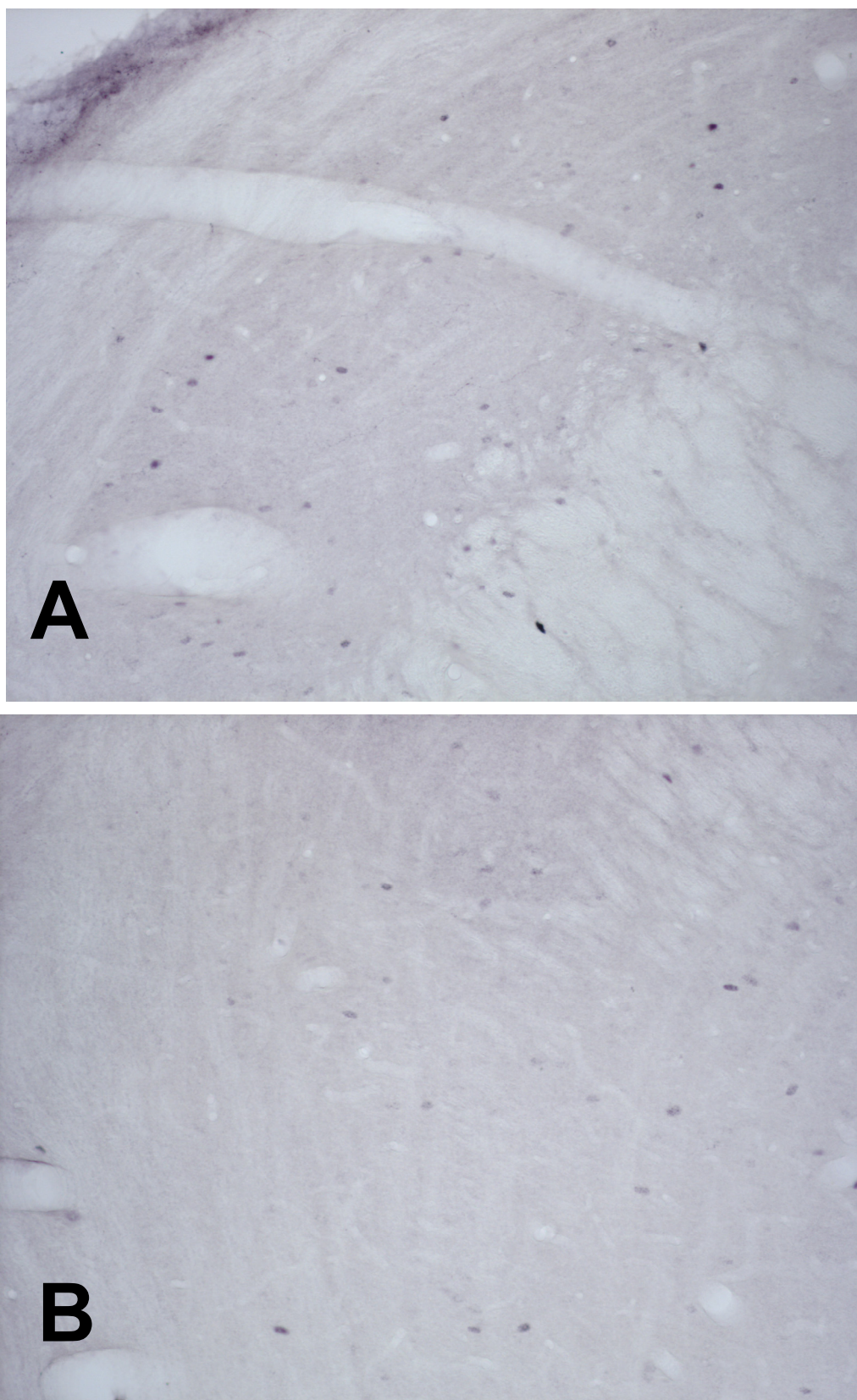


Fig. 4.42.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor somático (DS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos, en una hemisección ipsilateral a la aplicación del estímulo doloroso, **(A)** en el subnúcleo dLPB y **(B)** en el subnúcleo eLPB.

2.6.- Grupo Dolor Visceral.

El grupo estimulado con dolor visceral mediante el *test de las contracciones abdominales*, una inyección de ácido acético al 3,5% intraperitoneal, presentó al igual que los ejemplares estimulados con dolor somático superficial, un incremento bilateral, estadísticamente significativo, del número de células Fos-positivas, pero sin predominio contralateral. Asimismo, mientras que en los animales del grupo DS era el subnúcleo dlPB el más inmunorreactivo frente a Fos, en los del grupo DV el mayor incremento de elementos marcados lo ofreció el subnúcleo elPB. También mostraremos unas secciones coronales a nivel de los tercios intermedio y caudal del núcleo del tracto solitario (NTS), principal puerta de entrada vía nervio vago a la porción lateral del PB de la información sensorial procedente del territorio peritoneal, que demuestran la eficacia del *test de las contracciones abdominales* en activar las neuronas nociceptoras de ese territorio peritoneal.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm) el incremento de inmunoreactividad se centró en el subnúcleo dlPB y en KF, a los que siguió el subnúcleo elPB mostraron valores por encima de lo apreciado en el grupo CS.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) ya se produjo un incremento notable del número de células marcadas, a expensas del subnúcleo dlPB y, muy especialmente, elPB, aunque sin alcanzar los valores obtenidos en el grupo CN.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) se mantuvo claramente la elevada inmunoreactividad del subnúcleo elPB, manteniéndose discretamente por encima de los valores basales el subnúcleo dlPB.

	NIVEL ROSTRAL	NIVEL INTERMEDIO	NIVEL CAUDAL
Grupo DV	44±7	56±9	52±8

Tabla 4.5.- Media (\pm Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 μ m de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo dolor visceral (DV).

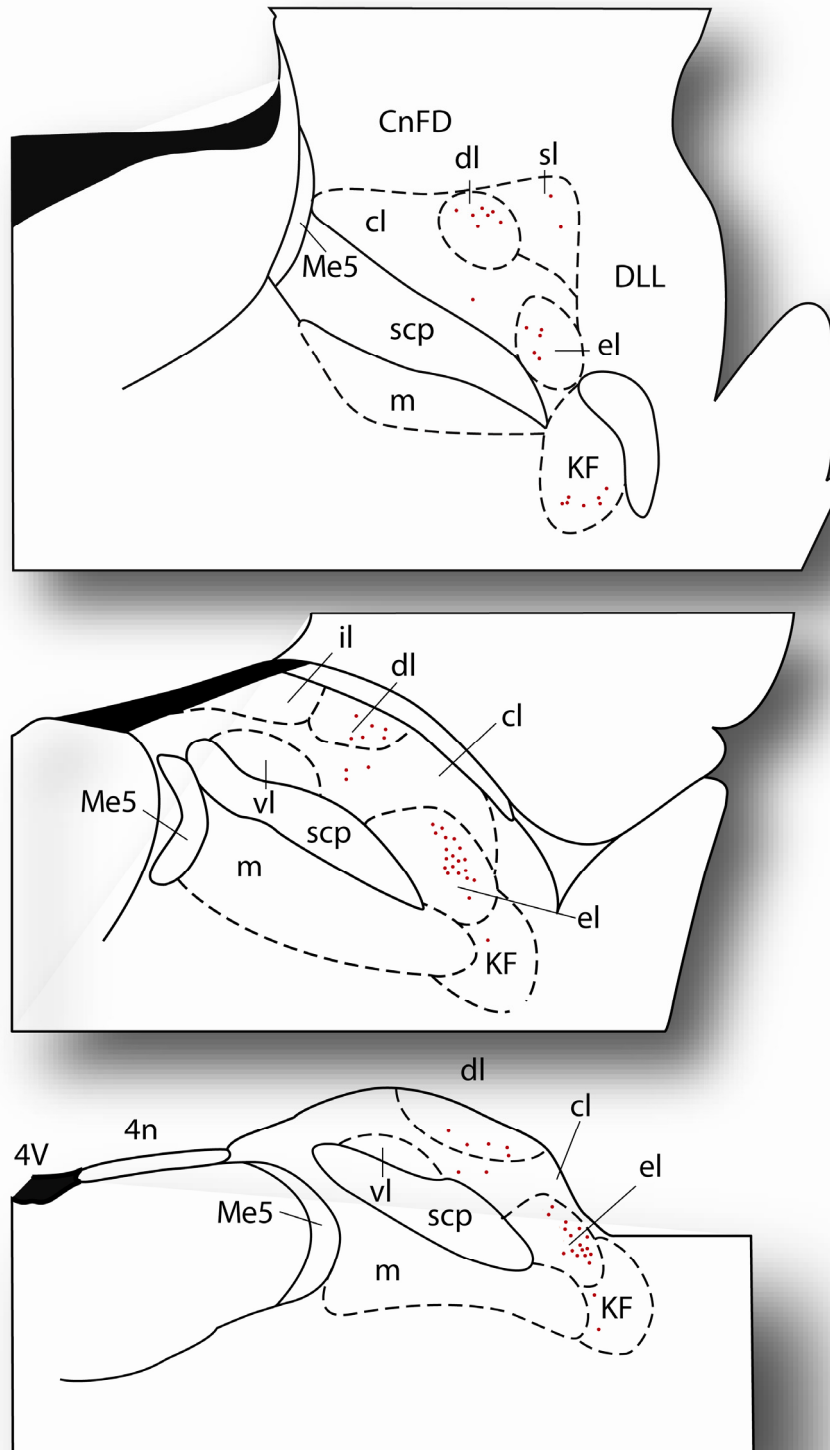


Fig. 4.43.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupo dolor visceral (DV) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB de rata. (Cada punto equivale a 2 neuronas Fos-positivas).

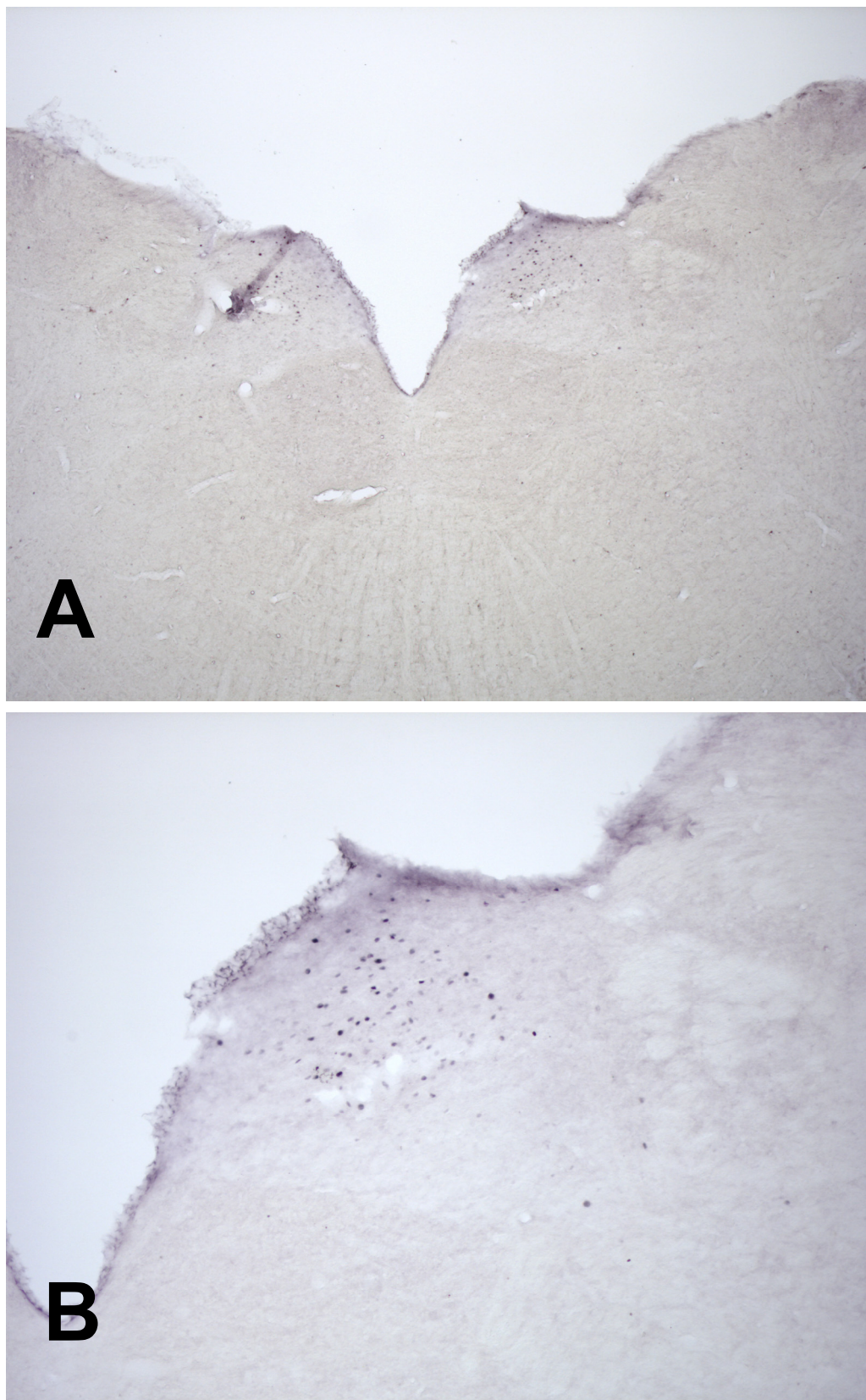


Fig. 4.44.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de un corte coronal a nivel del tercio intermedio del núcleo del tracto solitario (NTS) de una rata del grupo dolor visceral (DV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

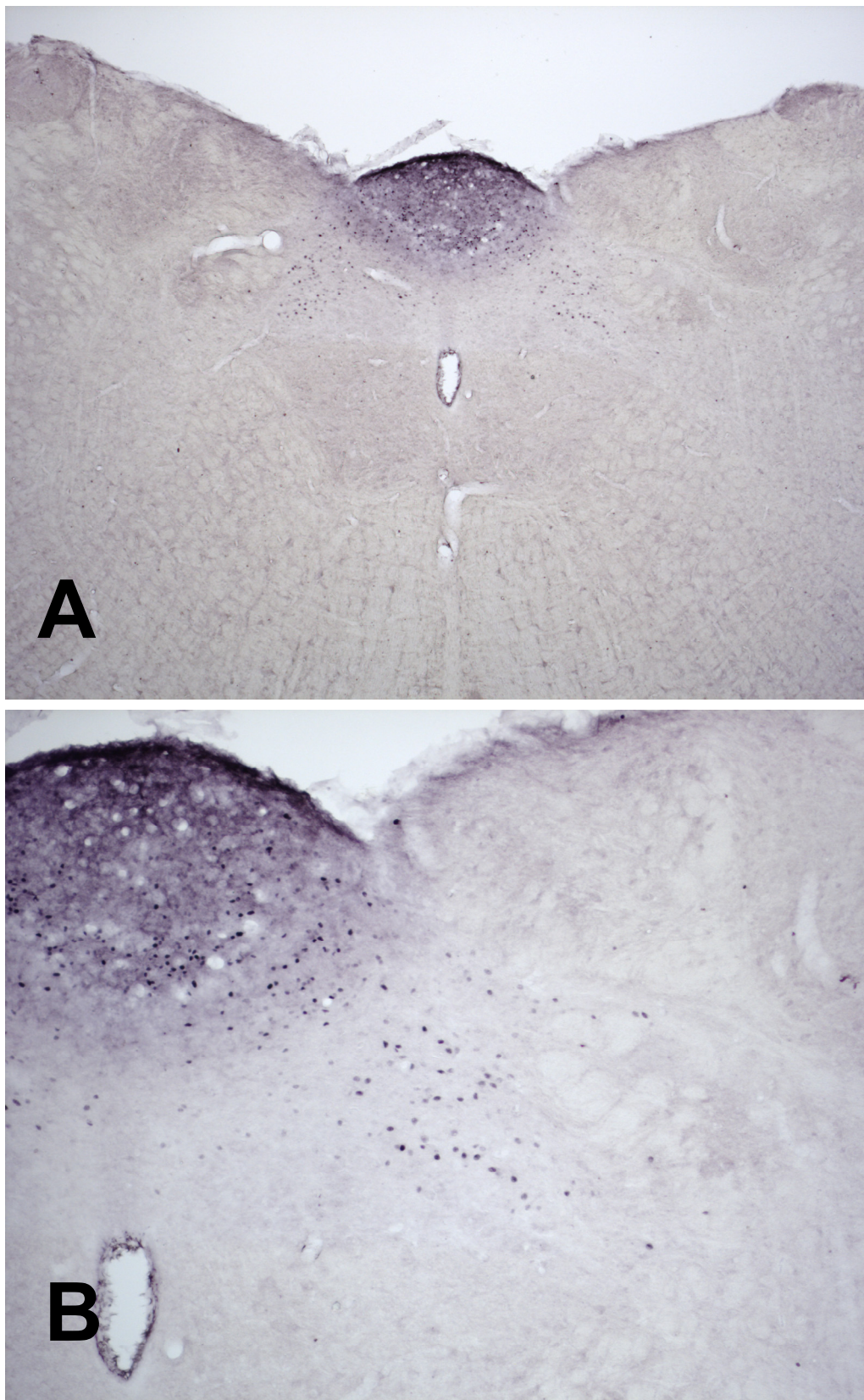


Fig. 4.45.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de un corte coronal a nivel del tercio caudal del núcleo del tracto solitario (NTS) de una rata del grupo dolor visceral (DV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

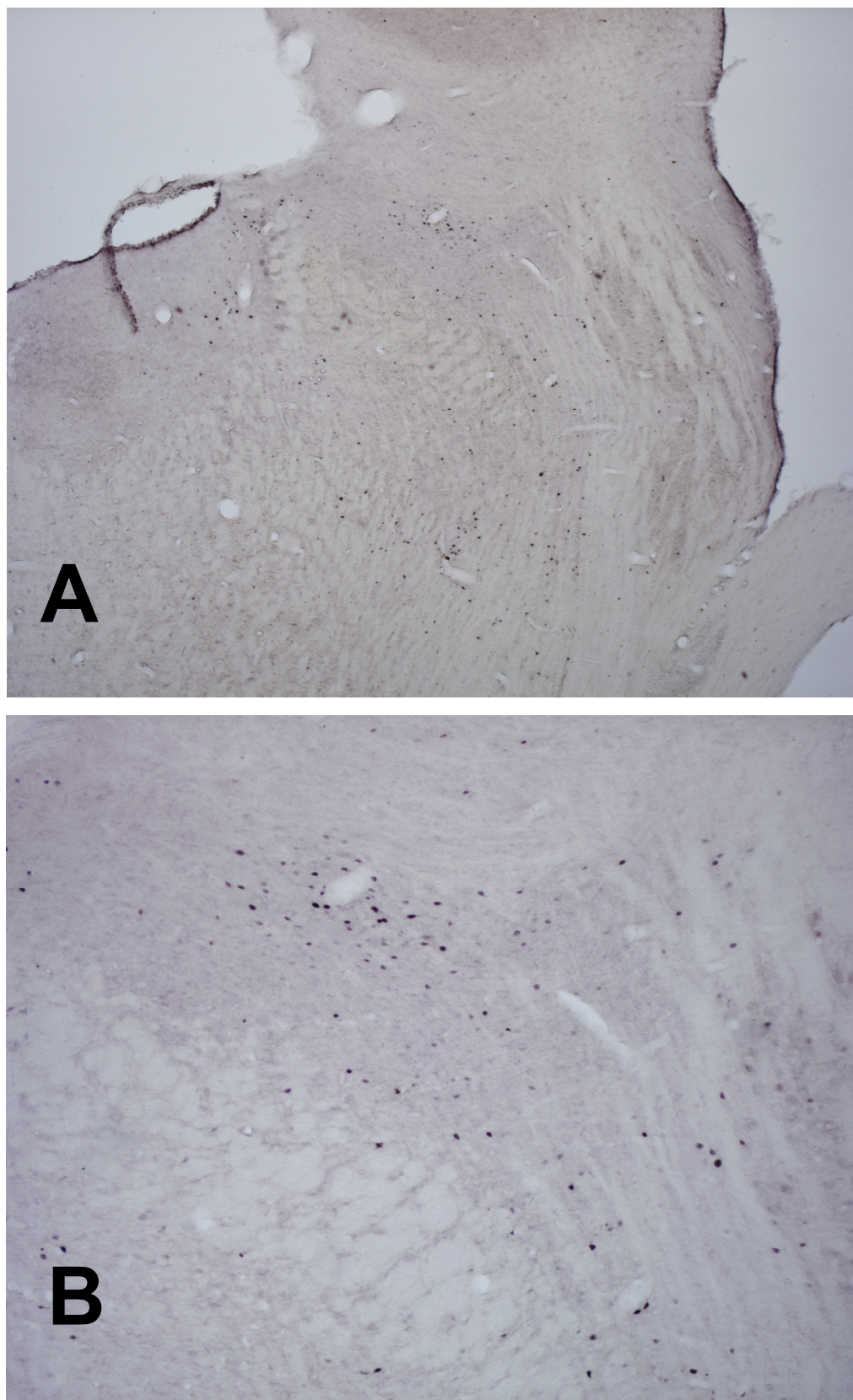


Fig. 4.46.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor visceral (DV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

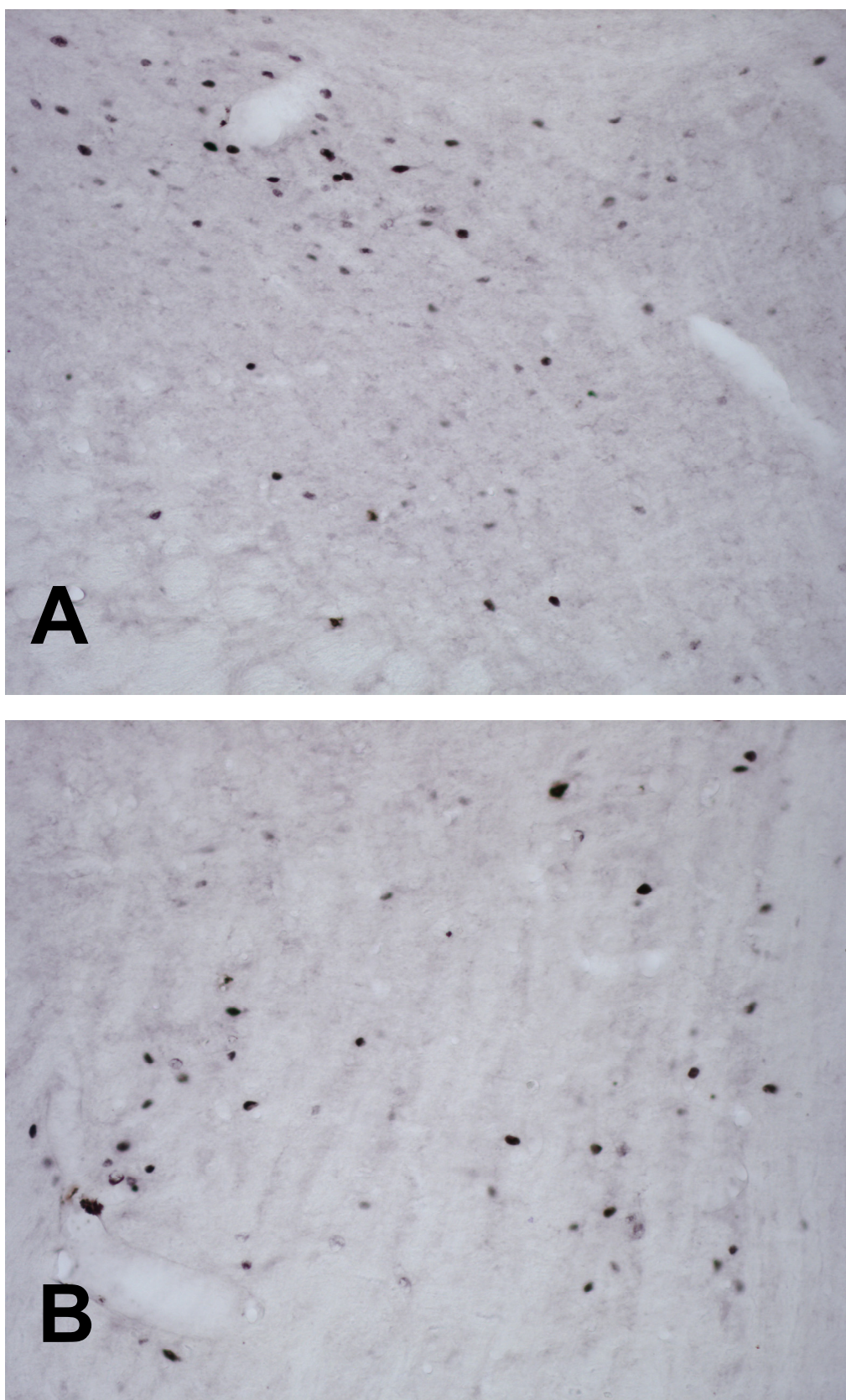


Fig. 4.47.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor visceral (DV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos **(A)** en el subnúcleo dlPB y **(B)** en KF.

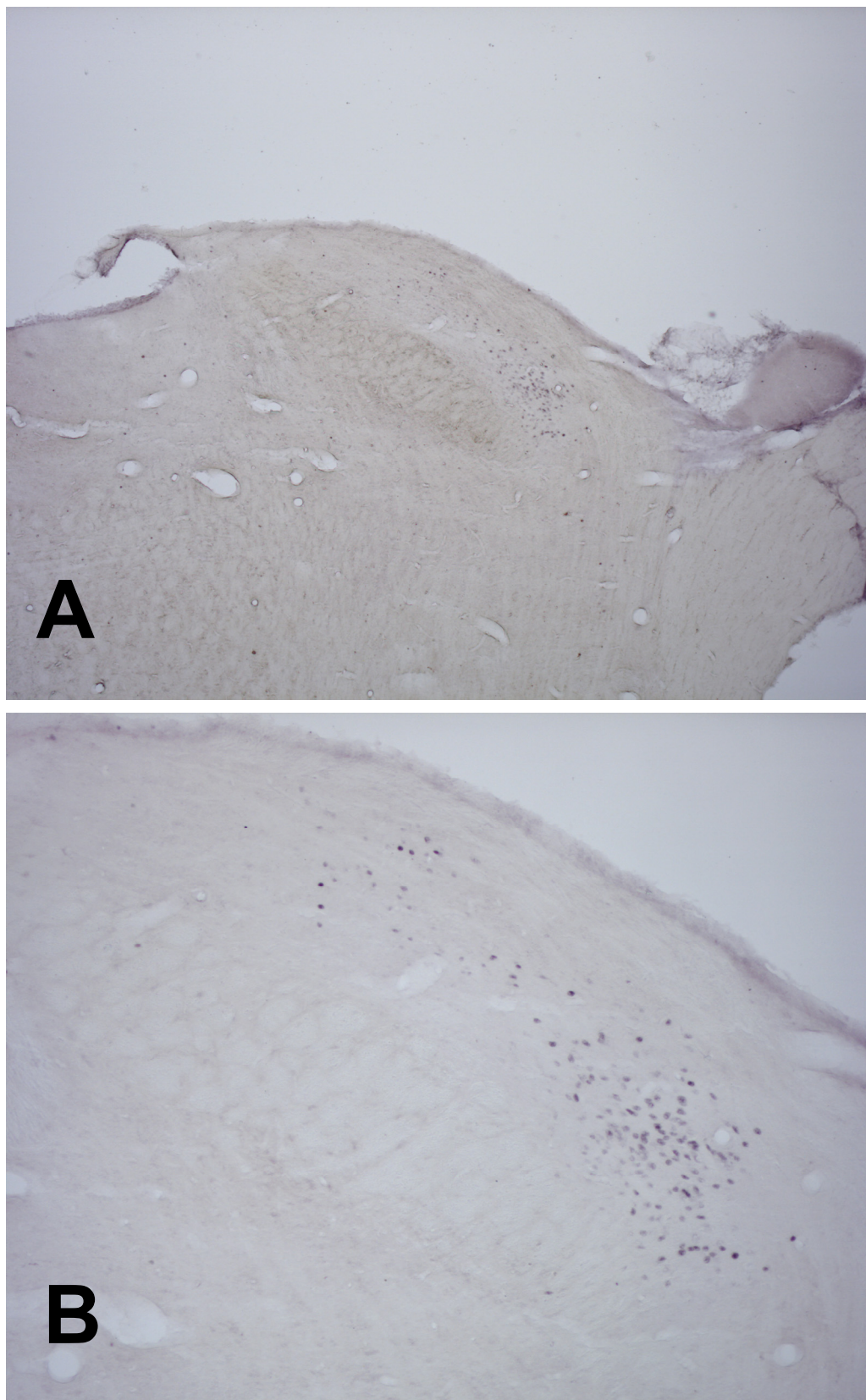


Fig. 4.48.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor visceral (DV), que muestran la inmunoreactividad frente a Fos.

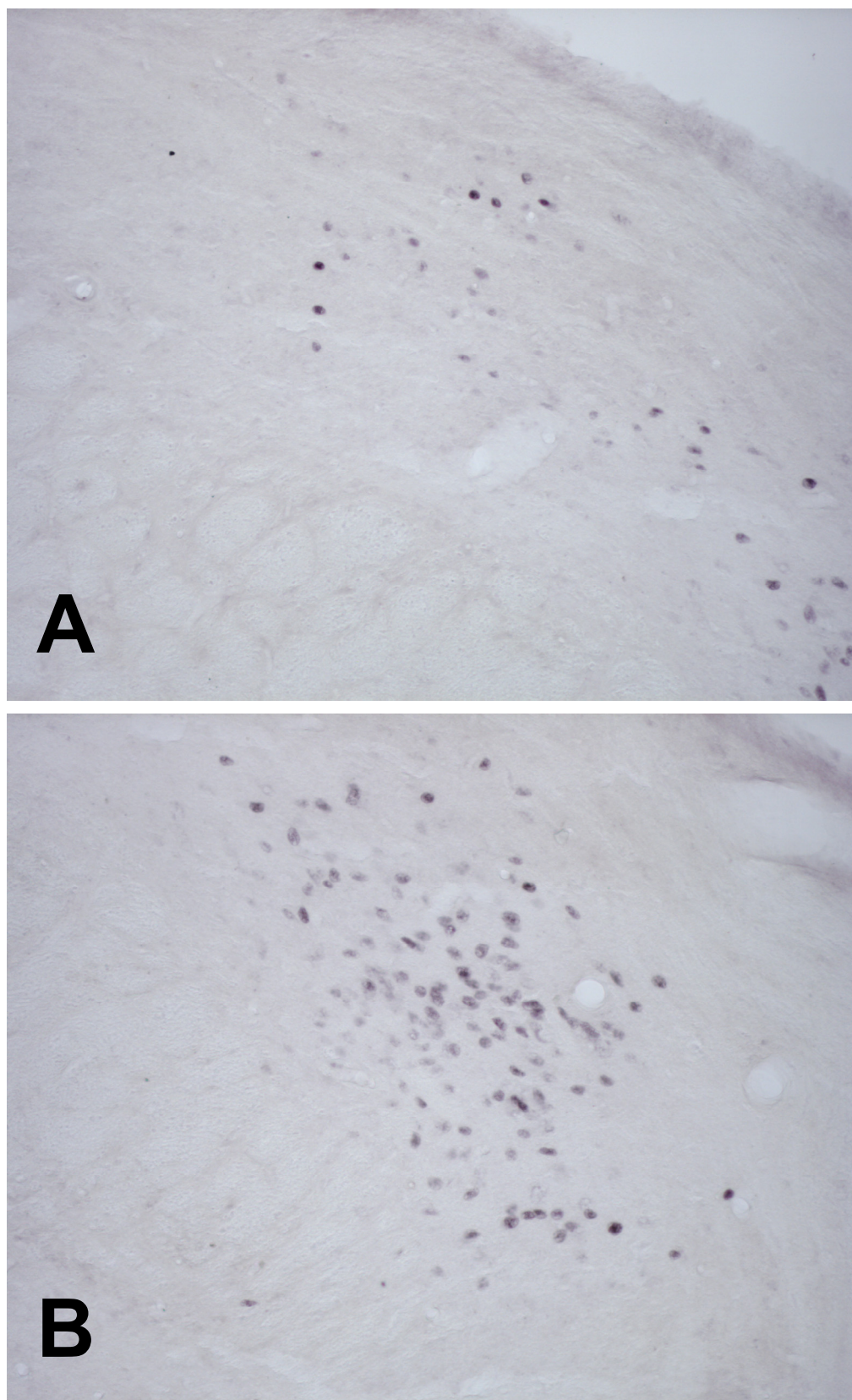


Fig. 4.49.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor visceral (DV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos **(A)** en el subnúcleo dlPB y **(B)** en eIPB.

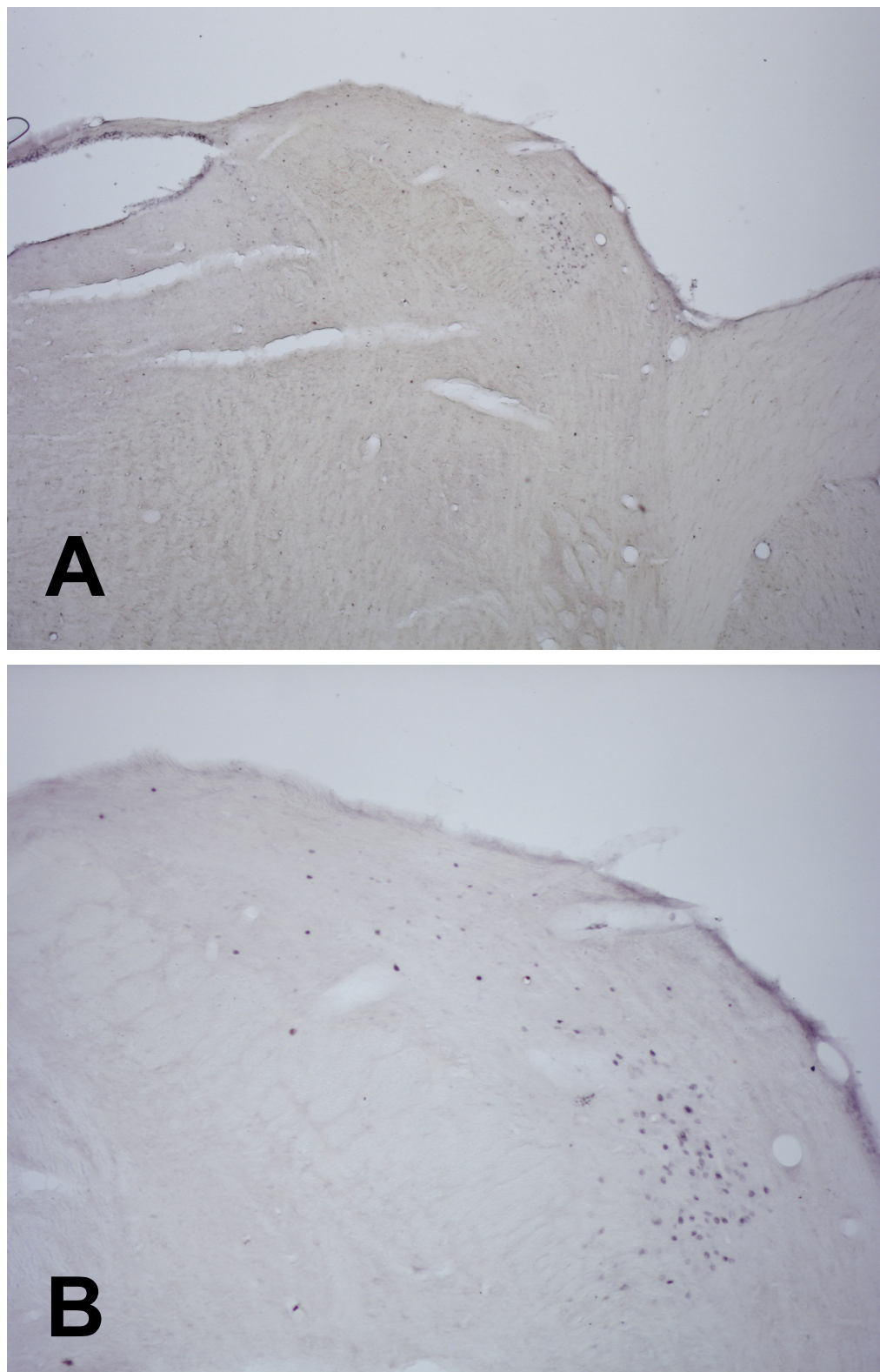


Fig. 4.50.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor visceral (DV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

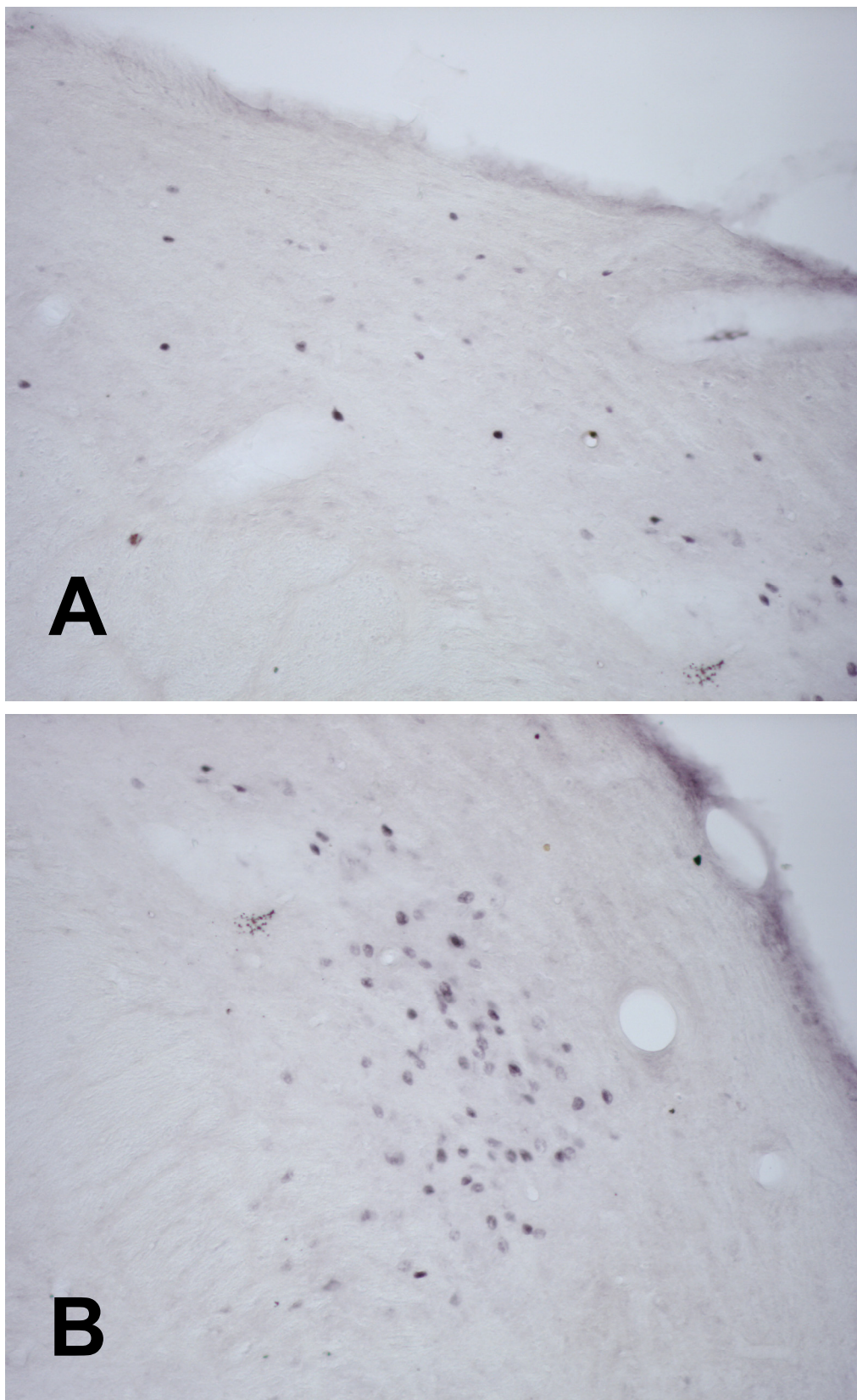


Fig. 4.51.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo dolor visceral (DV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos (**A**) en el subnúcleo dIPB y (**B**) en elPB.

2.7.- Grupo Morfina+Dolor somático (MS).

En los animales tratados con morfina de forma previa a la aplicación de un estímulo doloroso somático superficial pudimos observar un patrón de distribución de Fos similar al observado en los animales del grupo DS. Esto es, un incremento bilateral de la inmunorreactividad frente a Fos, con predominio contralateral, debida fundamentalmente al aumento del marcaje en el subnúcleo sIPB y en KF en el tercio rostral y en el subnúcleo dIPB en los tercios intermedio y caudal. Al igual que en el grupo DS ofreceremos la descripción en base a los valores hallados en las hemisecciones contralaterales al estímulo nociceptivo aplicado.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), además del ya mencionado aumento del marcaje en el subnúcleo sIPB y en KF, apreciamos un aparente descenso estadísticamente no significativo en el número de células inmunorreactivas en el subnúcleo eIPB.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm), al igual que en el grupo DS, frente al descenso generalizado del marcaje en el resto de subnúcleos, en el subnúcleo dIPB se incrementó el número de células marcadas.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm), como en el tercio intermedio, el único subnúcleo que mostró valores altos respecto del grupo CS y del mismo modo que el grupo DS fue el dIPB.

	NIVEL ROSTRAL	NIVEL INTERMEDIO	NIVEL CAUDAL
Grupo MS	54±7	50±7	26±6

Tabla 4.6.- Media (\pm Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 μ m de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo morfina+dolor somático (MS).

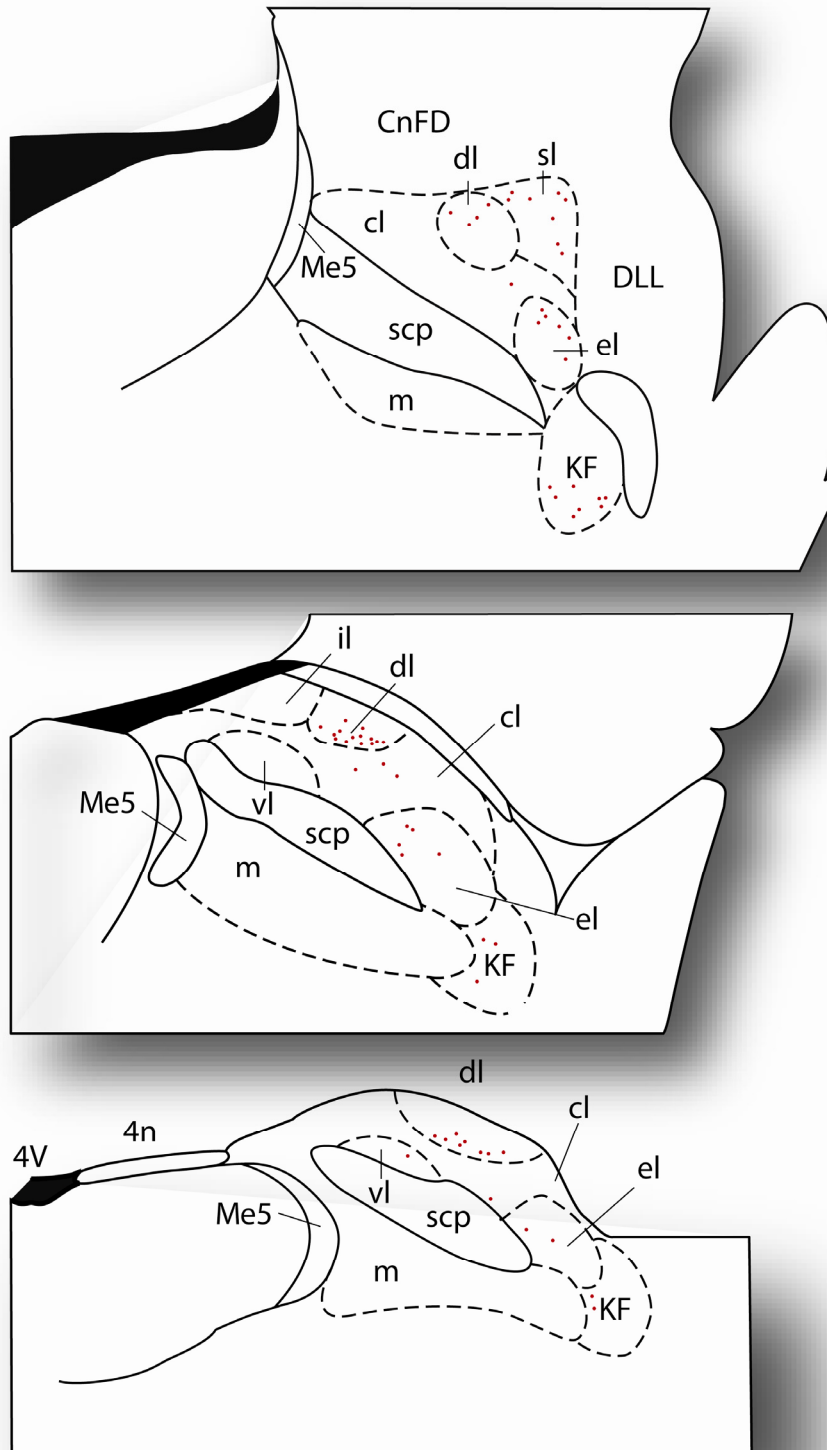


Fig. 4.52.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupomorfin+dolor somático (MS) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB de rata. (Cada punto equivale a 2 células Fos-positivas).

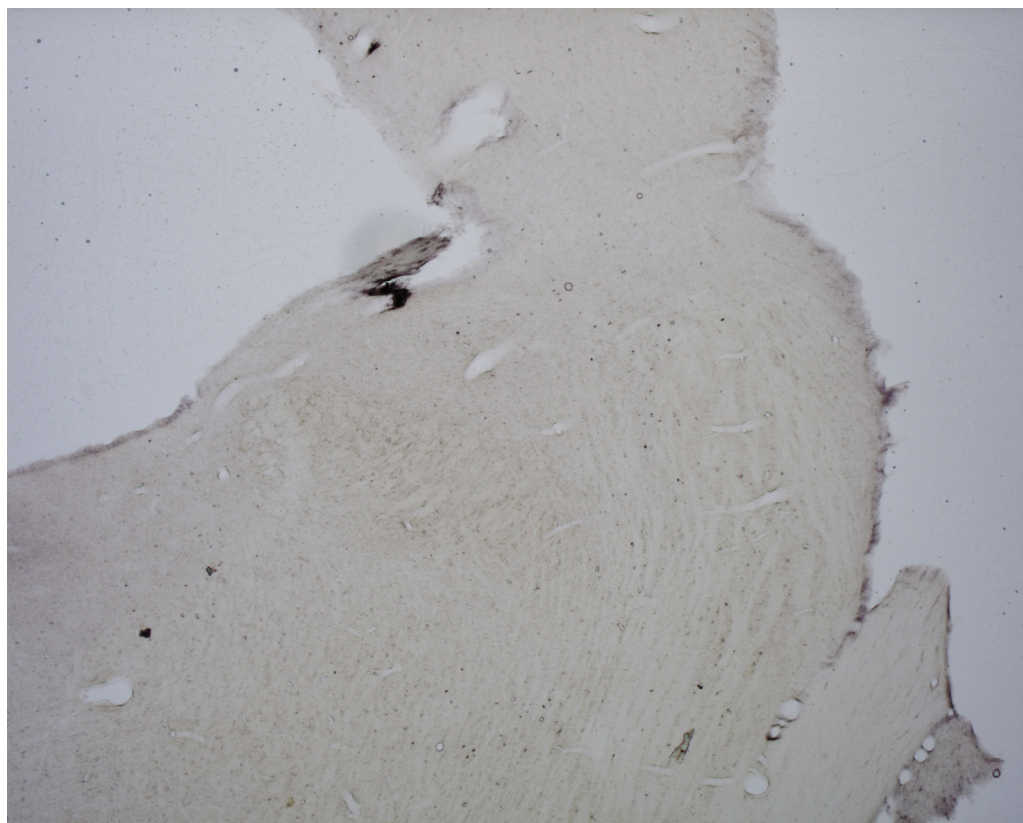


Fig. 4.53.- *Microfotografía (4x) de un corte coronal a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupomorfina+ dolor somático (MS), que muestra la inmunorreactividad frente a Fos,.*

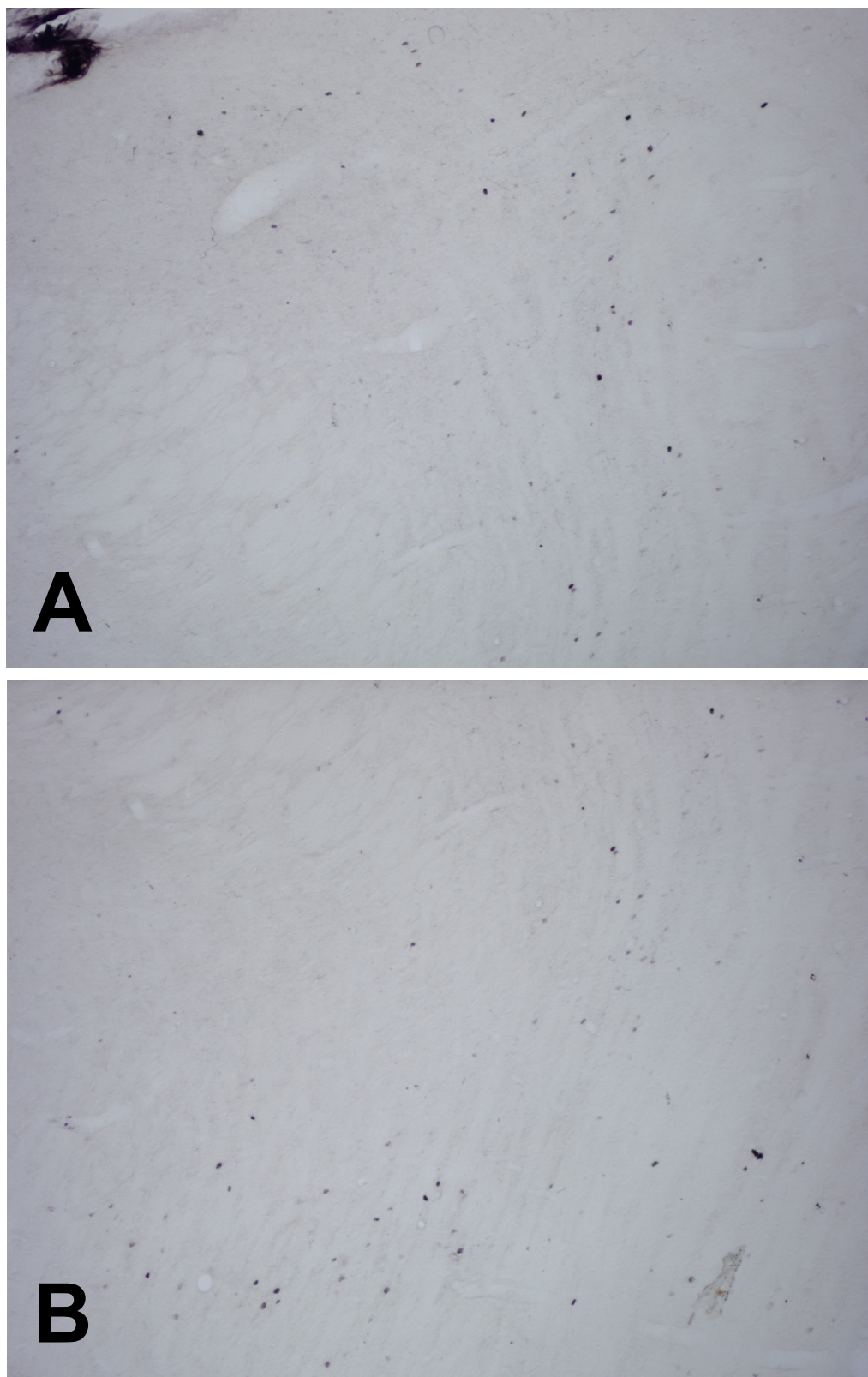


Fig. 4.54.- Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo morfina+dolor somático (MS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos **(A)** en los subnúcleos sLPB, dLPB, cLPB y eLPB y **(B)** en KF.

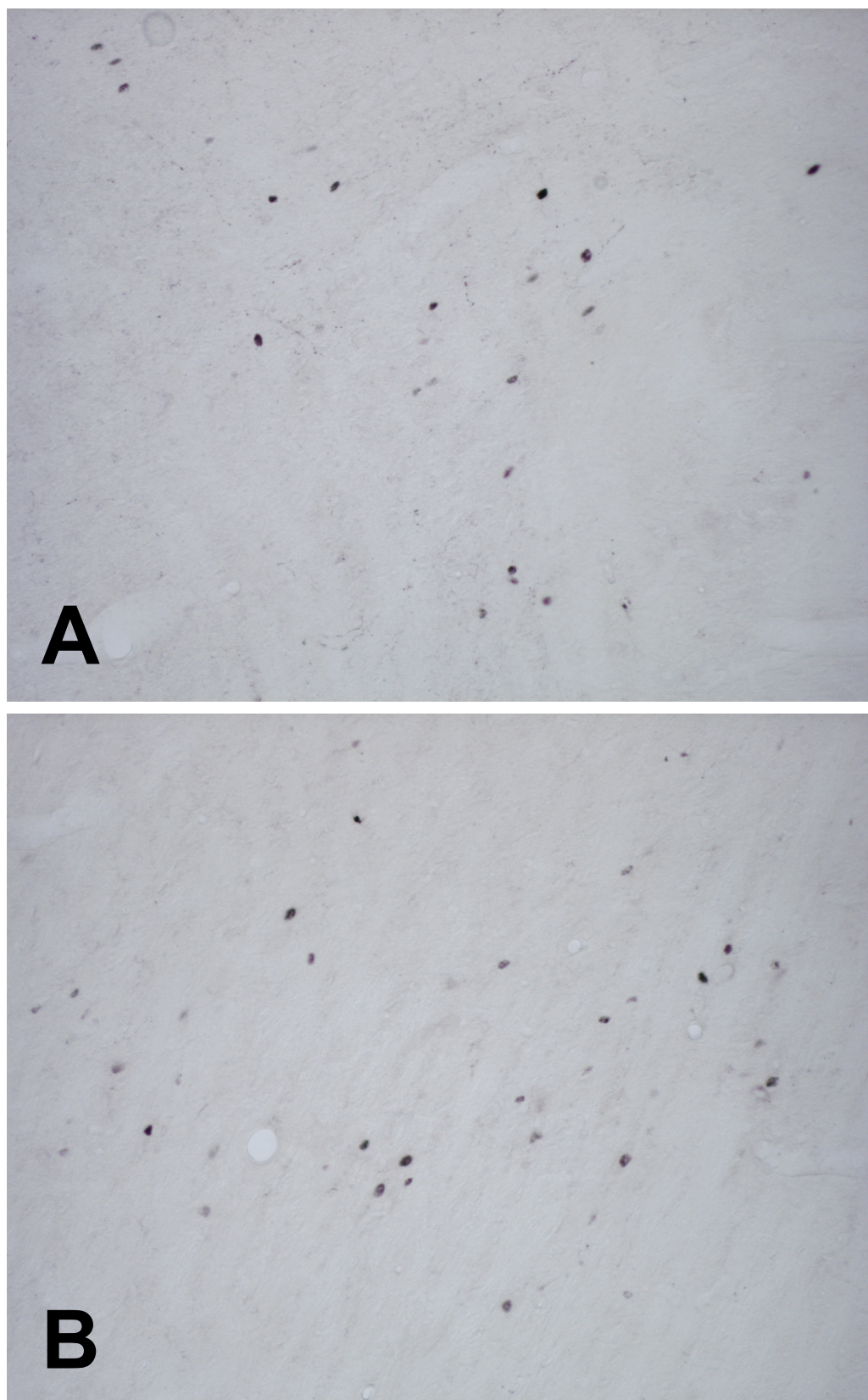


Fig. 4.55.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo morfina+dolor somático (MS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos **(A)** en los subnúcleos sIPB y dIPB y **(B)** en KF.

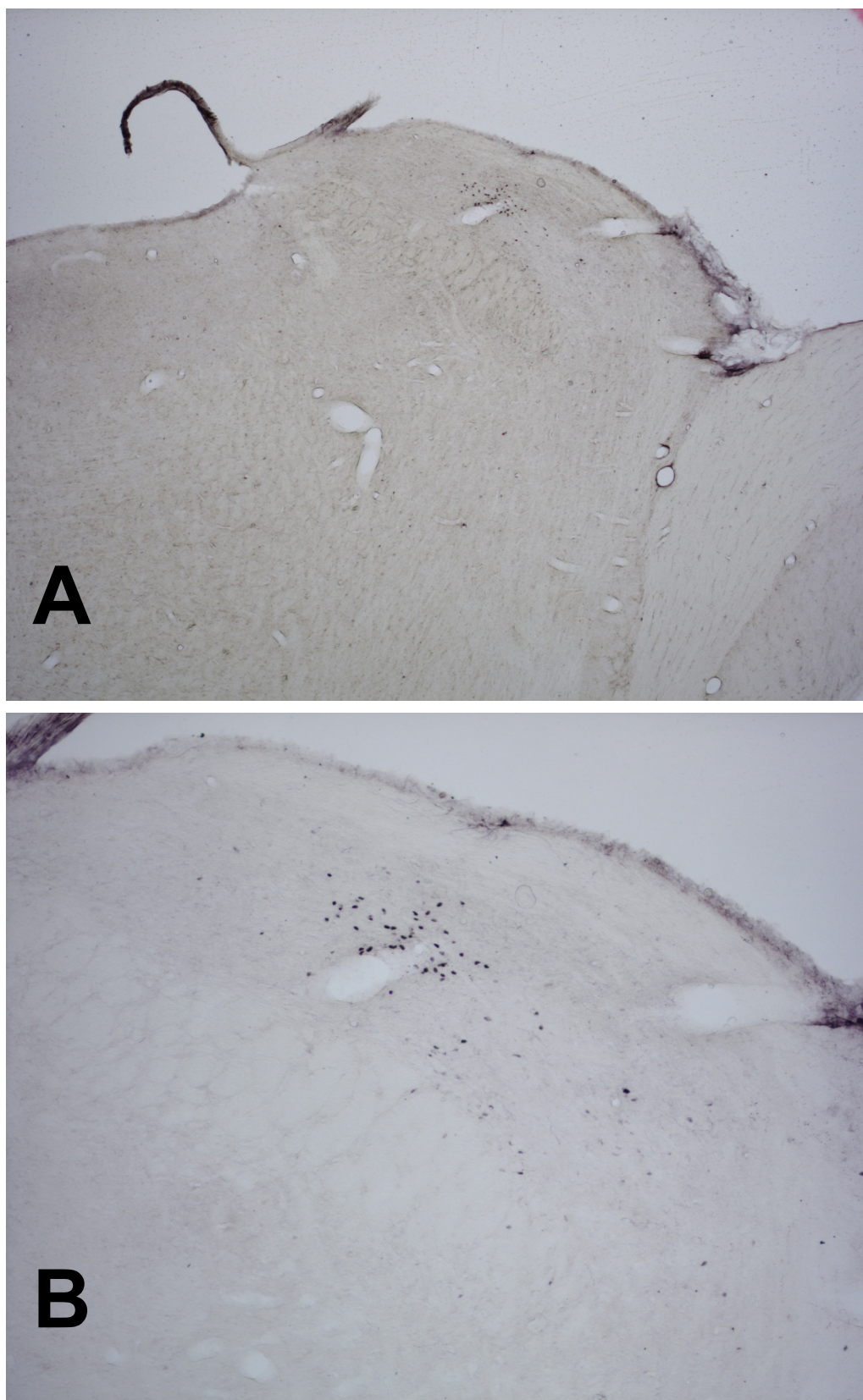


Fig. 4.56.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo morfina+dolor somático (MS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

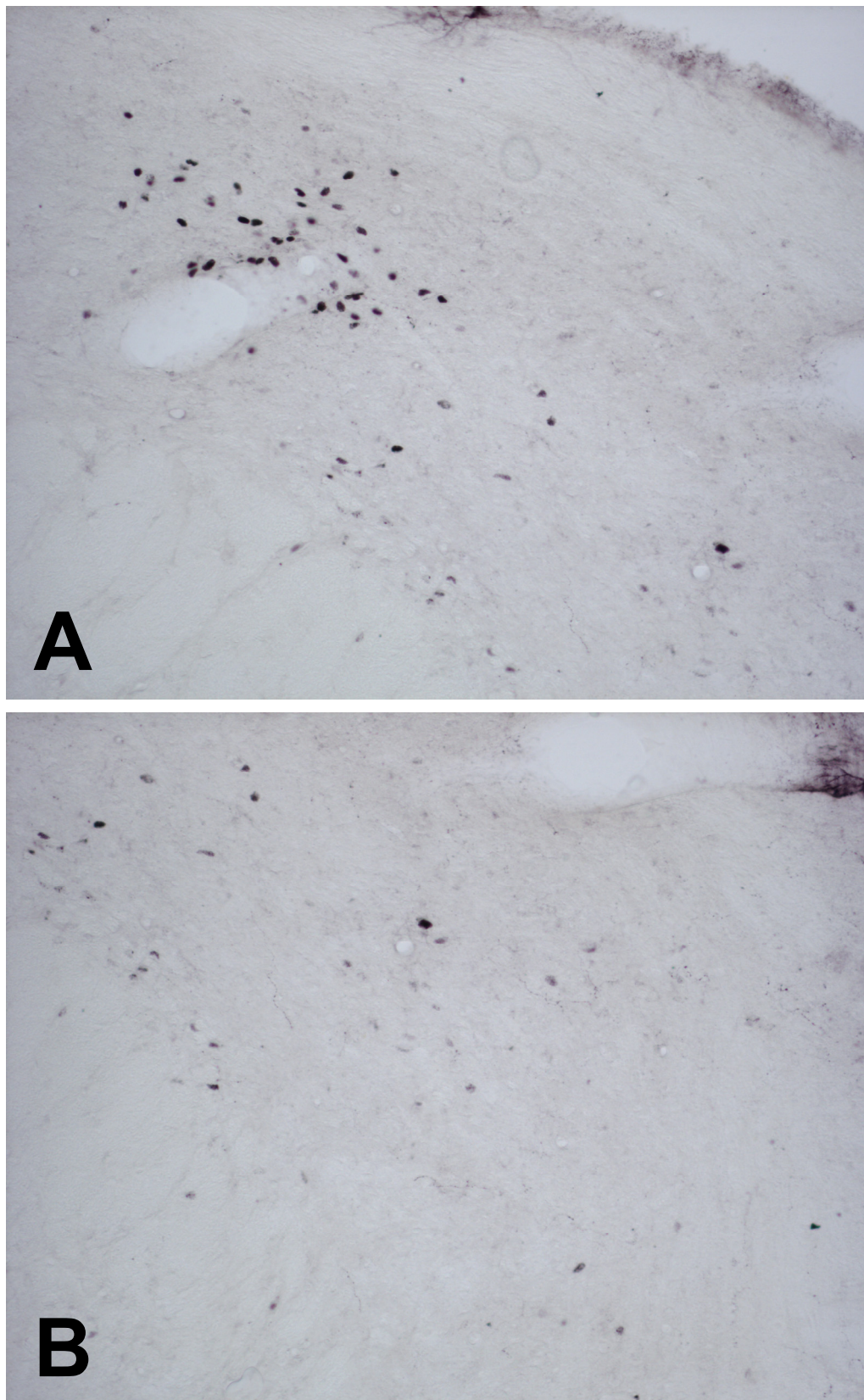


Fig. 4.57.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupomorfin+ dolor somático (MS), que muestran **(A)** la inmunorreactividad frente a Fos en el subnúcleo dIPB y **(B) su ausencia** en el eIPB.

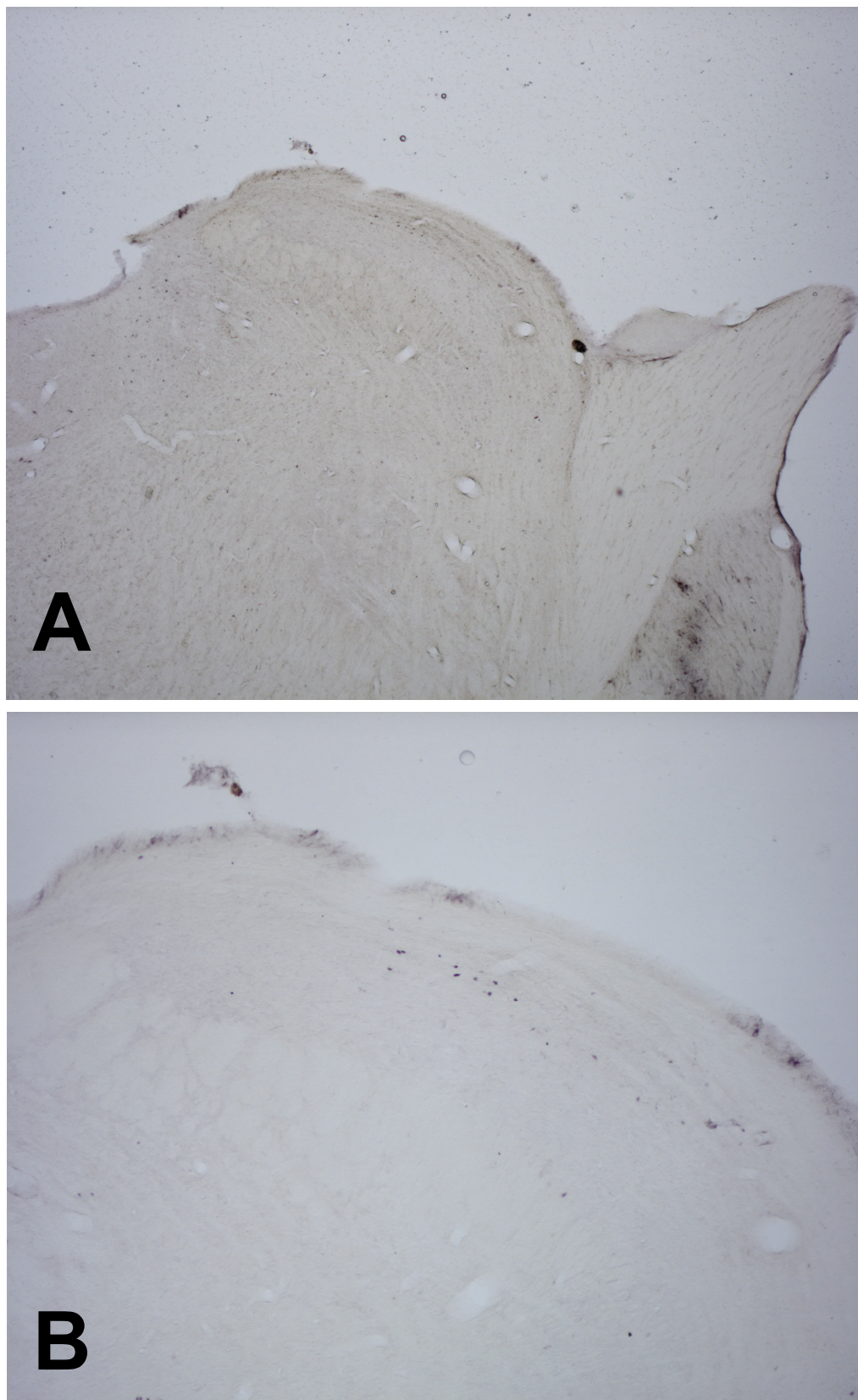


Fig. 4.58.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo morfina+dolor somático (MS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



Fig. 4.59.- Microfotografía (20x) de un corte coronal a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupomorfin+ dolor somático (MS), que muestra la inmunorreactividad frente a Fos en el subnúcleo dLPB y su **ausencia** en el LPB.

2.8.- Grupo Metamizol+Dolor somático (NS).

La administración previa al estímulo nociceptivo somático superficial de metamizol, a diferencia de lo ocurrido con la morfina, y del mismo modo que en el grupo CN, indujo una fuerte inmunorreacción bilateral frente a Fos, sin que se constataran diferencias estadísticamente significativas entre las hemisecciones ipsilaterales y sus correspondientes contralaterales. Se produjo, por tanto, una supresión del mayor marcaje contralateral inducido por el test de la formalina en los animales del grupo DS.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm) el patrón de distribución fue una mezcla de lo observado en los grupos CN y DS: en el subnúcleo sIPB el comportamiento fue el del mismo subnúcleo del grupo CN; sin embargo, en los subnúcleos dIPB y eIPB el marcaje se acercó más al medido en las mismas hemisecciones ipsilaterales de los animales del grupo DS.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) el patrón de distribución de Fos fue en todo similar al observado en los ejemplares del grupo CN (gran expresión de *c-fos* en los subnúcleos cIPB y eIPB), incluida la escasa inmunorreactividad detectada en el subnúcleo dIPB de la hemisección contralateral, que de este modo no mostró la inmunorreactividad provocada por el test de la formalina.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) se mantuvo el mismo patrón descrito para el nivel intermedio.

	NIVEL ROSTRAL	NIVEL INTERMEDIO	NIVEL CAUDAL
Grupo NS	63±8	130±17	105±14

Tabla 4.7.- Media (\pm Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 μ m de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo metamizol+dolor somático (NS).

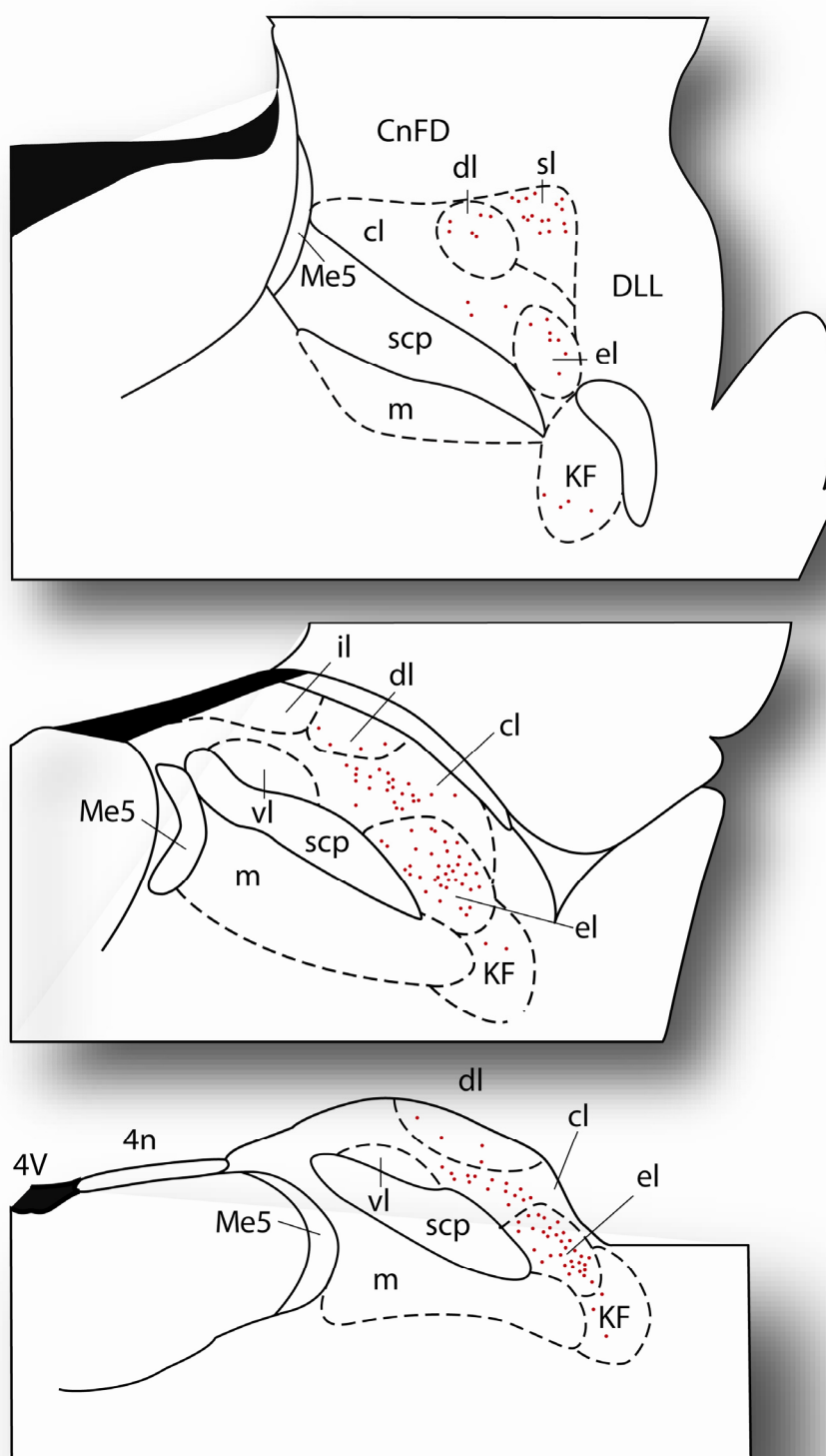


Fig. 4.60.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupo metamizol+dolor somático (NS) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB de rata. (Cada punto equivale a 2 células Fos-positivas).

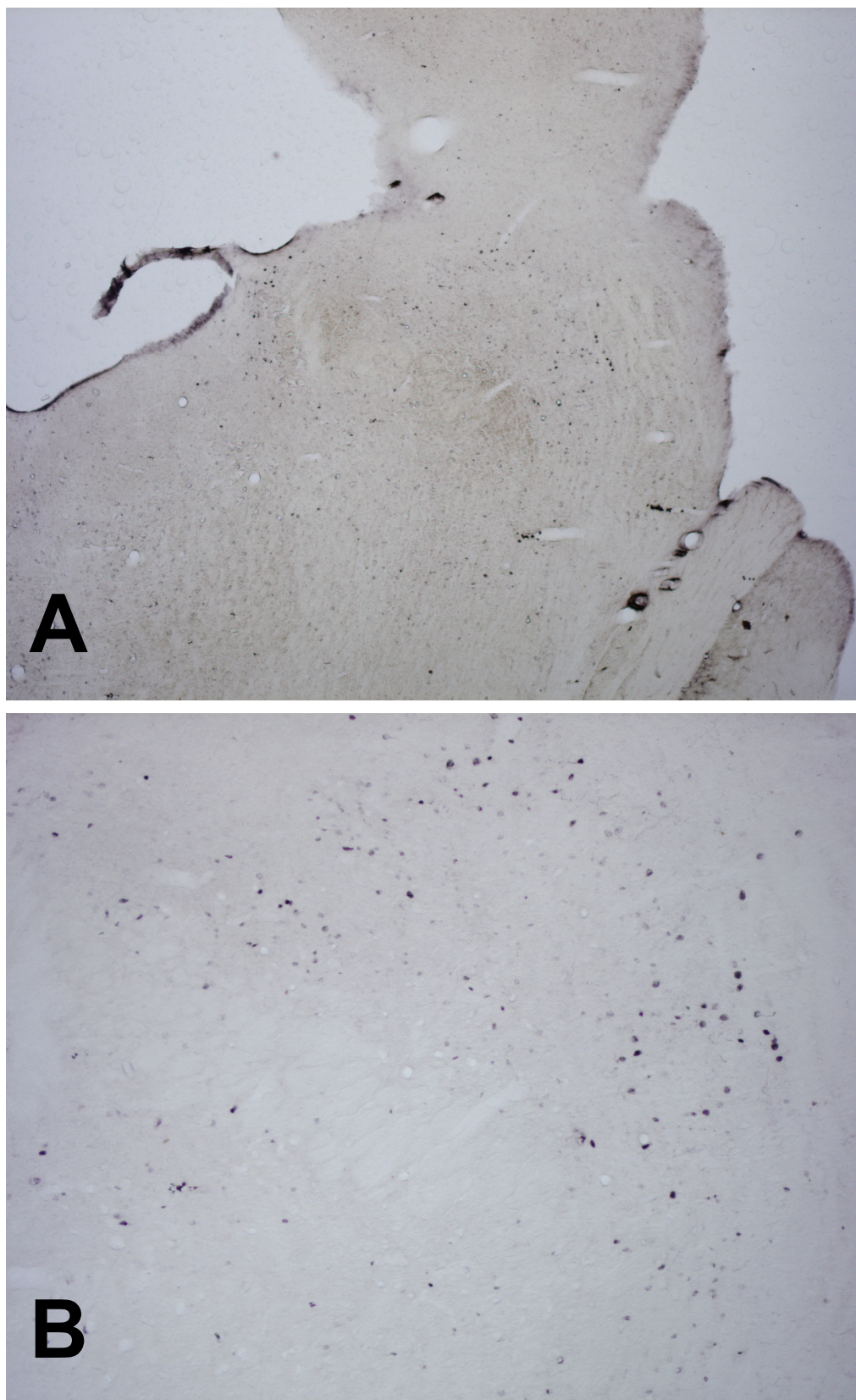


Fig. 4.61.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo metamizol+dolor somático (NS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

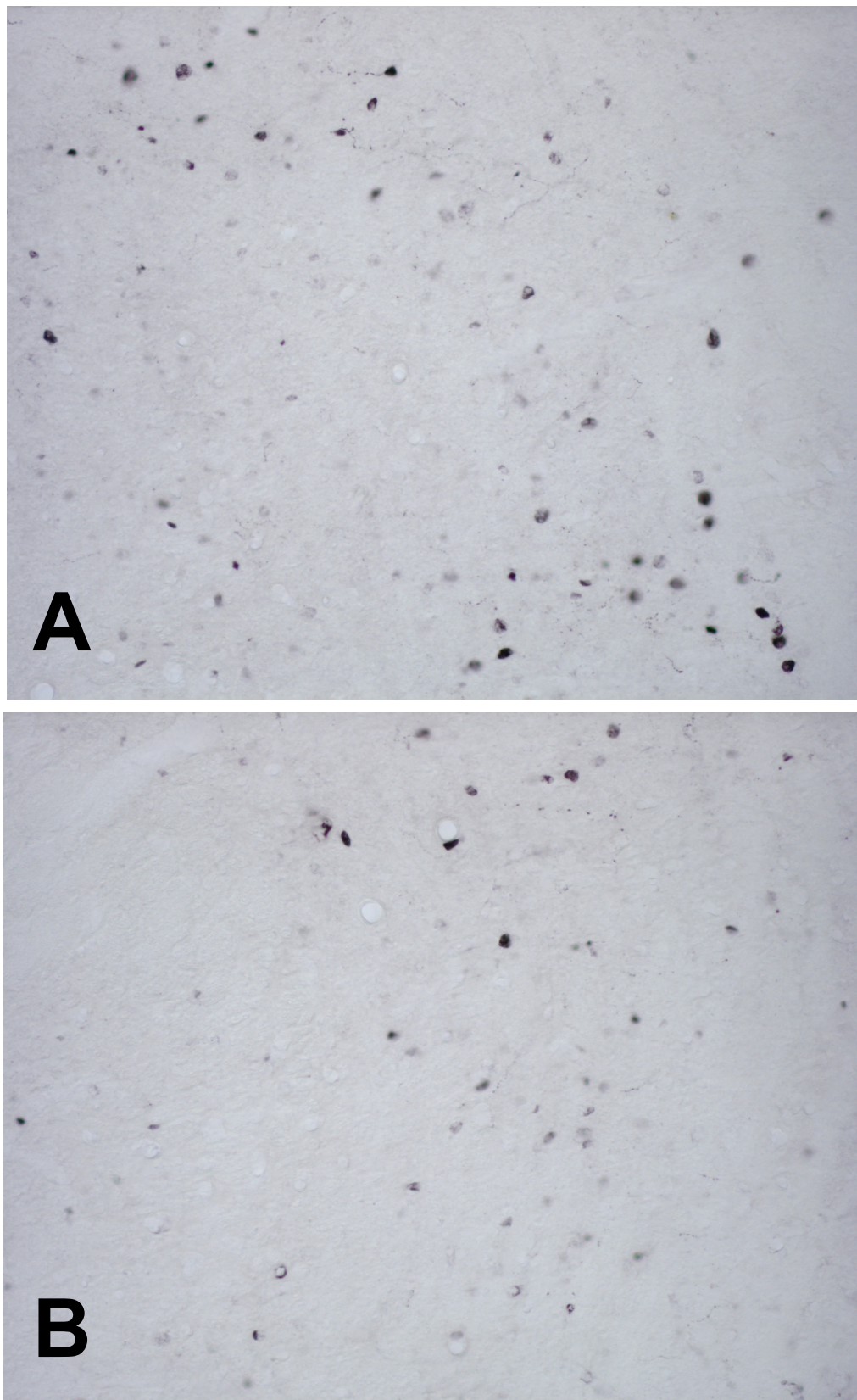


Fig. 4.62.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupometamizol+ dolor somático (NS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en los subnúcleos **(A)** sIPB y **(B)** eIPB.

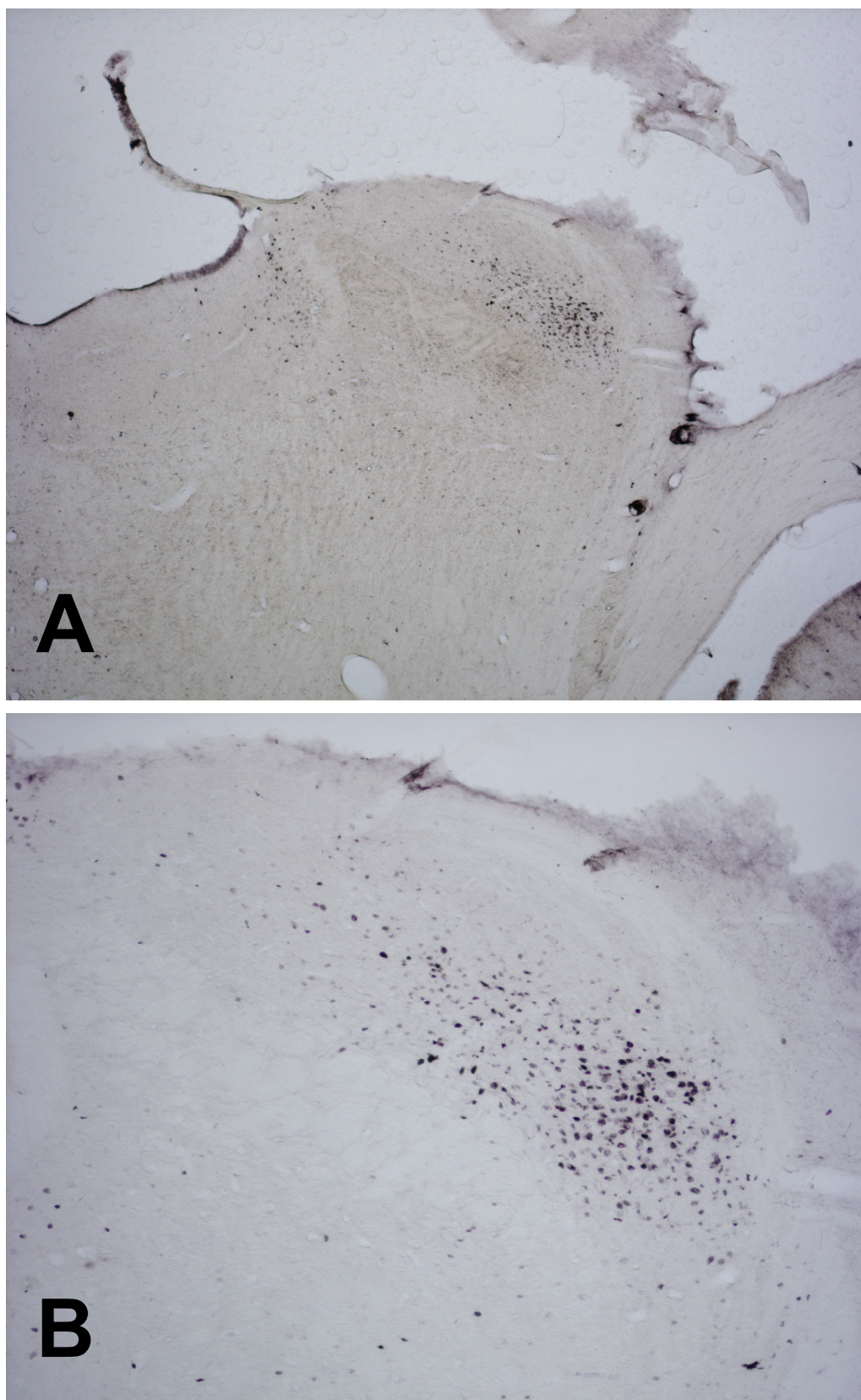


Fig. 4.63.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo metamizol+dolor somático (NS), que muestran la inmunoreactividad frente a Fos.

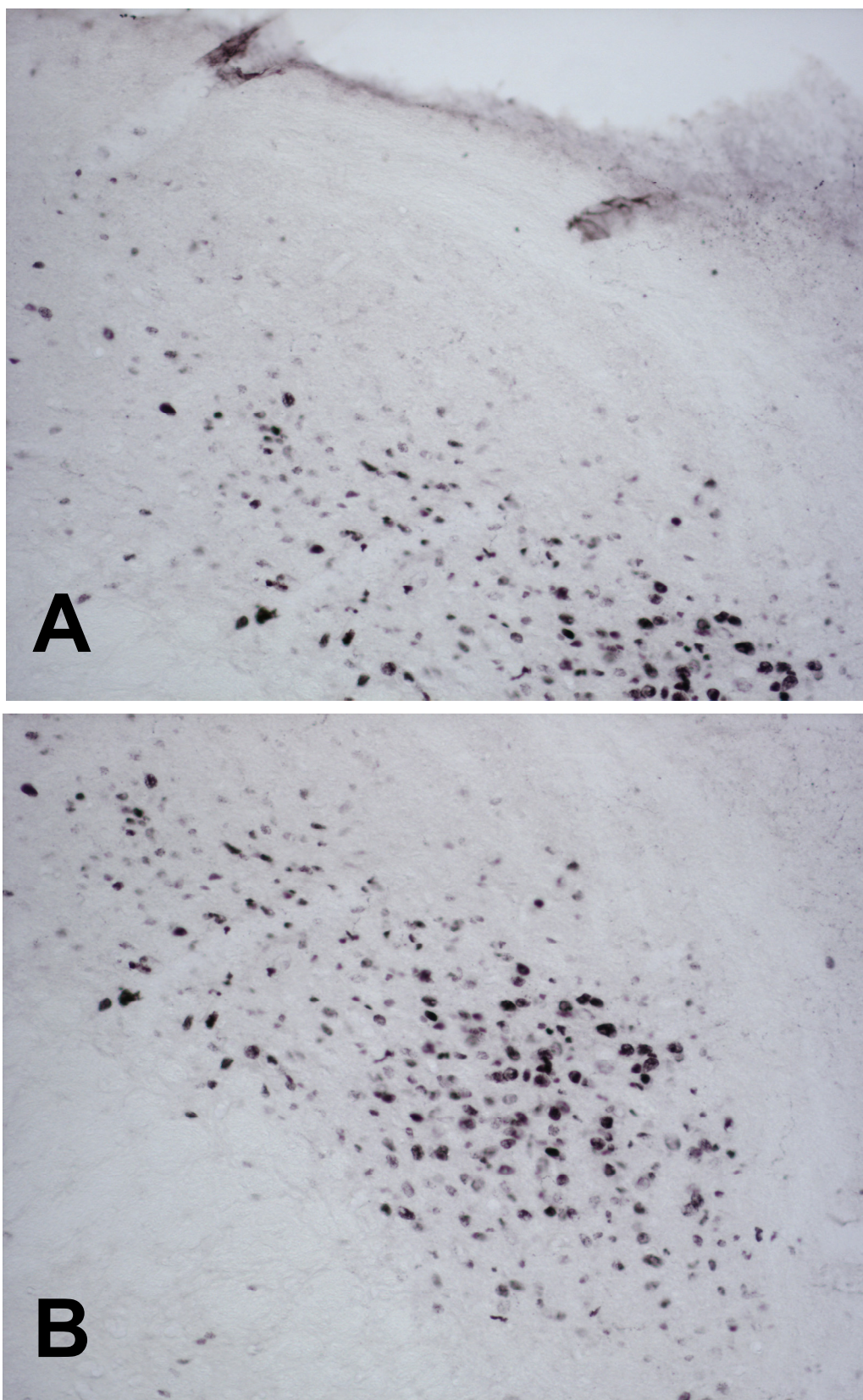


Fig. 4.64.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupometamizol+ dolor somático (NS), que muestran **(A)** la inmunorreactividad frente a Fos en los subnúcleos clPB, con ausencia en dlPB, y **(B)** en elPB.

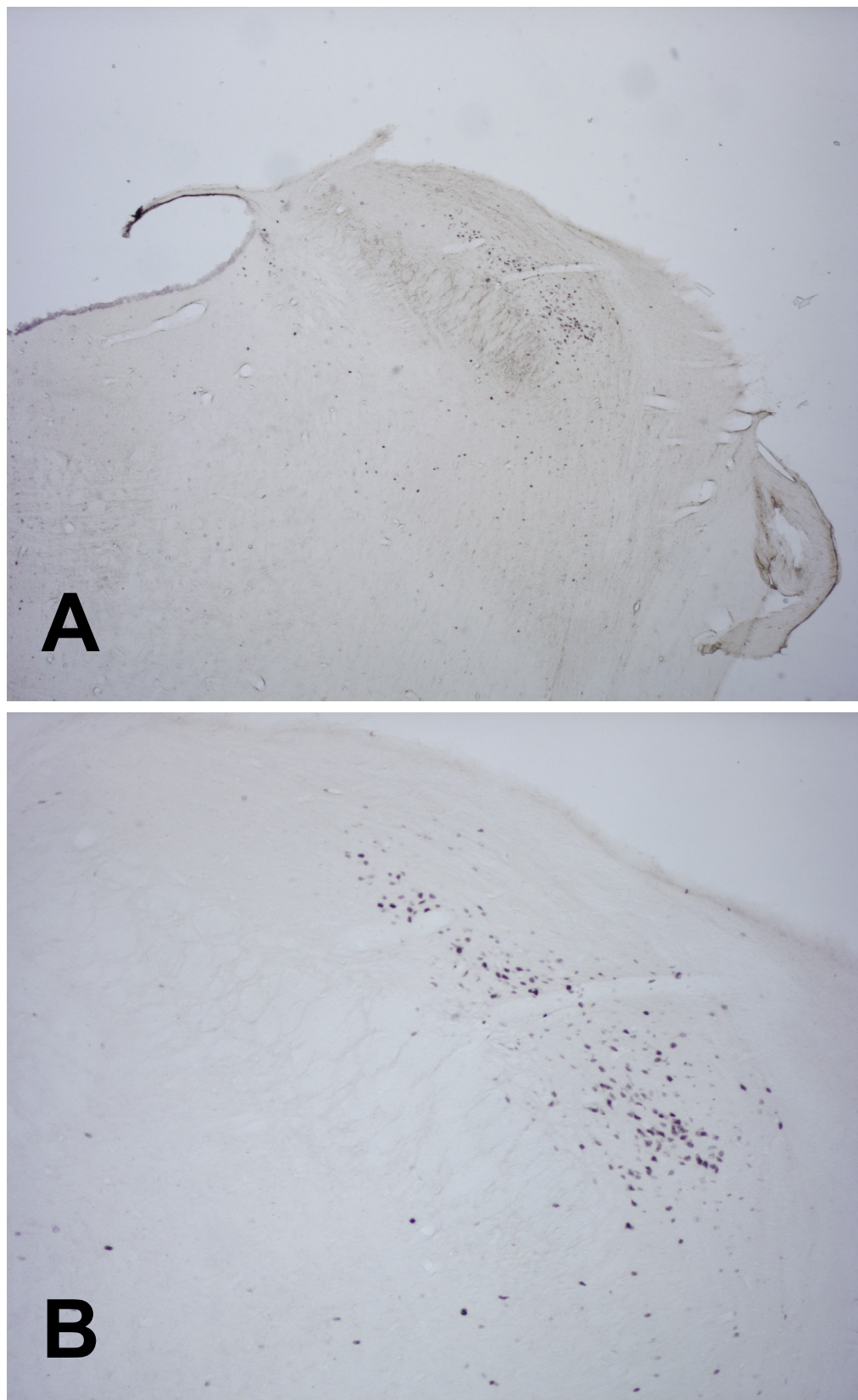


Fig. 4.65.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo metamizol+dolor somático (NS), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

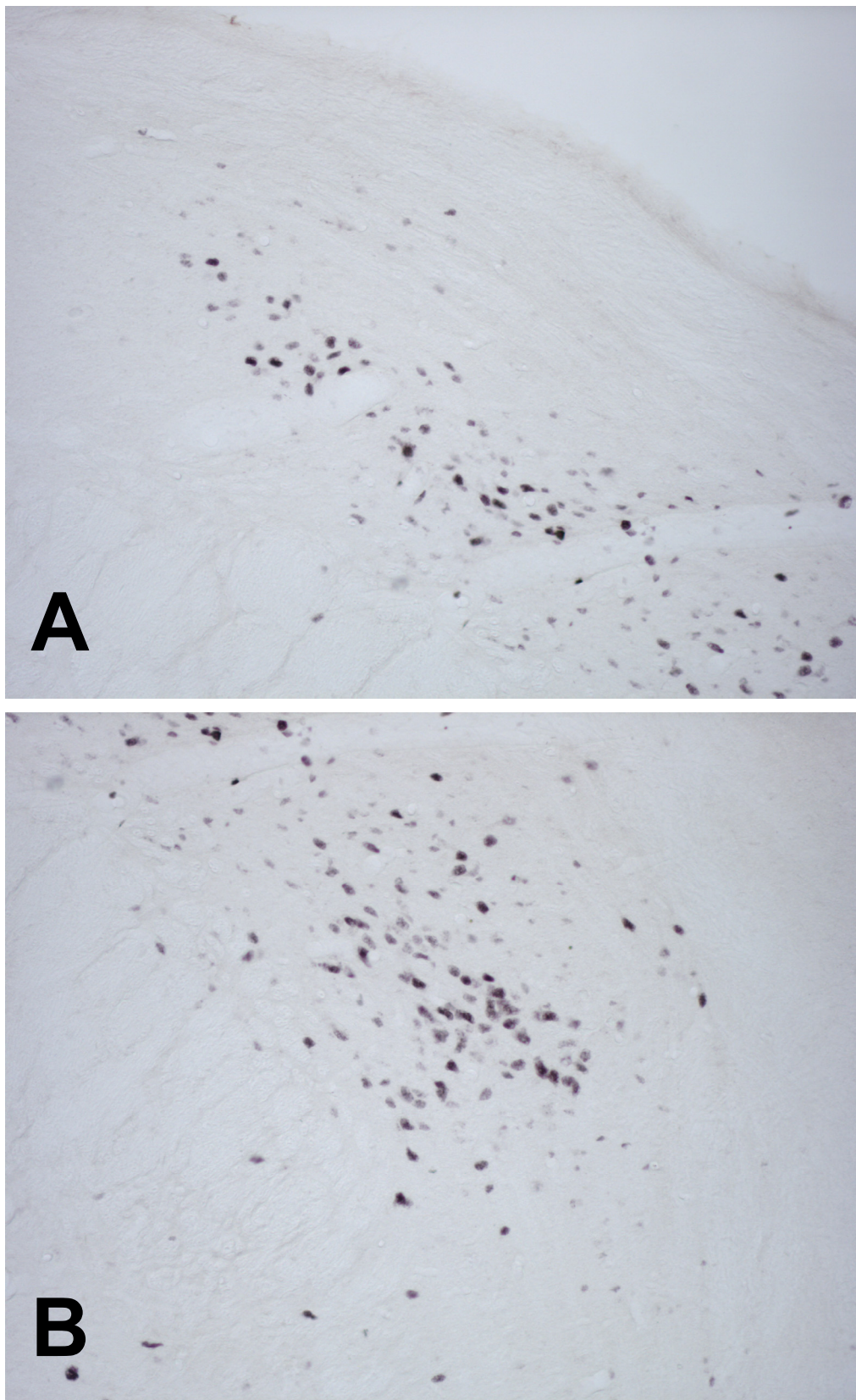


Fig. 4.66.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupometamizol+ dolor somático (NS), que muestran **(A)** la inmunorreactividad frente a Fos en los subnúcleos cIPB y **(B)** en elPB.

2.9.- Grupo Morfina+Dolor visceral (MV).

La morfina administrada de forma previa a la aplicación de un estímulo doloroso visceral, como el test de las contracciones abdominales, no modificó de forma esencial el patrón de distribución de Fos inducido por el estímulo nociceptivo visceral. Así pues, el patrón obtenido en el grupo MV fue similar al observado en los animales del grupo DV, especialmente en lo referente al incremento de inmunoreactividad del subnúcleo elPB en los niveles intermedio y caudal.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm) fue donde aparentemente se observaron mayores diferencias, estadísticamente no significativas, con respecto al grupo DV, tendentes a una menor inmunoreactividad en el subnúcleo dlPB. El resto de los elementos Fos-positivos a este nivel se localizaron, como en el grupo DV, en el subnúcleo elPB y en KF.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) ya identificamos el típico patrón de distribución de Fos inducido por estimulación dolorosa visceral caracterizado por una importante inmunoreactividad del subnúcleo elPB y, en menor medida, el subnúcleo dlPB.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) se mantuvo el mismo patrón del nivel intermedio, con una elevada inmunoreactividad en el subnúcleo elPB, manteniéndose por encima de los valores basales el subnúcleo dlPB.

	NIVEL ROSTRAL	NIVEL INTERMEDIO	NIVEL CAUDAL
Grupo MV	25±6	60±9	64±10

Tabla 4.8.- Media (\pm Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 μ m de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo morfina+dolor visceral (MV).

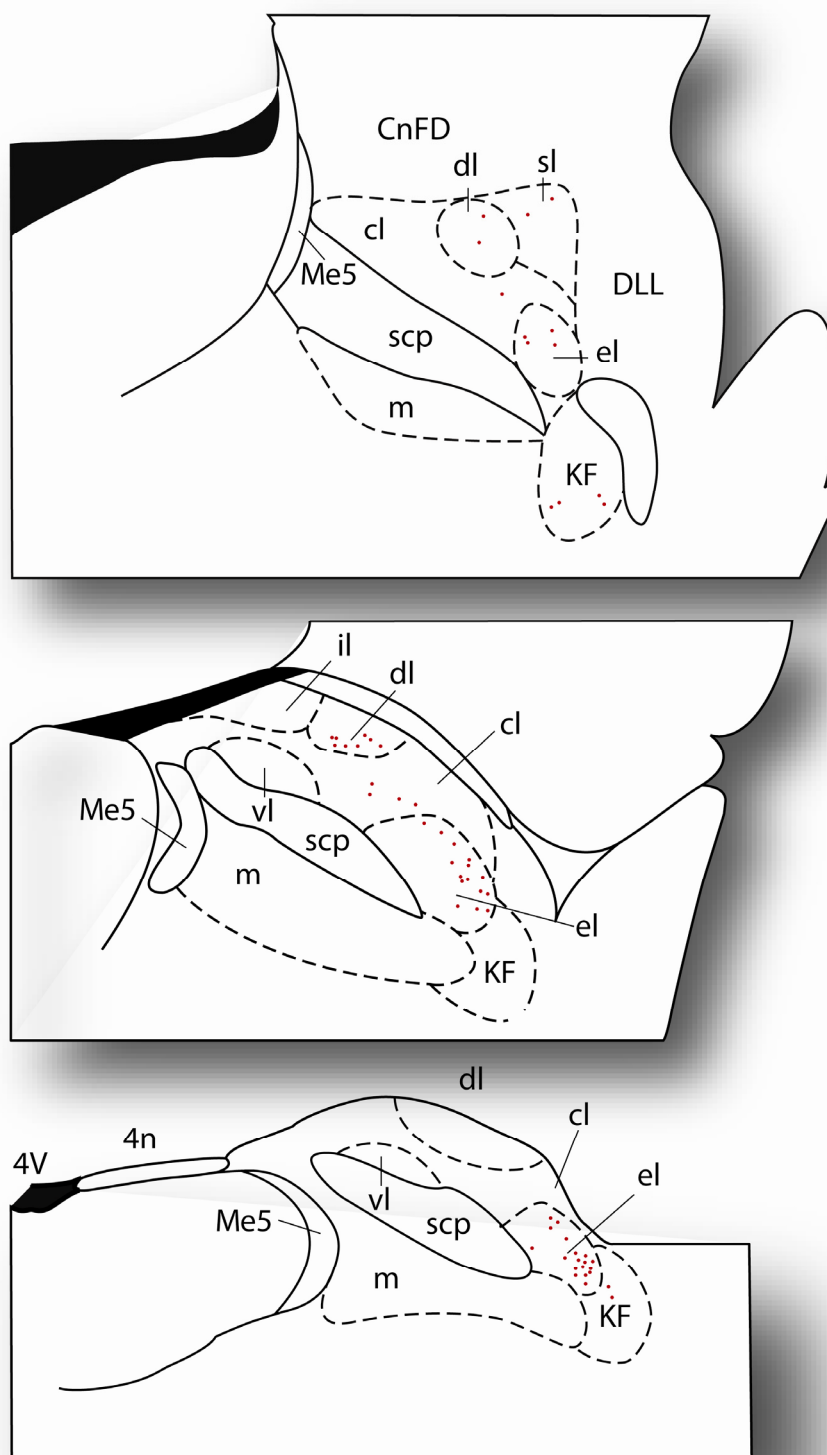


Fig. 4.67.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupomorfin+dolor visceral (MV) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB de rata. (Cada punto equivale a 2 células Fos-positivas).

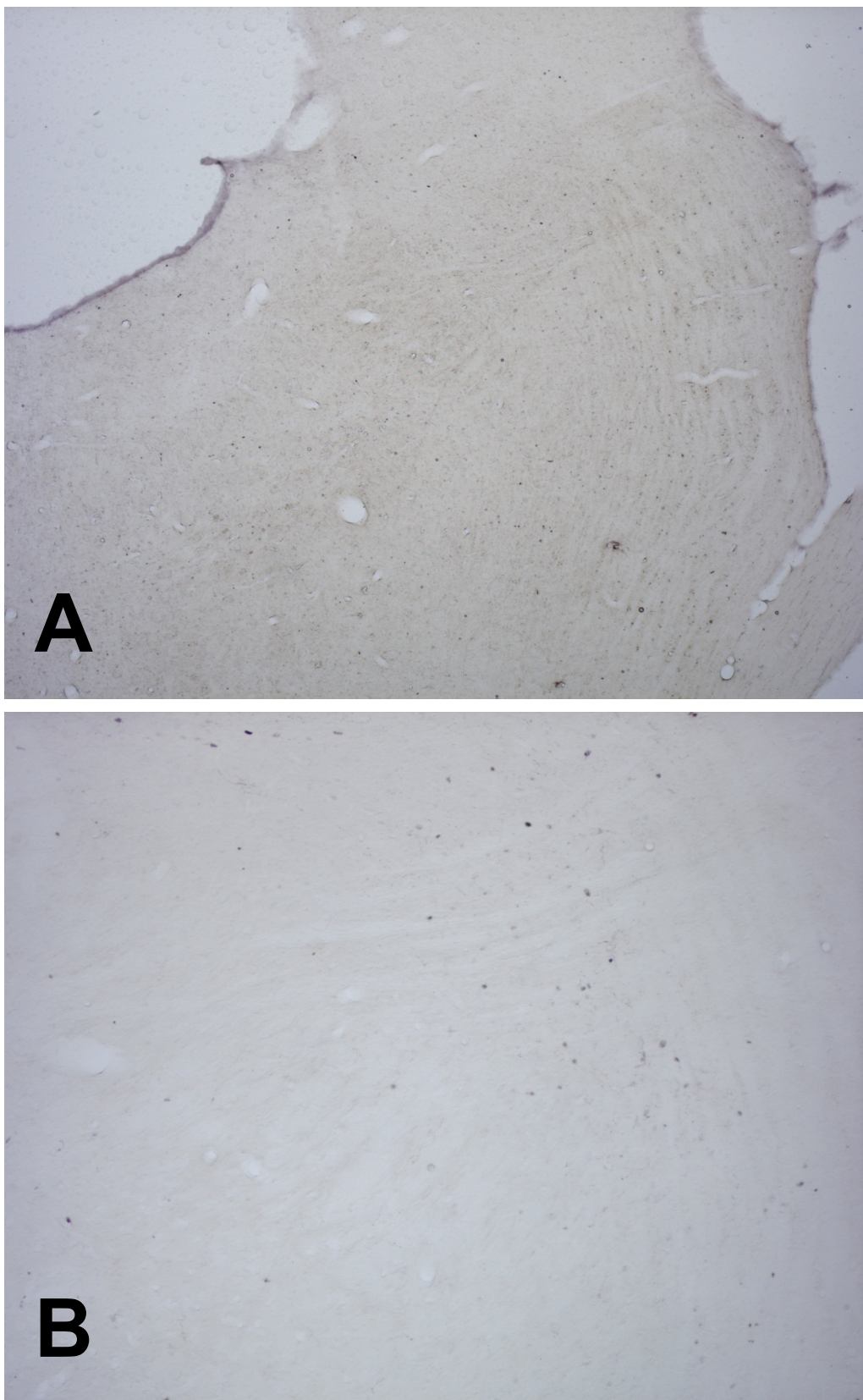


Fig. 4.68.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo morfina+dolor visceral (MV), que muestran la inmunoreactividad frente a Fos.

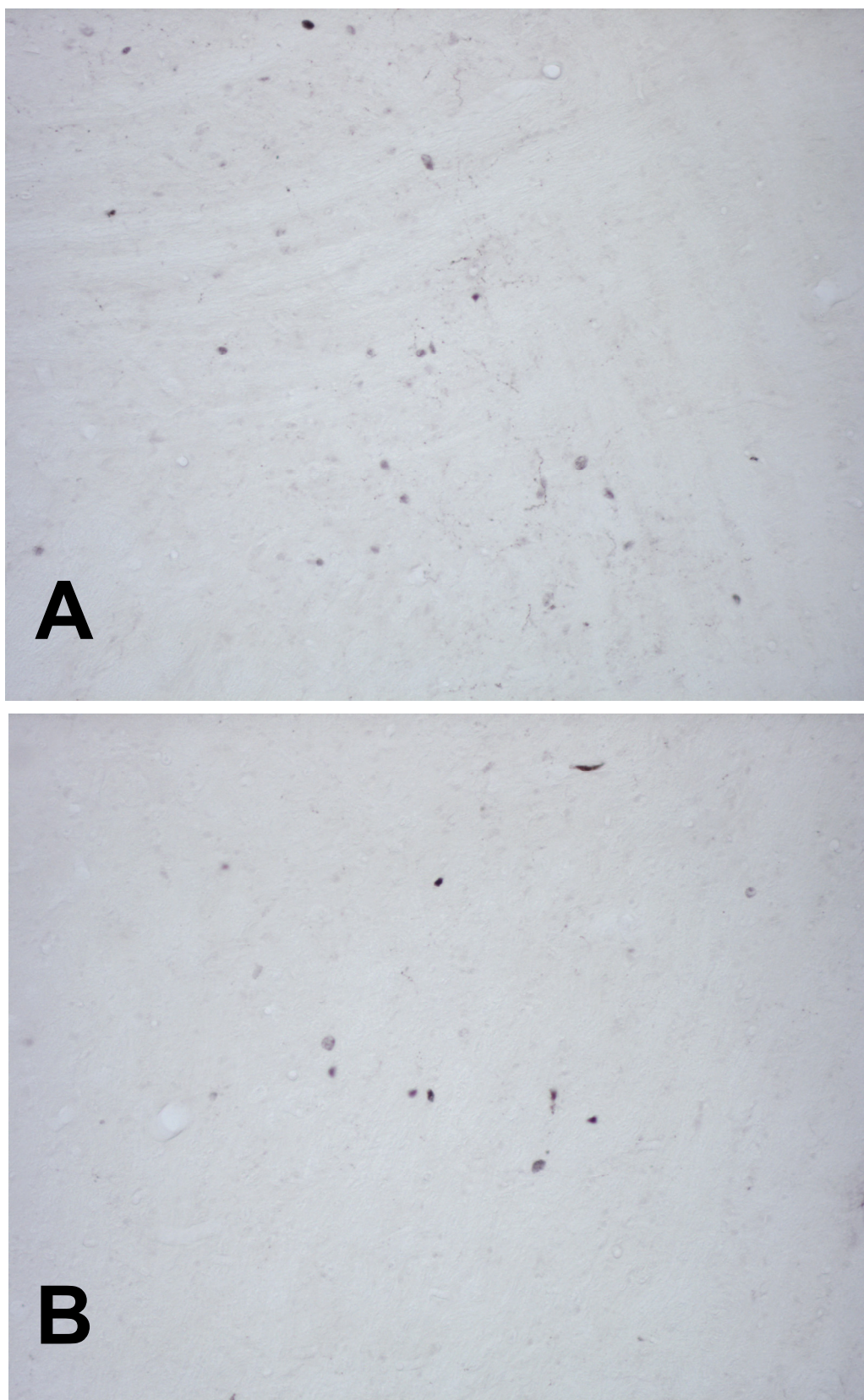


Fig. 4.69.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupomorfina+ dolor visceral (MV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos (**A**) en el subnúcleo elPB y (**B**) en KF.

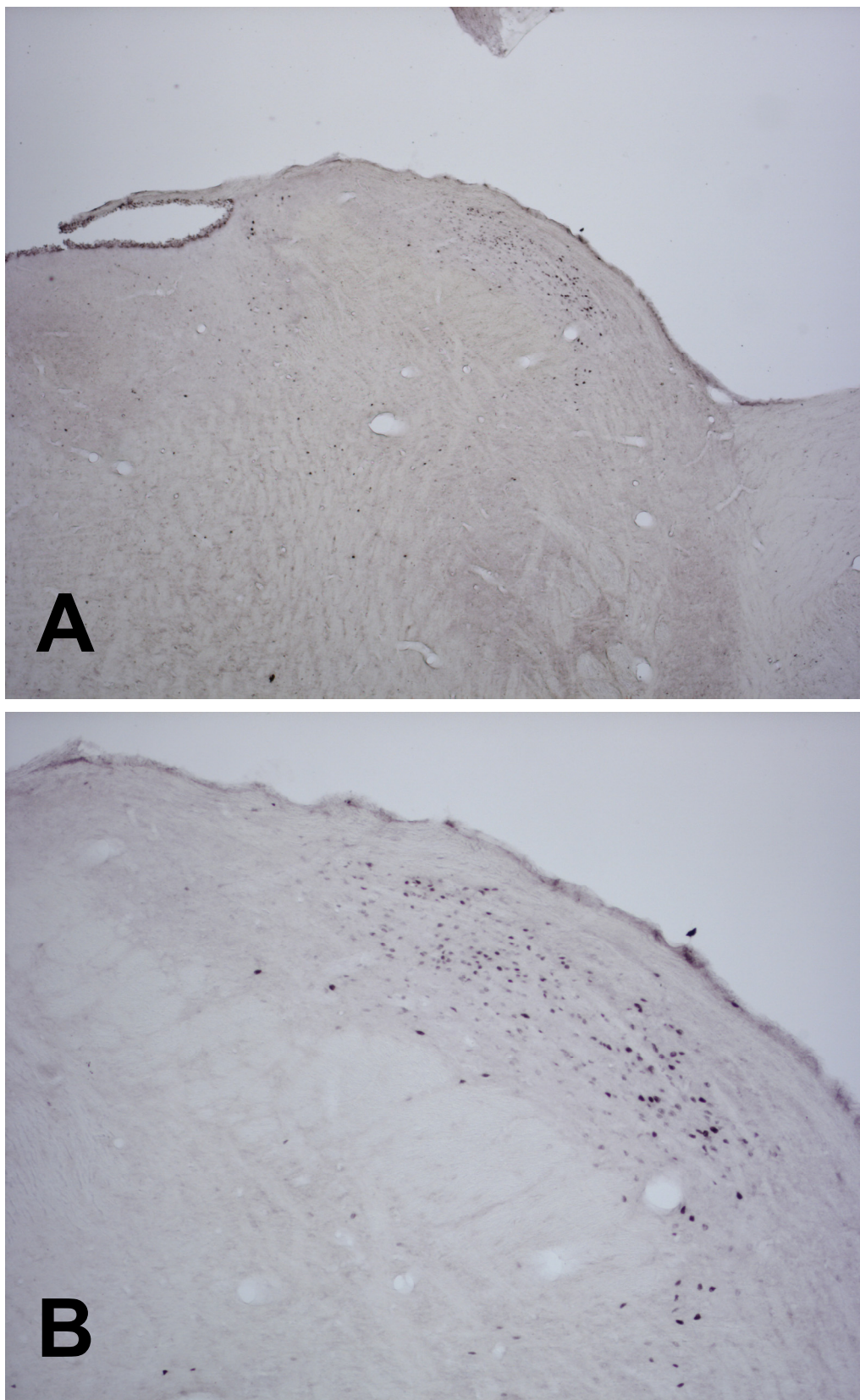


Fig. 4.70.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo morfina+dolor visceral (MV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

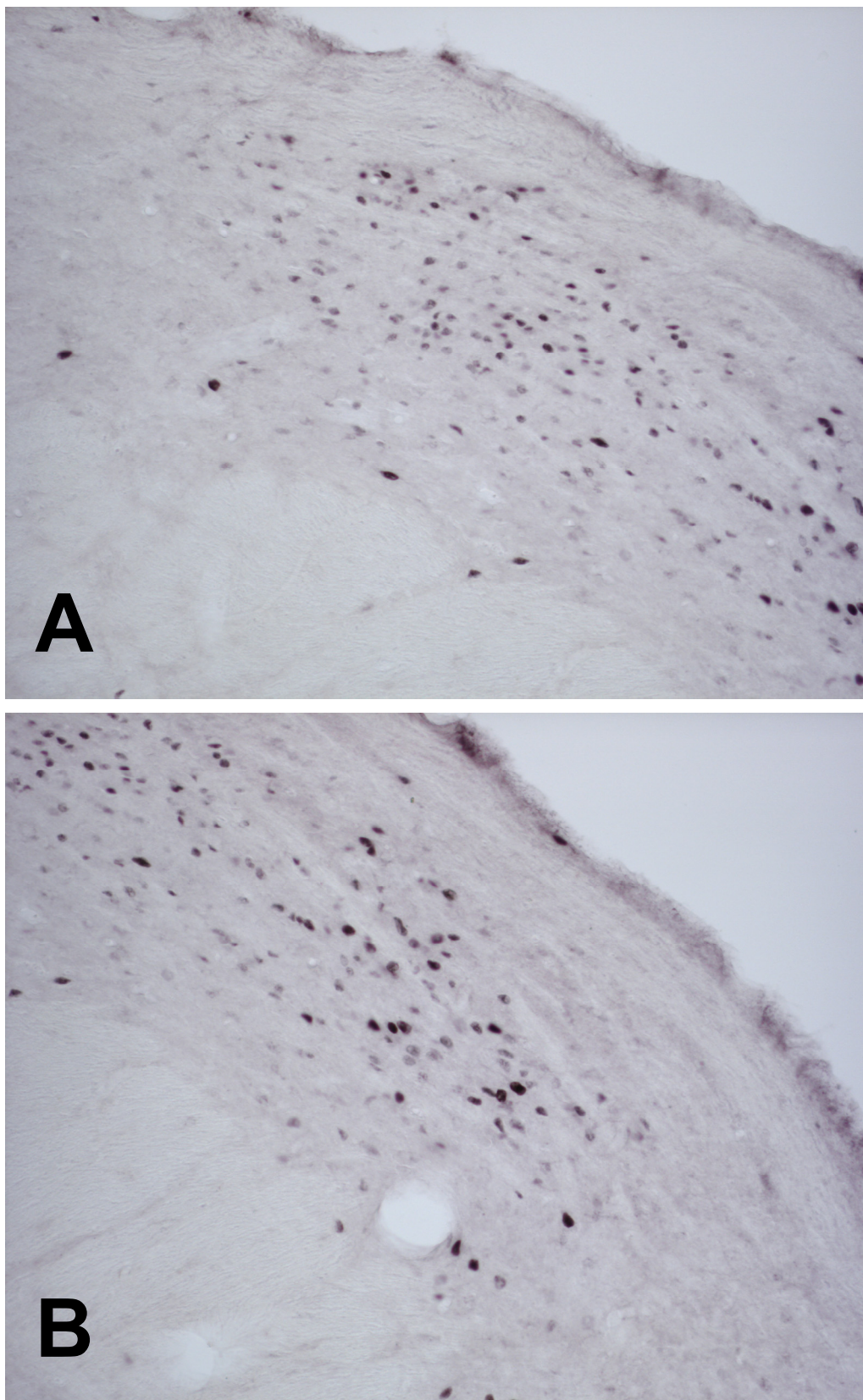


Fig. 4.71.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupomorfin+ dolor visceral (MV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos **(A)** en el subnúcleo dlPB y **(B)** en el subnúcleo dlPB.

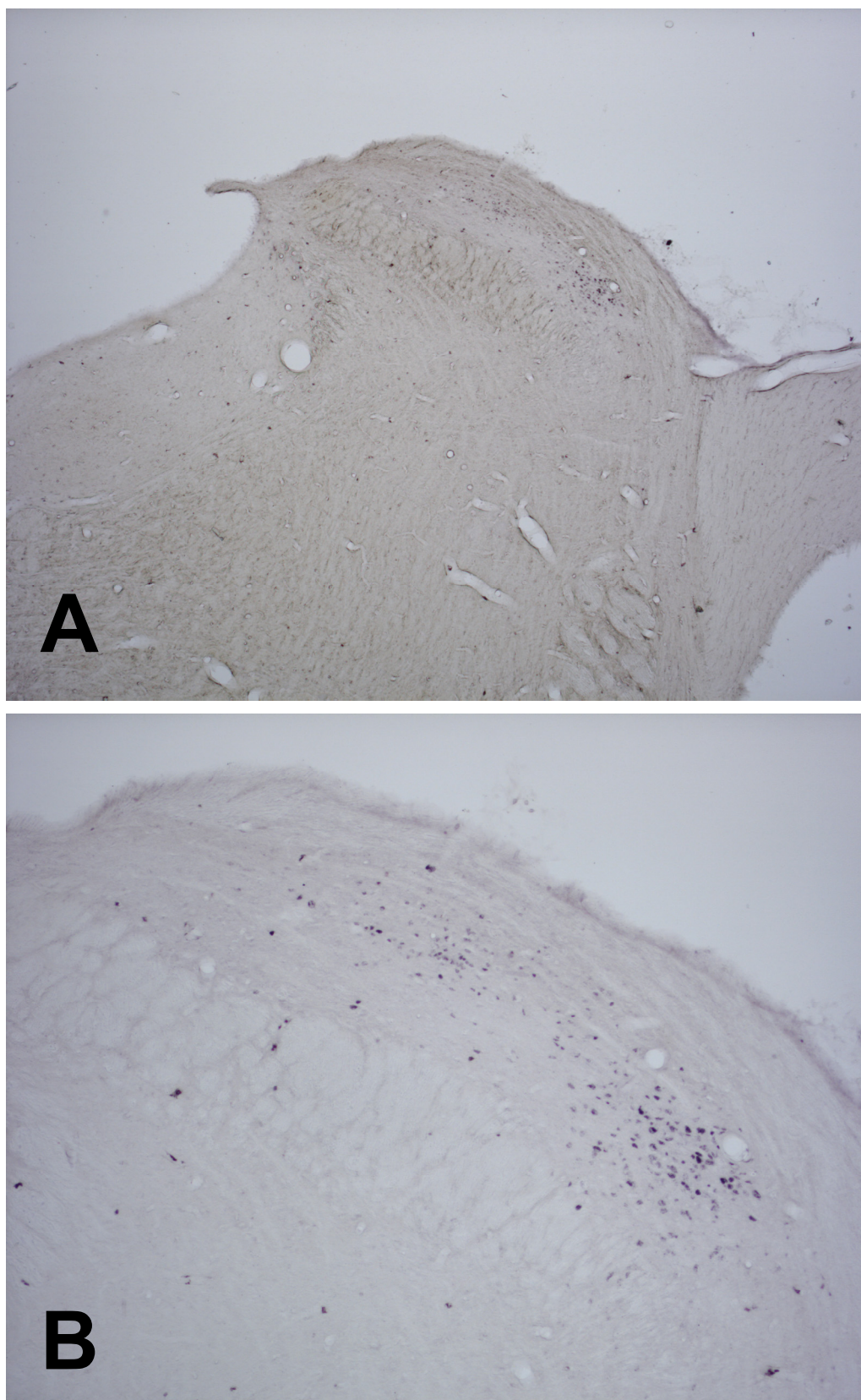


Fig. 4.72.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo morfina+dolor visceral (MV), que muestran la inmunoreactividad frente a Fos.

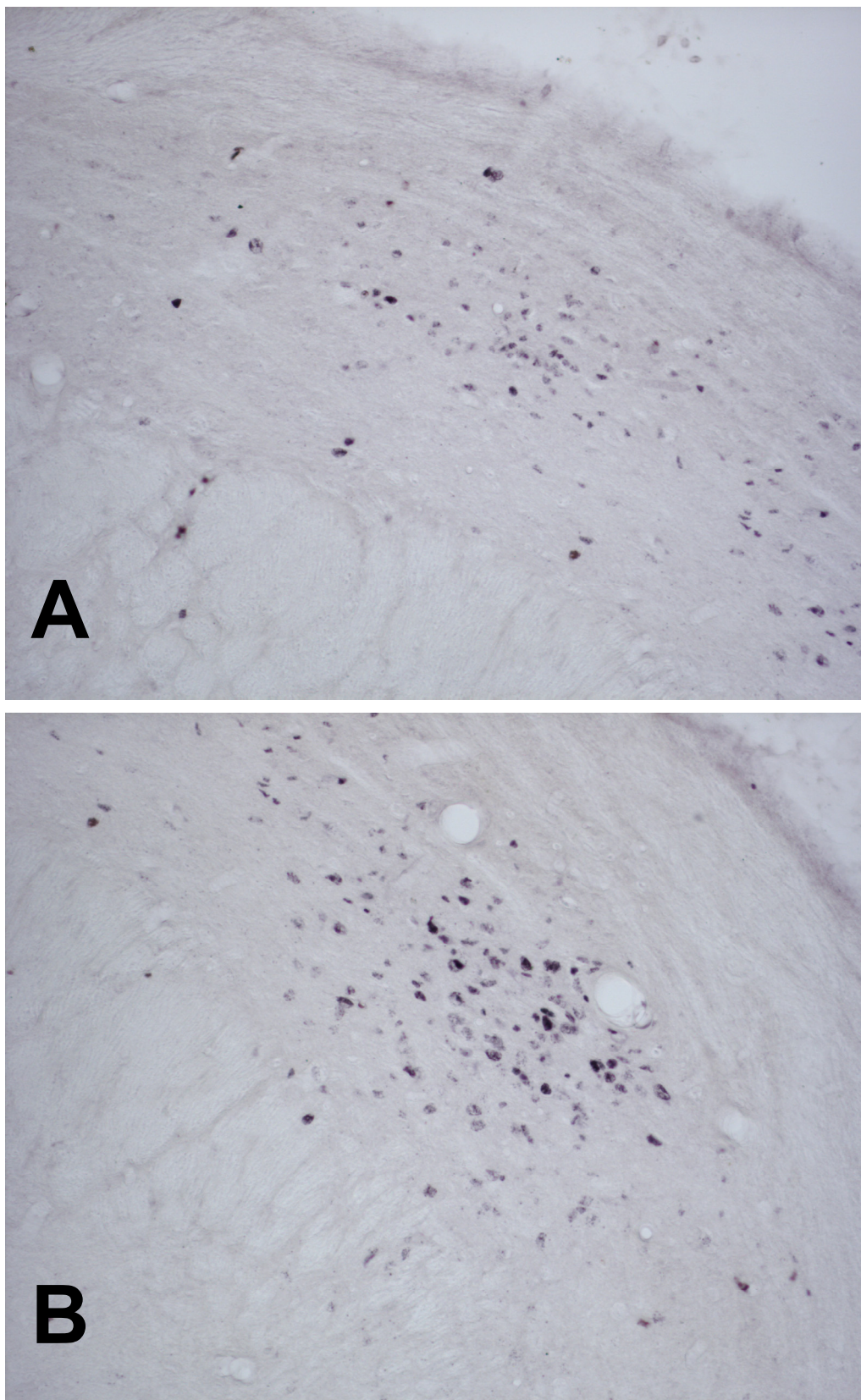


Fig. 4.73.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupomorfin+ dolor visceral (MV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos (**A**) en el subnúcleo dlPB y (**B**) en el subnúcleo dlPB.

2.10.- Grupo Metamizol+Dolor visceral (NV).

De nuevo, y como ya fuera descrito previamente, el metamizol volvió a incrementar la inmunorreactividad frente a Fos en la porción lateral del PB de la rata, fundamentalmente en los tercios intermedio y caudal. Al ser administrado de forma previa a la aplicación de un estímulo doloroso visceral, observamos que el patrón de distribución de Fos inducido por el metamizol, se superpuso con el inducido por la inyección de ácido acético, obteniendo como resultado un intenso marcaje contra Fos en los subnúcleos dlPB, clPB y elPB.

A nivel ROSTRAL (Bregma -8.76 mm) fue donde la inmunorreactividad fue menor, aunque se apreció que los subnúcleos más inmunorreactivos fueron el dlPB y el elPB.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) obtuvimos, de nuevo, como en los grupos CN y NS, una intensa inmunorreactividad en los subnúcleos elPB y, en menor medida, clPB. Pero junto a ellos, también apreciamos el incremento de marcaje en el subnúcleo dlPB, que el dolor visceral induce a este nivel.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) se repitió el mismo patrón del nivel intermedio, con una elevada inmunorreactividad en el subnúcleo elPB, manteniéndose por encima de los valores basales los subnúcleos clPB y dlPB.

	NIVEL ROSTRAL	NIVEL INTERMEDIO	NIVEL CAUDAL
Grupo NV	34±8	107±13	126±15

Tabla 4.9.- Media (\pm Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 μ m de la porción lateral del PB en los 3 niveles rostrocaudales seleccionados del grupo metamizol+dolor visceral (NV).

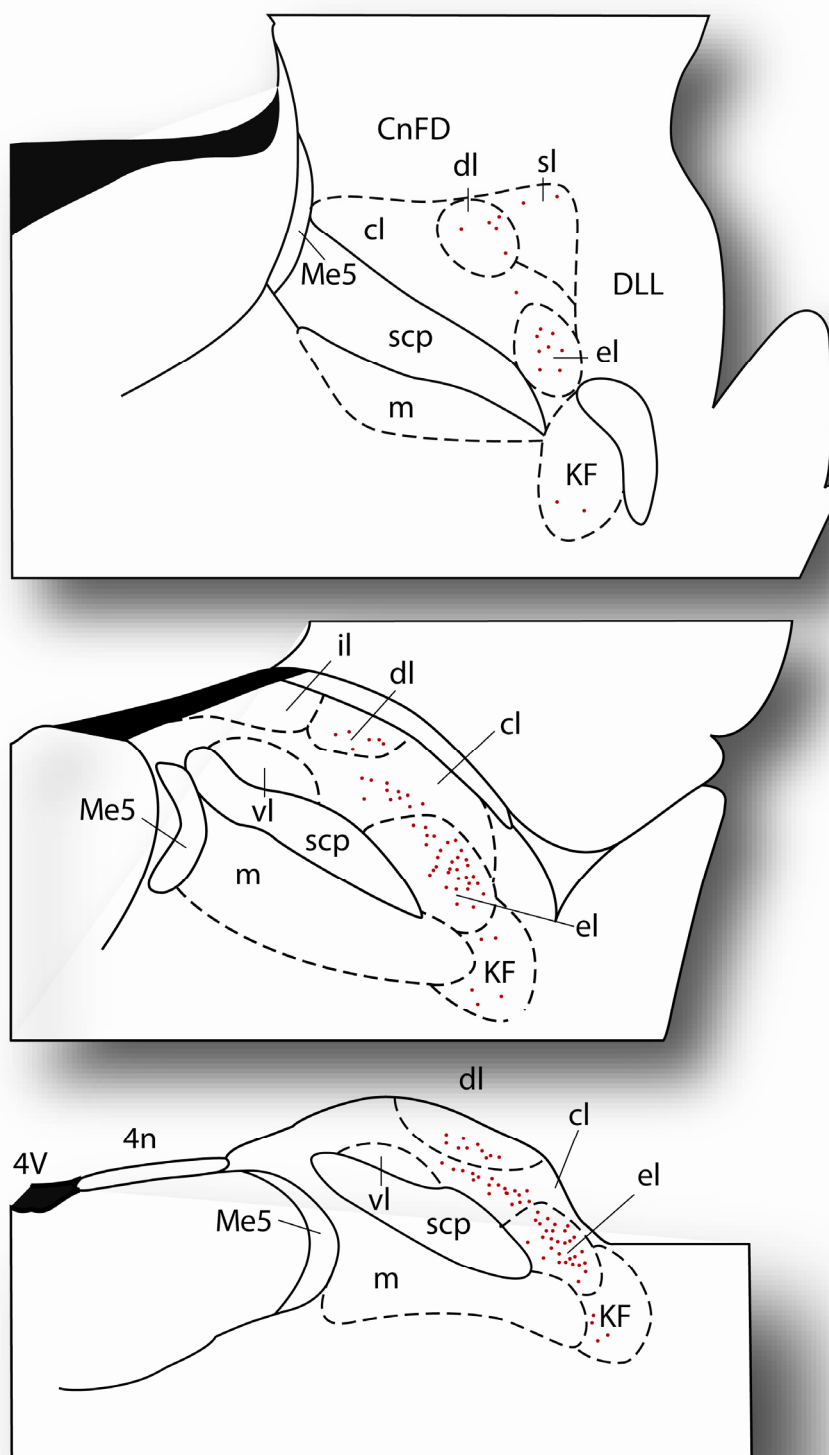


Fig. 4.74.- Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes a los niveles (A) ROSTRAL (Bregma -8.76 mm), (B) INTERMEDIO (Bregma -9.00 mm) y (C) CAUDAL (Bregma -9.24 mm) (Paxinos y Watson, 2005) del grupometamizol+dolor visceral (NV) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en los diferentes subnúcleos de la porción lateral del PB de rata. (Cada punto equivale a 2 células Fos-positivas).

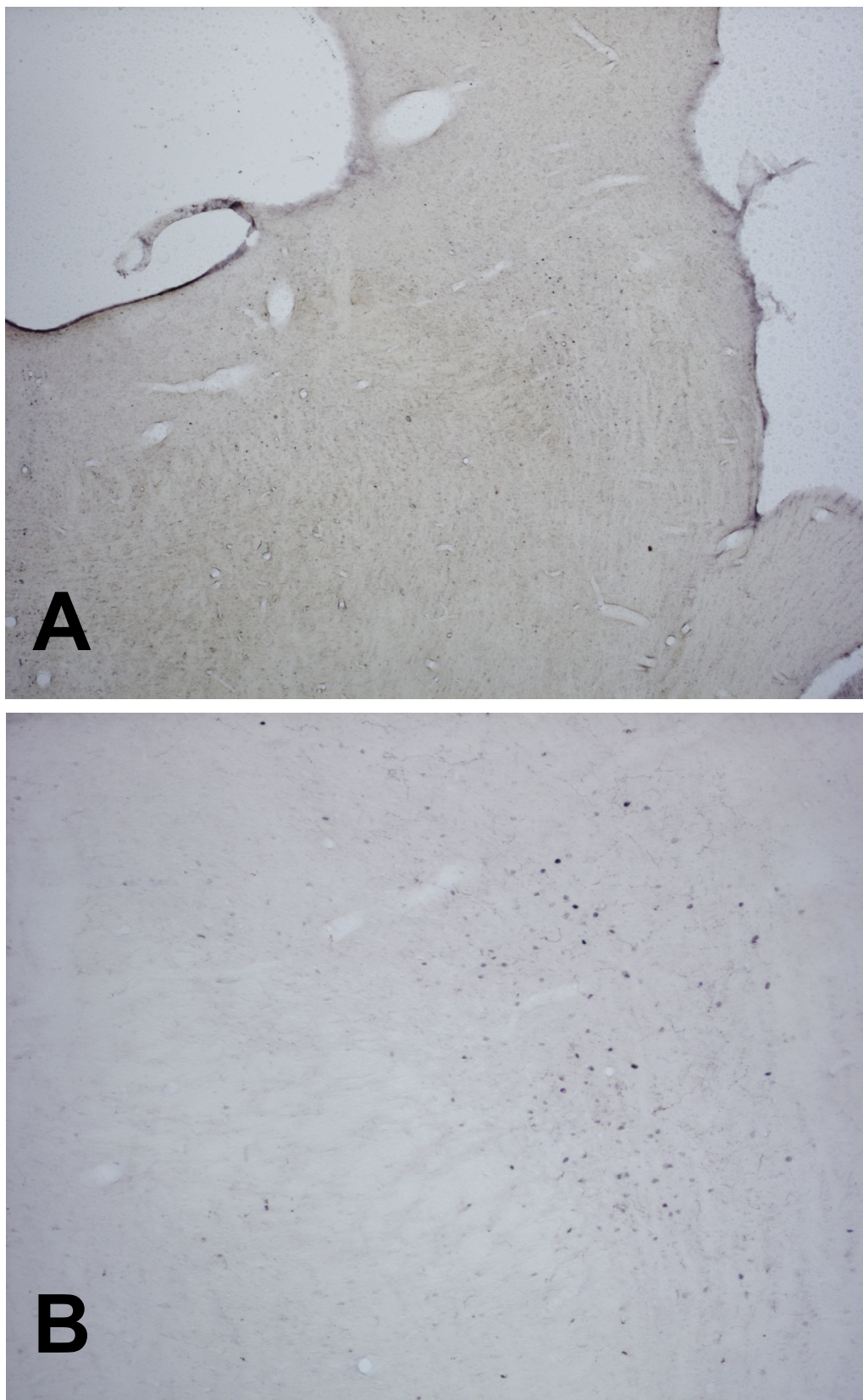


Fig. 4.75.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupo metamizol+dolor visceral (NV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



Fig. 4.76.- Microfotografía (20x) de un corte coronal a nivel del tercio ROSTRAL de la porción lateral del PB de rata del grupometamizol+ dolor visceral (NV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en el subnúcleo dlPB.

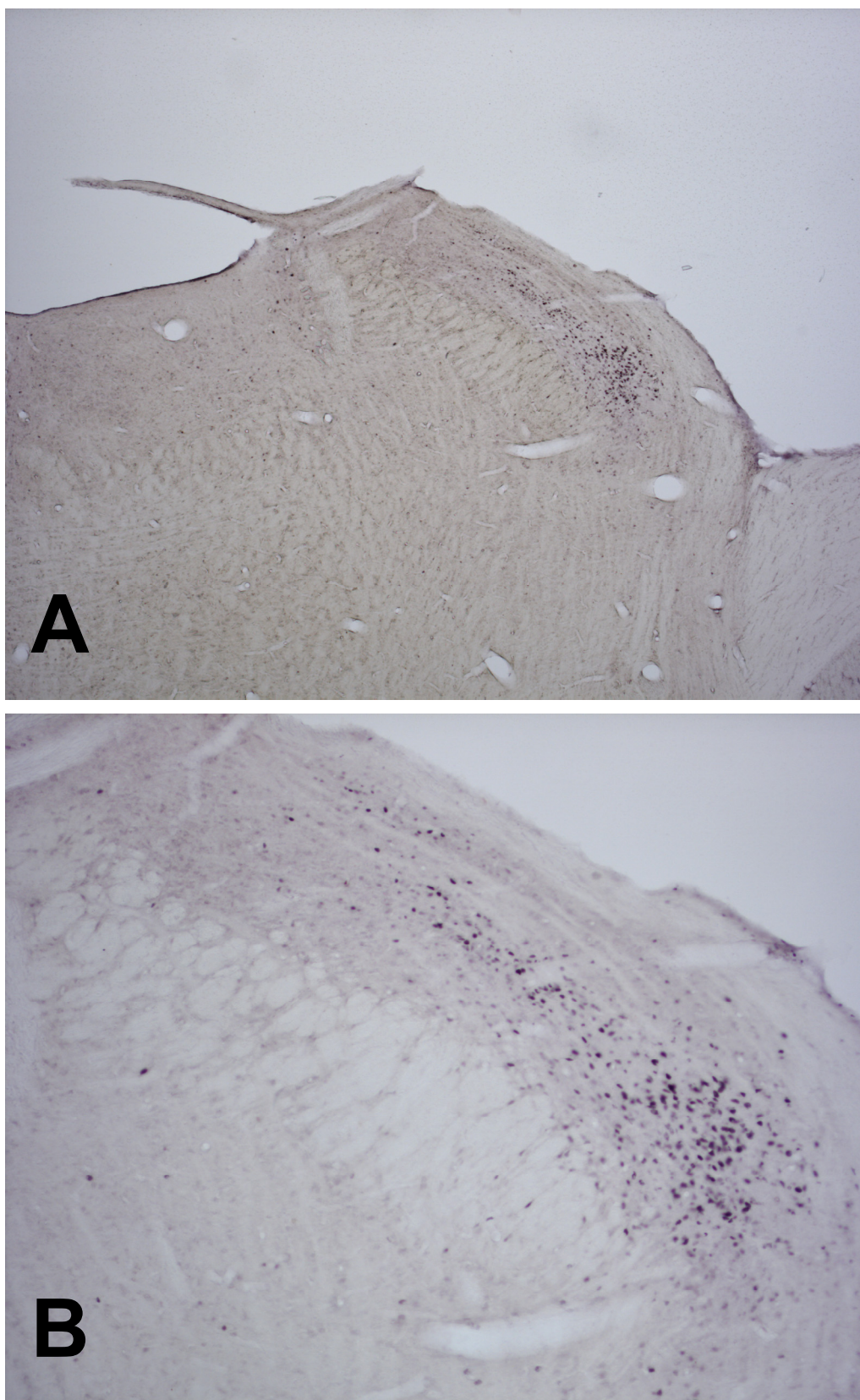


Fig. 4.77.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo metamizol+dolor visceral (NV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

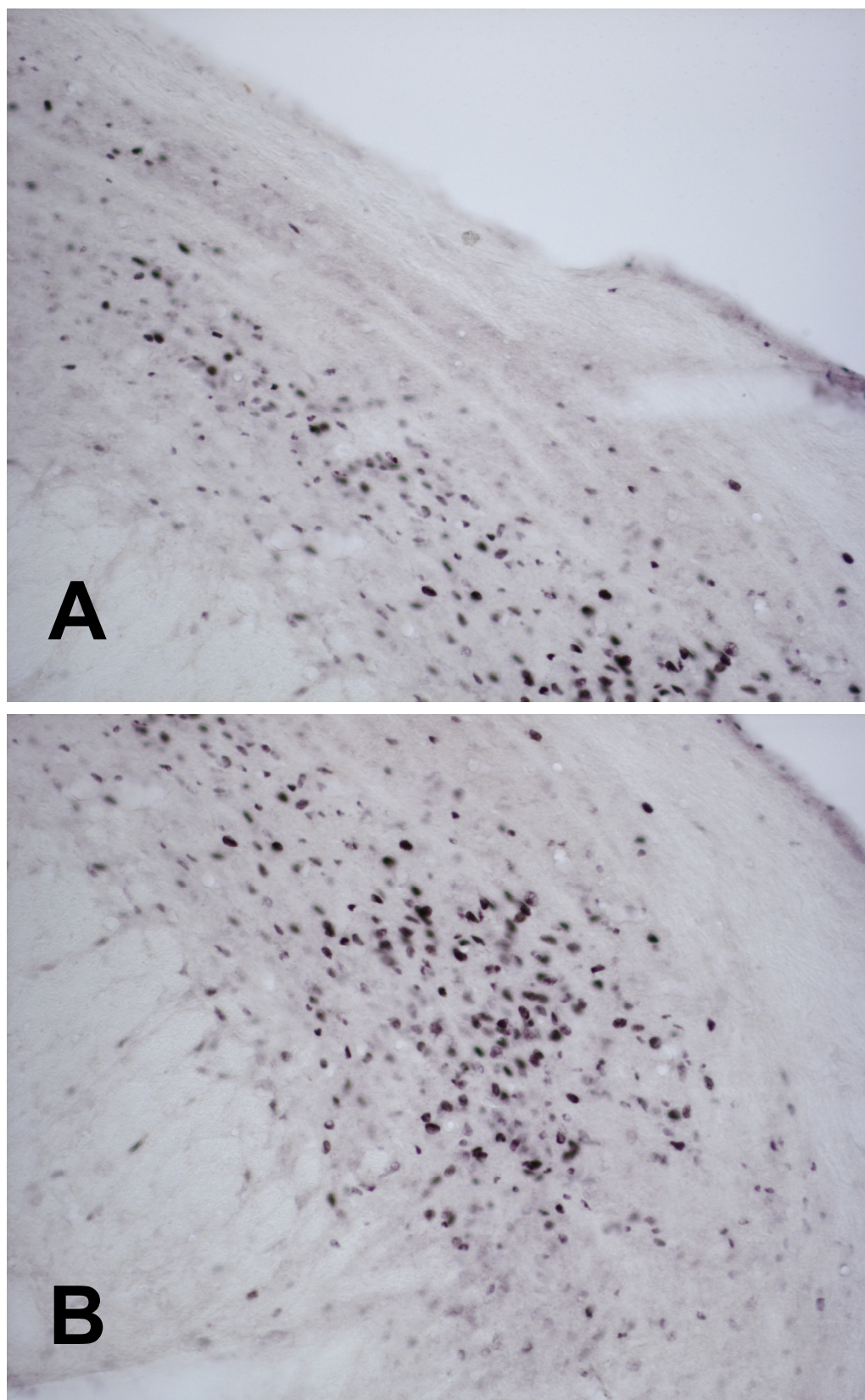


Fig. 4.78.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo metamizol+ dolor visceral (NV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en los subnúcleos **(A)** dlPB y **(B)** en vlPB.

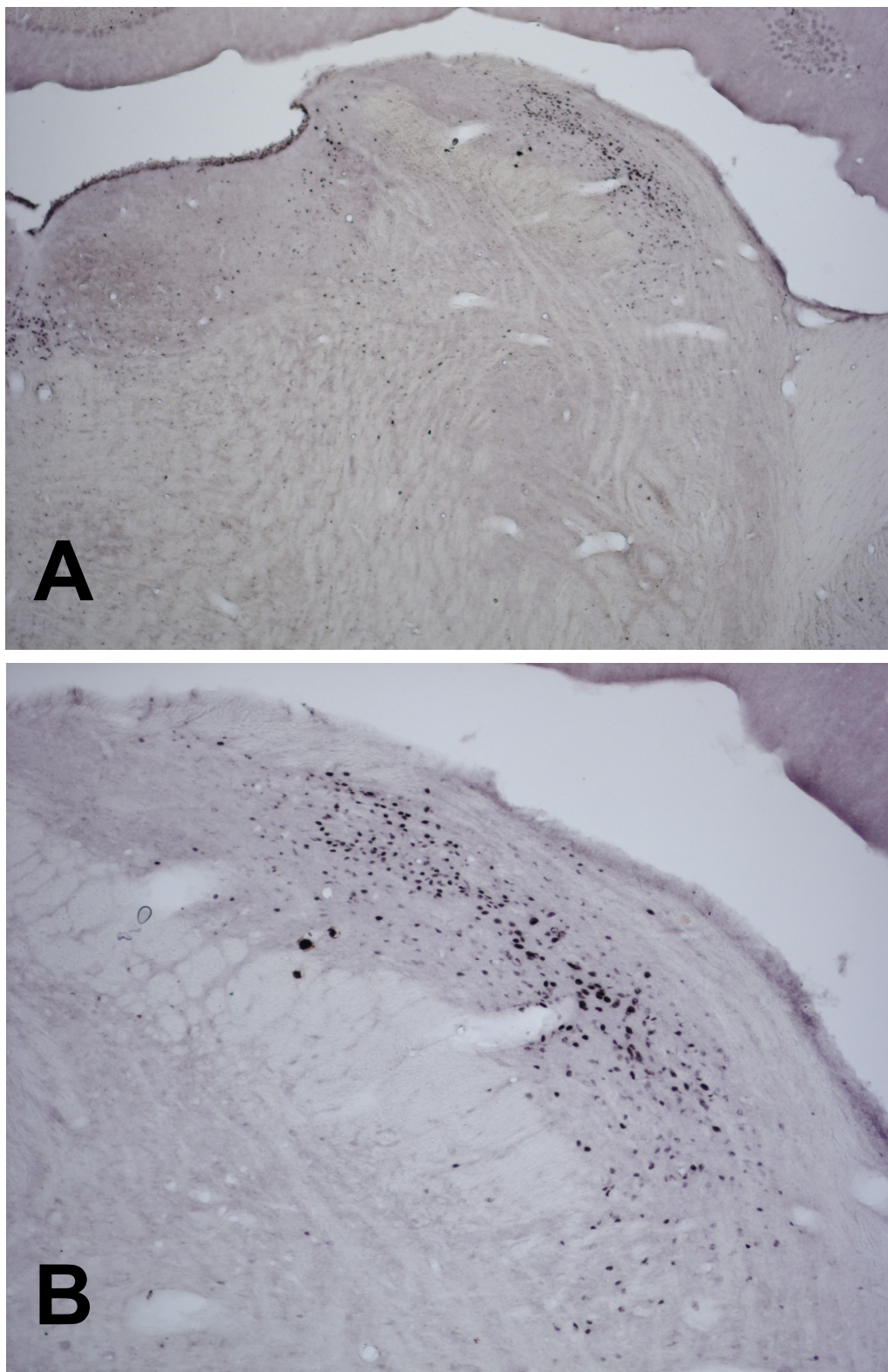


Fig. 4.79.- Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo metamizol+dolor visceral (NV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

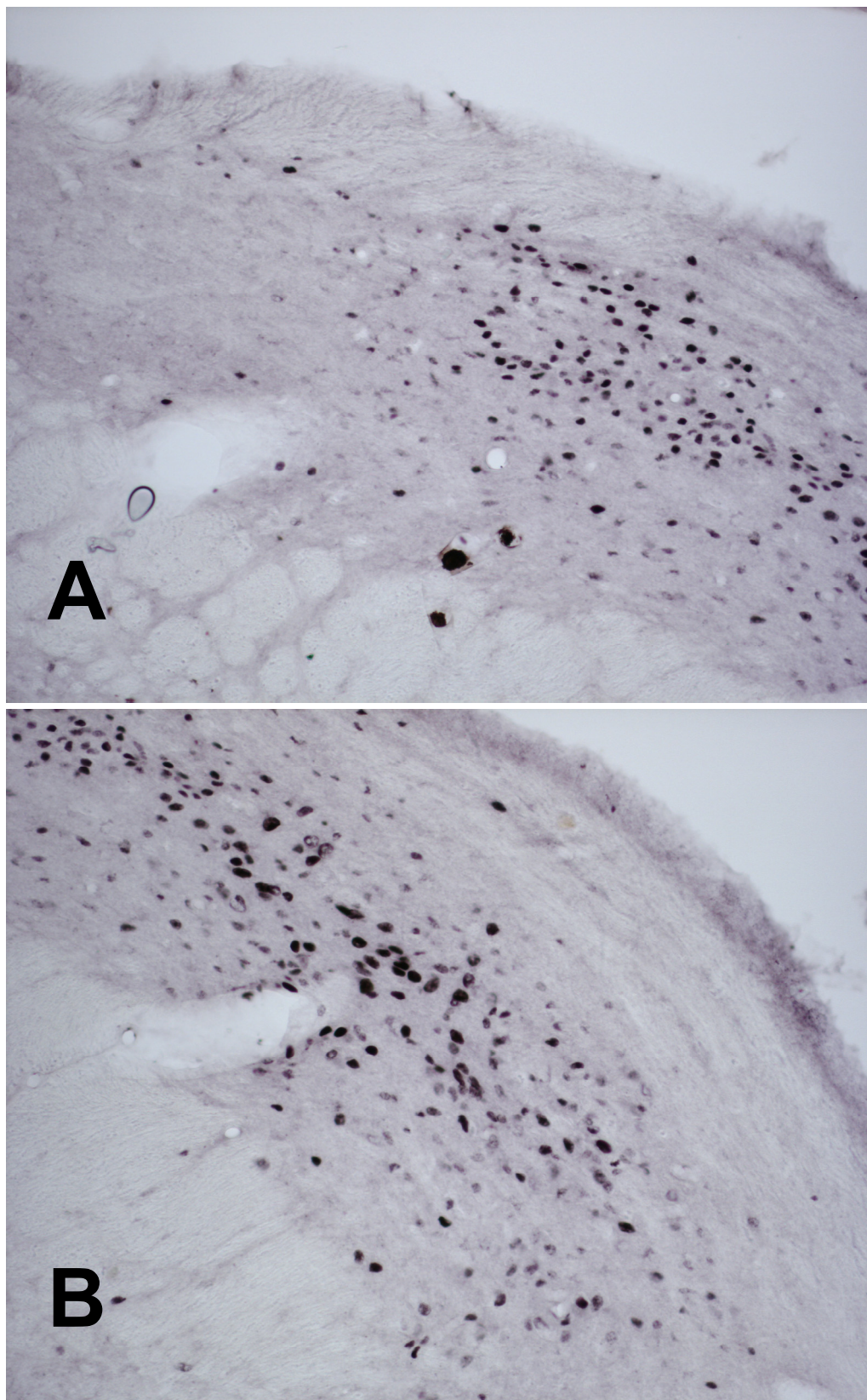


Fig. 4.80.- Microfotografías (20x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo metamizol+ dolor visceral (NV), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos en los subnúcleos **(A)** clPB y **(B)** en elPB.

3.- Estudio Estadístico.

3.1.- Análisis Global



En primer lugar se presentan la descriptiva (media, número de casos y desviación típica) para las variables originales Intermedio y Caudal. El análisis descriptivo se ha llevado a cabo para cada grupo experimental y se acompaña con una gráfica de las medias estimadas para las variables originales dentro de cada uno de los 9 grupos.

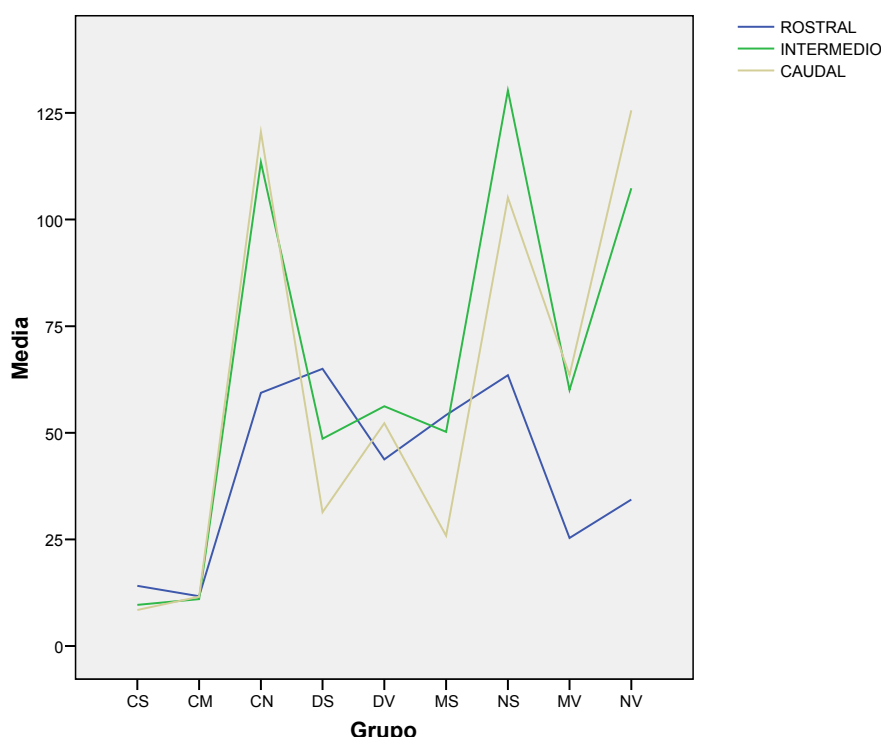


Fig. 4.81.- Gráfica de las medias estimadas para cada variable dentro de cada uno de los 9 grupos experimentales.

Efectuamos un análisis de la varianza de un factor para las variables ROSTRAL, INTERMEDIO y CAUDAL, siendo el factor el grupo experimental que presenta 9 condiciones experimentales diferentes. El resultado se recoge en la Tabla 4.10 que a su vez reproduce las tablas ANOVA para las 3 variables.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
ROSTRAL	CS	18	14,11	5,178	1,220	11,54	16,69	7	21
	CM	18	11,67	4,627	1,091	9,37	13,97	5	19
	CN	18	59,39	8,161	1,924	55,33	63,45	50	68
	DS	18	65,00	7,670	1,808	61,19	68,81	55	74
	DV	18	43,78	7,142	1,683	40,23	47,33	36	53
	MS	18	54,17	7,334	1,729	50,52	57,81	45	65
	NS	18	63,50	8,361	1,971	59,34	67,66	55	75
	MV	18	25,33	6,164	1,453	22,27	28,40	20	35
	NV	18	34,33	6,472	1,525	31,12	37,55	25	45
Total		162	41,25	20,824	1,636	38,02	44,48	5	75
INTERMEDIO	CS	18	9,67	4,015	,946	7,67	11,66	5	15
	CM	18	11,00	3,941	,929	9,04	12,96	6	16
	CN	18	113,44	13,678	3,224	106,64	120,25	90	130
	DS	18	48,61	8,521	2,008	44,37	52,85	40	60
	DV	18	56,22	9,143	2,155	51,68	60,77	45	67
	MS	18	50,22	7,496	1,767	46,49	53,95	40	59
	NS	18	130,28	17,442	4,111	121,60	138,95	110	150
	MV	18	60,06	9,421	2,221	55,37	64,74	48	72
	NV	18	107,33	13,711	3,232	100,51	114,15	90	125
Total		162	65,20	42,191	3,315	58,66	71,75	5	150
CAUDAL	CS	18	8,44	2,955	,697	6,97	9,91	4	13
	CM	18	11,56	3,552	,837	9,79	13,32	7	17
	CN	18	120,56	17,497	4,124	111,85	129,26	96	139
	DS	18	31,39	5,158	1,216	28,82	33,95	25	38
	DV	18	52,22	8,667	2,043	47,91	56,53	41	64
	MS	18	25,89	6,480	1,527	22,67	29,11	18	34
	NS	18	105,17	15,685	3,697	97,37	112,97	90	133
	MV	18	63,56	10,348	2,439	58,41	68,70	52	76
	NV	18	125,61	17,284	4,074	117,02	134,21	95	140
Total		162	60,49	45,022	3,537	53,50	67,47	4	140

Tabla 4.10.- Descriptivos para las variables ROSTRAL, INTERMEDIO y CAUDAL.

Se deduce de ellas que hay diferencias significativas entre los 9 grupos experimentales para las 3 variables: ROSTRAL ($F=164,283$; $p<0,0001$), INTERMEDIO ($F=299,443$; $p<0,0001$) y Caudal ($F=307,792$; $p<0,0001$).

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ROSTRAL	Inter-grupos	62536,457	8	7817,057	164,283	,000
	Intra-grupos	7280,167	153	47,583		
	Total	69816,623	161			
INTERMEDIO	Inter-grupos	269388,778	8	33673,597	299,443	,000
	Intra-grupos	17205,500	153	112,454		
	Total	286594,278	161			
CAUDAL	Inter-grupos	307256,753	8	38407,094	307,792	,000
	Intra-grupos	19091,722	153	124,782		
	Total	326348,475	161			

Tabla 4.11.- Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para las variables ROSTRAL, INTERMEDIO y CAUDAL.

Puesto que el análisis detectó diferencias entre los grupos tenía sentido realizar comparaciones múltiples para determinar conjuntos homogéneos de grupos de tratamiento que compartirían la misma media. Sin embargo, es sabido que no existe una única técnica para llevar a cabo estas comparaciones y que el resultado final depende de la que hayamos empleado. Por esta razón utilizamos los métodos de Tukey y Scheffé que producen situaciones extremas, particularmente este último que siendo el más conservador conduce siempre a un menor número de conjuntos homogéneos.

En el nivel ROSTRAL de la porción lateral del PB, el método de Tukey determinó hasta 6 subconjuntos homogéneos, mientras que el de Scheffé determinó 5:

- En los extremos de estos subconjuntos destacaron por un lado los grupos CS y CM y por el otro los grupos DS, NS y CN.
- Un segundo bloque por ambos extremos estaría integrado por un lado por los grupos MV y NV, mientras que por el otro nos encontramos con el grupos MS.
- Por último, en los subconjuntos centrales se situó el grupo DV.

ROSTRAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	6
HSD de Tukey ^a							
CM	18	11,67					
CS	18	14,11					
MV	18		25,33				
NV	18			34,33			
DV	18				43,78		
MS	18					54,17	
CN	18					59,39	59,39
NS	18						63,50
DS	18						65,00
Sig.		,979	1,000	1,000	1,000	,366	,270
Scheffé ^a							
CM	18	11,67					
CS	18	14,11					
MV	18		25,33				
NV	18		34,33				
DV	18			43,78			
MS	18				54,17		
CN	18				59,39	59,39	
NS	18					63,50	
DS	18					65,00	
Sig.		,997	,061	1,000	,739	,652	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

Tabla 4.12.- Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable ROSTRAL.

En el nivel INTERMEDIO de la porción lateral del PB, el método de Tukey determinó hasta 5 subconjuntos homogéneos, mientras que el de Scheffé determinó 4, siendo la distribución de los mismos diferente a la del nivel ROSTRAL:

- En los extremos de estos subconjuntos destacaron por un lado los mismos grupos CS y CM, pero por el otro tan sólo se mantuvo el grupo NS.
- En el segundo bloque por ambos extremos, que dado el solapamiento con el subconjunto central lo incluiría, veríamos ahora por un lado por los grupos DS, MS, DV y MV, mientras que por el otro nos encontraríamos con los grupos NV y CN.

INTERMEDIO

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05						
		1	2	3	4	5		
HSD de Tukey ^a	CS	18	9,67					
	CM	18	11,00					
	DS	18		48,61				
	MS	18		50,22	50,22			
	DV	18		56,22	56,22			
	MV	18			60,06			
	NV	18				107,33		
	CN	18				113,44		
	NS	18						130,28
	Sig.			1,000	,442	,129	,728	1,000
Scheffé ^a	CS	18	9,67					
	CM	18	11,00					
	DS	18		48,61				
	MS	18		50,22				
	DV	18		56,22				
	MV	18		60,06				
	NV	18			107,33			
	CN	18			113,44			
	NS	18					130,28	
	Sig.			1,000	,242	,933	1,000	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

Tabla 4.13.- Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable INTERMEDIO.

Por último a nivel CAUDAL de la porción lateral del PB, el método de Tukey determinó 5 subconjuntos homogéneos, mientras que el método de Scheffé determinó hasta 6 subconjuntos:

- En este caso quedaron mucho más claras las diferencias entre los grupos que recibieron dosis altas de metamizol, es decir, los grupos CN, NS y NV y los grupos control CS y CM, quedando en el centro los subconjuntos estimulados nociceptivamente, con o sin morfina previa.

CAUDAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05						
		1	2	3	4	5	6	
HSD de Tukey ^a	CS	18	8,44					
	CM	18	11,56					
	MS	18		25,89				
	DS	18		31,39				
	DV	18			52,22			
	MV	18			63,56			
	NS	18				105,17		
	CN	18					120,56	
	NV	18					125,61	
	Sig.			,996	,864	,066	1,000	,912
Scheffé ^a	CS	18	8,44					
	CM	18	11,56	11,56				
	MS	18		25,89	25,89			
	DS	18		31,39	31,39			
	DV	18				52,22		
	MV	18				63,56		
	NS	18					105,17	
	CN	18						120,56
	NV	18						125,61
	Sig.		1,000	,072	,974	,328	1,000	,985

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

Tabla 4.14.- Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable CAUDAL.

3.2.- Análisis Parciales

Al igual que en el análisis global, en cada uno de los análisis parciales presentamos los *descriptivos* seguidos de un análisis de las varianzas (ANOVA).

Es importante recordar en este punto que para poder realizar un ANOVA es necesario que:

1º: Las observaciones sean *independientes*.

2º: Haya una *homogeneidad* en las varianzas, por lo que la variable respuesta (nº de núcleos marcados), debe tener la misma variabilidad en todos los grupos. Esto se contrasta con el *test de Levene*.

3º: La variable respuesta sea *normal* en cada uno de los grupos. Esto se contrasta con el *test de Kolmogoróv*.

En los descriptivos, ofrecidos en primer lugar, se incluyen el número de observaciones (N), la media, la desviación típica, el error típico, el intervalo de confianza para la media al 95%, el mínimo y el máximo.

Estos datos fueron contrastados tanto con el *test de Levene* como con el *test de Kolmogoróv*, que también se ofrecen tras los descriptivos.

A continuación, completamos el análisis estadístico con el ANOVA y con los estudios post-hoc de determinación de subconjuntos homogéneos de Tukey y de Scheffé.

Finalmente, se concluye el estudio con una representación gráfica de los resultados obtenidos.

3.2.1.- Análisis Parcial Dolor: CS, DS y DV.

El objetivo de este análisis fue evaluar el efecto que sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB tendría la aplicación de un estímulo nociceptivo, ya sea éste somático (test de la formalina) o visceral (test de las contracciones abdominales). Para ello comparamos entre sí los grupos CS, DS y DV.

El análisis estadístico incluyó una obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables ROSTRAL, INTERMEDIO Y CAUDAL, siendo el factor el grupo experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales tanto para la variable ROSTRAL ($F=258.207$; $p<0,01$), INTERMEDIO ($F=195.443$; $p<0,0001$) y CAUDAL ($F=234.406$; $p<0,0001$).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO I) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CS) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (DS y DV) que cuando se compararon entre sí los grupos DS y DV, independientemente del método empleado, Tukey o Scheffé.

La determinación de subconjuntos homogéneos mediante los métodos de Tukey y Scheffé confirmó las diferencias entre los 3 grupos.

Finalmente, vemos la representación gráfica de estos resultados mediante un histograma de barras de error, en el que, de nuevo, destacan las diferencias ya mencionadas.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
ROSTRAL	CS	18	14,11	5,178	1,220	11,54	16,69	7	21
	DS	18	65,00	7,670	1,808	61,19	68,81	55	74
	DV	18	43,78	7,142	1,683	40,23	47,33	36	53
	Total	54	40,96	22,082	3,005	34,94	46,99	7	74
INTERMEDIO	CS	18	9,67	4,015	,946	7,67	11,66	5	15
	DS	18	48,61	8,521	2,008	44,37	52,85	40	60
	DV	18	56,22	9,143	2,155	51,68	60,77	45	67
	Total	54	38,17	21,884	2,978	32,19	44,14	5	67
CAUDAL	CS	18	8,44	2,955	,697	6,97	9,91	4	13
	DS	18	31,39	5,158	1,216	28,82	33,95	25	38
	DV	18	52,22	8,667	2,043	47,91	56,53	41	64
	Total	54	30,69	19,003	2,586	25,50	35,87	4	64

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
ROSTRAL	5,001	2	51	,010
INTERMEDIO	21,068	2	51	,000
CAUDAL	17,937	2	51	,000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ROSTRAL	Inter-grupos	23521,037	2	11760,519	258,207	,000
	Intra-grupos	2322,889	51	45,547		
	Total	25843,926	53			
INTERMEDIO	Inter-grupos	22452,111	2	11226,056	195,443	,000
	Intra-grupos	2929,389	51	57,439		
	Total	25381,500	53			
CAUDAL	Inter-grupos	17261,815	2	8630,907	234,406	,000
	Intra-grupos	1877,833	51	36,820		
	Total	19139,648	53			

Tabla 4.15.- Resultados del Análisis Parcial Dolor: CS, DS y DV: Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

ROSTRAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	CS	18	14,11	
	DV	18		43,78
	DS	18		65,00
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé ^a	CS	18	14,11	
	DV	18		43,78
	DS	18		65,00
	Sig.		1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

INTERMEDIO

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	CS	18	9,67	
	DS	18		48,61
	DV	18		56,22
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé ^a	CS	18	9,67	
	DS	18		48,61
	DV	18		56,22
	Sig.		1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

CAUDAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	CS	18	8,44	
	DS	18		31,39
	DV	18		52,22
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé ^a	CS	18	8,44	
	DS	18		31,39
	DV	18		52,22
	Sig.		1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

Tabla 4.16.- Resultados del Análisis Parcial Dolor: CB, DS y DV: Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.

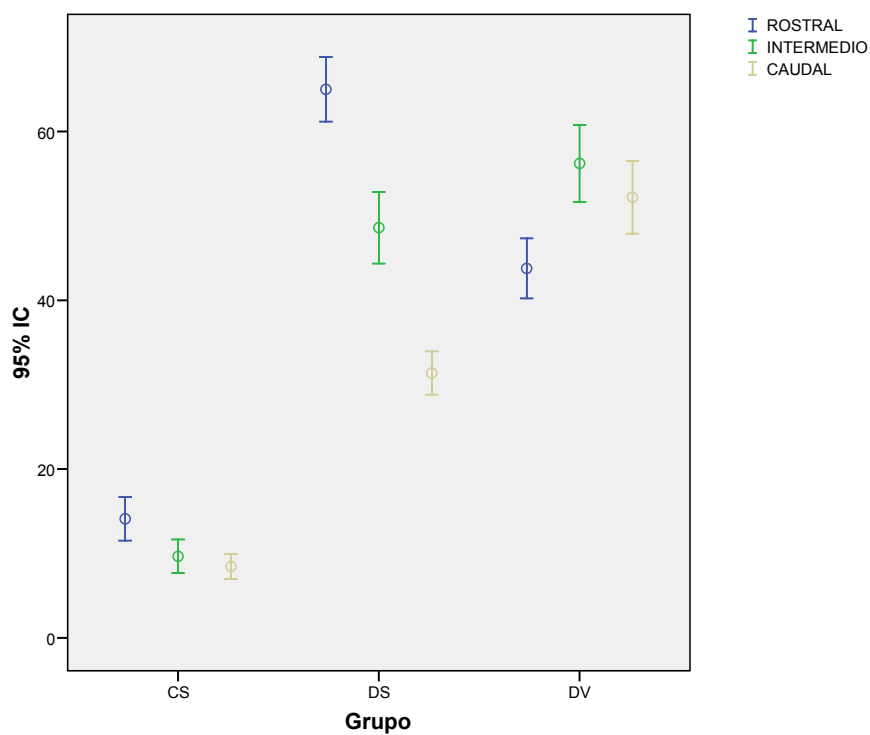


Fig. 4.82.- Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Dolor: CS, DS y DV.

3.2.2.- Análisis Parcial Analgesia: CS, CM y CN

El objetivo de este análisis fue evaluar el efecto que sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB tendría la aplicación de un estímulo antinociceptivo, en este caso la administración por vía parenteral bien de morfina, bien de metamizol, dos analgésicos con mecanismos de acción teóricamente diferentes. Para ello comparamos entre sí los grupos CS, CM y CN.

El análisis estadístico incluyó una obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables ROSTRAL, INTERMEDIO y CAUDAL, siendo el factor el grupo experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales tanto para la variable ROSTRAL ($F=339.652$; $p<0,0001$), INTERMEDIO ($F=875.035$; $p<0,0001$) y CAUDAL ($F=672.192$; $p<0,0001$).

Sin embargo, el estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO II) tan sólo detectó diferencias cuando comparamos el grupo CN con cualquiera de los otros dos grupos, CS y CM, tanto en el nivel ROSTRAL ($F=258.207$; $p<0,01$), INTERMEDIO ($F=195.443$; $p<0,0001$) y CAUDAL ($F=234.406$; $p<0,0001$), independientemente del método empleado, Tukey o Scheffé.

La determinación de subconjuntos homogéneos mediante los métodos de Tukey y Scheffé confirmaron las diferencias entre el grupo CN y los otros dos, el CS y el CM, en los 3 niveles.

Finalmente, en la representación gráfica de estos resultados mediante un histograma de barras de error, vemos de nuevo como se hace patente la diferencia entre el grupo CN y los otros dos, CS y CM.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
ROSTRAL	CS	18	14,11	5,178	1,220	11,54	16,69	7	21
	CM	18	11,67	4,627	1,091	9,37	13,97	5	19
	CN	18	59,39	8,161	1,924	55,33	63,45	50	68
	Total	54	28,39	22,965	3,125	22,12	34,66	5	68
INTERMEDIO	CS	18	9,67	4,015	,946	7,67	11,66	5	15
	CM	18	11,00	3,941	,929	9,04	12,96	6	16
	CN	18	113,44	13,678	3,224	106,64	120,25	90	130
	Total	54	44,70	49,776	6,774	31,12	58,29	5	130
CAUDAL	CS	18	8,44	2,955	,697	6,97	9,91	4	13
	CM	18	11,56	3,552	,837	9,79	13,32	7	17
	CN	18	120,56	17,497	4,124	111,85	129,26	96	139
	Total	54	46,85	53,610	7,295	32,22	61,48	4	139

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
ROSTRAL	20,438	2	51	,000
INTERMEDIO	25,942	2	51	,000
CAUDAL	61,114	2	51	,000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ROSTRAL	Inter-grupos	26000,778	2	13000,389	339,652	,000
	Intra-grupos	1952,056	51	38,276		
	Total	27952,833	53			
INTERMEDIO	Inter-grupos	127598,815	2	63799,407	875,035	,000
	Intra-grupos	3718,444	51	72,911		
	Total	131317,259	53			
CAUDAL	Inter-grupos	146757,481	2	73378,741	672,192	,000
	Intra-grupos	5567,333	51	109,163		
	Total	152324,815	53			

Tabla 4.17.- Resultados del Análisis Parcial Analgesia: CS, CM y CN: Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

ROSTRAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	CM	18	11,67
	CS	18	14,11
	CN	18	59,39
	Sig.		,467
Scheffé ^a	CM	18	11,67
	CS	18	14,11
	CN	18	59,39
	Sig.		,500

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

INTERMEDIO

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	CS	18	9,67
	CM	18	11,00
	CN	18	113,44
	Sig.		,886
Scheffé ^a	CS	18	9,67
	CM	18	11,00
	CN	18	113,44
	Sig.		,896

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

CAUDAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	CS	18	8,44
	CM	18	11,56
	CN	18	120,56
	Sig.		,647
Scheffé ^a	CS	18	8,44
	CM	18	11,56
	CN	18	120,56
	Sig.		,673

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

Tabla 4.18.- Resultados del Análisis Parcial Analgesia: CS, CM y CN: Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé.

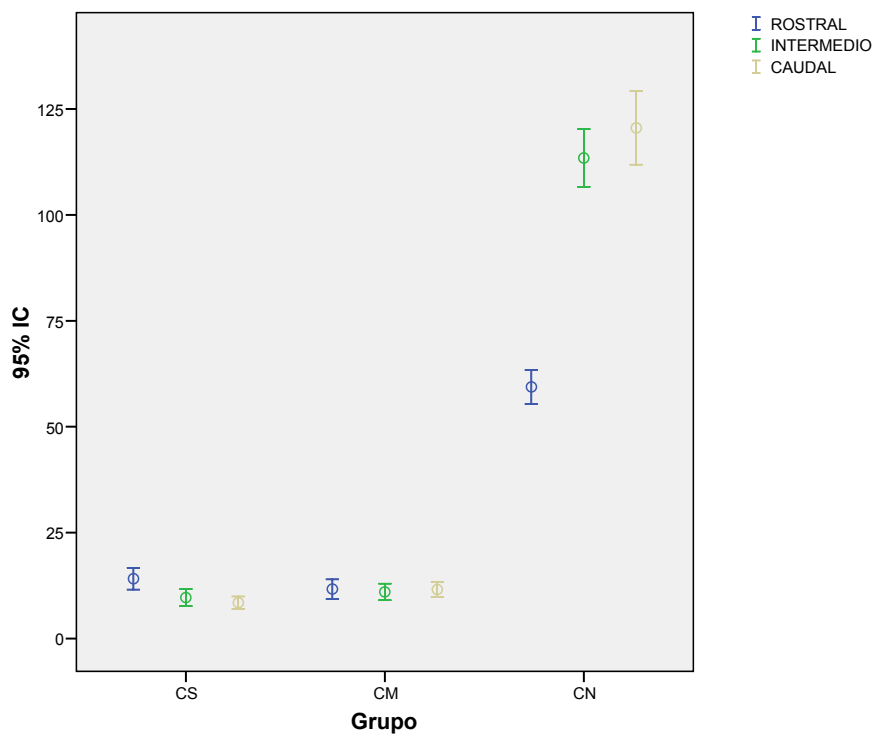


Fig. 4.83.- Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia: CS, CM y CN.

3.2.3.- Análisis Parcial Analgesia+Dolor Somático: DS, MS y NS.

El objetivo de este análisis fue evaluar, en el caso de que así fuera, el efecto que, sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB, pudiera tener la administración previa al estímulo doloroso somático superficial de un analgésico, morfina o metamizol. Para ello comparamos entre sí los grupos DS, MS y NS.

El análisis estadístico incluyó una obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables ROSTRAL, INTERMEDIO y CAUDAL, siendo el factor el grupo experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales tanto para la variable ROSTRAL ($F=10.193$; $p<0,0001$), INTERMEDIO ($F=271.890$; $p<0,0001$) y CAUDAL ($F=336.358$; $p<0,0001$).

Un estudio pormenorizado (ANEXO III) matizó esas diferencias entre los grupos DS, MS y NS cuando se compararon entre sí. De esta forma, comprobamos como, tanto a nivel INTERMEDIO como CAUDAL, el grupo NS mostró un comportamiento diferente estadísticamente respecto de los otros 2 grupos, DS y MS, lo que no ocurrió a nivel ROSTRAL, independientemente del método de comparaciones múltiples empleado, Tukey o Scheffé.

La determinación de subconjuntos homogéneos confirmó las diferencias existentes entre el grupo que recibió metamizol, NS, y los otros dos, DS y MS.

Finalmente, vemos la representación gráfica de estos resultados mediante un histograma de barras de error, que de nuevo evidencia las diferencias antes señaladas.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
ROSTRAL	DS	18	65,00	7,670	1,808	61,19	68,81	55	74
	MS	18	54,17	7,334	1,729	50,52	57,81	45	65
	NS	18	63,50	8,361	1,971	59,34	67,66	55	75
	Total	54	60,89	9,053	1,232	58,42	63,36	45	75
INTERMEDIO	DS	18	48,61	8,521	2,008	44,37	52,85	40	60
	MS	18	50,22	7,496	1,767	46,49	53,95	40	59
	NS	18	130,28	17,442	4,111	121,60	138,95	110	150
	Total	54	76,37	40,246	5,477	65,39	87,36	40	150
CAUDAL	DS	18	31,39	5,158	1,216	28,82	33,95	25	38
	MS	18	25,89	6,480	1,527	22,67	29,11	18	34
	NS	18	105,17	15,685	3,697	97,37	112,97	90	133
	Total	54	54,15	37,842	5,150	43,82	64,48	18	133

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
ROSTRAL	1,335	2	51	,272
INTERMEDIO	65,641	2	51	,000
CAUDAL	21,940	2	51	,000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ROSTRAL	Inter-grupos	1240,333	2	620,167	10,193	,000
	Intra-grupos	3103,000	51	60,843		
	Total	4343,333	53			
INTERMEDIO	Inter-grupos	78485,593	2	39242,796	271,890	,000
	Intra-grupos	7361,000	51	144,333		
	Total	85846,593	53			
CAUDAL	Inter-grupos	70550,259	2	35275,130	336,358	,000
	Intra-grupos	5348,556	51	104,874		
	Total	75898,815	53			

Tabla 4.19.- Resultados del Análisis Parcial Analgesia+Dolor Somático: DS, MS y NS: Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

ROSTRAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	MS	18	54,17
	NS	18	63,50
	DS	18	65,00
	Sig.		1,000
Scheffé ^a	MS	18	54,17
	NS	18	63,50
	DS	18	65,00
	Sig.		1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000

INTERMEDIO

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	DS	18	48,61
	MS	18	50,22
	NS	18	130,28
	Sig.		,915
Scheffé ^a	DS	18	48,61
	MS	18	50,22
	NS	18	130,28
	Sig.		,922

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica =

CAUDAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	MS	18	25,89
	DS	18	31,39
	NS	18	105,17
	Sig.		,250
Scheffé ^a	MS	18	25,89
	DS	18	31,39
	NS	18	105,17
	Sig.		,282

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

Tabla 4.20.- Resultados del Análisis Parcial Analgesia+Dolor Somático: DS, MS y NS: Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé.

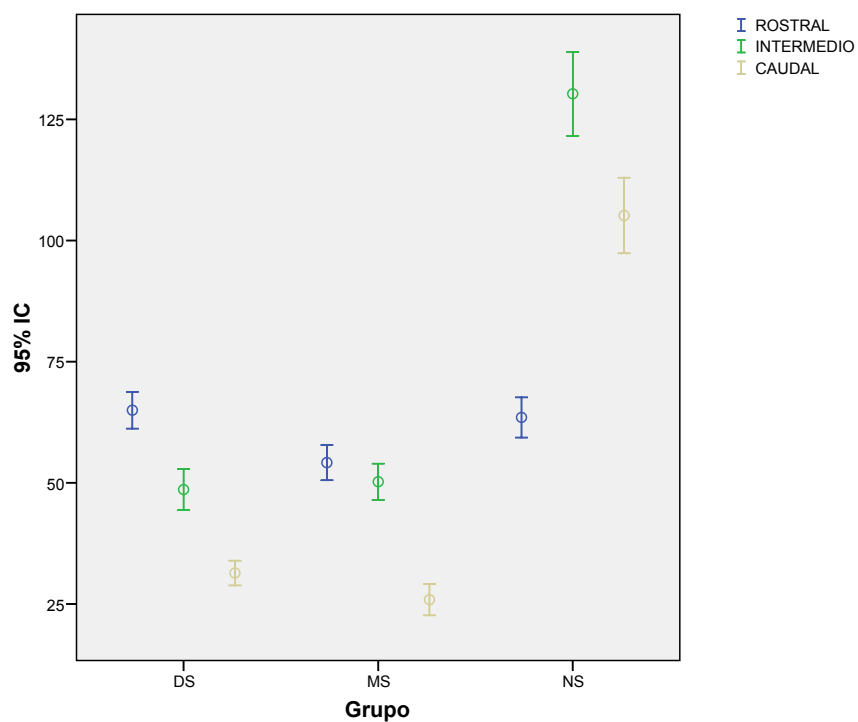


Fig. 4.84.- Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia+Dolor Somático: DS, MS y NS.

3.2.4.- Análisis Parcial Analgesia+Dolor Visceral: DV, MV y NV.

El objetivo de este análisis fue evaluar, en el caso de que así fuera, el efecto que, sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB, pudiera tener la administración, previa al estímulo doloroso visceral, de un analgésico, morfina o metamizol. Para ello comparamos entre sí los grupos DV, MV y NV.

El análisis estadístico incluyó una obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables ROSTRAL, INTERMEDIO y CAUDAL, siendo el factor el grupo experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales tanto para la variable ROSTRAL ($F=35.095$; $p<0,0001$), INTERMEDIO ($F=121.436$; $p<0,0001$) y CAUDAL ($F=175.259$; $p<0,0001$).

Un estudio pormenorizado (ANEXO IV) confirmó las diferencias entre los 3 grupos DV, MV y NV cuando se compararon entre sí, tanto para la variable ROSTRAL como para la variable CAUDAL, independientemente del método empleado. Fue en el nivel INTERMEDIO en el que se puso de manifiesto que las diferencias eran mucho más acusadas cuando era con el grupo NV con el que comparábamos los otros dos, DV y MV, independientemente del método empleado, Tukey o Scheffé.

La determinación de subconjuntos homogéneos mediante los métodos de Tukey y Scheffé reiteró estos resultados.

Finalmente, vemos la representación gráfica de estos resultados mediante un histograma de barras de error, que de nuevo evidencia las diferencias antes señaladas.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
ROSTRAL	DV	18	43,78	7,142	1,683	40,23	47,33	36	53
	MV	18	25,33	6,164	1,453	22,27	28,40	20	35
	NV	18	34,33	6,472	1,525	31,12	37,55	25	45
	Total	54	34,48	9,988	1,359	31,76	37,21	20	53
INTERMEDIO	DV	18	56,22	9,143	2,155	51,68	60,77	45	67
	MV	18	60,06	9,421	2,221	55,37	64,74	48	72
	NV	18	107,33	13,711	3,232	100,51	114,15	90	125
	Total	54	74,54	25,807	3,512	67,49	81,58	45	125
CAUDAL	DV	18	52,22	8,667	2,043	47,91	56,53	41	64
	MV	18	63,56	10,348	2,439	58,41	68,70	52	76
	NV	18	125,61	17,284	4,074	117,02	134,21	95	140
	Total	54	80,46	34,849	4,742	70,95	89,98	41	140

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
ROSTRAL	,877	2	51	,422
INTERMEDIO	7,895	2	51	,001
CAUDAL	8,197	2	51	,001

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
ROSTRAL	Inter-grupos	3062,370	2	1531,185	35,095	,000
	Intra-grupos	2225,111	51	43,630		
	Total	5287,481	53			
INTERMEDIO	Inter-grupos	29173,370	2	14586,685	121,436	,000
	Intra-grupos	6126,056	51	120,119		
	Total	35299,426	53			
CAUDAL	Inter-grupos	56191,593	2	28095,796	175,259	,000
	Intra-grupos	8175,833	51	160,310		
	Total	64367,426	53			

Tabla 4.21.- Resultados del Análisis Parcial Analgesia+Dolor Visceral: DV, MV y NV: Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

ROSTRAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	MV	18	25,33	
	NV	18		34,33
	DV	18		43,78
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé ^a	MV	18	25,33	
	NV	18		34,33
	DV	18		43,78
	Sig.		1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

INTERMEDIO

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a	DV	18	56,22
	MV	18	60,06
	NV	18	107,33
	Sig.		,550
Scheffé ^a	DV	18	56,22
	MV	18	60,06
	NV	18	107,33
	Sig.		,580

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica =

CAUDAL

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	DV	18	52,22	
	MV	18		63,56
	NV	18		125,61
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé ^a	DV	18	52,22	
	MV	18		63,56
	NV	18		125,61
	Sig.		1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,000.

Tabla 4.22.- Resultados del Análisis Parcial Analgesia+Dolor Visceral: DV, MV y NV: Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé.

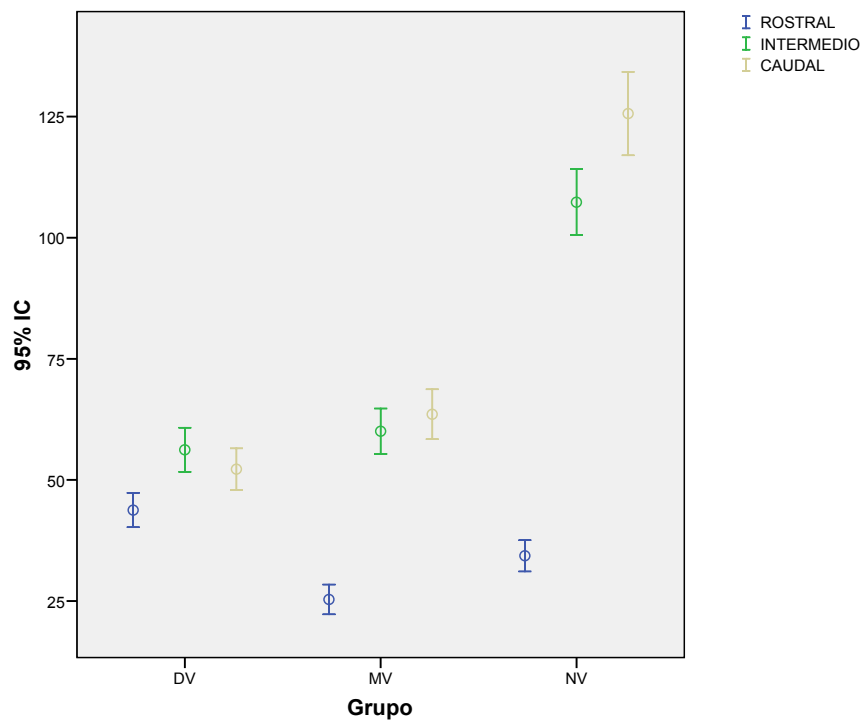


Fig. 4.85.- Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia+Dolor Visceral: DV, MV y NV.

3.2.5.- ANEXO I: Análisis Parcial Dolor.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
ROSTRAL	HSD de Tukey	CS	DS	-50,889*	2,250	,000	-56,32	-45,46
			DV	-29,667*	2,250	,000	-35,10	-24,24
		DS	CS	50,889*	2,250	,000	45,46	56,32
			DV	21,222*	2,250	,000	15,79	26,65
		DV	CS	29,667*	2,250	,000	24,24	35,10
			DS	-21,222*	2,250	,000	-26,65	-15,79
	Scheffé	CS	DS	-50,889*	2,250	,000	-56,56	-45,22
			DV	-29,667*	2,250	,000	-35,34	-23,99
		DS	CS	50,889*	2,250	,000	45,22	56,56
			DV	21,222*	2,250	,000	15,55	26,89
		DV	CS	29,667*	2,250	,000	23,99	35,34
			DS	-21,222*	2,250	,000	-26,89	-15,55
INTERMEDIO	HSD de Tukey	CS	DS	-38,944*	2,526	,000	-45,04	-32,85
			DV	-46,556*	2,526	,000	-52,65	-40,46
		DS	CS	38,944*	2,526	,000	32,85	45,04
			DV	-7,611*	2,526	,011	-13,71	-1,51
		DV	CS	46,556*	2,526	,000	40,46	52,65
			DS	7,611*	2,526	,011	1,51	13,71
	Scheffé	CS	DS	-38,944*	2,526	,000	-45,31	-32,57
			DV	-46,556*	2,526	,000	-52,93	-40,19
		DS	CS	38,944*	2,526	,000	32,57	45,31
			DV	-7,611*	2,526	,015	-13,98	-1,24
		DV	CS	46,556*	2,526	,000	40,19	52,93
			DS	7,611*	2,526	,015	1,24	13,98
CAUDAL	HSD de Tukey	CS	DS	-22,944*	2,023	,000	-27,83	-18,06
			DV	-43,778*	2,023	,000	-48,66	-38,90
		DS	CS	22,944*	2,023	,000	18,06	27,83
			DV	-20,833*	2,023	,000	-25,72	-15,95
		DV	CS	43,778*	2,023	,000	38,90	48,66
			DS	20,833*	2,023	,000	15,95	25,72
	Scheffé	CS	DS	-22,944*	2,023	,000	-28,04	-17,84
			DV	-43,778*	2,023	,000	-48,88	-38,68
		DS	CS	22,944*	2,023	,000	17,84	28,04
			DV	-20,833*	2,023	,000	-25,93	-15,73
		DV	CS	43,778*	2,023	,000	38,68	48,88
			DS	20,833*	2,023	,000	15,73	25,93

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

3.2.6.- ANEXO II: Análisis Parcial Analgesia.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
ROSTRAL	HSD de Tukey	CS	CM	2,444	2,062	,467	-2,53	7,42
			CN	-45,278*	2,062	,000	-50,26	-40,30
		CM	CS	-2,444	2,062	,467	-7,42	2,53
			CN	-47,722*	2,062	,000	-52,70	-42,74
		CN	CS	45,278*	2,062	,000	40,30	50,26
			CM	47,722*	2,062	,000	42,74	52,70
	Scheffé	CS	CM	2,444	2,062	,500	-2,76	7,64
			CN	-45,278*	2,062	,000	-50,48	-40,08
		CM	CS	-2,444	2,062	,500	-7,64	2,76
			CN	-47,722*	2,062	,000	-52,92	-42,52
		CN	CS	45,278*	2,062	,000	40,08	50,48
			CM	47,722*	2,062	,000	42,52	52,92
INTERMEDIO	HSD de Tukey	CS	CM	-1,333	2,846	,886	-8,20	5,54
			CN	-103,778*	2,846	,000	-110,65	-96,91
		CM	CS	1,333	2,846	,886	-5,54	8,20
			CN	-102,444*	2,846	,000	-109,32	-95,57
		CN	CS	103,778*	2,846	,000	96,91	110,65
			CM	102,444*	2,846	,000	95,57	109,32
	Scheffé	CS	CM	-1,333	2,846	,896	-8,51	5,84
			CN	-103,778*	2,846	,000	-110,95	-96,60
		CM	CS	1,333	2,846	,896	-5,84	8,51
			CN	-102,444*	2,846	,000	-109,62	-95,27
		CN	CS	103,778*	2,846	,000	96,60	110,95
			CM	102,444*	2,846	,000	95,27	109,62
CAUDAL	HSD de Tukey	CS	CM	-3,111	3,483	,647	-11,52	5,30
			CN	-112,111*	3,483	,000	-120,52	-103,70
		CM	CS	3,111	3,483	,647	-5,30	11,52
			CN	-109,000*	3,483	,000	-117,41	-100,59
		CN	CS	112,111*	3,483	,000	103,70	120,52
			CM	109,000*	3,483	,000	100,59	117,41
	Scheffé	CS	CM	-3,111	3,483	,673	-11,89	5,67
			CN	-112,111*	3,483	,000	-120,89	-103,33
		CM	CS	3,111	3,483	,673	-5,67	11,89
			CN	-109,000*	3,483	,000	-117,78	-100,22
		CN	CS	112,111*	3,483	,000	103,33	120,89
			CM	109,000*	3,483	,000	100,22	117,78

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

3.2.7.- ANEXO III: Análisis Parcial Analgesia+Dolor Somático Superficial.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
ROSTRAL	HSD de Tukey	DS	MS	10,833*	2,600	,000	4,56	17,11
			NS	1,500	2,600	,833	-4,78	7,78
		MS	DS	-10,833*	2,600	,000	-17,11	-4,56
			NS	-9,333*	2,600	,002	-15,61	-3,06
		NS	DS	-1,500	2,600	,833	-7,78	4,78
			MS	9,333*	2,600	,002	3,06	15,61
	Scheffé	DS	MS	10,833*	2,600	,001	4,28	17,39
			NS	1,500	2,600	,847	-5,06	8,06
		MS	DS	-10,833*	2,600	,001	-17,39	-4,28
			NS	-9,333*	2,600	,003	-15,89	-2,78
		NS	DS	-1,500	2,600	,847	-8,06	5,06
			MS	9,333*	2,600	,003	2,78	15,89
INTERMEDIO	HSD de Tukey	DS	MS	-1,611	4,005	,915	-11,28	8,06
			NS	-81,667*	4,005	,000	-91,33	-72,00
		MS	DS	1,611	4,005	,915	-8,06	11,28
			NS	-80,056*	4,005	,000	-89,72	-70,39
		NS	DS	81,667*	4,005	,000	72,00	91,33
			MS	80,056*	4,005	,000	70,39	89,72
	Scheffé	DS	MS	-1,611	4,005	,922	-11,71	8,49
			NS	-81,667*	4,005	,000	-91,76	-71,57
		MS	DS	1,611	4,005	,922	-8,49	11,71
			NS	-80,056*	4,005	,000	-90,15	-69,96
		NS	DS	81,667*	4,005	,000	71,57	91,76
			MS	80,056*	4,005	,000	69,96	90,15
CAUDAL	HSD de Tukey	DS	MS	5,500	3,414	,250	-2,74	13,74
			NS	-73,778*	3,414	,000	-82,02	-65,54
		MS	DS	-5,500	3,414	,250	-13,74	2,74
			NS	-79,278*	3,414	,000	-87,52	-71,04
		NS	DS	73,778*	3,414	,000	65,54	82,02
			MS	79,278*	3,414	,000	71,04	87,52
	Scheffé	DS	MS	5,500	3,414	,282	-3,11	14,11
			NS	-73,778*	3,414	,000	-82,38	-65,17
		MS	DS	-5,500	3,414	,282	-14,11	3,11
			NS	-79,278*	3,414	,000	-87,88	-70,67
		NS	DS	73,778*	3,414	,000	65,17	82,38
			MS	79,278*	3,414	,000	70,67	87,88

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

3.2.8.- ANEXO IV: Análisis Parcial Analgesia+Dolor Visceral.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
ROSTRAL	HSD de Tukey	DV	MV	18,444*	2,202	,000	13,13	23,76
			NV	9,444*	2,202	,000	4,13	14,76
		MV	DV	-18,444*	2,202	,000	-23,76	-13,13
			NV	-9,000*	2,202	,000	-14,31	-3,69
		NV	DV	-9,444*	2,202	,000	-14,76	-4,13
			MV	9,000*	2,202	,000	3,69	14,31
	Scheffé	DV	MV	18,444*	2,202	,000	12,89	24,00
			NV	9,444*	2,202	,000	3,89	15,00
		MV	DV	-18,444*	2,202	,000	-24,00	-12,89
			NV	-9,000*	2,202	,001	-14,55	-3,45
		NV	DV	-9,444*	2,202	,000	-15,00	-3,89
			MV	9,000*	2,202	,001	3,45	14,55
INTERMEDIO	HSD de Tukey	DV	MV	-3,833	3,653	,550	-12,65	4,99
			NV	-51,111*	3,653	,000	-59,93	-42,29
		MV	DV	3,833	3,653	,550	-4,99	12,65
			NV	-47,278*	3,653	,000	-56,10	-38,46
		NV	DV	51,111*	3,653	,000	42,29	59,93
			MV	47,278*	3,653	,000	38,46	56,10
	Scheffé	DV	MV	-3,833	3,653	,580	-13,04	5,38
			NV	-51,111*	3,653	,000	-60,32	-41,90
		MV	DV	3,833	3,653	,580	-5,38	13,04
			NV	-47,278*	3,653	,000	-56,49	-38,07
		NV	DV	51,111*	3,653	,000	41,90	60,32
			MV	47,278*	3,653	,000	38,07	56,49
CAUDAL	HSD de Tukey	DV	MV	-11,333*	4,220	,026	-21,52	-1,15
			NV	-73,389*	4,220	,000	-83,58	-63,20
		MV	DV	11,333*	4,220	,026	1,15	21,52
			NV	-62,056*	4,220	,000	-72,24	-51,87
		NV	DV	73,389*	4,220	,000	63,20	83,58
			MV	62,056*	4,220	,000	51,87	72,24
	Scheffé	DV	MV	-11,333*	4,220	,034	-21,97	-,69
			NV	-73,389*	4,220	,000	-84,03	-62,75
		MV	DV	11,333*	4,220	,034	,69	21,97
			NV	-62,056*	4,220	,000	-72,70	-51,41
		NV	DV	73,389*	4,220	,000	62,75	84,03
			MV	62,056*	4,220	,000	51,41	72,70

*. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

F. 11. Esquema de la estructura del cerebro - Corte horizontal. A. Capa molecular. B. Capa de los granos. C. Substancia blanca. D. Vista de plano de una célula de Purkinje. E. Célula estreñada de la capa molecular. F. Dorsaciones nerviosas que rodean los cuerpos de las células de Purkinje. G. Granos cuyo eje se bifurca en la capa molecular. H. Células estrelladas superficiales. I. Granos de neuroglia en forma de penacho. J. Fibras mucosas. K. Fibras trepadoras de la capa de los granos. L. Células mismas zona.



F. 12. Esquema de una lamina cerebelosa. Corte longitudinal. A. Capa molecular. B. Capa de los granos. C. Substancia blanca. D. Cilindro eje ascendente de un grano. E. Bifurcación de este cilindro eje y su continuación con una fibra paralela. F. Célula de Purkinje vista de perfil. G. Estremo de las fibras paralelas. H. Cilindro eje de una célula de Purkinje.

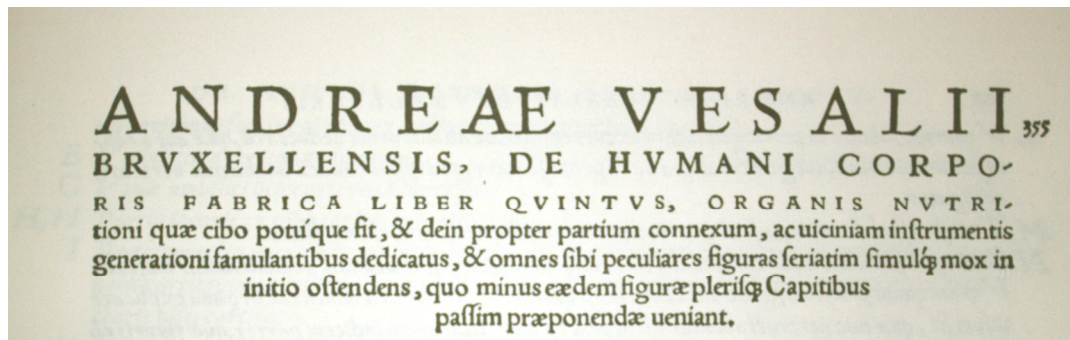


S.R. Cajal - delineo.

R. Padró - pinx.



05 DISCUSIÓN



1.- Consideraciones metodológicas



uestro trabajo de investigación se ha centrado en estudiar el posible papel que el núcleo parabraquial (PB) podría desempeñar ya sea en el circuito ascendente de transmisión de la información nociceptiva, o bien en el circuito descendente antinociceptivo de control de dicha información algésica. Asimismo, nuestro estudio ha profundizado en el papel que el PB podría jugar el mecanismo de acción de fármacos analgésicos como el metamizol o la morfina.

El estudio de los circuitos neurales nociceptivo y antinociceptivo ha suscitado, desde que se tuvo conocimiento de su existencia, el interés de los investigadores. Con el paso del tiempo el número de estructuras del sistema nervioso central que se han asociado a uno u otro circuito, o incluso a los dos, ha ido creciendo paulatinamente.

Han sido ya varios los trabajos aparecidos recientemente que han abarcado en su estudio un número creciente de núcleos y centros nerviosos, y cuyo objetivo ha sido determinar en cuáles de todos ellos se registraba actividad tras la aplicación de un estímulo nociceptivo (Porro

y cols., 1991a y b; Lantéri-Minet *y cols.*, 1993 y 1994; Rodella *y cols.*, 1998).

El PB, situado en la porción dorsolateral de la protuberancia, alrededor del pedúnculo cerebelo superior, y asociado clásicamente con una amplia variedad de funciones autonómicas como, por ejemplo, la regulación cardiovascular (Chamberlin y Saper, 1992; Saleh y Connell, 1997; Guo *y cols.*, 2005), y funciones del sistema gustativo (Nishijo y Norgren, 1990), y del respiratorio (Mizusawa *y cols.*, 1995), es una de esas estructuras que se ha implicado en los mecanismos tanto nociceptivos como analgésicos (Bernard *y cols.*, 1994; Bellavance y Beitz, 1996; Clement *y cols.*, 1996; Hermanson y Blomqvist, 1996; Bester *y cols.*, 1997; Buritova *y cols.*, 1998; Richard *y cols.*, 2005; Li *y cols.*, 2006; Jergova *y cols.*, 2008).

La mayoría de los trabajos que inicialmente han señalado al PB como posible participante en los circuitos de transmisión y control del dolor, se han llevado a cabo en animales en mayor o menor medida anestesiados (Bellavance y Beitz, 1996; Clement *y cols.*, 1996; Li *y cols.*, 2006; Jergova *y cols.*, 2008), mientras que nuestro trabajo se ha realizado sobre animales conscientes no anestesiados. De este modo evitamos las seguras interferencias que el anestésico va a producir tanto en los impulsos excitadores o inhibidores como en las respuestas neuronales y, por tanto, en la expresión de *c-fos* (Takayama *y cols.*, 1994).

Ya señalamos que entre las diferentes técnicas que permiten detectar los cambios metabólicos en el sistema nervioso central inducidos por estímulos nociceptivos destacaban el método de la 2-desoxiglucosa (2-DG) (Sokoloff *y cols.*, 1977), basado en la medición de la glucosa utilizada localmente en el encéfalo (para revisión ver Porro y Cavazzuti, 1993), y el estudio de la expresión del proto-oncogén *c-fos* como marcador de actividad neuronal (Hunt *y cols.*, 1987; Sagar *y cols.*,

1988; Menétrey *y cols.*, 1989; Dragunow y Faull, 1989; Bullit, 1990; Sandkühler, 1991; Munglani *y cols.*, 1993).

El método de la 2-DG, tiene la ventaja de que puede ser aplicado en animales no anestesiados pero, tiene también algunos inconvenientes como son la falta de resolución celular y la incompatibilidad con otras técnicas neuroanatómicas. Inconvenientes que no tiene el estudio de la expresión de *c-fos*, a lo cual hay que añadir la ventaja de su relativa facilidad de aplicación, ya que no se necesita una gran infraestructura (Sharp *y cols.*, 1993). Todo esto posibilitó una rápida aparición de trabajos en los que se estudió el patrón de distribución de *c-fos* inducido tras aplicar al animal de experimentación diferentes estímulos nociceptivos (Hunt *y cols.*, 1987; Menétrey *y cols.*, 1989; Bullit, 1990; Sandkühler, 1991; Keay y Bandler, 1993; Lantéri-Minet *y cols.*, 1993; Keay, *y cols.*, 1994; Lantéri-Minet *y cols.*, 1994; Clement *y cols.*, 1996; Munglani *y cols.*, 1996; Harris, 1998; Rodella *y cols.*, 1998).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunas neuronas no expresan la proteína Fos al activarse por lo que, en esos casos, el estudio de la expresión del proto-oncogén *c-fos* no sería una herramienta válida como marcador de actividad neuronal. Por ello, la interpretación de los resultados obtenidos a partir de experimentos en los que se utiliza esta técnica debe limitarse a las poblaciones de neuronas en las que se expresa la proteína Fos. No deberemos olvidar, por tanto, que además de las neuronas visualizadas con las técnicas específicas de revelado inmunocitoquímico de la proteína Fos, otras poblaciones de neuronas no detectadas por esta técnica podrían de igual modo participar en los procesos sometidos a estudio. Y, dado que es la técnica principal del presente estudio, esta limitación deberá ser tenida en cuenta al interpretar nuestros resultados.

Por último, a la hora de comparar resultados no hay que olvidar otros factores que pueden influir en el resultado final como, por ejemplo, el diferente grosor de los cortes, el hecho de que los animales fueran previamente anestesiados (del que nos extenderemos más adelante), o incluso, el hecho de que el animal de experimentación fue de una especie diferente (Stamford, 1995).

2.- Expresión basal de *c-fos* en la porción lateral del PB



Hemos observado en nuestros animales del grupo control simulado (CS) una presencia, aunque escasa, de células Fos-positivas. Esta discreta expresión basal de Fos podría ser debida tanto a estímulos ambientales externos (estímulos auditivos, olfatorios, táctiles, etc.) como a internos (cambios hemodinámicos, respiratorios, etc., debidos al estrés que pudieran provocar las manipulaciones previas) que no estuvieran directamente bajo nuestro control.

El PB no es la primera estructura troncoencefálica que encontramos en nuestro laboratorio, que muestra expresión basal de *c-fos*. En 1996, Valverde-Navarro *y cols.*, trabajando con ratas de la cepa Wistar, observaron una discreta expresión basal de *c-fos* en la PAG de ratas no estimuladas intencionadamente, en consonancia con el estudio previo de Herdegen *y cols.* (1995), quienes encontraron en la PAG de sus ratas no estimuladas un número similar de células marcadas.

El resto de datos sobre la expresión basal de *c-fos* en el PB los encontramos al revisar la expresión de Fos en aquellos grupos controles con los que los diversos autores comparan los resultados de sus grupos estimulados nociceptivamente (Bellavance y Beitz, 1996; Clement *y*

cols., 1996; Hermanson y Blomqvist, 1996; Buritova *y cols.*, 1998; Richard *y cols.*, 2005; Li *y cols.*, 2006; Jergova *y cols.*, 2008).

El factor clave que determina la aparición de un mayor o menor número de células Fos-positivas en el PB de los grupos control en estos estudios es la mayor o menor presencia en ellos de anestésicos.

En el trabajo de Clement *y cols.* (1996) los animales del grupo control permanecieron bajo anestesia con halotano durante todo el período de supervivencia hasta el sacrificio, lo que provocó un incremento dramático del número de elementos inmunorreactivos frente a Fos, principalmente en los subnúcleos elPB y clPB de la mitad caudal del PB. La expresión de *c-fos* en el PB fue tan intensa que les impidió estudiar los efectos de la estimulación nociceptiva a este nivel al quedar éstos enmascarados. Los autores explican la intensa inmunorreactividad observada por los cambios cardiocirculatorios y respiratorios que la anestesia provoca y que llegarían al PB desde el núcleo del tracto solitario. Los propios autores concluyen la importancia de emplear animales no anestesiados en este tipo de estudios, siempre que los requerimientos éticos lo permitan.

Bellavance *y cols.* (1996) también describieron en su grupo control simulado una significativa presencia de elementos marcados que atribuyen a estímulos externos y no a la breve (siempre inferior a 20 s.) exposición de los animales al isoflurano durante el proceso de inyección del suero salino en la pata trasera.

En el resto de trabajos analizados (Hermanson y Blomqvist, 1996; Buritova *y cols.*, 1998; Li *y cols.*, 2006; Jergova *y cols.*, 2008) los autores coinciden en restar importancia al marcaje observado en el PB de sus grupos control. En los trabajos de Hermanson y Blomqvist (1996) y de Buritova *y cols.* (1998) se refiere una ausencia casi total de neuronas Fos-positivas, con presencia aislada de algún elemento

inmunorreactivo en los subnúcleos sIPB, dIPB y cIPB, que coincide con la falta de contacto de los animales de estos grupos control con ningún anestésico en el período previo al sacrificio. También se describe una muy discreta presencia de marcaje en el PB de los diferentes grupos control (normal, anestesiado con éter y salino) del trabajo de Li *y cols.* (2006) y de los grupos nativo y simulado del reciente estudio de Jergova *y cols.* (2008). En este último se describen similares resultados para el grupo nativo, que no tiene contacto con anestésicos, y para el grupo simulado que sí fue anestesiado con halotano durante la maniobras quirúrgicas, pero cuyo sacrificio se retrasó un mínimo de 3 días tras la anestesia.

La escasa expresión de *c-fos* observada en el PB de nuestros animales controles simulados, coincide con la de aquellos trabajos en los que los animales no han tenido contacto con la anestesia durante el período de supervivencia previo al sacrificio (Hermanson y Blomqvist, 1996; Buritova *y cols.*, 1998), y difiere tanto más cuanto mayor es el contacto previo con el anestésico (Bellavance y Beitz, 1996; Clement *y cols.*, 1996; Li *y cols.*, 2006; Jergova *y cols.*, 2008).

Evidentemente, las neuronas Fos-positivas observadas en el PB de nuestro grupo CS no pueden ser inducidas por ningún anestésico previo ya que los animales de este grupo no tuvieron contacto alguno con la anestesia hasta el momento del sacrificio en el que recibieron una sobredosis de pentobarbital. Teniendo en cuenta que desde el momento de la administración del pentobarbital hasta la introducción de la solución fijadora pasaban menos de 10 minutos y que se necesitan al menos 20 minutos para que la proteína Fos pueda ser detectada por las técnicas inmunocitoquímicas empleadas en el presente trabajo (Herdegen *y cols.*, 1991), es muy improbable que el marcaje apreciado se deba a la inducción iatrogénica de *c-fos* por efecto de la propia anestesia (Takayama *y cols.*, 1994).

Pensamos, asimismo, que, aunque factible, tampoco es probable que el marcaje sea atribuible a posibles factores ambientales incontrolados, como señalan Bellavance y Beitz (1996), puesto que los animales permanecen en todo momento en espacios de acceso restringido y condiciones ambientales controladas como ya se indicó en el apartado de Material y Métodos. Creemos, por tanto, que, aunque el número de células marcadas es muy discreto, su presencia podría deberse al hecho de que, como ya quedó descrito, los animales de este grupo fueron sometidos a las mismas manipulaciones que los animales de los grupos estimulados, básicamente las necesarias para la inmovilización del animal, pero sin recibir el estímulo algésico o analgésico. Estas manipulaciones, podrían provocar en el animal un estado de estrés capaz de inducir la expresión de *c-fos* (Ceccatelli *y cols.*, 1989; Sharp *y cols.*, 1991; Krukoff y Khalili, 1997). La inmunorreactividad en el PB de estos animales del grupo CS podría, por tanto, estar asociada al posible estado de estrés provocado en el animal. Este dato estaría apoyado por el hecho de que en una situación de estrés se desencadenan algunos cambios vegetativos típicos como el aumento de la presión arterial, taquicardia..., en cuya regulación participa el núcleo del tracto solitario, una de las más importantes fuentes de estímulos al PB (Herbert *y cols.*, 1990).

3.- Respecto al papel de la porción lateral del PB en el circuito nociceptivo.



uestros resultados han puesto de manifiesto que la aplicación de un estímulo doloroso es capaz de inducir la expresión de *c-fos* en el PB de rata. Sin embargo, también han demostrado que el patrón de distribución de Fos obtenido varía dependiendo de la naturaleza del estímulo nociceptivo.

En nuestro estudio, hallamos un incremento significativo de la expresión de *c-fos* en el subnúcleo KF de la mitad rostral del PB y en los subnúcleos dlPB y elPB de las porciones intermedia y caudal del PB, tras un estímulo nociceptivo visceral, en concreto tras una inyección intraperitoneal de ácido acético al 3,5% (test de las contracciones abdominales), respecto de los animales del grupo control simulado, apoyando la participación del PB en el circuito nociceptivo visceral.

Tras una exhaustiva revisión bibliográfica tan sólo hemos encontrado tres trabajos en los que se ha estudiado la expresión de *c-fos* en el PB de rata tras estímulo nociceptivo visceral (Clement *y cols.*, 1996; Rodella *y cols.*, 1998; Li *y cols.*, 2006).

De los tres estudios, el trabajo de Rodella *y cols.* (1998) empleó el mismo estímulo doloroso visceral utilizado por nosotros en el presente trabajo: la inyección intraperitoneal de ácido acético. Los datos ofrecidos por los autores del estudio acerca de la inmunorreactividad frente a Fos en el PB tras una inyección de ácido acético intraperitoneal, forman parte de un trabajo mucho más amplio en el que los autores analizan la distribución de las neuronas Fos-positivas en prácticamente todo el encéfalo (tronco de encéfalo, hipotálamo, tálamo, subtálamo y telencéfalo) tras dos formas de estimulación nociceptiva visceral (inyección intraperitoneal de ácido acético e inyección de formalina en la vejiga de la orina) y una de estimulación nociceptiva somática (inyección de formalina en la musculatura profunda del cuello). La basta extensión del estudio limita forzosamente el detalle de su exposición, a pesar de lo cual encontramos que de las dos únicas estructuras de las que ofrece microfotografías una es el PB (a nivel mesencefálico o rostral). Los datos numéricos del incremento de células marcadas inducido en el PB por los diferentes estímulos probados los hallamos en una tabla y tan sólo discriminan entre la porción medial y la lateral del PB, aunque en el texto de la publicación podemos ampliar esta información al concretar los autores que las células marcadas se sitúan en los subnúcleos slPB y

cIPB, siendo la única diferencia que refieren entre los dos estímulos dolorosos viscerales aplicados el que la inyección de ácido acético intraperitoneal provocaba un mayor número de elementos marcados que la inyección de formalina en la vejiga de la orina. Por último, es importante señalar que los animales estudiados por Rodella *y cols.* (1998) permanecieron durante todo el experimento anestesiados con metoxyfluorano. De hecho, su estudio incluyó un grupo control “anestesia” en el que no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control “normal” formado por animales no estimulados.

Un par de años antes del artículo de Rodella *y cols.* (1998), se publicó el primer trabajo que incluía un estudio detallado de la expresión de c-fos en el PB de rata tras diferentes estímulos dolorosos: muscular, articular, cardiopulmonar y peritoneal (Clement *y cols.*, 1996). Para conseguir la estimulación nociceptiva peritoneal los autores recurrieron también al test de las contracciones abdominales, esto es, a la inyección intraperitoneal de ácido acético. Al igual que en trabajo de Rodella *y cols.* (1998), Clement *y cols.* (1996) mantuvieron a los animales anestesiados durante las 2 horas que duró la experimentación, previas al sacrificio, con el objeto de minimizar el sufrimiento de los animales, e incluyeron igualmente un grupo control “anestesia”. El anestésico empleado en el estudio de Clement *y cols.* (1996) fue el halotano. Curiosamente, sin embargo, y a diferencia de lo descrito por Rodella *y cols.* (1998), el halotano provocó un incremento tan dramático de la inmunorreactividad frente a Fos en el PB, que imposibilitó a los autores cualquier análisis del patrón de distribución de las neuronas Fos-positivas inducidas por los diferentes estímulos algésicos aplicados, ya que los resultados quedaban enmascarados por la expresión de c-fos inducida por el halotano. La inducción de c-fos era especialmente intensa en la mitad caudal o pontina del PB, a nivel de los subnúcleos eIPB y cIPB. Los autores relacionan la expresión de c-fos inducida por el halotano con los cambios hemodinámicos y/o

respiratorios que el anestésico pudiera provocar y señalan la importancia de llevar a cabo este tipo de experimentos en animales no anestesiados, siempre que las consideraciones éticas lo permitan.

El mismo problema de la anestesia enmascarando posibles datos acerca de la expresión de *c-fos* tras estímulo nociceptivo visceral a nivel del PB también lo encontramos en otro trabajo previo (Lantéri-Minet *y cols.*, 1993). En este caso los propios autores reconocen que el hecho de llevar a cabo el estudio en ratas anestesiadas previamente con una mezcla de halotano, oxígeno y óxido nitroso (N₂O) fue probablemente la causa de que no pudieran demostrar el papel del PB en el procesamiento de la información dolorosa visceral inducida, tanto por la inyección intraperitoneal de ácido acético como por la distensión colorrectal.

No volvemos a encontrar un estudio de la expresión de *c-fos* en el PB tras estímulo doloroso visceral hasta prácticamente una década más tarde.

Un reciente trabajo de Li *y cols.* (2006) se convierte en el único que hemos encontrado en la bibliografía en el que se ha estudiado de forma específica y detallada la expresión de *c-fos* en el PB de rata tras estímulo nociceptivo visceral. Los autores concluyen que hay un incremento de células marcadas en los subnúcleos elPB, dlPB y KF en los animales del grupo estimulado frente a los de los grupos controles “normal”, “anestesia” y “salino” (Li *y cols.*, 2006). De nuevo, los animales estimulados son previamente anestesiados, aunque en esta ocasión tan sólo durante las manipulaciones necesarias para la estimulación dolorosa. El anestésico empleado es el éter y de forma similar a lo observado por Rodella *y cols.* (1998), éste no provoca un aumento de inmunorreactividad frente a Fos estadísticamente significativo en ninguno de los subnúcleos del PB, comparado con el resto de grupos control.

No hemos encontrado ningún estudio en el que se analizara la expresión de *c-fos* inducida por un estímulo doloroso visceral en animales no anestesiados. Aunque los grupos control “anestesia” con metoxyfluorano (Rodella *y cols.*, 1998) y con éter (Li *y cols.*, 2006) no provocaron un incremento significativo de Fos en el PB en comparación con el grupo control “normal” no anestesiado, están presentes también en la bibliografía los trabajos que apuntan en sentido contrario cuando el anestésico empleado es el halotano (Lantéri-Minet *y cols.*, 1993; Clement *y cols.*, 1996). Es posible que no todos los anestésicos influyan del mismo modo en la expresión de *c-fos* en el PB, pero es evidente que ante la disparidad de resultados encontrados en la bibliografía no podemos descartar que el hecho de exponer a los animales estimulados en mayor o menor medida a un anestésico influya en el resultado final observado (Takayama *y cols.*, 1994).

Por ello, en nuestro estudio, los animales de los grupos estimulados, incluidos obviamente los del grupo DV, no fueron expuestos a los efectos de ningún anestésico previo. En estas condiciones observamos neuronas Fos-positivas en la mayoría de subnúcleos de la porción lateral del PB, siendo mayor el incremento en los subnúcleos slPB, clPB y dlPB y menor en los subnúcleos el y KF. Nuestros resultados son congruentes con los trabajos previamente analizados, especialmente con el de Rodella *y cols.* (1998), quienes emplearon el mismo estímulo nociceptivo visceral, y en menor medida con el reciente trabajo de Li *y cols.* (2006), en el que difería el estímulo aplicado.

Estos datos son, además, congruentes con los hallazgos anatómicos y electrofisiológicos descritos previamente (Kalia y Sullivan, 1982; Menétrey y Basbaum, 1987; Herbert *y cols.*, 1990; Bernard *y cols.*, 1994; Grundy, 2002). La información sensorial, incluida la nociceptiva, procedente del territorio peritoneal es conducida al interior

del sistema nervioso central a través del nervio vago o a través de los nervios espláncnicos, hasta llegar al núcleo del tracto solitario (Grundy, 2002). La principal puerta de entrada de las aferencias viscerales del nervio vago al tronco de encéfalo es el núcleo del tracto solitario (Kalia y Sullivan, 1982). Del mismo modo, la información viscerosensible conducida por los nervios espláncnicos hasta la médula espinal también alcanza el núcleo del tracto solitario (Menétrey y Basbaum, 1987). En las neuronas del núcleo del tracto solitario, la información hace relevo y se dirige, entre otros lugares del sistema nervioso central, al PB (Herbert *y cols.*, 1990). Estos datos anatómicos fueron corroborados por experimentos electrofisiológicos en los que se registraba activación neuronal en el PB tras estímulos viscerales nociceptivos (Bernard *y cols.*, 1994).

El análisis conjunto y comparado de nuestros propios resultados con los recogidos en la bibliografía nos permite afirmar que el PB es una estructura claramente involucrada en el circuito nociceptivo visceral, no sólo por sus conexiones sino por la activación neuronal constatada en términos de incremento de la expresión de c-fos tras inyección intraperitoneal de ácido acético, siendo los subnúcleos slPB, clPB, dlPB y elPB los principalmente implicados.

Por lo que respecta al papel del PB en el circuito nociceptivo somático superficial, nuestros resultados mostraron incremento de la expresión de c-fos en los subnúcleos slPB, clPB y dlPB en la porción rostral del PB, tras la inyección subcutánea de formalina al 5% (test de la formalina) en la planta de la pata trasera derecha de los animales del grupo dolor somático (DS) con respecto al PB de los animales del grupo control simulado, lo que en principio apoyaría la participación del PB en la conducción de un estímulo nociceptivo somático superficial.

A diferencia de lo observado cuando el estímulo doloroso era visceral, la revisión de la bibliografía en busca de antecedentes de

trabajos publicados en los que se hubiese estudiado de forma específica el patrón de distribución de *c-fos* en el PB de rata tras estímulo somático superficial nos ofreció unos cuantos resultados (Bellavance *y cols.*, 1996; Hermanson y Blomqvist, 1996; Bester *y cols.*, 1997; Buritova *y cols.*, 1998; Richard *y cols.*, 2005; Jergova y cols., 2008).

Bellavance *y cols.* (1996) observaron que la aplicación de un estímulo nociceptivo somático superficial aplicado de forma unilateral en la pata trasera del animal provocaba un incremento bilateral de Fos principalmente en los subnúcleos clPB, dlPB, elPB y KF. Al compararlo con el nuestro, el estudio de Bellavance *y cols.* (1996) presenta algunas diferencias que dificultarían la comparación de resultados: el estímulo doloroso somático empleado fue la inyección en la superficie ventral o plantar de la pata trasera izquierda de adyuvante de Freund, el tiempo mínimo de supervivencia postestímulo fue de 6 horas y los autores sometieron a las ratas a una breve anestesia con isoflurano durante las maniobras de aplicación del estímulo algésico. En sus conclusiones, los autores defienden claramente la participación del PB en el circuito nociceptivo ascendente somático superficial.

El mismo año y en la misma revista, con tan sólo dos números de diferencia, Hermanson y Blomqvist (1996) publicaron un trabajo similar. En este caso el estímulo aplicado fue el mismo que el que nosotros hemos empleado en el presente estudio: la inyección en una única pata trasera de formalina del 5% (test de la formalina). Ello provocó un incremento bilateral, con predominio contralateral, estadísticamente significativo en los subnúcleos slPB y dlPB y no significativo en el clPB. En este caso los animales fueron expuestos a una breve anestesia con éter durante la inyección de la formalina y el patrón de expresión de *c-fos* obtenido a los 75-90 minutos de la estimulación. Los autores defienden que sus resultados descartan un papel importante del subnúcleo elPB en el circuito nociceptivo e implican al PB en el circuito nociceptivo que conducirían el estímulo

doloroso al hipotálamo donde se generarían las respuestas autonómicas y homeostáticas características de una situación de daño tisular.

Bester *y cols.* (1997) emplearon como estímulo nociceptivo somático superficial en su estudio la inmersión de la pata trasera izquierda del animal en agua a altas temperaturas (33, 40, 44, 48 y 52°C). Al igual que en los trabajos precedentes mantuvieron anestesiados, en este caso con halotano, a los animales durante la aplicación del estímulo algésico. Los resultados mostraron un incremento bilateral de Fos en el PB con predominio contralateral, principalmente en los subnúcleos elPB (porción externa), dlPB y slPB. Es interesante destacar que en su estudio incluyeron un análisis paralelo del núcleo del tracto solitario en el que no observaron inmunorreactividad frente a Fos en los ejemplares estimulados por lo que afirmaron que el marcaje observado en el PB era consecuencia exclusiva de la activación de la vía espino-parabraquial directa, y no de neuronas que desde la médula proyectan al núcleo del tracto solitario y de éste al PB.

Buritova *y cols.* (1998) son los primeros en llevar a cabo su estudio sobre ratas no anestesiadas durante la estimulación dolorosa. En su trabajo el estímulo somático superficial consistió en una inyección intraplantar en la pata derecha de carrageenan. Estos autores observaron, de nuevo, un incremento bilateral con predominio contralateral en el PB de sus animales estimulados. Los mayores incrementos en el marcaje los observaron en la porción externa del elPB y en el slPB, siendo algo menores en el dlPB y el clPB. En general, resaltan que sus resultados son congruentes con los anteriormente mencionados, con pequeñas diferencias que achacan al leve, según ellos, efecto de la anestesia empleada en los trabajos previos y la falta de homogeneidad en la delimitación de los subnúcleos observada entre los diferentes estudios.

Más recientemente, Richard *y cols.* (2005) confirmaron los resultados observados con anterioridad, volviendo a señalar a los subnúcleos slPB, dlPB, clPB y, sobretodo, a la porción externa del elPB como aquéllos que mayor incremento de células Fos-positivas mostraron tras una inyección intraplantar de formalina en la pata trasera derecha de ratas no anestesiadas.

La diferencia fundamental entre los distintos trabajos que han analizado el patrón de distribución de Fos en el PB de ratas tras un estímulo nociceptivo superficial, estriba en la imayor o menor relevancia que se le concede al subnúcleo elPB. Mientras que el grupo de investigadores sueco (Hermanson y Blomqvist, 1996; Richard *y cols.*, 2005) lo relega a un papel secundario respecto de otros subnúcleos como el slPB, el clPB y el dlPB, el laboratorio francés (Bester *y cols.*, 1997; Buritova *y cols.*, 1998) lo señala como el principal subnúcleo del PB en el circuito nociceptivo. Las razones que unos y otros aducen para justificar esta discrepancia incluyen una variada lista que afecta al uso o no de anestésico durante la aplicación del estímulo nociceptivo, la falta de uniformidad en la delimitación y nomenclatura de los subnúcleos del PB, la distinta naturaleza del estímulo doloroso aplicado, que a su vez abriría la puerta a la posibilidad de que, por ejemplo, la formalina fuera un estímulo insuficiente para inducir Fos en el elPB o que indujera la expresión de otros genes de expresión inmediata distintos del *c-fos*.

Todos estos datos sobre el patrón de distribución de Fos en el PB de la rata son congruentes con los hallazgos anatómicos y electrofisiológicos descritos previamente.

Las neuronas de la lámina I y parte externa de la lámina II (IIo) de la médula espinal constituyen el primer y principal relevo de la información nociceptiva somática que llega desde los receptores periféricos por los axones de las protoneuronas o neuronas sensitivas

primarias (Besson y Chaouch, 1987). Uno de los principales destinos de las proyecciones ascendentes originadas en las neuronas de las láminas I y II de la médula espinal que responden a la información nociceptiva es el PB (Cechetto *y cols.*, 1985; Hylden *y cols.*, 1989; Slugg y Light, 1994; Bernard *y cols.*, 1995; Fiel y Herbert, 1995). Mayoritariamente, estas proyecciones ascendentes desde las láminas I y II al PB se decusan y ascienden contralateralmente, aunque una significativa proporción de las mismas son bilaterales (Spike *y cols.*, 2003), lo que explicaría que el marcaje de Fos observado en el PB tras estímulo doloroso sea, habitualmente, bilateral con predominio contralateral. Esta es, de hecho, la explicación que Jergova *y cols.* (2008) dan al hecho de que en su estudio sobre la expresión de *c-fos* en el PB tras lesión nerviosa periférica unilateral, el estudio sobre el patrón de distribución de Fos en el PB más reciente que hemos encontrado en la literatura, mostrase un incremento de la inmunoreactividad frente a Fos claramente bilateral, sin predominio contralateral estadísticamente significativo. La terminación de los axones de estas neuronas de proyección espino-parabraquial se centra en los subnúcleos sIPB, dIPB y porción externa del eIPB, lo que en general coincide con aquellos subnúcleos que expresan *c-fos* tras estimulación dolorosa somática, siendo las pequeñas discrepancias descritas en la bibliografía comentada justificadas por el largo árbol dendrítico que poseen las neuronas del PB que reciben las proyecciones desde la médula espinal y que en ocasiones se extiende más allá de los límites del subnúcleo en el que se localiza el soma neuronal (Bourgeois *y cols.*, 2003). Finalmente, la existencia de proyecciones desde el PB al hipotálamo, a la región ventrolateral del bulbo raquídeo, al núcleo del tracto solitario o al núcleo central de la amígdala sugiere un papel en las respuestas endocrinas, autonómicas y afectivo-emocionales al dolor (Fulwiler y Saper, 1984; Bernard y Besson, 1990; Bernard *y cols.*, 1993; Bester *y cols.*, 1995).

Las evidencias anatómicas fueron corroboradas por experimentos electrofisiológicos en los que se registraba activación neuronal en el PB tras estímulos nociceptivos (Bernard y Besson, 1990; Menendez *y cols.*, 1996; Bester *y cols.*, 2000).

Nuestros datos sobre el patrón de distribución de Fos en el PB de rata tras estimulación nociceptiva somática superficial, coincide fundamentalmente con los resultados ofrecidos por Richard *y cols.* (2005). Este dato es congruente con el hecho de que es con el trabajo de estos autores con el que coincide tanto el estímulo aplicado, el test de la formalina, como con el método de aplicarlo, la inmovilización con las manos del animal no anestesiado.

Del análisis de los datos recogidos en la bibliografía, así como de nuestros propios resultados, se concluye, por tanto, que la porción lateral del PB intervendría en el circuito nociceptivo somático superficial, al igual que vimos que también lo haría si la estimulación dolorosa fuera de origen visceral.

4.- Respecto al papel de la porción lateral del PB en el circuito antinociceptivo.



a administración de sustancias analgésicas nos ofreció, al analizar en nuestro estudio el patrón de distribución de Fos inducido en el PB, unos resultados dispares dependiendo del analgésico administrado. La morfina no incrementó la expresión de Fos en el PB de los ejemplares de nuestro grupo control morfina (CM) respecto de los del grupo control simulado (CS), ni modificó de forma estadísticamente significativa, al ser administrada previamente, el patrón de distribución de la inmunorreactividad frente a Fos observado en los grupos estimulados nociceptivamente, grupos morfina+dolor

somático (MS) y morfina+dolor visceral (MV). La administración de metamizol, por el contrario, aumentó, de forma dramática la inmunorreactividad frente a Fos de forma bilateral, especialmente en la mitad caudal o pontina del PB, en la porción externa del eIPB. Este incremento del número de elementos marcados fue observado en todo los grupos que recibieron metamizol, independientemente de si fueron estimulados o no de forma dolorosa posteriormente, grupos control metamizol (CN), metamizol+dolor somático (NS) y metamizol+dolor visceral (NV).

Tan sólo hemos encontrado un trabajo previo en la literatura que estudió el efecto que, sobre el patrón de distribución de Fos en el PB inducido por un estímulo algésico, tendría la administración previa al estímulo nociceptivo de una sustancia analgésica (Hiroshima *y cols.*, 2001). Concretamente, en este estudio se analizó el efecto que la administración subcutánea de diferentes dosis de morfina (3 mg/kg y 10 mg/kg) 30 minutos antes del estímulo doloroso tendría sobre la expresión de c-fos en el PB de la rata inducida por el desplazamiento dental experimental. Sus resultados claramente muestran como la morfina provoca un descenso en el número de neuronas marcadas en el PB frente al grupo no tratado, siendo este efecto antagonizado por la naloxona. Estos datos serían, en principio, contradictorios con nuestros resultados. Sin embargo, existen varios detalles a tener en cuenta en el trabajo de Hiroshima *y cols.* (2001) que dificulta la comparación de sus resultados con los nuestros. Por un lado existen diferencias metodológicas que por sí sólo ya podrían justificar diferencias en los resultados: nuestro estudio se ha llevado a cabo sobre cortes coronales de 40 μm de grosor, mientras que el de Hiroshima *y cols.* (2001) se ha practicado sobre cortes de 50 μm , un 20% más gruesos; ellos utilizaron un anticuerpo primario anti-Fos de Santa Cruz y nosotros de Sigma-Genosys; del mismo modo, nuestro trabajo se realizó sobre animales no anestesiados y el del grupo de científicos japoneses sobre animales anestesiados con halotano. En este punto, nos gustaría señalar que a

pesar de que los autores refieren haber incorporado un “grupo control de animales anestesiados” con el que descartan que el halotano incremente la inmunorreactividad de forma estadísticamente significativa respecto del “grupo control de animales normales”, no anestesiados, los valores que ofrecen en el apartado de resultados son extremadamente elevados, del orden de 40-50 veces los valores hallados por el resto de grupos que han estudiado la expresión de c-fos en el PB tras estimulación dolorosa. Unos valores tan elevados en todos los grupos de animales no están justificados ni por el mayor grosor de los cortes estudiados ni por el distinto anticuerpo primario empleado. De hecho, el único comentario de los autores al efecto de la morfina sobre la expresión de c-fos en el PB fue para indicar que “apoya la participación de varias vías nociceptivas en la inducción de neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el PB tras un movimiento dental experimental”. En cualquier caso, la “excepcionalidad” de sus resultados y la falta de argumentos metodológicos o de cualquier otro tipo ofrecidos que los justifique, nos obliga a plantear reservas a los valores aportados.

Sin embargo, y a pesar de la falta de estudios específicos, existen otros datos que nos sugieren que, efectivamente, el PB participaría en el circuito inhibitorio descendente, apoyados, en un principio, en la suma de datos indirectos tanto de conexiones anatómicas como de respuestas fisiológicas de las neuronas del PB.

El PB está estratégicamente situado desde el punto de vista anatómico para influir en el circuito antinociceptivo descendente. A modo de ejemplo, recordaremos que el PB envía y recibe proyecciones de la sustancia gris periacueductal (PAG) (Beitz, 1982; Krout *y cols.*, 1998), considerada la principal estructura del circuito endógeno de modulación de la transmisión nociceptiva (Behbehani, 1995). La relación entre la PAG y el PB queda confirmada con el dato de que la

estimulación tanto eléctrica como química de la PAG provoca incremento de Fos en el PB (Hayward y Castellanos, 2003).

Pero, la PAG no ha sido la única estructura del circuito analgésico endógeno que se ha relacionado con el PB. Holstege (1988) describió la existencia de proyecciones desde el PB hasta el núcleo del rafe magno, otro de los centros principales del circuito antinociceptivo descrito por Basbaum y Fields (1984), que a su vez proyecta sobre la médula para inhibir las neuronas nociceptivas. Esta conexión con el núcleo del rafe magno volvería a relacionar al PB con el sistema endógeno de analgesia. Dicha hipótesis se vería reforzada por los datos ofrecidos por Katayama *y cols.* (1986) quienes concluyen que la estimulación del PB activaría el sistema descendente de supresión del dolor excitando las neuronas del núcleo del rafe magno.

En el mismo sentido, Petrov *y cols.* (1992a y 1992b) demostraron la existencia de conexiones recíprocas entre el PB y el núcleo dorsal del rafe, el cual también ha sido, posteriormente, implicado en el circuito de control de la información nociceptiva (Wang y Nakai, 1994).

A las evidencias anatómicas se sumaron los estudios electrofisiológicos en los que, en primer lugar, se pudo comprobar tanto en gatos (DeSalle *y cols.*, 1985) como en humanos (Katayama *y cols.*, 1985) que la estimulación eléctrica de la región parabraquial provocaba supresión del dolor. Posteriormente, también se observó en primates que la estimulación eléctrica de la región parabraquial-subcoerulea inhibía las neuronas nociceptoras espinotalámicas a nivel torácico (Brennan *y cols.*, 1987). Finalmente, tras la estimulación mediante microelectrodos del PB de la rata se vio que se producía la supresión, a nivel del núcleo caudal del trigémino, de la transmisión de estímulos nociceptivos originados en la córnea (Chiang *y cols.*, 1995; Meng *y cols.*, 2000).

Además de los trabajos anatómicos y electrofisiológicos, los estudios funcionales también han aportado datos apoyando el papel del PB en la modulación de la información nociceptiva. De hecho, uno de los primeros datos indirectos de la participación del PB en la producción de analgesia se obtuvo al comprobar que, la microinyección de carbacol, un agonista de la acetilcolina, en el PB del gato provocaba una profunda supresión de las respuestas dolorosas, que no se modificaba con la administración previa o posterior de naloxona y que no era reproducible mediante la microinyección de morfina en los mismos lugares que el carbacol, lo que indicaba que se trataba de una analgesia no opioide (Katayama *y cols.*, 1984).

Este último dato acerca de la falta de respuesta analgésica tras la microinyección de morfina en el PB del gato (Katayama *y cols.*, 1984), sería congruente con los resultados observados en nuestro estudio en el PB de la rata tras la administración intraperitoneal de morfina, con o sin estímulo nociceptivo posterior.

A pesar de que algunos trabajos previos señalaban la posible participación del PB en el circuito analgésico mediado por opiáceos a partir de datos tanto directos (ya hemos comentado el trabajo de Hiroshima *y cols.*, 2001), como indirectos, tales como la presencia en el PB de neuronas encefalinérgicas (Hermanson *y cols.*, 1992), para las que el Fos parece no ser un factor de transcripción crucial (Johnston *y cols.*, 1994), y aunque no podemos descartar que la morfina active las neuronas encefalinérgicas del PB expresando otros genes de expresión inmediata distintos de *c-fos*, la ausencia de cambios estadísticamente significativos en el patrón de distribución de Fos en el PB de nuestros grupos tratados con morfina apoyaría la teoría propuesta por Katayama *y cols.* (1984) en relación a la participación del PB dentro de un circuito antinociceptivo no mediado por opiáceos.

Esta teoría sería además compatible con el resultado que obtuvimos en los animales de los grupos CN, NS y NV, a los que se administró una dosis intraperitoneal de 500 mg/kg de metamizol. En todos ellos pudimos observar una masiva expresión de Fos en el PB.

Son varias las explicaciones a este fenómeno. Por un lado, el metamizol, que se administró en todos los animales por vía intraperitoneal, podría estimular territorios inervados por fibras del vago que, vía núcleo del tracto solitario, alcanzaría el PB, provocando el incremento de inmunorreactividad frente a Fos observado. Para descartar esta posibilidad serían necesarios posteriores estudios en los que se utilizase una vía de administración diferente a la intraperitoneal y que evite la posible irritación a nivel peritoneal, como por ejemplo la intravenosa o la subcutánea. No nos parece, sin embargo, que esta sea la explicación real porque si la elevada inmunorreactividad provocada por el metamizol se basara en una hipotética irritación del territorio peritoneal, con mayor motivo deberíamos haber obtenido similares resultados al analizar el PB del grupo estimulado con dolor visceral (DV). La aplicación del test de las contracciones abdominales, consistente en una inyección intraperitoneal de ácido acético al 3,5%, empleado en nuestro trabajo como modelo de dolor visceral, efectivamente, provocó un incremento de la inmunorreactividad frente a Fos en el PB de las ratas del grupo DV en comparación con las del grupo control, pero éste fue claramente inferior al provocado por el metamizol.

Otra posible explicación incidiría en los posibles efectos hemodinámicos y respiratorios que pudiera provocar el metamizol sobre el animal de experimentación. Efectivamente, revisando la literatura hemos encontrado un patrón de distribución parecido en el trabajo de Clement *y cols.* (1996). Curiosamente, estos autores obtienen este marcaje similar en su grupo control con halotano, y lo justifican precisamente por los cambios hemodinámicas y/o respiratorios que

provoca la anestesia halogenada. No entran en descripciones detalladas de dicho patrón de marcaje y proponen como fundamental que los futuros estudios de Fos en el PB se lleven a cabo en animales no anestesiados. Revisando el trabajo, sin embargo, encontramos que, aunque ciertamente en el texto del mismo no se hace referencia a cómo es el patrón de distribución de Fos inducido por el halotano, en las Fig. 10 y 11 del artículo sí se pueden apreciar material iconográfico en el que aparece representado dicho patrón. De este modo pudimos comprobar que la inmunorreactividad frente a Fos inducida por halotano se concentraba en los subnúcleos clPB y elPB, de forma muy similar a la observada en nuestros “grupos metamizol”. A la vista de estos resultados, sería muy interesante seguir profundizando en este campo, sobre animales no anestesiados, en diferentes situaciones hemodinámicas, para de este modo poder discriminar si el marcaje inducido por el metamizol observado en nuestro estudio es debido al efecto analgésico del metamizol o a posibles cambios hemodinámicos provocados. Aunque, finalizaremos estas reflexiones indicando que, incluso en el supuesto de que el metamizol indujese cambios hemodinámicos, esta descrito que éstos podrían ser causa de analgesia (Tavares *y cols.*, 1995; Wiertelak *y cols.*, 1997).

5.- Respecto al Papel de la Porción Lateral del PB en el Mecanismo de Acción del Metamizol.



na revisión exhaustiva de la bibliografía nos confirmó la existencia de un número cada vez mayor de trabajos que evidenciaban que el metamizol no sólo ejercía un efecto a nivel periférico, común a los Anti-Inflamatorios No Esteroideos (AINEs), sino también a nivel central.

Los primeros datos sobre los efectos a *nivel central* del metamizol se publicaron a partir de la segunda mitad de la década de los 80. La administración tanto intraperitoneal como intravenosa de metamizol en ratas con la médula espinal y el sistema nervioso central supraespinal intactos provocó una depresión de la actividad en la mayoría de los axones medulares estudiados debido a la activación de la inhibición por parte de la PAG (Carlsson *y cols.*, 1986). La microinyección de metamizol directamente a nivel de la PAG potenció los efectos analgésicos de la morfina inyectada intratecalmente a nivel medular (Carlsson y Jurna, 1987). Así mismo, la administración intravenosa de metamizol produjo, en la actividad neuronal inducida por estimulación eléctrica de las aferencias nociceptivas, una depresión a nivel de las neuronas de la parte dorsomedial del núcleo ventral del tálamo, encargado de conducir los impulsos dolorosos hacia la corteza (Carlsson *y cols.*, 1988).

Ya en la década de los 90, nuevos estudios sobre el posible efecto central antinociceptivo del metamizol han sido realizados. Algunos han señalado a la médula espinal como la principal diana del metamizol (Neugebauer *y cols.*, 1994; Selve *y cols.*, 1996). Mientras que otros han apuntado a niveles supraespinales (Tortorici y Vanegas, 1994; Jones, 1996; Akman *y cols.*, 1996; Tortorici *y cols.*, 1996; Vanegas *y cols.*, 1997; Beirith *y cols.*, 1998).

Neugebauer *y cols.* (1994) demostraron que la administración intravenosa de metamizol reducía de forma intensa la actividad de las neuronas del asta posterior de la médula, mientras que la de las fibras amielínicas (de tipo C) apenas se veía afectada, lo que señalaba a la médula espinal como el principal sitio de acción del metamizol.

Selve *y cols.* (1996) no consiguieron efectos analgésicos tras la inyección intratecal de metamizol, mientras que sí los observaron tras su administración sistémica vía intraperitoneal. De ahí dedujeron que el

metamizol actuaría a nivel central, directa o indirectamente, a nivel de médula espinal, pero sólo si es administrado sistémicamente o en combinación con otras drogas de activación supraespinal. En su estudio también se demostró que en dicho efecto analgésico participaría, al menos en parte, la galanina.

Akman *y cols.* (1996) señalaron el efecto analgésico del metamizol administrado tanto por vía intraventricular, intratecal o subcutánea, antes de la aplicación del test de contracción abdominal, consistente en una inyección intraperitoneal de ácido acético, pero no previo al test de sacudida de la cola (*tail-flick test*) ni al test de la plancha caliente (*hot-plate test*). Según estos autores, la aparición más rápida de los efectos antinociceptivos cuando la administración del fármaco era intraventricular o intratecal frente a la aparición más lenta cuando la vía era subcutánea, sugeriría que este efecto analgésico sería de origen central, apuntando, además, que estarían involucrados mecanismos opioides con liberación de endorfinas y/o enkefalinas endógenas.

Los resultados obtenidos a finales de los 80 que apuntaban que el metamizol ponía en marcha el circuito supraespinal de analgesia endógena descrito por Basbaum y Fields (1984), fueron ratificados por los trabajos de Tortorici y Vanegas (1994), Tortorici *y cols.* (1996) y Jones (1996). En ellos se observaban efectos analgésicos tras microinyectar metamizol directamente tanto en la PAG (Tortorici y Vanegas, 1994; Tortorici *y cols.*, 1996) como en el núcleo del rafe magno (Jones, 1996), señalando, además, que este efecto era parcialmente revertido por la naloxona.

De nuevo, los efectos antinociceptivos por acción a nivel central de la microinyección de metamizol en la PAG fueron puestos de manifiesto, en este caso concreto, por la constatación a nivel medular de una disminución de la respuesta a estímulos dolorosos naturales de las neuronas de amplio margen dinámico o WDR (*Wide Dynamic Range*),

unas de las más importantes en la transmisión ascendente de la información nociceptiva (Vanegas *y cols.*, 1997), añadiendo en un estudio mucho más reciente el dato de que este efecto era revertido por la microinyección de naloxona en la RVM (Vasquez y Vanegas, 2000).

En un detallado estudio sobre el mecanismo de acción del metamizol (Beirith *y cols.*, 1998), se ha constatado que el metamizol provoca una analgesia a nivel tanto espinal como supraespinal, frente al dolor neuropático inducido tanto por la formalina como por la capsaicina y frente a la hiperalgesia inducida por el glutamato, al parecer, relacionada con su capacidad de modular la acción y/o liberación de aminoácidos excitadores a nivel de médula espinal, así como de interaccionar de forma directa sobre la unión del glutamato a sus receptores. En este mismo trabajo se considera poco probable que en los mecanismos subyacentes a la acción antinociceptiva del metamizol participen péptidos opiáceos, receptores GABA_B, el sistema serotoninérgico, los canales de potasio sensibles al ATP, la vía del óxido nítrico y su precursor la L-arginina, el complejo proteico G_i/G_o sensible a la toxina tóserínica administrada intraventricularmente ni una modulación de las hormonas adrenales.

Finalmente, en un reciente estudio en el que se investigó el efecto de la combinación de morfina y metamizol a dosis subanalgésicas, se constató que dicha combinación sí conseguía potenciar los efectos analgésicos de la morfina cuando se empleaba un modelo de dolor visceral (la inyección de ácido acético intraperitoneal o *test de las contracciones abdominales*), pero no cuando se probaba en un modelo de dolor somático (dolor térmico en la planta de las patas). Asimismo, el efecto analgésico observado en el modelo de dolor visceral no se veía alterado por la administración previa de naloxona (Taylor *y cols.*, 1998).

Como se puede apreciar, en ninguno de estos trabajos se menciona o señala al PB como estructura que pudiera ser responsable de la actividad analgésica de origen central constatada en todos ellos.

Nuestro estudio, es el primero, según la revisión bibliográfica, en estudiar la repercusión que la administración del metamizol provoca en el PB.

La administración de metamizol en nuestro experimento provocó claramente la expresión de Fos en el PB.

Si la expresión de Fos detectada por técnicas inmunocitoquímicas se acepta que es reflejo de actividad neuronal, el dato de la inducción de *c-fos* en el PB por el metamizol, junto con las evidencias del efecto analgésico que tiene la estimulación eléctrica o química del PB, apoyaría la hipótesis de que el PB mediaría, al menos en parte, en el efecto analgésico del metamizol.

Posteriores estudios del comportamiento analgésico que combinen la administración de metamizol con estrategias que bien bloqueen o bien faciliten la actividad en el PB, serían interesantes para continuar ofreciendo datos acerca de posible papel del PB en el mecanismo de acción del metamizol.

6.- Respecto al Papel de la Porción Lateral del PB en el Mecanismo de Acción de la Morfina.

A diferencia de lo sucedido con el metamizol la revisión bibliográfica si nos ha ofrecido un trabajo previo en el que se estudió la expresión de Fos en el PB tras la administración de morfina (Hiroshima

y cols., 2001), en animales a los que posteriormente se aplicó un estímulo nociceptivo.

Como ya hemos comentado anteriormente, Hiroshima *y cols.* (2001) observaron como la morfina disminuía la expresión de *c-fos* en el PB inducida por el desplazamiento dental nociceptivo. Este dato, junto al de la presencia en el PB de al menos una de las familias de opiáceos endógenos, la enkefalina (Hermanson *y cols.*, 1992), apoyaría la participación de la morfina en la respuesta analgésica mediada por el PB.

En nuestro estudio, la administración de morfina no provocó cambios significativos en la expresión de Fos con respecto al grupo simulado. Según nuestros resultados, la morfina no sería capaz ni de inducir la expresión de *c-fos* en el PB, ni de modificar, de forma estadísticamente significativa, el patrón de distribución inducido tras aplicar un estímulo nociceptivo tanto somático superficial como visceral. Estos resultados no apoyarían la participación del PB en el mecanismo de acción de la morfina, contrariamente a lo sugerido por Hermanson *y cols.*, (1992) o por Hiroshima *y cols.* (2001)

Sin embargo, ya hemos comentado los inconvenientes metodológicos que hemos detectado en el trabajo de Hiroshima *y cols.* (2001) y que nos obliga a mantener ciertas reservas frente a sus resultados. También hemos justificado la falta de inducción de *c-fos* en el PB por la morfina, a pesar de la presencia de opiáceos endógenos, por la posibilidad de actuar a través de otros genes de expresión inmediata (Hermanson y Blomqvist, 1996). Y, por último, hemos señalado cómo la microinyección de morfina en el PB no suprimía las respuestas nociceptivas (Katayama *y cols.*, 1984).

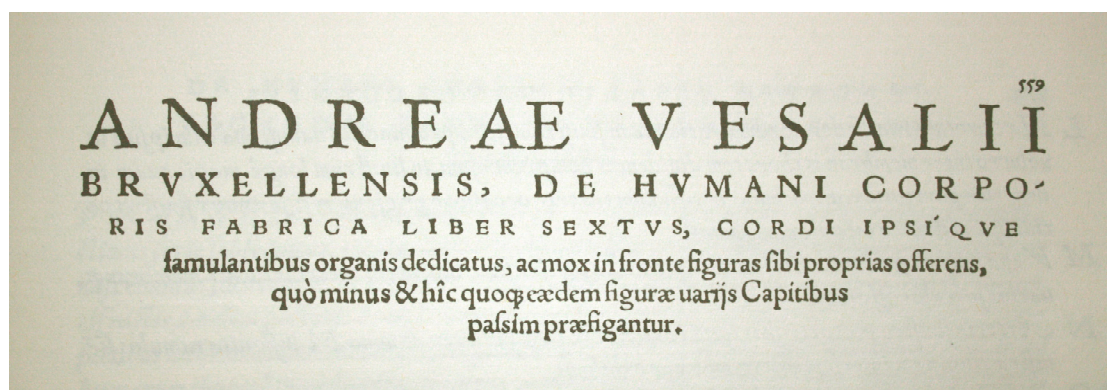
Por ello, a pesar de que no podemos descartar que el PB esté involucrado en el efecto analgésico de la morfina por medio de otros

mecanismos de acción en los que no participe el proto-oncogén *c-fos*, nuestros resultados no apoyarían al papel de la porción lateral del PB en el mecanismo de acción de la morfina.

Tabla 1. del libro II.



06 CONCLUSIONES



- 1.-** La porción lateral del núcleo parabraquial participa en el circuito nociceptivo somático superficial, principalmente por medio de los subnúcleos superior (slPB) y dorsal (dlPB).
- 2.-** La porción lateral del núcleo parabraquial participa en el circuito nociceptivo visceral, principalmente por medio del subnúcleo externo (elPB).
- 3.-** La porción lateral del núcleo parabraquial participa en el mecanismo de acción del metamizol, principalmente por medio de los subnúcleos externo (elPB) y central (clPB).
- 4.-** La porción lateral del núcleo parabraquial no participa en el mecanismo de acción de la morfina, al menos mediante la expresión del proto-oncogen *c-fos*.

63

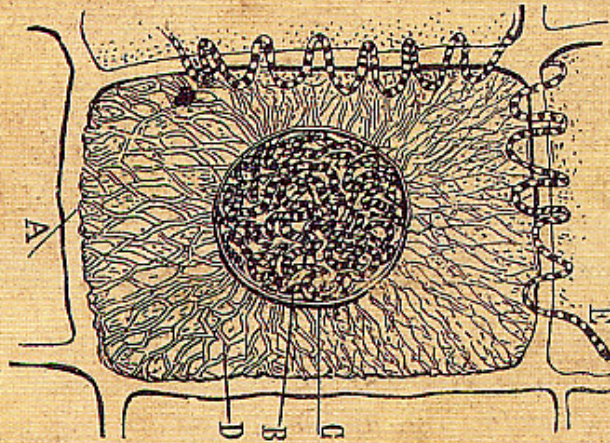
MANUAL
DE
HISTOLOGÍA NORMAL
Y DE
TÉCNICA MICROGRÁFICA

FOR EL

Dr. D. Santiago Ramón y Cajal

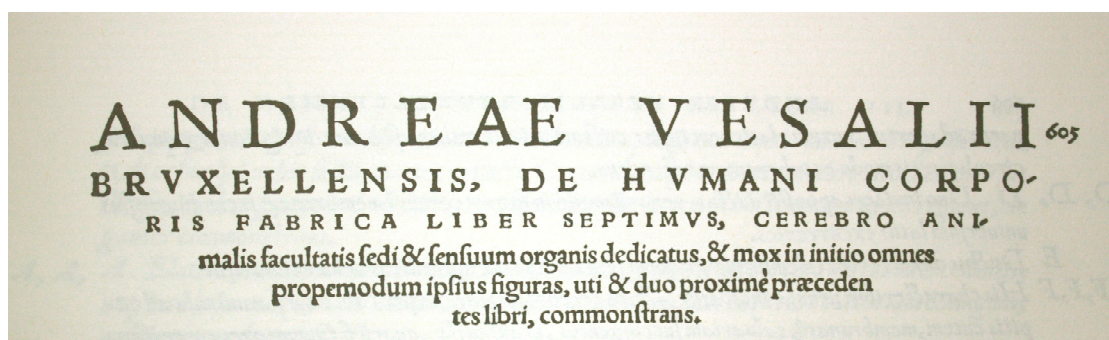
CATEDRÁTICO DE ANATOMÍA, POR OPOSICIÓN, EN LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA; EXAYUDANTE
DE ANATOMÍA DE LA FACULTAD DE MÉDICINA DE ZARAGOZA,
DIRECTOR QUE FUÉ, POR OPOSICIÓN, DEL MUSEO ANATÓMICO DE ESTA FACULTAD,
EXOFICIAL MÉDICO DEL CUERPO DE SANIDAD MILITAR, POR OPOSICIÓN, ETC

OBRA ILUSTRADA CON PROFUSION DE GRABADOS
COPIA DE LAS PREPARACIONES ORIGINALES DEL AUTOR



VALENCIA

07 BIBLIOGRAFÍA



- ABBATE, R.; GORI, A.M.; PINTO, S.; ATTANASIO, M.; PANICCIA, R.; COPPO, M.; CASTELLANI, S.; GIUSTI, B.; BODDI, M.; NERI SERNERI, G.G. (1990) *Cyclooxygenase and lipoxigenase metabolite synthesis by polymorphonuclear neutrophils: in vitro effect of dipyrene*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. **41**:89-93.
- ACUÑA-GOYCOLEA, C.; FUENTEALBA, P.; TORREALBA, F. (2000) *Anatomical substrate for separate processing of ascending and descending visceral information in the nucleus of the solitary tract of the rat*. Brain Res **883**: 229-232.
- ADAMS, R.D.; VICTOR, M. (1992) *Principios de neurología*. 20 ed. Reverté. Barcelona. pp 101-115.
- AICHER, S.A.; RANDICH, A. (1990) *Antinociception and cardiovascular responses produced by electrical stimulation in the nucleus tractus solitarius, nucleus reticularis ventralis, and the caudal medulla*. Pain **42**: 103-119.
- AKMAN, H.; AKSU, F.; GÜLTEKIN, I.; ÖZBEK, H.; ORAL, U.; DORAN, F.; BAYSAL, F. (1996) *A possible central antinociceptive effect of dipyrene in mice*. Pharmacology **53**: 71-78.
- ALIAGA L.; BAÑOS J.L.; BARUTELL C.; MOLET J.; RODRÍGUEZ DE LA SERNA A. (1996) *Dolor y utilizacion clinica de los analgésicos*. Editorial MRC, Barcelona.
- ALLEN, W.F. (1923) *Origin and distribution of the tractus solitarius in the guinea pig*. J Comp Neurol **35**: 171-204.
- AMMONS, W.E.; BLAIR, R.W.; FOREMAN, R.D. (1983) *Vagal afferent inhibition of primate thoracic spinothalamic neurons*. J Neurophysiol **50**: 926-939.
- ANTON, F.; HERDEGEN, T.; PEPPEL, P.; LEAH, J.D. (1991) *C-fos-like immunoreactivity in rat brainstem neurons following noxious chemical stimulation of the nasal mucosa*. Neuroscience **41**: 629-641.

- ASTON-JONES, G.; SHIPLEY, M.T.; GRZANNA, R. (1995) *The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups*. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. pp 183-213.
- ASTRÖM, K.E. (1953) *On the central course of afferent fibers in the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagal nerves and their nuclei in the mouse*. *Acta Physiol Scand* **29** (Suppl. 106): 209-320.
- BANDLER, R; CARRIVE, P (1988) *Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat*. *Brain Res* **439**: 95-106.
- BANDLER, R; DEPAULIS, A (1991) *Midbrain periaqueductal gray control of defensive behavior in the cat and rat*. En: *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 175-198.
- BANDLER, R; CARRIVE, P; DEPAULIS, A (1991) *Introduction: emerging principles of organization of the midbrain periaqueductal gray matter*. En: *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 1-8.
- BANDLER, R.; SHIPLEY, M.T. (1994) *Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: medules dor emotional expression?* *Trends Neurosci* **17**: 379-389.
- BANDLER, R.; KEAY, K.A. (1996) *Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression*. *Prog Brain Res* **107**: 285-300.
- BAÑOS J.E.; BOSCH F. (1994) *El dolor como problema asistencial*. En: Carlos R.; Baños J.E. (eds). *Monografias Dr. Antonio Esteve*. Vol. 16. Barcelona. Doyma. 11-19.
- BARNARD, J.W. (1936) *A phylogenetic study of the visceral afferent areas associated with the facial, glosopharyngeal and vagus nerves and their fiber connections. The efferent facial nucleus*. *J Comp Neurol* **65**: 503-602.
- BASBAUM, AI; FIELDS, HL (1978) *Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis*. *Ann Neurol* **4**: 451-462. Citado en: Basbaum, A.I. y Fields, H.L. (1984) *Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry*. *Annu Rev Neurosci* **7**: 309-338.
- BASBAUM, AI; FIELDS, HL (1979) *The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the cord of the cat and rat: Further studies on the anatomy of pain modulation*. *J Comp Neurol* **187**: 513-532.
- BASBAUM, AI; FIELDS, HL (1984) *Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry*. *Annu Rev Neurosci* **7**: 309-338.
- BEHBEHANI, M.M. (1995) *Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray*. *Prog Neurobiol* **46**: 575-605.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J.B. (1998) *Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action*. *Eur J Pharmacol* **345**: 233-245.
- BEITZ, AJ (1982) *The organization of afferent projections to the periaqueductal gray of the rat*. *Neuroscience* **7**: 133-159.

- BEITZ, AJ (1985) *The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions.* J Comp Neurol **237**: 445-459.
- BEITZ, AJ; SHEPARD RD (1985) *The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A Golgi analysis.* J Comp Neurol **237**: 460-475.
- BEITZ, AJ (1995) *Periaqueductal gray.* En: The rat nervous system. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. pp 173-182.
- BELLAVANCE, L.L.; BEITZ, A.J. (1996) *Altered c-fos expression in the parabrachial nucleus in a rodent model of CFA-induced peripheral inflammation.* J Comp Neurol **366**: 431-447.
- BENEDETTI C.; CHAPMAN C.R. (1990) *Acute pain: A review of its effects and therapy with systemic opioids.* En: Benedetti C, Chapman CR and Giron (Eds) *Advances in pain research and therapy.* Nueva York. Raven Press, **14**: 367-424.
- BERKLEY, K.J.; SCOFIELD, S.L. (1990) *Relays from the spinal cord and solitary nucleus through the parabrachial nucleus to the forebrain in the cat.* Brain Res **529**: 333-338.
- BERNARD, J.F.; ALDEN, M.; BESSON, J.M. (1993) *The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat.* J Comp Neurol. **329**:201-29.
- BERNARD, J.F.; HUANG, G.F.; BESSON, J.M. (1994) *The parabrachial area: electrophysiological evidence for an involvement in visceral nociceptive processes.* J Neurophysiol. **71**:1646-1660.
- BERNARD, J.F.; BESSON, J.M. (1990) *The spino(trigemino)pontoamygdaloid pathway: Electrophysiological evidence for an involvement in pain processes.* J. Neurophysiol. **63**: 473-490
- BESSON, J.A.; CHAOUCH, A. (1987) *Peripheral and spinal mechanisms of nociception.* Physiol Rev **67**: 67-186.
- BESTER, H.; BEGGS, S.; WOOLF, C.J. (2000) *Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush.* J Comp Neurol. **428**:45-61.
- BESTER H, CHAPMAN V, BESSON JM, BERNARD JF. (2000) *Physiological properties of the lamina I spinoparabrachial neurons in the rat.* J Neurophysiol. **83**:2239-59.
- BESTER, H.; MATSUMOTO, N.; BESSON, J.M.; BERNARD, J.F. (1997) *Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-fos study in the rat.* J Comp Neurol **383**: 439-458.
- BLANCO, J. (1994) *Genética general.* Editorial Marbán S.L. Madrid. pp 113-122.
- BON, K.; LANTÉRI-MINET, M.; DE POMMERY, J.; MICHIELS, J.F.; MENÉTREY, D. (1996) *Cyclophosphamide cystitis as a model of visceral pain in rats. A survey of hindbrain structures involved in visceroreception and nociception using the expression of c-Fos and Krox-24 proteins.* Exp Brain Res **108**: 404-416.
- BONICA JJ. (1980) *Pain: introduction.* Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis. **58**:1-17.

- BOURGEAIS L.; GAURIAU C.; MONCONDUIT L.; VILLANUEVA L.; BERNARD J.F. (2003) *Dendritic domains of nociceptive-responsive parabrachial neurons match terminal fields of lamina I neurons in the rat.* J Comp Neurol. **464**(2):238-56.
- BULLIT, E. (1990) *Expression of c-fos-like protein as a marker for neurone activity following noxious stimulation in the rat.* J Comp Neurol **269**: 517-530.
- BULLIT, E. (1991) *Somatotopy of spinal nociceptive processing.* J Comp Neurol **312**: 279-290.
- BURITOVA, J.; HONORE, P.; CHAPMAN, V.; BESSON, J.M. (1995) *Carrageenan oedema and spinal Fos-LI neurones are reduced by peroxicam in the rat.* Neuroreport **6**: 1257-1260.
- BURITOVA, J.; BESSON, JM.; BERNARD, J. (1998) *Involvement of the spinoparabrachial pathway in inflammatory nociceptive processes: a c-fos protein study in the awake rat.* J Comp Neurol **397**: 10-28.
- BYSTRZYCKA, E.K.; NAIL, B.S. (1985) *Brain stem nuclei associated with respiratory, cardiovascular and other autonomic functions.* En: The rat nervous system. Vol. 2. Paxinos, G. (ed.) Academic Press. Sydney. pp 95-110.
- CAMERON, A.A.; KHAN, I.A.; WESTLUND, K.N.; CLIFFER, K.D.; WILLIS, W.D. (1995a) *The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: A phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study.I. Ascending projections.* J Comp Neurol **351**: 568-584.
- CAMERON, A.A.; KHAN, I.A.; WESTLUND, K.N.; WILLIS, W.D. (1995b) *The efferent projection of the periaqueductal gray in the rat: A phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections.* J comp Neurol **351**: 585-601.
- CANNON, J.T.; PRIETO, G.J.; LEE, A.; LIEBESKIND, J.C. (1982) *Evidence for opioid and nonopioid forms of stimulation-produced analgesia in the rat.* Brain Res **243**: 315-321.
- CARLSSON, K.H.; HELMERICH, J.; JURNA, I. (1986) *Activation of inhibition from the periaqueductal gray matter mediates central analgesic effect of metamizol (Dipyrone).* Pain **27**: 373-390.
- CARLSSON, K.H.; JURNA, I. (1987) *The role of descending inhibition in the antinociceptive effects of the pyrazolone derivatives, metamizol (dipyrone) and aminophenazone ("Pyramidon").* Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol **335**: 154-159.
- CARLSSON, K.H.; MONZEL, W.; JURNA, I. (1988) *Depression by morphine and the non-opioid analgesic agents, metamizol (dipyrone), lysine acetylsalicylate, and paracetamol, of activity in rat thalamus neurones evoked by electrical stimulation of nociceptive afferents.* Pain **32**: 313-326.
- CARRIVE, P. (1991) *Functional organization of the PAG neurons controlling regional vascular beds.* En: The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 67-100.
- CARRIVE, P.; BANDLER, R. (1991) *Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal gray: a correlative functional and anatomical study.* Brain Res **541**: 206-215.

- CARSTENS, E.; SAXE, I.; RALPH, R. (1995) *Brainstem neurons expressing c-fos immunoreactivity following irritant chemical stimulation of the rat's tongue*. Neuroscience **69**: 939-953.
- CECCATELLI, S; VILLAR, M.J; GOLDSTEIN, M; HÖKFELT, T. (1989) *Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress*. Proc. Natl. Acad. Sci. **86**: 9569-9573.
- CECHETTO DF, STANDAERT DG, SAPER CB. (1985) *Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat*. J Comp Neurol. **240(2)**:153-60.
- CHAPMAN C.R.; BONICA J.J. (1983) *Current concepts: Acute Pain*. Washington Scope, 5-38.
- CHAMBERLIN NL, SAPER CB. (1992) *Topographic organization of cardiovascular responses to electrical and glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat*. J Comp Neurol. **326(2)**:245-62.
- CHAPMAN, V.; HONORE, P.; BURITOVA, J.; BESSON, J.M. (1995) *Cholecystokinin B receptor antagonism enhances the ability of a low dose of morphine to reduce c-fos expression in the spinal cord of the rat*. Neuroscience **67**: 731-739.
- CHAPMAN, V.; HONORE, P.; BURITOVA, J.; BESSON, J.M. (1995) *The contribution of NMDA receptor activation to spinal C-Fos expression in a model of inflammatory pain*. Br. J. Pharmacol. **116**: 1628-1634.
- CHIANG, C.Y.; HU, J.W.; SESSLE, B.J. (1994) *Parabrachial area and nucleus raphe magnus-induced modulation of nociceptive and nonnociceptive trigeminal subnucleus caudalis neurons activated by cutaneous or deep inputs*. J Neurophysiol **71**: 2430-2445.
- CHIANG CY, SESSLE BJ, HU JW.(1995) *Parabrachial area and nucleus raphe magnus-induced modulation of electrically evoked trigeminal subnucleus caudalis neuronal responses to cutaneous or deep A-fiber and C-fiber inputs in rats*. Pain. **62(1)**:61-8.
- CHUNG, R.Y.; MASON, P.; STRASSMAN, A.; MACIEWICZ, R. (1987) *Suppression of the jaw-opening reflex by periaqueductal gray stimulation is decreased by paramedian brainstem lesions*. Brain Res **403**: 172-176.
- CLEMENT, C.I.; KEAY, K.A.; BANDLER, R. (1995) *Halothane anesthesia-induced activation of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the midbrain periaqueductal gray*. Proc Aust Neurosci Soc **6**: 180.
- CLEMENT, C.I.; KEAY, K.A.; OWLER, B.K.; BANDLER, R. (1996) *Common patterns of increased and decreased fos expression in midbrain and pons evoked by noxious deep somatic and noxious visceral manipulations*. J Comp Neurol **366**: 495-515.
- CONTI, F.; BARBARESI, P.; FABRI, M. (1988) *Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivisions in the rat periaqueductal gray matter*. Neuroscience **24**: 629-633.
- CURRAN, T.; FRANZA, B.R. (1988) *Fos and Jun: the AP-1 connection*. Cell **55**: 395-397.
- CURRAN, T.; ABATE, C.; COEHN, D.R.; MACGREGOR, P.F.; RAUSCHER III, F.J.; SONNENBERG, J.L.; CONNOR, J.A.; MORGAN, J.I. (1990) *Inducible proto-oncogene transcription factors: third messengers in the brain?* Cold Spring Harbor Symp Quant Biol **55**: 225-234.

- CUSINS M.; POWER I. (1999) *Acute and Postoperative pain*. En WALL, P.D.; MELZACK R. (Eds) Textbook of pain. 4ª Ed. , 462-463.
- DAHL, J.B.; KEHLET, H. (1993) *The value of the pre-emptive analgesia in the treatment of postoperative pain*. Br J Anaesth **70**: 434-439.
- DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (1991) *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. Plenum Press. New York. 473 pp.
- DISTEL, R.J. AND SPIELGELMAN B.M. (1990) *Proto-oncogene c-fos as a transcription factor*. Adv Cancer Res **55**: 37-55.
- DRAGUNOW, M.; FAULL, R. (1989) *The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing*. J Neurosci Methods **29**: 261-265.
- DU, H.J.; ZHOU, S.Y. (1990) *Involvement of solitary tract nucleus in control of nociceptive transmission in cat spinal cord neurons*. Pain **40**: 323-331.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. (1977) *The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats*. Pain **4**: 161-174.
- ESTEVEZ, F.O.G.; McWILLIAM, P.N.; BATTEN, T.F.C. (2000) *Nitric oxide producing neurones in the rat medulla oblongata that project to nucleus tractus solitarii*. J Chem Neuroanat **20**: 185-197.
- ETIENNE-DECANT, J. (1990) *Manual de bioquímica genética*. Masson. Barcelona. pp 149-165.
- FANSELOW, M.S. (1991) *The midbrain periaqueductal gray as a coordinator of action in response to fear and anxiety*. En: The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 151-173.
- FARKAS, E.; JANSEN, A.S.P.; LOEWY, A.D. (1997) *Periaqueductal gray matter projection to vagal preganglionic neurons and the nucleus tractus solitarius*. Brain Res **764**: 257-261.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M. (1978) *Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs*. Eur J Pharmacol **53**: 39-48.
- FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. (1991) *Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits*. Annu Rev Neurosci **14**: 219-245.
- FULWILER CE, SAPER CB. FULWILER CE, SAPER CB. (1984) *Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat*. Brain Res. **319(3)**:229-59.
- GABINETE DE ESTUDIOS SOCIOLÓGICOS BERNARD KRIEFF (1998) *Libro blanco sobre el dolor. Macro-estudio socio-epidemiológico*. Laboratorios Knoll. Madrid.
- GEBHART, G.F.; SANDKUHLER, J.; THALHAMMER, J.G.; ZIMMERMANN, M. (1983) *Inhibition of spinal nociceptive information by stimulation in midbrain of the cat is blocked by lidocaine microinjected in nucleus raphe magnus and medullary reticular formation*. J Neurophysiol **50**: 1446-1458.

- GIEROBA, Z.J.; BLESSING, W.W. (1994) *Depressor neurons in caudal medulla demonstrated by Fos expression following activation of cardiopulmonary vagal (Bezold-Jarisch) receptors*. Proc Aust Neurosci Soc **5**: 189.
- GOBEL, S. (1978) *Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis)*. J Comp Neurol **180**: 395-414.
- GOGAS, K.R.; PRESLEY, R.W.; LEVINE, J.D.; BASBAUM, A.I. (1991) *The antinociceptive action of supraspinal opioids results from an increase in descending inhibitory control: correlation of nociceptive behavior and c-fos expression*. Neuroscience **42**: 617-628.
- GRUNDY D. (2002) *Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent*. Gut. **1**:i2-5.
- GUNDLACH, A.L. (1991) *Regional subdivisions in the midbrain periaqueductal gray of the cat revealed by in vitro receptor autoradiography*. En: The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 449-464.
- GUO, Z.L.; MOAZZAMI, A.R.; LONGHURST, J.C. (2005) *Stimulation of cardiac sympathetic afferents activates glutamatergic neurons in the parabrachial nucleus: relation to neurons containing nNos*. Brain Res. **1053**: 97-107.
- HALSELL, C.B. (1998) *Differential distribution of amygdaloid input across rostral solitary nucleus subdivisions in rat*. Ann N Y Acad Sci **855**: 482-485.
- HAMILTON, B.L. (1973) *Cytoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat*. J Comp Neurol **149**: 1-28.
- HAMMOND, D.L.; PRESLEY, R.; GOGAS, K.R.; BASBAUM, A.I. (1992) *Morphine or U-50,488 suppresses Fos protein-like immunoreactivity in the spinal cord and nucleus tractus solitarii evoked by a noxious visceral stimulus in the rat*. J Comp Neurol **315**: 244-253.
- HARDY, P.A.J. (1993) *Pre-emptive extradural analgesia*. Br J Anaesth **70**: 493.
- HARER, R.M.; NI, H.; ZHANG, J. (1991) *Discharge relationships of periaqueductal gray neurons to cardiac and respiratory patterning during sleep and waking states*. En: The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 41-55.
- HARRIS JA (1998) *Using c-fos as a neural marker of pain*. Brain Res Bull **45**: 1-8.
- HAYWARD L.; CASTELLANOS M. (2003) *Increased c-Fos expression in select lateral parabrachial subnuclei following chemical versus electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in rats*. Brain Research **974**: 153-166.
- HERBERT H.; MOGA, M.M.; SAPER, C.B. (1990) *Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat*. J Comp Neurol **293**: 540-580.
- HERBERT H.; SAPER, C.B. (1992) *Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray matter in the rat*. J Comp Neurol **315**: 34-52.
- HERDEGEN, T.; KOVARY, K.; LEAH, J.; BRAVO, R. (1991) *Specific temporal and spatial distribution of Jun, Fos and Krox-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation*. J Comp Neurol **313**: 178-191.

- HERDEGEN, T.; KOVARY, K.; BUHL, A.; BRAVO, R.; ZIMMERMANN, M.; GASS, P. (1995) *Basal expression of the inducible transcription factors c-jun, jun B, jun D; c-fos, and krox-24 in the adult rat brain.* J Comp Neurol **354**: 39-56.
- HERMANSON, O.; ERICSON, H.; LARHAMMAR, D.; BLOMQUIST, A. (1992) *Expression of FOS-like immunoreactivity and preproenkephalin mRNA en the rat parabrachial nucleus after nociceptive mechanical stimulation of the skin.* Soc.Neurosci. Abstr. 18: 832
- HERMANSON, O.; BLOMQUIST, A. (1996) *Subnuclear localization of Fos-like immunoreactivity in the rat parabrachial nucleus after nociceptive stimulation.* J Comp Neurol **368**: 45-56.
- HIROSHIMA K, MAEDA T, HANADA K, WAKISAKA S. (2001) *Temporal and spatial distribution of Fos protein in the parabrachial nucleus neurons during experimental tooth movement of the rat molar.* Brain Res. **27**;908(2):161-73.
- HOLSTEGE G. (1988) *Anatomical evidence for a strong ventral parabrachial projection to nucleus raphe magnus and adjacent tegmental field.* Brain Res. **26**;447(1):154-8.
- HOSOBUCHI, Y.; ADAMS, J.E.; LINCHITZ, R. (1977) *Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone.* Science **197**: 183-186.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. (1981) *Use of avidin-biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures.* J Histochem Cytochem **29**: 577-580.
- HUNT, S.P.; PINI, A.; EVAN, G. (1987) *Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation.* Nature **328**: 632-634.
- HYLDEN JL, ANTON F, NAHIN RL. (1989) *Spinal lamina I projection neurons in the rat: collateral innervation of parabrachial area and thalamus.* Neuroscience. **28**(1):27-37.
- JERGOVA, S.; KOLESAR, D.; CIZKOVA, D. (2008) *Expression of c-Fos in the parabrachial nucleus following peripheral nerve injury in rats.* European Journal of Pain 12: 172-179.
- JHAMANDAS, J.H.; HARRIS, K.H.; PETROV, T.; YANG, H.Y.T.; JHAMANDAS, K.H. (1998) *Activation of neuropeptide FF neurons in the brainstem nucleus tractus solitarius following cardiovascular challenge and opiate withdrawal.* J Comp Neurol **402**: 210-221.
- JOHNSTON HM, MORRIS BJ. (1994) *Induction of c-fos gene expression is not responsible for increased proenkephalin mRNA levels in the hippocampal dentate gyrus following NMDA stimulation.* Brain Res Mol Brain Res. **25**(1-2):147-50.
- JONES, S.L.; BLAIR, R.W. (1995) *Noxious heat-evoked Fos-like immunoreactivity in the rat medulla, with emphasis on the catecholamine cell groups.* J Comp neurol **354**: 410-422.
- JONES, S.L. (1996) *Dipyrone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex.* Eur J Pharmacol **318**: 37-40.
- JÜRGENS, U. (1991) *Neurochemical study of PAG control of vocal behavior.* En: The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 11-21.

- KALIA, M.; MESULAM, M.M. (1980a) *Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: I. The cervical vagus and nodose ganglion.* J. Comp. Neurol. **193**: 435-465.
- KALIA, M.; MESULAM, M.M. (1980b) *Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac and gastrointestinal branches.* J Comp Neurol **193**: 467-508.
- KALIA, M.; SULLIVAN, J.M. (1982) *Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat.* J Comp Neurol **211**: 248-264.
- KATAYAMA Y, TSUBOKAWA T, HIRAYAMA T, YAMAMOTO T. (1985) *Pain relief following stimulation of the pontomesencephalic parabrachial region in humans: brain sites for nonopioid-mediated pain control.* Appl Neurophysiol.**48**(1-6):195-200.
- KATAYAMA Y, TSUBOKAWA T, MAEJIMA S, YAMAMOTO T. (1986) *Responses of raphe-spinal neurons to stimulation of the pontine parabrachial region producing behavioral nociceptive suppression in the cat.* Appl Neurophysiol. **49**(3):112-20.
- KATAYAMA Y, WATKINS LR, BECKER DP, HAYES RL. (1984) *Evidence for involvement of cholinceptive cells of the parabrachial region in environmentally induced nociceptive suppression in the cat.* Brain Res. **299**(2):348-53.
- KAUBE, H.; KEAY, K.A.; HOSKIN, K.L.; BANDLER, R.; GOADSBY, P.J. (1993) *Expression of c-Fos-like immunoreactivity in the caudal medulla and upper cervical spinal cord following stimulation of the superior sagittal sinus in the cat.* Brain Res **629**: 95-102.
- KEAY, K.A.; BANDLER, R. (1993) *Deep and superficial noxious stimulation increase Fos-like immunoreactivity in different regions of the midbrain periaqueductal gray of the rat.* Neurosci Lett **154**: 23-26.
- KEAY, K.A.; CLEMENT, C.J.; OWLER, B.; DEPAULIS, A.; BANDLER, R. (1994) *Convergence of deep somatic and visceral nociceptive information onto a discrete ventrolateral midbrain periaqueductal gray region.* Neuroscience **61**: 727-732.
- KITAMURA T, NAGAO S, KUNIMOTO K, SHIRAMA K, YAMADA J. (2001) *Cytoarchitectonic subdivisions of the parabrachial nucleus in the Japanese monkey (Macacus fuscatus) with special reference to spinoparabrachial fiber terminals.* Neurosci Res. **39**(1):95-108.
- KROUT, K.; JANSEN, A.; LOEWY, D. (1998) *Periaqueductal Gray Matter Projection to the Parabrachial Nucleus in Rat Periaqueductal Gray Matter Projection to the Parabrachial Nucleus in Rat.* J Comp Neurol. **401**:437-454
- KRUKOFF, TL; KHALILI, P. (1997) *Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain..* J. Comp. Neurol. **377**: 509-519.
- LANTÉRI-MINET, M.; ISNARDON, P.; DE POMMERY, J.; MENÉTREY, D. (1993) *Spinal and midbrain structures involved in visceroreception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins.* Neuroscience **55**: 737-753.
- LANTÉRI-MINET, M.; WEIL-FUGAZZA, J.; DE POMMERY, J.; MENÉTREY, D. (1994) *Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-fos other immediate early gene proteins.* Neuroscience **58**: 287-298.

- LARSON, C.R. (1991) *Activity of PAG neurons during conditioned vocalization in the macaque monkey*. En: The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 23-40.
- LATARJET, M.; RUIZ LIARD, A. (1990) *Anatomía humana. Tomo I*. 2ª ed. Panamericana. México. p 178.
- LAWRENCE, A.J.; CASTILLO-MELÉNDEZ, M.; McLEAN, K.J.; JARROTT, B. (1998) *The distribution of nitric oxide synthase-, adenosine deaminase- and neuropeptide Y-immunoreactivity through the entire rat nucleus tractus solitarius. Effect of unilateral nodose ganglionectomy*. J Chem Neuroanat **15**: 27-40.
- LEAH, J.D.; SANDKUHLER, J.; HERDEGEN, T.; MURASHOV, A.; ZIMMERMANN, M. (1992) *Potentiated expression of Fos protein in the rat spinal cord following bilateral noxious cutaneous stimulation*. Neuroscience **48**: 525-532.
- LEWIS, J.W.; BALDRIGHI, G.; AKIL, H. (1987) *A possible interface between autonomic function and pain control: opioid analgesia and the nucleus tractus solitarius*. Brain Res **424**: 65-70.
- LI, Y.W.; DAMPNEY, R.A.L. (1994) *Expression of fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits*. Neuroscience **61**: 613-634.
- LI, L.; DING, J.; REN, Z.; HAN, Q.; HU, G.; XIAO, M. (2006) *Expression and colocalization of NADPH-diaphorase and Fos in the subnuclei of the parabrachial nucleus in rats following visceral noxious stimulation*. Brain Res **1114**: 41-52.
- LIMA, D.; AVELINO, A. (1994) *Spinal c-fos expression is differentially induced by brief or persistent noxious stimulation*. Neuroreport **5**: 1853-1856.
- LIN, L.H.; CASELL, M.D.; SANDRA, A.; TALMAN, W.T. (1998) *Direct evidence for nitric oxide synthase in vagal afferents to the nucleus tractus solitarii*. Neuroscience **84**: 549-558.
- LIN, L.H.; SAHAI, A.K.; ROCKLAND, K.S.; TALMAN, W.T. (2000) *The distribution of neuronal nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of the squirrel monkey*. Brain Res **856**: 84-92.
- LOVICK, T.A. (1993) *Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses*. Prog Neurobiol **40**: 631-644.
- MANNING, B.H.; MAYER, D.J. (1995a) *The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the formalin test*. Pain **63**: 141-152.
- MANNING, B.H.; MAYER, D.J. (1995b) *The central nucleus of the amygdala contributes to the production of morphine antinociception in the rat tail-flick test*. J Neurosci **15**: 8199-8213.
- MANTYH, P.W. (1982) *The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a Nissl, Weil and Golgi analysis*. J Comp Neurol **204**: 349-363.
- MASON, P.; FIELDS, H.L. (1989) *Axonal trajectories and terminations of on- and off-cells in the cat lower brainstem*. J Comp Neurol **288**: 185-207.

- McCARTHY, M.M.; PFAFF, D.W.; SCHWARTZ-GIBLIN, S. (1991) *Midbrain central gray GABA_A receptor activation enhances and blockade reduces sexual behavior in the female rat*. *Exp Brain Res* **86**: 108-116.
- MELLER, ST; DENNIS, BJ (1990). *Quantitative Nissl study of the neuronal types, and recognition of cytoarchitectural subdivisions, within the rabbit periaqueductal gray*. *J Comp Neurol* **302**: 87-99.
- MELZACK, R.; WALL, P.D. (1965) *Pain mechanisms: a new theory*. *Science* **150**: 971-979.
- MENENDEZ L, BESTER H, BESSON JM, BERNARD JF.(1996) *Parabrachial area: electrophysiological evidence for an involvement in cold nociception*. *J Neurophysiol.* **75**(5):2099-116.
- MENÉTREY, D.; BASBAUM, A.I. (1987) *Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: A possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation*. *J Comp Neurol* **255**: 439-450.
- MENÉTREY, D.; GANNON, A.; LEVINE, J.D.; BASBAUM, A.I. (1989) *Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation*. *J Comp Neurol* **285**: 177-195.
- MENG, X.W.; BUDRA, B.; SKINNER, K.; OHORA, P.T.; FIELDS, H.L. (1997) *Noradrenergic input nociceptive modulatory neurons in the rat rostral ventromedial medulla*. *J Comp Neurol* **377**: 381-391.
- MENGA, I.; HUB, J.; BEREITER, D. (2000) *Parabrachial area and nucleus raphe magnus inhibition of corneal units in rostral and caudal portions of trigeminal subnucleus caudalis in the rat*. *Pain* **87**: 241±251
- MIZUSAWA A, OGAWA H, KIKUCHI Y, HIDA W, SHIRATO K. (1995) *Role of the parabrachial nucleus in ventilatory responses of awake rats*. *J Physiol.* **489** (Pt 3):877-84.
- MOLANDER, C.; GRANT, G. (1995) *Spinal cord cytoarchitecture*. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. pp 39-45.
- MONTRONE, V.; PETRUZZELLA, O.; PETROSINO, R. (1992) *El dolor: un síntoma multidisciplinar*. Harofarma. Barcelona. pp 85-193.
- MORGAN, JI; CURRAN, T (1991) *Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun*. *Annu Rev Neurosci* **14**: 421-451.
- MORGAN, M.M.; SOHN, J.H.; LOHOF, A.M.; BEN-ELIYAHU, S.; LIEBESKIND, J.C. (1989) *Characterization of stimulation-produced analgesia from the nucleus tractus solitarius in the rat*. *Brain Res* **486**: 175-180.
- MORGAN, M.M. (1991) *Differences in antinociception evoked from dorsal and ventral regions of the caudal periaqueductal gray matter*. En: *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 139-150.
- MUGNAINI, E.; BERREBI, A.S.; MORGAN, J.I.; CURRAN, T. (1989) *Fos-like immunoreactivity induced by seizure in mice is specifically associated with euchromatin in neurons*. *Eur J Neurosci* **1**: 46-52.

- MUNGLANI, R.; JONES, J.G.; HUNT, S. (1993) *Pre-emptive analgesia. use of immediate early genes expression as markers of neuronal stimulation*. Br J Anaesth **71**: 458.
- MUNGLANI, R.; HUNT, S.P. (1995) *Molecular biology of pain*. Br J Anaesth **75**: 186-192.
- MUNGLANI, R.; BOND, A.; SMITH, G.D.; HARRISON, S.M.; ELLIOT, P.J.; BIRCH, P.J.; HUNT, S.P. (1995) *Changes in neuronal markers in a mononeuropathic rat model: relationship between neuropeptide Y, pre-emptive drug treatment and long-term mechanical hyperalgesia*. Pain **63**: 21-31.
- MUNGLANI, R.; FLEMING, B.G.; HUNT, S.P. (1996) *Remembrance of times past: the significance of c-fos in pain*. Br J Anaesth **76**: 1-4.
- MURIEL VILLORIA, C.; MADRID ARIAS, J.L. (1993) *Consideraciones en torno al tratamiento farmacológico del dolor*. Europharma. Madrid. pp 39-91.
- MURPHY, A.Z.; ENNIS, M.; RIZVI, T.A.; BEHBEHANI, M.M.; SHIPLEY, M.T. (1995) *Fos expression induced by changes in arterial pressure is localized in distinct, longitudinally organized columns of neurons in the rat midbrain periaqueductal gray*. J Comp Neurol. **360**: 286-300.
- NAGEOTTE, J. (1906) *The pars intermedia or nervus intermedius of Wrisberg, and the bulbo-pontine nucleus in man*. Rev Neurol Psychiatr **4**: 473-488.
- NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H.G.; HE, X.; LÜCKE, T.; GÜNDLING, P.; SCHMIDT, R.F. (1994) *Electrophysiological evidence for a spinal antinociceptive action of dipyrone*. Agents Actions **41**: 62-70.
- NIEUWENHUYIS, R.;VOOGD, J.; VAN HUIJZEN, C. (1988) *The human central nervous system. A synopsis and atlas. 3rd ed.* Springer-Verlag. Berlín. pp 321-323.
- NORGREN, R. (1995) *Gustatory system*. En: The rat nervous system. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. pp 751-771.
- OGAWA, S.; KOW, L.M.; McCARTHY, M.M.; PFAFF, D.W.; SCHWARTZ-GIBLIN, S. (1991) *Midbrain PAG control of female reproductive behavior: In vivo electrophysiological characterization of actions of lordosis-relevant substances*. En: The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 211-235.
- OLSZEWSKI, J.; BAXTER, D. (1954) *Cytoarchitecture of the human brain stem*. J. B. Lippincott Company. Philadelphia.
- ONSTOTT, D.; MAYER, B.; BEITZ, A.J. (1993) *Nitric oxide synthase immunoreactive neurons anatomically define a longitudinal dorsolateral column within the midbrain periaqueductal gray of the rat: analysis using laser confocal microscopy*. Brain Res **610**: 317-324.
- OWLER, B.; CLEMENT, C.I.; KEAY, K.A.; BANDLER, R. (1994) *Deep somatic and visceral noxious stimuli evoke Fos expression in different spinal cord laminae and a common region of the nucleus of the solitary tract*. Proc Aust Neurosci Soc **5**: 200.
- PALKOVITS, M.; MEZEY, E.; ESKAY, E.; ESKAY, R.L. (1987) *Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alfa-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat*. Brain Res **436**: 323-328.

- PAXINOS, G.; WATSON, C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press. New York.
- PETROV T, KRUKOFF TL, JHAMANDAS JH. (1992) *The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: a combined double retrograde and immunocytochemical study*. J Comp Neurol. **318**(1):18-26.
- PETROV T, JHAMANDAS JH, KRUKOFF TL. (1992) *Characterization of peptidergic efferents from the lateral parabrachial nucleus to identified neurons in the rat dorsal raphe nucleus*. J Chem Neuroanat. **5**(5):367-73.
- PFLUG, A.E.; BONICA J.J. (1977) *Physiopatology and control of postoperative pain*. Arch Surg **112**: 773-781.
- PORRO, C.A.; CAVAZZUTI, M.; GALETTI, A.; SASSATELLI, L. (1991) *Functional activity mapping of the rat brainstem during formalin-induced noxious stimulation*. Neuroscience **41**: 667-680.
- PORRO, C.A.; CAVAZZUTI, M. (1993) *Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model*. Prog Neurobiol **41**: 565-607.
- PREYSLER, R.W.; MENÉTREY, D.; LEVINE, J.D.; BASBAUM, A.J. (1990) *Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord*. J Neurosci **10**: 323-335.
- PRETEL, S.; PIEKUT, D.T. (1991) *Enkephalin, substance P, and serotonin axonal input to c-fos-like immunoreactive neurons of the rat spinal cord*. Peptides **12**: 1243-1250.
- PRICE, D.D.; HAYASKI, H.; DUBNER, R.; RUDA, M.A. (1979) *Functional relationships between neurons of the marginal and substantia gelatinosa layers of the primate dorsal horn*. J Neurophysiol **42**: 1590-1608.
- PRIETO, G.J.; CANNON, J.T.; LIEBESKIND, J.C. (1983) *Nucleus raphe magnus lesions disrupt stimulation-produced analgesia from ventral but not dorsal midbrain areas in the rat*. Brain Res **261**: 53-57.
- RABASA ASENJO, B. (1998) *Libro blanco sobre el dolor*. Gabinete de Estudios Sociológicos Bernard Krief, Madrid
- RAMÓN Y CAJAL, S. (1909) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Vol 1. A. Maloine. Paris.
- RAMÓN Y CAJAL, S. (1911) *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Vol. 2. A. Maloine. Paris. pp 159-261.
- RANDICH, A.; AIMONE, L.D.; GEBHART, G.F. (1987) *Medullary substrates of descending spinal inhibition activated by intravenous administration of [D-Ala²]methionine enkephalinamide in the rat*. Brain Res **411**: 236-247.
- RANDICH, A.; ROOSE, M.G.; GEBHART, G.F. (1988) *Characterization of antinociception produced by glutamate microinjection in the nucleus tractus solitarius and the nucleus reticularis ventralis*. J Neurosci **8**: 4675-4684.
- RANDICH, A.; AICHER, S.A. (1988) *Medullary substrates mediating antinociception produced by electrical stimulation of the vagus*. Brain Res **445**: 68-76.

- RANSONE, L.J.; VERMA, I.M. (1990) *Nuclear proto-oncogenes fos and jun*. *Annu Rev Cell Biol* **6**: 539-557.
- REYNOLDS, D.V. (1969) *Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation*. *Science* **164**: 444-445.
- REXED B. (1954) *A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat*. *J Comp Neurol*. **100(2)**:297-379.
- RICHARD, S.; ENGBLOM, D.; PAUES, J.; MACKERLOVA, L.; BLOMQVIST, A. (2005) *Activation of the parabrachio-amygdaloid pathway by immune challenge or spinal nociceptive input: a quantitative study in the rat using fos immunohistochemistry and retrograde tract tracing*. *J Comp Neurol* **481**: 210-219.
- RODELLA, L.; REZZANI, R.; GIOIA, M.; TREDICI, G.; BIANCHI, R. (1998) *Expression of Fos immunoreactivity in the rat supraspinal regions following noxious visceral stimulation*. *Brain Res Bull* **47**: 357-366.
- ROMERO J. (1992) *Colaboración entre atención primaria y la unidad del dolor*. En: *El dolor y su tratamiento actual*. II curso interactivo. Gálvez Mateos, R. Granada, 97-99.
- RULL BARTOMEU, M. (1993) *Metamizol*. II Reunión Internacional de Anestesia Regional y Tratamiento del Dolor (ESRA Internacional Meeting): 54-59.
- RUTHERFORD, S.D.; WIDDOP, R.E.; SANNAJUST, F.; LOUIS, W.J.; GUNDLACH, A.L. (1992) *Expression of c-fos and NGFI-A messenger RNA in the medulla oblongata of the anaesthetized rat following stimulation of vagal and cardiovascular afferents*. *Mol Brain Res* **13**: 301-312.
- SAGAR, S.M.; SHARP, F.R.; CURRAN, T. (1988) *Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level*. *Science* **240**: 1328-1331.
- SAKUMA, Y.; PFAFF, D.W. (1979) *Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat*. *Am J Physiol* **237**: R278-R284.
- SAHA, S.; BATTEN, T.F.C.; HENDERSON, Z. (2000) *A gabaergic projection from the central nucleus of the amygdala to the nucleus of the solitary tract: A combined anterograde tracing and electron microscopic immunohistochemical study*. *Neuroscience* **99**: 613-626.
- SALEH TM, CONNELL BJ. (1997) *Modulation of the cardiac baroreflex following reversible blockade of the parabrachial nucleus in the rat*. *Brain Res*. **767(2)**:201-7.
- SAMBUCETTI; L.C.; CURRAN, T. (1986) *The fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose*. *Science* **234**: 1417-1420.
- SANDKÜHLER, J. (1991) *Induction of the proto-oncogene c-fos as a cellular marker of brainstem neurons activated from the PAG*. En: *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization*. Depaulis, A. y Bandler, R. (eds.). Plenum Press. New York. pp 267-286.
- SANDKÜHLER, J.; HERDEGEN, T. (1995) *Distinct patterns of activated neurons throughout the rat midbrain periaqueductal gray induced by chemical stimulation within its subdivisions*. *J Comp Neurol* **357**: 546-553.
- SAPER, C.B. (1995) *Central autonomic system*. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. pp 107-135.

- SCHWARTZ-GIBLIN, S.; McCARTHY, M.M. (1995) *A sexual column in the PAG?* Trends Neurosci **18**: 129.
- SELVE, N.; ENGLBERGER, W.; FRIDERICHS, E.; HENNIES, H.H.; REIMANN, W.; WILFFERT, B. (1996) *Galanin receptor antagonists attenuate spinal antinociceptive effects of DAMGO, tramadol and non-opioid drugs in rats.* Brain Res **735**: 177-187.
- SHARP FR, SAGAR SM, HICKS K, LOWENSTEIN D, HISANAGA K. (1991) *c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress.* J neurosci. **11(8)**:2321-31.
- SHERRINGTON, C.S. (1906) *The integrative action of the nervous system.* Yale University Press. New Haven.
- SHENG, M.; GREENBERG, M.E. (1990) *The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system.* Neuron **4**: 477-485.
- SHIMADA, S.G.; OTTERNESS, I.G.; STITT, J.T. (1994) *A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrrone.* Agents Actions **41**: 188-192.
- SKINNER, K.; BASBAUM, A.I.; FIELDS, H.L. (1997) *Cholecystinin and enkephalin in brainstem pain medulating circuits.* Neuroreport. **8**: 2995-2998.
- SLUGG, R.M.; *Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with phaseolus vulgaris leucoagglutinin.* J.Comp. Neurol. **339**: 49-61.
- SOKAL, R.R.; RHOLF, J. (1995). *Biometry. Third Edition.* W.H. Freeman and Co. New York.
- SOKOLOFF, L.; REIVICH, M.; KENNEDY, C.; DES ROSIERS, M.H.; PATLAK, C.S.; PETTIGREW, K.D.; SAKURADA, O.; SHINOHARA, M. (1977) *The 14C-deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat.* J Neurochem **28**: 897-931.
- SPIKE RC, PUSKÁR Z, ANDREW D, TODD AJ. (2003) *A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord.* Eur J Neurosci. **18(9)**:2433-48.
- STAMFORD, J.A. (1995) *Descending control of pain.* Br J Anaesth **75**: 217-227.
- STERNBACH R.A. (1986) *Survey of pain in United States: The Nuprin pain report.* Clin J Pain **2**: 49-53.
- STRASSMAN, A.M.; VOS, B.P. (1993) *Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation.* J Comp Neurol **331**: 495-516.
- TABER, E. (1961) *The cytoarchitecture of the brain stem of the cat.* J Comp Neurol **116**: 27-69.
- TABER, R.I.; GREENHOUSE, D.D.; RENDELL, J.K.; IRWIN, S. (1969) *Agonist and antagonist interactions of opioids on acetic acid-induced abdominal stretching in mice.* J Pharmacol Exp Ther **169**:29-38.
- TAGAWA, T.; IMAIZUMI, T.; HARADA, S.; ENDO, T.; SHIRAMOTO, M.; HIROOKA, Y.; TAKESHITA, A. (1994) *Nitric oxide influences neuronal activity in the nucleus tractus solitarius of rat brainstem slices.* Circ Res **75**: 70-76.

- TAKAYAMA, K.; SUZUKI, T.; MIURA, M. (1994) *The comparison of effects of various anesthetics on expression of Fos protein in the rat brain*. *Neurosci Lett* **176**: 59-62.
- TAKEMURA, M.; TSUJIO, A.; IWASE, K.; SHIMADA, T.; SHIGENAGA, Y. (1998) *Central terminals of orofacial primary afferents and NADPH-diaphorase activity in the trigemino-solitary complex of rats*. *Brain Res* **781**: 78-90.
- TAVARES, I.; LIMA, D. (1994) *Descending projections from the caudal medulla oblongata to the superficial or deep dorsal horn of the rat spinal cord*. *Exp Brain Res* **99**: 455-463.
- TAVARES, I.; ALBINO-TEXEIRA, A.; LIMA, D. (1995) *Hypertension inhibits noxious-evoked c-fos expression in the rat spinal cord*. *Neuroreport* **6**: 1664-1668.
- TAYLOR, J.; MELLSTRÖM, B.; FERNAUD, I.; NARANJO, J.R. (1998) *Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-fos immunoreactivity in spinal cord*. *Eur J Pharmacol* **351**: 39-47.
- TESTUT, L.; LATARJET, A. (1973) *Tratado de anatomía humana. Tomo II*. Salvat. Barcelona. p 886.
- THE LANCET (1991) *Postoperative pain relief and non-opioid analgesics*. *Lancet* **337**, 56: 524-526.
- TÖLLE, T.R.; SCHADRACK, J.; CASTRO-LOPES, J.M.; EVAN, G.; ROQUES, B.P.; ZIEGLGANSBERGER, W. (1994a) *Effects of kelaforphan and morphine before and after noxious stimulation on immediate-early gene expression in rat spinal cord neurons*. *Pain* **56**: 103-112.
- TÖLLE, T.R.; HERDEGEN, T.; SCHADRACK, J.; BRAVO, R.; ZIMMERMANN, M.; ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1994b) *Application of morphine prior to noxious stimulation differentially modulates expression of FOS, JUN, and KROX-24 proteins in rat spinal cord neurons*. *Neuroscience* **58**: 305-321.
- TORRES, L.M.; CALDERON, E.; FUENTES, R. (1996) *Seguridad del metamizol*. *Rev Soc Esp Dolor* **3**: 135-138.
- TORTORICI, V.; VANEGAS, H. (1994) *Putative role of medullary off- and on-cells in the antinociception produced by dipyrone (metamizol) administered systemically or microinjected into the PAG*. *Pain* **57**: 197-205.
- TORTORICI, V.; VASQUEZ, E.; VANEGAS, H. (1996) *Naloxone partial reversal of the antinociception produced by dipyrone microinjected into the periaqueductal gray of rats. Possible involvement of medullary off- and on-cells*. *Brain Res* **725**:106-10.
- TORVIK, A. (1956) *Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract, and adjacent structures*. *J Comp Neurol* **106**: 51-141.
- TRAUB, R.J.; STITT, S.; GEBHART, G.F. (1995) *Attenuation of c-Fos expression in the rat lumbosacral spinal cord by morphine or tramadol following noxious colorectal distention*. *Brain Res* **701**: 175-182.
- TRAUB, R.J.; SENGUPTA, J.N.; GEBHART, G.F. (1996) *Differential c-fos expression in the nucleus of the solitary tract and spinal cord following noxious gastric distention in the rat*. *Neuroscience* **74**: 873-884.
- VALVERDE NAVARRO, A.A.; OLUCHA, F.E.; GARCÍA VERDUGO, J.M.; HERNÁNDEZ GIL DE TEJADA, T.; RUIZ TORNER, A.; MARTÍNEZ SORIANO, F. (1996) *Distribution of basal-expressed c-fos-like immunoreactive cells of the periaqueductal grey matter of the rat*. *Neuroreport* **7**: 2749-2752.

- VAN BOCKSTAELE, E.J.; ASTON-JONES, G.; PIERIBONE, V.A.; ENNIS, M.; SHIPLEY, M.T. (1991) *Subregions of the periaqueductal gray topographically innervate the rostral ventral medulla in the rat*. J Comp Neurol **309**: 305-327.
- VAN DER KOOY, D.; KODA, L.Y.; MCGINTY, J.F.; GERFEN, C.R.; BLOOM, F.E. (1984) *The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat*. J Comp Neurol **224**: 1-24.
- VANEGAS, H.; TORTORICI, V.; EBLEN-ZAJJUR, A.; VÁSQUEZ, E. (1997) *PAG-microinjected dipyrone (metamizol) inhibits responses of spinal dorsal horn neurons to natural noxious stimulation in rats*. Brain Res **759**: 171-174.
- VÁSQUEZ, E.; VANEGAS, H. (2000) *The antinociceptive effect of PAG-microinjected dipyrone in rats is mediated by endogenous opioids of the rostral ventromedial medulla*. Brain Res **854**: 249-252.
- VIDAL F. (1987) *Los costes del dolor*. Dolor **2** :7-8.
- WALL, P.D. (1988) *Prevention of postoperative pain*. Pain **33**: 289-290.
- WANG, Q.P.; NAKAI, Y. (1994) *The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation*. Brain Res Bull **34**: 575-585.
- WANG, Q.P.; NAKAI, Y. (1995) *Immunoelectron microscopy of β -endorphinergic synaptic innervation of nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the dorsal raphe nucleus*. Brain Res **684**: 185-193.
- WHITEHEAD, M.C. (1988) *Neuronal architecture of the nucleus of the solitary tract in the hamster*. J Comp Neurol **276**: 547-572.
- WHITEHEAD, M.C. (1990) *Subdivisions and neurons types of the nucleus of the solitary tract that project to the parabrachial nucleus in the hamster*. J Comp Neurol **301**: 554-574.
- WIERTELAK, E.P.; ROEMER, B.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. (1997) *Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on illness-induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesias*. Brain Res **748**: 143-150.
- WILLIS, W.D.; WESTLUND, K.N.; CARLTON, S.M. (1995) *Pain*. En: The rat nervous system. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. pp 725-750.
- WINKLER, C.; POTTER, A. (1911) *An anatomical guide to experimental researches on the cat brain*. Versluys. Amsterdam.
- YEW, D.T.; LUO, C.B.; ZHENG, D.R.; GUAN, Y.L.; LIN, Y.Q.; CHEN, W.Z. (1990) *Development and localization of enkephalin and substance P in the nucleus of tractus solitarius in the medulla oblongata of human fetuses*. Neuroscience **34**: 491-498.
- ZIMMERMANN, M. (1983) *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. Pain **16**: 109-110.
- ZITTEL, T.T; GEORGIO, R.d.; BRECHA, N.C.; STERNINI, C.; RAYBOULD, H.E. (1993) *Abdominal surgery induces c-fos expression in the nucleus of the solitary tract in the rat*. Neurosci Lett **159**: 79-82.