

**UNIVERSIDAD DE VALENCIA**  
**Facultad de Medicina y Odontología**



**“EFECTO DE LA PREGABALINA SOBRE LA EXPRESIÓN  
DE FOS EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO Y LA MÉDULA  
ESPINAL EN DOS MODELOS DE DOLOR NEUROPÁTICO”**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por

**Vicente Luis Villanueva Pérez**

Dirigida por

**Dr. Alfonso Amador Valverde Navarro**  
**Dr. Francisco Martínez Soriano**  
**Dr. José de Andrés Ibáñez**

**2012**



**“EFECTO DE LA PREGABALINA SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE FOS EN EL TRONCO DEL  
ENCÉFALO Y LA MÉDULA ESPINAL EN DOS  
MODELOS DE DOLOR NEUROPÁTICO”**

Trabajo de investigación que presenta

**VICENTE LUIS VILLANUEVA PÉREZ**

Para optar al grado de

**Doctor  
por la Universidad de Valencia.**

Dirigido por los doctores

**Alfonso Amador Valverde Navarro**

Profesor Titular de Universidad

**Francisco Martínez Soriano**

Catedrático de Universidad

**y**

**José de Andrés Ibáñez**

Profesor Titular de Universidad

Realizado en el:

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

**Enero 2012  
VALENCIA**





Alfonso Amador Valverde Navarro y Francisco Martínez Soriano, Profesores del Departamento de Anatomía y Embriología Humana, y José de Andrés Ibáñez, Profesor del Departamento de Cirugía, ambos Dptos. de la Universidad de Valencia

HACEMOS CONSTAR:

Que Vicente Luis Villanueva Pérez ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de su Tesis Doctoral "EFECTO DE LA PREGABALINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FOS EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO Y LA MÉDULA ESPINAL EN DOS MODELOS DE DOLOR NEUROPÁTICO"

Y para que así conste y surta efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia a 23 de Enero de 2012.



Alfonso Amador Valverde Navarro



Francisco Martínez Soriano



José de Andrés Ibáñez



*A mi mujer*  
*A mi hijo*  
*A mis buenos amigos*



## **Agradecimientos**

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

A los Directores de la Tesis, los Dres. Alfonso A. Valverde Navarro, Francisco Martínez Soriano y José de Andrés Ibáñez, quienes me dieron la oportunidad de realizar este trabajo y que tanto me han ayudado y enseñado a lo largo de estos años. Quiero agradecerles su dedicación, ya que he podido contar con ellos en todo momento para aconsejarme y apoyarme.

A la Dra. Amparo Ruiz Torner, por su ayuda y el tiempo invertido en la revisión y corrección de este trabajo.

A todos y cada uno de los integrantes del GESADA, desde el primero, el Dr. Tomás Hernández Gil de Tejada, al último de los estudiantes en incorporarse. Sin su labor, en todo momento desinteresada, nunca habría podido realizar un estudio de este tipo en el que han sido necesarias tantas horas de laboratorio. Mi reconocimiento, aquí también, a la labor desempeñada por los técnicos del laboratorio D. Joan Martí Pozo y D<sup>a</sup>. Ana Barberá Carrión.

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



# Índice

## 01.-INTRODUCCIÓN

1.- Concepto y epidemiología del dolor	3
1.1.-Tipos de dolor	6
2.- Pregabalina	8
2.-Sustrato anatómico de la transmisión nociceptiva	14
2.1.-Receptores	14
2.2.-Fibras nerviosas	17
2.3.-Asta posterior o dorsal de la médula	18
2.4.-Vías ascendentes	21
3.-Sistema de control endógeno de la transmisión nociceptiva	24
3.1.-Sustancia gris periacueductal (PAG)	27
3.2.-La Región rostral y ventromedial del bulbo raquídeo (RVM)	30
3.3.- Otros Núcleos implicadas en la Modulación de la Transmisión Nociceptiva	32
3.3.a.- Núcleo del Rafe Dorsal (DR)	34
3.3.b.- Locus Coeruleus (LC)	35
3.3.c.- Núcleo Parabraquial (PB)	36
3.3.d.- Núcleo del Tracto Solitario (NTS)	38
4.-El proto-oncogén <i>c-fos</i>	39
4.1.-Oncogenes y proto-oncogenes	39
4.2.-Proto-oncogén <i>c-fos</i>	42
4.3.-Empleo del proto-oncogén <i>c-fos</i> como marcador celular de actividad neuronal	43

## 02.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

1.-Planteamiento del Problema	47
2.-Hipótesis de Trabajo	48
2.-Objetivos	49

## 03.-MATERIAL Y METODOS

1.-Animal de experimentación	53
2.-Grupos experimentales	54
3.-Anestesia y perfusión	57
4.-Obtención de los cortes	59
5.-Revelado inmunocitoquímico del proto-oncogén <i>c-fos</i>	59
6.-Montaje de cortes	61
7.-Selección de los niveles de estudio	62
7.1.- A nivel medular	62
7.2.- A nivel troncoencefálico	62



8.- Técnicas de Estudio Citoarquitectónico: Método de Nissl	67
9.-Técnicas de Estudio Histoquímico e Inmunohistoquímico	68
9.1.- Protocolo para la detección histoquímica de la NADPH-diaforasa (NADPHd)	68
9.2.-Protocolo para la detección inmunocitoquímica de la enzima tirosinhidroxilasa	69
9.3.-Protocolo para la detección inmunocitoquímica de la serotonina	70
10.-Obtención de los patrones de distribución de las neuronas Fos-positivas	71
11.-Obtención de imágenes digitalizadas de las preparaciones	72
12.-Análisis estadístico de los datos	73
12.1.-Análisis global	73
12.2.-Análisis parciales	74

#### **04.-RESULTADOS**

1.-Consideraciones generales	77
Estudio descriptivo	78
2.- Asta Posterior de la Médula Espinal	78
2.1.- Estudio Citoarquitectónico	78
2.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico	80
2.3.- Grupo Control Pregabalina	80
2.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo	80
2.5.- Grupo Control Dolor Neuropático	80
2.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo	81
2.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático	81
3.- Núcleo del Tracto Solitario	95
3.1.- Estudio Cito y Quimioarquitectónico	95
3.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico	98
3.3.- Grupo Control Pregabalina	98
3.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo	98
3.5.- Grupo Control Dolor Neuropático	99
3.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo	99
3.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático	99
4.- Porción Lateral del Núcleo Parabraquial	109
4.1.- Estudio Cito y Quimioarquitectónico	109
4.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico	113
4.3.- Grupo Control Pregabalina	113
4.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo	114
4.5.- Grupo Control Dolor Neuropático	115
4.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo	115
4.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático	116
5.- Locus Coeruleus	126
5.1.- Estudio Cito e Inmunoquimioarquitectónico	126
5.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico	129
5.3.- Grupo Control Pregabalina	129
5.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo	129
5.5.- Grupo Control Dolor Neuropático	129
5.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo	129
5.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático	130



6.- Núcleo del Rafe Dorsal	139
6.1.- Estudio Cito e Inmunoquimioarquitectónico	139
6.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico	142
6.3.- Grupo Control Pregabalina	142
6.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo	142
6.5.- Grupo Control Dolor Neuropático	142
6.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo	142
6.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático	143
 Estudio estadístico	 152
7.- Estudio Estadístico del Asta Posterior de la Médula	152
7.1.-Análisis global	152
7.2.-Análisis parciales	156
7.2.a.-Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG	157
7.2.b.-Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP	160
7.2.c.-Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC	164
7.2.d.-Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP	168
7.2.e.- ANEXO I: Análisis Global	172
7.2.f.- ANEXO II: Análisis Parcial Dolor	174
7.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo	175
7.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático	176
 8.- Estudio Estadístico del Núcleo del Tracto Solitario	 177
8.1.-Análisis global	177
8.2.-Análisis parciales	181
8.2.a.-Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG	182
8.2.b.-Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP	185
8.2.c.-Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC	189
8.2.d.-Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP	193
8.2.e.- ANEXO I: Análisis Global	197
8.2.f.- ANEXO II: Análisis Parcial Dolor	199
8.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo	200
8.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático	201
 9.- Estudio Estadístico de la Porción Lateral del PB	 202
9.1.-Análisis global	202
9.2.-Análisis parciales	206
9.2.a.-Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG	207
9.2.b.-Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP	210
9.2.c.-Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC	214
9.2.d.-Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP	218
9.2.e.- ANEXO I: Análisis Global	222
9.2.f.- ANEXO II: Análisis Parcial Dolor	224
9.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo	225
9.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático	226
 10.- Estudio Estadístico del Locus Coeruleus	 227
10.1.-Análisis global	227
10.2.-Análisis parciales	231
10.2.a.-Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG	232
10.2.b.-Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP	235
10.2.c.-Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC	239
10.2.d.-Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP	243
10.2.e.- ANEXO I: Análisis Global	247
10.2.f.- ANEXO II: Análisis Parcial Dolor	249
10.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo	250
10.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático	251



11.- Estudio Estadístico del Núcleo del Rafe Dorsal	252
11.1.-Análisis global	252
11.2.-Análisis parciales	256
11.2.a.-Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG	257
11.2.b.-Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP	260
11.2.c.-Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC	264
11.2.d.-Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP	268
11.2.e.- ANEXO I: Análisis Global	272
11.2.f.- ANEXO II: Análisis Parcial Dolor	274
11.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo	275
11.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático	276

## **05.-DISCUSIÓN**

1.-Consideraciones metodológicas	279
2.- Asta Posterior de la Médula Espinal	281
3.- Núcleo del Tracto Solitario	284
4.- La porción lateral del PB	290
5.- Locus Coeruleus	303
6.- Núcleo del Rafe Dorsal	306

## **06.-CONCLUSIONES** 309

## **07.-BIBLIOGRAFÍA** 313



## Abreviaturas

2-DG	2-desoxiglucosa.
AINE	antiinflamatorio no esteroideo.
APd	Asta Posterior Derecha.
APi	Asta Posterior Izquierda.
cIPB	subnúcleo central de la porción lateral del núcleo parabraquial.
CNC	grupo control dolor nociceptivo.
CNP	grupo control dolor neuropático.
CPG	grupo control pregabalina.
CSF	grupo control simulado fisiológico.
dIPB	subnúcleo dorsal de la porción lateral del núcleo parabraquial.
DR	núcleo dorsal del rafe.
eIPB	subnúcleo externo de la porción lateral del núcleo parabraquial.
iIPB	subnúcleo interno de la porción lateral del núcleo parabraquial.
KF	Núcleo de Kölliker-Fuse
LC	Locus Coeruleus.
LPB	porción lateral del núcleo parabraquial.
LPBc	tercio caudal de la porción lateral del núcleo parabraquial.
LPBi	tercio intermedio de la porción lateral del núcleo parabraquial.
LPGi	núcleo reticular paragigantocelular lateral.
MPB	porción medial del núcleo parabraquial.
NTS	núcleo del tracto solitario.
PAG	sustancia gris periacueductal.
PGNC	grupo pregabalina + dolor nociceptivo.
PGNP	grupo pregabalina + dolor neuropático.
PrH	núcleo prepósito del hipogloso.
RMg	núcleo del rafe magno.
RVM	región rostral y ventromedial del bulbo raquídeo.
SAL	sistema anterolateral.
vIPB	subnúcleo ventral de la porción lateral del núcleo parabraquial.



# **01 INTRODUCCIÓN**



## 1.-Concepto y Epidemiología del Dolor

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”**. (1)

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;
- d) **comportamentales**, que se manifiestan por los gestos y las actitudes frente al dolor.

En las sociedades occidentales la demanda de medicamentos o técnicas analgésicas no deja de incrementarse, de forma que se han conseguido avances relevantes tanto en la obtención de nuevos fármacos analgésicos como en las formas de administración de los mismos.

El dolor, además de tener una **dimensión individual** (*psicológica, familiar, social y laboral del individuo*) tiene una importante **repercusión social y económica**, que genera elevados costes tanto directos (gastos por asistencia sanitaria, compensación económica por enfermedad, incapacidades, etc. como indirectos: falta de ingresos del trabajador autónomo, para el Estado por la disminución o cese de la actividad en el trabajo, etc. El coste de estos últimos es el doble de los directos y sólo el reconocimiento de sus manifestaciones clínicas y la instauración de un tratamiento adecuado y temprano podrían minimizar las repercusiones descritas.

Según el estudio “*Pain in Europe*” (2, 3), realizado sobre más de 46.000 pacientes de 16 países, entre octubre de 2002 y junio de 2003, el dolor crónico es un problema extenso que afecta a 1 de cada 5 individuos, y en uno de cada tres hogares existe algún miembro que experimenta dolor. Además, la mitad de los individuos con dolor crónico sufre dolor severo.

La prevalencia en Europa se sitúa en el 19% (cerca de 75 millones de personas), aunque existen algunas diferencias entre países, es más alta en Italia, Noruega y Polonia, y más baja (11%) en España (5% de dolor moderado y 6% severo). Esta misma encuesta refiere, que el dolor es la consulta más frecuente en Atención Primaria, y sólo el 23% de los pacientes acude al especialista (2). En Europa el dolor es responsable de la pérdida de 500 millones de días laborales/año, lo que supone a la economía europea cerca de 34 mil millones de euros (2).

El dolor crónico y dentro de éste, el **dolor neuropático**, recientemente definido como **“el dolor producido por lesiones y enfermedades que afectan a las vías somatosensitivas dentro del sistema nerviosos periférico o central”** (4) es un problema frecuente en

la práctica clínica y por lo general se manifiesta como un síntoma crónico y persistente. (5).

El manejo del dolor neuropático crónico representa un importante problema de salud pública, ocasionando amplios costes sanitarios y severa afectación funcional en los pacientes que lo padecen (6, 7). Se ha estimado una prevalencia entre el 1,5% -8% (8, 9) en la población general. Un reciente estudio realizado en Estados Unidos (10) muestra que el 20% de los pacientes remitidos a las unidades de dolor son diagnosticados de dolor neuropático.

En un estudio realizado en Canadá (11), la prevalencia del dolor crónico fue del 35 % de la población inspeccionada (1.207 pacientes), presentando síntomas de dolor neuropático el 17.9 %. El grupo de dolor neuropático, con predominio en mujeres, tenía la creencia de ser más perjudicado económicamente, sufriendo más restricciones en su movilidad y en sus actividades habituales (11).

Entre 1990 y 2004 se realizó una revisión sistemática de la bibliografía sobre la prevalencia del dolor neuropático en España, encontrándose una media de tres publicaciones/año (12). Las cifras de prevalencia oscilaron considerablemente según la población estudiada, definición de dolor o síndrome doloroso y tiempo de evolución. Los cuadros clínicos más frecuentemente estudiados fueron neuropatías y polineuropatías (42%), esclerosis múltiple (35%) y síndromes de atrapamiento (16%). Algunos episodios de DN quedaron sin tratar.

En un trabajo publicado en 2003 (13), se indica que más de la mitad de las personas que sufren dolor crónico no está satisfecha con su medicación, que supone un gasto de más de 3.000 millones de euros cada año a las arcas de la Sanidad pública española. Según la Sociedad Española del Dolor (el 29% de los pacientes), suelen recurrir a la

automedicación para tratar su dolor. Las consecuencias que pueden derivarse en cuanto a mal control, efectos adversos y el riesgo de interacciones suponen un incremento del gasto frente al previamente descrito. El estudio *DONEGA*, realizado en España en pacientes con dolor neuropático, la prevalencia de los síntomas de ansiedad o depresión fue considerable, rondando o superando el 20% (14).

### 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).

Nosotros, desde un punto de vista anatómico, utilizaremos una clasificación basada en el origen del dolor:

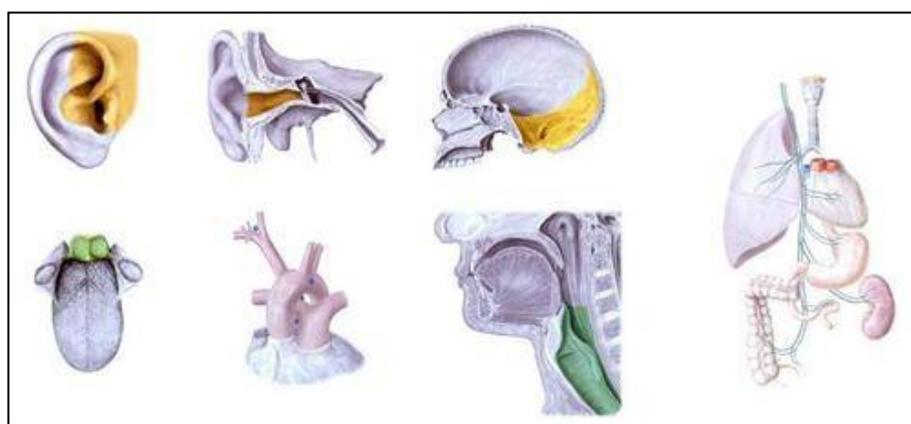
1) dolor **nociceptivo** o **no-neuropático**: si el dolor es debido a una patología situada en tejidos no neurales. Éste, a su vez, puede subdividirse según la localización anatómica de los nociceptores activados en tres tipos de dolor (15):

a) El dolor **nociceptivo 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

b) El dolor **nociceptivo 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.

c) El dolor **nociceptivo visceral**: se origina en las vísceras y órganos internos cuando éstos son irritados (fig.1.1). 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...).



**Fig.1.1.** Representación de las principales estructuras responsables del dolor visceral

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) dolor **neuropático**: si el dolor es debido a una lesión en el propio sistema nervioso. Serra (16) lo definió como un tipo de dolor generado por lesiones producidas directamente sobre el sistema nervioso central o periférico, es decir, el dolor que aparece como consecuencia de lesiones del propio sistema de recepción, conducción, y análisis de los estímulos nociceptivos, y no por la captación de estímulos originados fuera del sistema nervioso. Se caracteriza, entre otras manifestaciones, por alodinia, hiperalgesia, hiperestesia y parestesia, atribuibles a una hiperexcitabilidad de la membrana axonal. Este tipo de dolor puede presentarse espontáneamente en ausencia de lesión causal, o incluso aparecer por el tacto o estímulo mecánico de baja intensidad, donde el sistema nociceptivo se comportará de forma anormal, no existiendo relación causal entre lesión tisular y dolor. Éste sería el que nos encontraríamos en numerosas patologías de etiología diversa como la autoinmune (ej. la esclerosis múltiple), la metabólica (ej. la neuropatía diabética), la infecciosa (ej. la neuralgia postherpética), la vascular (ej. infarto), la traumática, la neoplásica,...

## 2.-Pregabalina

Durante las últimas décadas, los avances en el conocimiento de los mecanismos subyacentes al dolor han sido sustanciales, lo que a su vez ha estimulado la búsqueda y hallazgo de nuevas estrategias terapéuticas. Especialmente intensa, por necesaria, ha sido la actividad en el campo del dolor neuropático. Los pacientes aquejados de esta sintomatología son remitidos con frecuencia a las unidades de dolor debido a la refractariedad a las terapias analgésicas convencionales, incluidos, en no pocos casos, los opiáceos (17).

La lesión tisular inicia una serie de cambios, inicialmente

reversibles, en las vías dolorosas, tanto periféricas como centrales, que hacen que la información aferente pase a ser procesada por el sistema de un modo patológico (17). A nivel periférico, el daño tisular provoca una respuesta inflamatoria local con sensibilización de los nociceptores, transducción alterada e incremento de los impulsos nociceptivos conducidos hacia el sistema nervioso central. A su vez, la señal dolorosa procedente de estos nociceptores sensibiliza las neuronas secundarias de la vía dolorosa situadas en el asta posterior de la médula espinal. Finalmente, la actividad subsiguiente de nociceptores y fibras A-beta no dolorosas irá ampliándose provocando aumento del dolor, hiperalgesia y alodinia. En algunos pacientes, estos cambios pueden convertirse en modificaciones irreversibles en el circuito doloroso, apareciendo de este modo el dolor neuropático.

La falta de respuesta del dolor neuropático al tratamiento con analgésicos comunes, o en muchas ocasiones incluso a los opiáceos, ha llevado a los terapeutas a dirigir su mirada hacia otras soluciones farmacológicas. De entre todas las propuestas, actualmente una de las que se está reivindicando cada vez con mayor fuerza es el uso de fármacos antiepilépticos, que están demostrando ser una alternativa válida al tratamiento del dolor neuropático (18).

El mecanismo de acción de estos fármacos anticonvulsivantes es diferente al de los analgésicos tradicionales: mientras estos últimos reducen las señales aferentes procedentes tanto de tejido sano como de tejido lesionado, los fármacos antiepilépticos no tienen un efecto *per se* sobre la nocicepción sino que reducen la hiperexcitabilidad de las neuronas del asta posterior inducida por el daño tisular. Podríamos, por ello, denominarlos más bien antihiperalgésicos que antinociceptivos.

Uno de los fármacos antiepilépticos que primero se probaron en el tratamiento del dolor neuropático fue la gabapentina (19, 20). En la

actualidad, sin embargo, este fármaco original está siendo sustituido por nuevos derivados con el fin de aumentar su eficacia y reducir sus efectos adversos, entre los que destaca la pregabalina.

La pregabalina es el enantiómero S farmacológicamente activo del ácido 3-aminometil-5-metil-hexanoico, que es similar a su predecesor la gabapentina. Su mecanismo de acción no es conocido todavía con exactitud. A pesar de su nombre y del de su molécula predecesora (la gabapentina) no tiene acción directa gabaérgica, ni bloquea la recaptación de GABA ni su metabolismo. Se sabe, sin embargo, que la pregabalina, al igual que la gabapentina, se une a la subunidad proteica  $\alpha_2\delta$  de los canales de calcio voltaje-dependientes, lo que podría explicar su efecto antihiperalgésico (21).

La pregabalina ha demostrado actividad antialodínica y antihiperalgésica en varios modelos de dolor neuropático en roedores (22, 23, 24), observándose estos efectos con dosis de 2 a 4 veces inferiores a las de gabapentina. Además presenta una tolerabilidad mayor que con otros anticonvulsivantes, incluida la gabapentina. Los acontecimientos adversos más frecuentes son: mareos, somnolencia, edemas periféricos, cefalea, visión borrosa y estreñimiento, siendo todos ellos habitualmente de intensidad leve a moderada.

La pregabalina se emplea actualmente en nuestro país en diferentes tipos de dolor neuropático (25, 26). Sin embargo, su importancia e interés clínico podría verse ampliado, ya que también se está valorando su eficacia en la **analgesia preventiva**: una técnica que 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 (dolor postquirúrgico) con el fin de minimizar estos efectos desagradables desde el mismo 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 (27).

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 (28), lo cual fue rápidamente contestado por numerosos y prestigiosos investigadores que defendían no sólo la necesidad de la experimentación animal en el 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 (29,30).

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 (31).

Como ya hemos indicado, una de las mayores indicaciones de la analgesia preventiva sería el dolor postquirúrgico. 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 continúa. 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.

De hecho, el dolor post-quirúrgico puede ser considerado como un tipo de dolor neuropático que podríamos considerar transitorio o reversible. Estudios preclínicos han demostrado que la incisión quirúrgica en la pata de la rata es seguida por una hiperalgesia térmica y mecánica prolongada, como expresión clínica de una sensibilización central (32). Estos datos ponen de manifiesto que la sensibilización del asta posterior de la médula, aunque será reversible en la mayoría de pacientes quirúrgicos, puede ser un mecanismo algésico importante en los primeros días o semanas post-intervención. Los fármacos antihiperalgésicos, como la pregabalina, se convierten de este modo en analgésicos post-quirúrgicos atractivos porque ofrecen la posibilidad de bloquear el dolor patológico, mientras que permitirían el dolor fisiológico, que sería de utilidad por su función protectora y de alerta.

Asimismo, la acción de la pregabalina sería de interés en el dolor post-quirúrgico si tenemos en cuenta que el mecanismo de acción de estos fármacos anticonvulsivantes difiere por completo del de los opiáceos, por lo que evita la disminución de la motilidad intestinal, uno de los principales efectos adversos de los opioides en los pacientes post-quirúrgicos (33). Estos datos experimentales han sido corroborados en el único ensayo clínico doble-ciego, controlado con placebo, en dolor postquirúrgico dental, y donde los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con 300 mg de pregabalina y el grupo tratado con placebo (34).

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.

A pesar de todo lo dicho, 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 a los opiáceos, como es la pregabalina, en el tratamiento del dolor postquirúrgico.

Sin embargo, no se ha investigado suficientemente el sustrato anatómico en que se sustenta el efecto analgésico de esta sustancia antiepiléptica. Aunque es lógico pensar que un mayor conocimiento del mecanismo de acción de la pregabalina no sólo mejoraría su eficiencia en el tratamiento de las indicaciones terapéuticas ya establecidas (como el dolor neuropático), sino que permitiría potencialmente ampliarlas (por ejemplo al dolor postquirúrgico).

### **3.-Sustrato Anatómico de la Transmisión Nociceptiva.**

Cualquier 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 resultados previos como representativos de la organización anatómica de la transmisión nociceptiva de los mamíferos.

#### **3.1.- Receptores.**

Básicamente existen cinco tipos de receptores sensoriales (35): 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 (tabla 1.1).

<b>Categoría</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función</b>
<b>Mecanorreceptores</b>	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)
<b>Nociceptores</b>	A-delta mecánicos (terminaciones nerviosas libres)	Dolor a un pinchazo
	C-polimodales (terminaciones nerviosas libres)	Lesión tisular
<b>Termorreceptores</b>	Corpúsculos de Ruffini	Calor
	Corpúsculos de Krause	Frío

**Tabla 1.1.-** Clasificación de los receptores somatosensoriales.

Los **nociceptores** o receptores encargados de recoger la información de naturaleza dolorosa, fueron definidos por Sherrington (36) 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 es el caso en otros tipos de receptores (15, 35, 37, 38, 39).

Estas terminaciones corresponden a fibras nerviosas de *tipo A $\delta$* , 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 vísceras y órganos internos como la hoz y tienda del cerebelo, corazón, pleura, cavidad abdominal, vesícula biliar y testículos (*origen del dolor visceral*) (35).

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 (35, 37). Por todo ello, actualmente se tiende a aceptar la existencia de tres tipos de nociceptores, según la naturaleza del estímulo algésico (35): 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 (35).

### 3.2.- 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 (tabla 1.2): las *fibras A $\delta$* , escasamente mielinizadas, de entre 2-5  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  y una velocidad de conducción de 0,5-2 m/s (15, 35, 37, 38).

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

**Tabla 1.2.-** Clasificación de las 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 (35).

### 3.3.- Asta Posterior o Dorsal de la Médula.

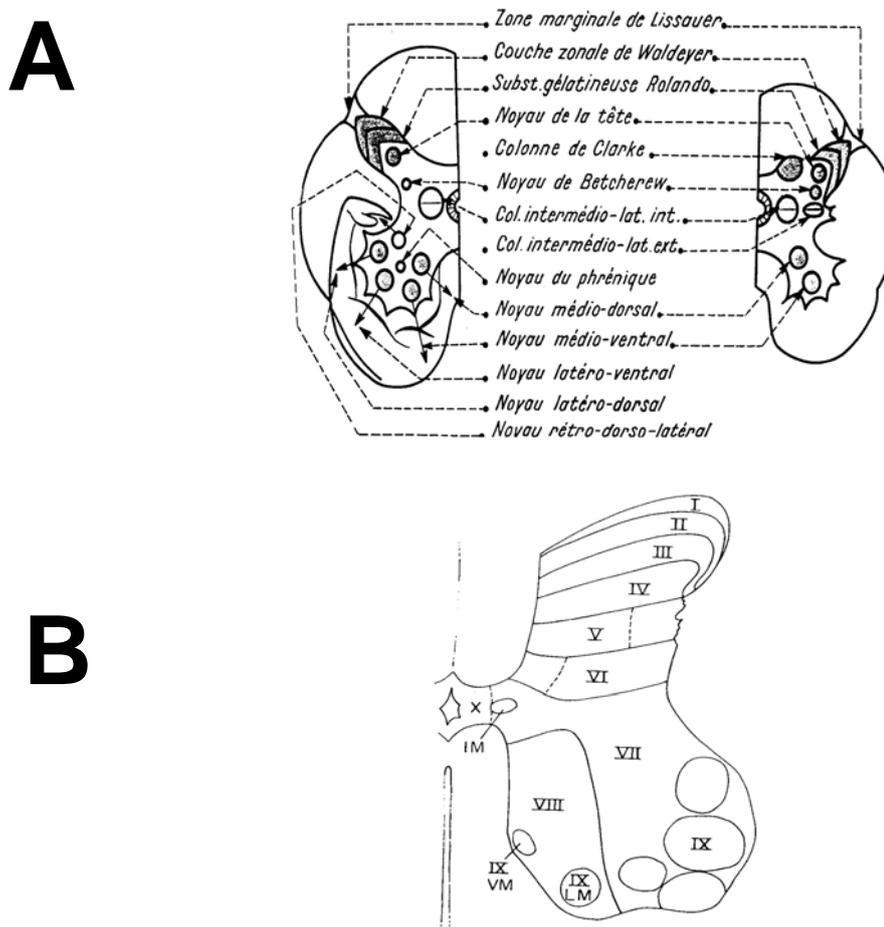
La sustancia gris medular está formada por una gran cantidad de elementos celulares agrupados en una serie de núcleos o láminas, más o menos superponibles, según la clasificación clásica o la de Rexed, respectivamente (tabla 1.3).

Región	Láminas de Rexed	Núcleos
<b>Asta dorsal</b>	I	Zona marginal
<b>Asta dorsal</b>	II	Sustancia gelatinosa
<b>Asta dorsal</b>	III,IV	Núcleo propio o en cabeza
<b>Asta dorsal</b>	V,VI	Núcleos de Clarke y de Bechterew
<b>Asta intermedia</b>	VII	Núcleos intermediomedial e intermediolateral
<b>Asta ventral</b>	VIII,IX	Núcleos motores
<b>Zona periependimaria</b>	X	Núcleo periependimario

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

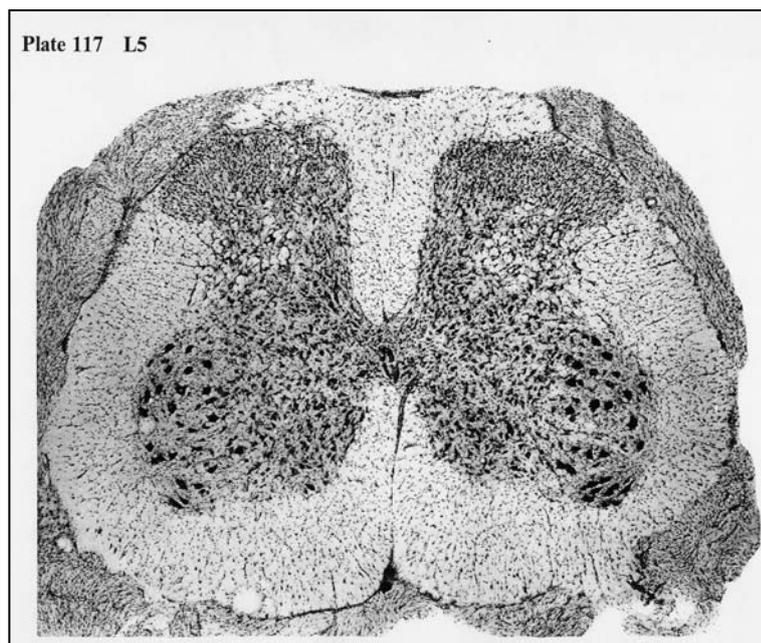
Las fibras que conducen la información nociceptiva al entrar en la médula forman parte del fascículo o tracto de Lissauer (35,37, 38). En este punto se dividen en una rama ascendente y otra descendente que, tras

recorrer varios segmentos medulares en ambos sentidos, penetran siempre en el interior del asta posterior medular (fig.1.2).



**Fig.1.2. (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 (23). **(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 (38).

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 (Ile), 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 (37).



**Fig.1.3.** Microfotografía (4x) correspondiente a una sección horizontal de la médula espinal de rata a nivel del mielómero L5 (tomada de Paxinos y Watson (40)).

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 (fig.1.3). 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 Iie*, que recibe información de naturaleza nociceptiva. En la *lámina Iio* encontramos dos tipos de neuronas, descritas en 1909 por Cajal, las células en tallo (stalk cells) y las células isletas (islets cells) (41). Estas células reciben aferencias primarias nociceptivas y envían proyecciones, principalmente, a las neuronas de la *lámina I* (42). En relación al primer tipo se sugiere que son interneuronas excitadoras de las neuronas de proyección nociceptoras, mientras que el segundo tipo serían inhibitorias. 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 $\delta$  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 el cerebro. Señalar, por último, que las células de la *lámina X* de Rexed, correspondiente al centro desflechado viscerosensible, reciben la información nociceptiva de origen visceral (43).

### 3.4.- 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, cinco: 1) el haz espinotalámico lateral, 2) el haz espinoreticular, 3) el haz espinomesencefálico (estos tres haces se incluyen, actualmente dentro del llamado sistema anterolateral), 4) el haz espinocervicotalámico y 5) el haz espinohipotálamico (15, 35, 37, 38, 39).

El *haz espinotalámico lateral* es la vía nociceptiva ascendente más destacada. Las neuronas nociceptivas cuyos axones contribuyen a formar este haz tienen su ubicación, principalmente, en las láminas I, IIe y V medulares, junto con la *lámina X* (37). 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* (35, 37, 39).

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* (35, 37, 39).

Otra parte de las fibras dolorosas del SAL continúan hasta el mesencéfalo, concretamente, hasta la *sustancia gris periacueductal*, el *núcleo cuneiforme* y las *capas profundas del colículo superior* (35, 37, 39), así como al *núcleo parabraquial* y *área pretectal anterior* (39). La importancia de estas proyecciones mesencefálicas ha hecho que algunos autores las hayan considerado como un haz independiente, denominándolo *haz espinomesencefálico* o *espinotectal*. Debido a las conexiones de alguno de estos centros (como el parabraquial) con el *cuero amigdalino*, el componente principal del sistema nervioso implicado en las emociones, se piensa que este haz espinomesencefálico contribuiría de forma esencial al componente afectivo-emocional del dolor (39).

También se ha descrito, un *haz espinocervicotalámico* (35, 37, 39), 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 (37), y V (39), dirigiendo sus axones ipsilateralmente por el cordón lateral de la médula hasta el *núcleo cervical externo o 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 (37).

Por último, mencionar el haz espinohipotálamico, que se dirige a los

centros de control autónomo supraespinales que activarían respuestas neuroendocrinas y cardiovasculares complejas en respuesta al dolor.

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 (35, 39) y SmII (35). Parte de la información nociceptiva, en concreto la vísceronociceptiva, va a llegar también a las neuronas de la corteza de la ínsula de Reil (35).

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 (35), la *amígdala* para dotarla de un significado emocional (35, 39) y el hipotálamo para desencadenar las respuestas vegetativas correspondientes (35).

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.

## 4.- 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 por la actuación de sustancias naturales que existen en el cerebro con las propiedades farmacológicas de los opiáceos.

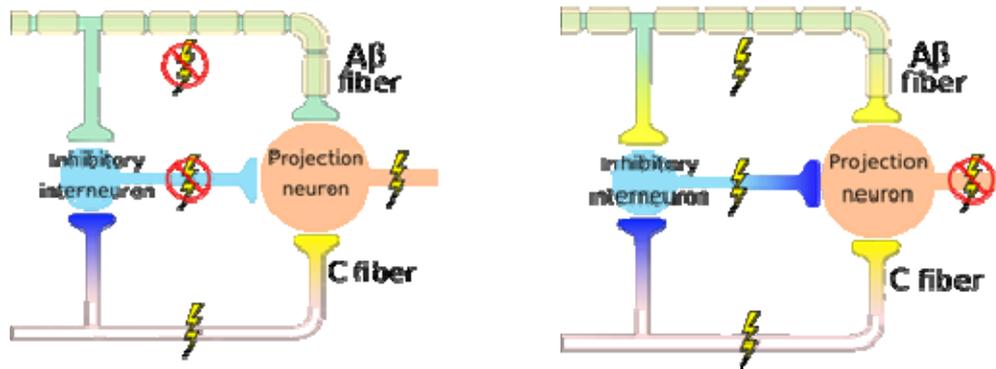
Los primeros autores que sugirieron la existencia de un mecanismo de control de la información nociceptiva aferente a la médula espinal fueron Melzack y Wall (fig.1.4)(44). Estos autores propusieron la *teoría de la puerta de control* para el dolor (fig.1.5). La esencia de esta teoría es que un estímulo (aplicado, por ejemplo, a la piel) activa a las fibras tanto de diámetro grande ( $A\beta$ , mielínicas, no nociceptivas) como a fibras finas nociceptivas ( $A\delta$  y C, escasamente mielínicas o amielínicas). Las fibras de mayor diámetro excitarían a las 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).



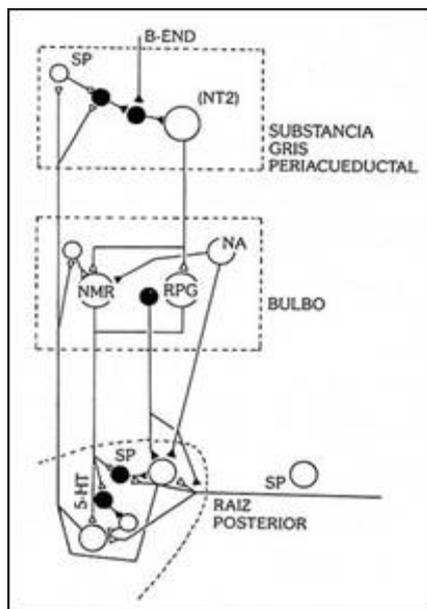
**Fig.1.4.** Patrick Wall (izda) y Ronald Melzack (dcha).

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 (44).



**Fig.1.6.** Esquema que ilustra el modelo de control descendente del dolor.

Sin embargo, las pruebas de confirmación de la existencia de este sistema de analgesia endógeno planteaban 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 (45).

Basándose en estos datos, (46, 47, 48)

elaboraron una hipótesis acerca de cuál sería la estructura de este circuito endógeno de modulación de la información nociceptiva (fig.1.6). 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  $\beta$ -endorfinas, encefalinas y dinorfinas). Este supuesto está apoyado 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, se 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 inhibidora, que a su vez, recibiría impulsos inhibidores de interneuronas productoras de opiáceos endógenos o de neuronas hipotalámicas  $\beta$ -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 excitadora, 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 inhibidoras 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 inhibitoras (endorfinérgicas y gabaérgicas).

#### 4.1.- La Sustancia Gris Periacueductal.

La sustancia gris periacueductal (PAG), tanto en el ser humano (49,50) como en el resto de los mamíferos (51) 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 (52, 53) 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 técnicas de Golgi (54) 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 (55), la PAG de la rata recibe y proyecta a todos los niveles del sistema nervioso central (51, 56, 57, 58).

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 (51): 1) Las monoaminas (*adrenalina, noradrenalina, histamina y serotonina*) y la acetilcolina; 2) Los aminoácidos simples (*glutamato, aspartato y ácido  $\gamma$ -aminobutírico o GABA*); 3) Los neuropéptidos (*neurotensina, sustancia P, enkefalina,  $\beta$ -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 (59, 60), repuestas

autónomas (61, 62, 63), vocalización (64, 65), comportamientos sexuales (66, 67) o modulación del dolor (48, 63, 68, 69, 70). 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 (48, 63, 68, 69, 70). Actualmente, sin embargo, se considera a la PAG como 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 (63, 71).

La mayoría de estudios citoarquitectónicos de 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 (53, 72, 73, 74, 75).

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 (60, 65, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82).

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. (83) 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 dorsomedial; 2) Columna dorsolateral; 3) Columna lateral; y 4) Columna ventrolateral. Una revisión de esta teoría ha sido recientemente publicada (84).

Sin embargo, desde que surgió la hipótesis de la organización en columnas de la PAG, 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 (85), o fusión de dos columnas en una en otros (51), siendo clave en todos los estudios la herramienta utilizada para identificar las diferentes columnas (75). Tales estudios han perseguido también definir conexiones intrínsecas en la PAG que servirían de nexo entre las diferentes columnas longitudinales propuestas (86, 87).

Uno de los primeros objetivos que se plantearon los investigadores fue comprobar si a cada tipo neuronal o columnas correspondía a 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 (69, 70, 88, 89, 90). 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.

#### 4.2.- 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 (48, 68). La RVM actúa como 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 (91, 92).

Las principales aferencias a los núcleos de esta región troncoencefálica proceden de la PAG y el núcleo cuneiforme (68, 93), así como de la formación reticular bulbar dorsal adyacente y el tegmento pontino dorsolateral (68). Otras aferencias a la RVM tienen su origen en estructuras diencefálicas y telencefálicas como son: el hipotálamo, cortex frontal, la amígdala, y el núcleo de la *stria terminalis* (68, 94).

En cuanto a las eferencias de la RVM, estas alcanzan mayoritariamente el asta posterior de la médula (95, 96), especialmente a las láminas I, II, V, VI y VII (68). Aunque, también, proyectan a diferentes estructuras diencefálicas (95).

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 (48, 68, 95). Las neuronas de la RVM son la principal fuente de serotonina que llega al asta posterior de la médula espinal (68). El bloqueo de la acción de la serotonina a nivel de la RVM o del asta posterior de la médula reduce, o incluso elimina, el efecto

analgésico de la morfina (68). Por otra parte, 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 (68). También desempeñan una función importante el GABA y la enkefalina (68, 93). La primera facilita la transmisión de la información nociceptiva, mientras que lo segundo bloquea 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 tirotropina o TRH y colecistoquinina*), como en los terminales aferentes a estos centros (*norepinefrina, neurotensina, glutamato, aspartato y acetilcolina*) (39, 48, 68, 93).

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 (39, 48, 68).

Estudios fisiológicos han permitido la identificación de tres tipos neuronales en el RVM, atendiendo a los cambios en la frecuencia de descarga inmediatamente antes de producirse el reflejo nociceptivo como consecuencia de un estímulo doloroso (68, 97):

1) Células ON: Sufren un súbito incremento en la frecuencia de descarga justo antes de producirse el reflejo de retirada. Las células ON son 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 (68). Por tanto, la activación de las células ON facilitaría la transmisión de la información nociceptiva a nivel del asta posterior de la médula espinal (68, 97).

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 (68). Por tanto, su activación dificultaría la transmisión de la información dolorosa a nivel del asta posterior de la médula espinal (68, 97).

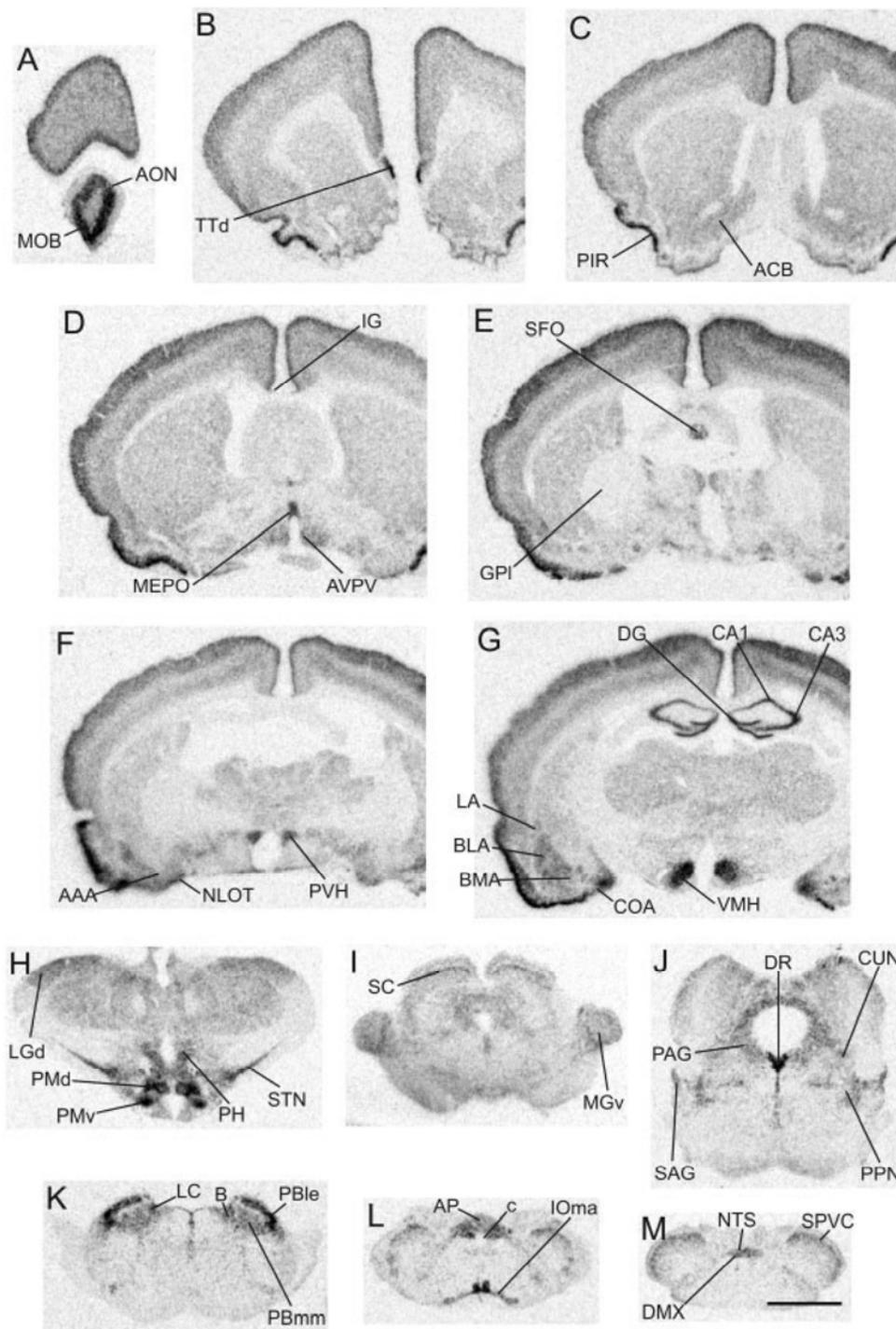
3) Células NEUTRAS: Son aquellas que no experimentan ningún cambio en la frecuencia de sus descargas previo al reflejo de retirada que aparece tras una estimulación dolorosa (68).

#### 4.3.- Otros Núcleos implicadas en la Modulación de la Transmisión Nociceptiva.

Desde que Basbaum y Fields (48) 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, 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 (*nociceptivo somático superficial, nociceptivo visceral, neuropático,...*).

Dado que nuestro trabajo va a profundizar en el sustrato anatómico del efecto analgésico de la pregabalina, seleccionaremos para nuestro estudio aquellos núcleos troncoencefálicos donde se ha detectado una mayor cantidad de mRNA de la subunidad alfa-2-delta-1 ( $\alpha 2\delta-1$ ) de los canales de calcio voltaje dependientes (98), la proteína a la que específicamente se une la pregabalina, y que se piensa que es donde reside su capacidad antihiperálgica (fig.1.7): el núcleo del tracto solitario (NTS), la porción lateral del núcleo parabraquial (PBL), el locus coeruleus (LC) o el

núcleo dorsal del rafe (DR).



**Fig. 1.7.** Distribución del mRNA de la subunidad alfa-2-delta-1 ( $\alpha 2\delta$ -1) de los canales de calcio voltaje dependientes. Tomado de Cole y cols. (98).

#### 4.3.a.- Núcleo del Rafe Dorsal.

El núcleo del rafe dorsal (DR) es el más grande de todos los núcleos del rafe, y es también, el núcleo que posee una mayor concentración de neuronas serotoninérgicas en todo el sistema nervioso central (99).

Es una estructura alargada localizada en la porción caudal de la PAG. Se extiende desde el polo caudal del complejo nuclear oculomotor hasta el segmento pontino. Lateralmente, se halla limitado por la PAG, en su porción mesencefálica, y por la sustancia gris periventricular del IV ventrículo, en su porción más caudal (99).

En la porción mesencefálica se han distinguido 4 subdivisiones, mientras que en la porción más caudal tan sólo ha sido identificada una región. El tamaño y morfología de las neuronas que forman el DR varía desde las pequeñas y esféricas (14  $\mu\text{m}$  de diámetro), hasta las grandes (35  $\mu\text{m}$ ) y multipolares, pasando por las de diámetro intermedio (24  $\mu\text{m}$ ) y aspecto fusiforme (99).

El DR recibe aferencias tanto descendentes como ascendentes. Entre las aferencias descendentes destacan las procedentes de la región habenuar, del cortex prefrontal y cingular, del hipotálamo y de la retina (99). Las aferencias ascendentes proceden del locus coeruleus, el núcleo tegmental laterodorsal, núcleos parabraquiales, sustancia gris del puente, sustancia negra, formación reticular del bulbo y de otros núcleos del rafe (99).

Las proyecciones originadas en el DR también pueden agruparse en ascendentes, las que se dirigen hacia los bulbos olfatorios, el hipotálamo, área septal, tálamo, caudado y putamen, hipocampo y corteza cerebral (99), y descendentes, aquellas que se dirigen al área tegmental dorsal y

ventral, locus coeruleus, núcleo parabraquial, complejo interpeduncular, sustancia negra, RMg y médula espinal cervical (39, 99).

En cuanto a la quimioarquitectura del DR, al igual que en otros núcleos del rafe, la serotonina es el principal neurotransmisor (39, 99, 100). Pero, también han sido identificados la encefalina y el GABA (39), así como fibras  $\beta$ -endorfinérgicas (101, 102).

El DR ha sido relacionado con la regulación de diversas funciones tales como la temperatura corporal, el sueño, la actividad cardiovascular, la secreción hormonal, el comportamiento sexual y motor, así como la modulación del dolor (101). Son numerosos los estudios que han observado una potente analgesia tras la estimulación eléctrica del DR o tras la inyección en el DR de morfina (101).

#### 4.3.b.- Locus Coeruleus.

El locus coeruleus (LC) es un grupo relativamente compacto y homogéneo de células situado en el tegmento pontino. Se extiende desde la rodilla del nervio facial (caudalmente) hasta alcanzar la PAG (rostralmente). Limitado dorsalmente por el pedículo cerebeloso superior, lateralmente por el núcleo mesencefálico del trigémino y el núcleo parabraquial, y ventral y medialmente por la sustancia gris del puente (103).

Se han descrito hasta tres tipos celulares en su constitución: un tipo neuronal de soma grande y multipolar, otro de tamaño intermedio y fusiforme y un tercero pequeño y redondeado u ovoide (103). Basándose en estos criterios citoarquitectónicos, el LC se ha dividido en dos subnúcleos: uno dorsal, formado por pequeñas células fuertemente empaquetadas, y otro ventral, compuesto por células más grandes y agrupadas con una menor densidad (103).

El LC recibe aferencias principalmente de dos centros (103): el LPGi y el núcleo prepósito del hipogloso (PrH). También se han demostrado, aunque en menor cantidad, aferencias procedentes del núcleo paraventricular hipotalámico y la zona intermedia de la sustancia gris de la médula espinal (103), del cortex insular, la amígdala central, el núcleo parafascicular talámico, el núcleo cuneiforme, la PAG, el DR, el núcleo del tracto solitario y los núcleos vestibulares (103).

Las proyecciones originadas en el LC son muy extensas llegando a prácticamente todos los niveles del neuroeje. En general, podemos clasificarlas en cinco grupos: las que proyectan al hipocampo, las neocorticales, las hipotalámicas, las cerebelosas y las medulares (103).

El más importante de los neurotransmisores localizado en las neuronas del LC es la noradrenalina o norepinefrina (103). Pero también han sido identificados en las neuronas del LC otras sustancias como la galanina, el neuropéptido Y, la vasopresina, la neurofisina, la neurotensina, el VIP, el factor natriurético atrial y la serotonina (103).

El LC ha sido implicado en diversas actividades fisiológicas tales como el sueño, la atención, la memoria, la vigilancia o la analgesia (103). En relación a este último aspecto, son abundantes los trabajos que destacan que la estimulación eléctrica del LC produce un efecto antinociceptivo en ratas anestesiadas (39).

#### 4.3.c.- Porción Lateral del Núcleo Parabraquial.

El núcleo parabraquial está situado en la porción dorsolateral del puente. Se subdivide en dos partes: una porción medial o ventral (MPB), localizada ventromedialmente al pedúnculo cerebeloso superior, y una porción lateral o dorsal (LPB), localizada dorsolateralmente al pedúnculo

cerebeloso superior. Algunos autores incluyen también al núcleo de Kölliker-Fuse como una tercera parte del núcleo parabraquial, situado ventrolateralmente al pedúnculo cerebeloso superior (104).

El diámetro medio de las células de ambas partes, medial y lateral, del núcleo parabraquial es de aproximadamente 16  $\mu\text{m}$ , con una morfología variada (multipolares, redondeadas, ovaladas o alargadas) (104).

El núcleo parabraquial recibe aferencias fundamentalmente del núcleo del tracto solitario (NTS): el MPB de la mitad rostral del NTS o gustativa, y el LPB de la mitad caudal o viscerosensible. También recibe proyecciones del núcleo ambiguo, del núcleo paraventricular del hipotálamo y de la amígdala (104).

A su vez, el núcleo parabraquial envía proyecciones ascendentes hacia los núcleos del rafe mesencefálico, el tálamo, el hipotálamo, la amígdala y el cortex frontal. Y también posee eferencias descendentes hacia el núcleo ambiguo, el núcleo del tracto solitario y la médula espinal (104).

Entre los neurotransmisores identificados en las neuronas del núcleo parabraquial se incluyen la neurotensina, la enkefalina y la sustancia P (104).

El núcleo parabraquial 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 (105).

#### 4.3.d.- Núcleo del Tracto Solitario.

El núcleo del tracto solitario (NTS) se extiende rostralmente hasta el nivel correspondiente al polo caudal del núcleo del facial. A este nivel, el NTS se encuentra situado dorsomedialmente con respecto al núcleo espinal del trigémino. Caudalmente, llega hasta el extremo inferior de la decusación piramidal. En este extremo caudal, los NTS de ambos lados se fusionan en la línea media para formar el denominado núcleo comisural de Cajal (105).

La mitad rostral del NTS, relacionada con el sistema gustativo (106), ha sido subdividida en cinco subnúcleos (107): medial, ventral, dorsal, rostrocentral y rostrolateral. A su vez, la mitad caudal del NTS, relacionada con la sensibilidad visceral (106), ha sido subdividida en siete subnúcleos (107): gelatinoso, dorsomedial, medial, parvocelular, central, intersticial y ventrolateral.

El NTS recibe aferencias de los nervios craneales V, VII, IX, X, así como de la corteza cerebral contralateral, del área lateral hipotalámica y del locus coeruleus. Sus proyecciones se dirigen hacia los núcleos de los nervios V, VII, IX, X, locus coeruleus, núcleo parabraquial y núcleo de Kölliker-Fuse (105). También reciben información del NTS otras áreas reticulares del tronco de encéfalo relacionadas con el sistema gustativo o con reflejos respiratorios y cardiovasculares (108).

En el NTS, ya sea en el interior de sus neuronas o bien en las fibras tanto aferentes como eferentes, se han identificado una amplia variedad de sustancias químicas, tales como, sustancia P, serotonina, neuropéptido Y, GABA, glutamato, noradrenalina, dopamina, vasopresina, neurotensina, VIP, colecistoquinina, enkefalina y somatostatina (106).

La mitad anterior del NTS ha sido clásicamente implicado en el circuito que conduce la información gustativa hacia la corteza (106), mientras que la mitad caudal ha sido asociada a la sensibilidad visceral general (108). Recientemente, sin embargo, el NTS ha sido relacionado con la producción de analgesia (109, 110, 111, 112, 113, 114, 115).

## **5.- El Proto-oncogén *c-fos*.**

### 5.1.- *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* (116). 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 (117).

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 (116).

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 (116, 118, 119, 120).

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 (117).

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 (117).

Los proto-oncogenes, por tanto, son genes celulares normales a partir de los cuales derivan los oncogenes retrovéricos (116, 117, 118, 119, 120).

Estos proto-oncogenes se denominan con la letra "c" seguida, tras un guión, de las tres mismas letras que caracterizan al oncogén correspondiente (117). 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 (117).

Los productos que codifican estos proto-oncogenes funcionarán como

mensajeros extracelulares polipeptídicos, receptores de superficie celular, proteinquinasas, proteínas G, factores de transcripción nucleares,... (117).

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.

Los proto-oncogenes conocidos hasta el momento se pueden agrupar en 5 familias (117) (tabla 1.4):

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*, *mil*, *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.

### 5.2.- Proto-oncogén *c-fos*.

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 (116, 119, 120).

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) (116, 117, 119, 120).

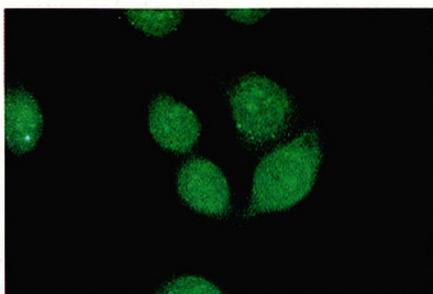
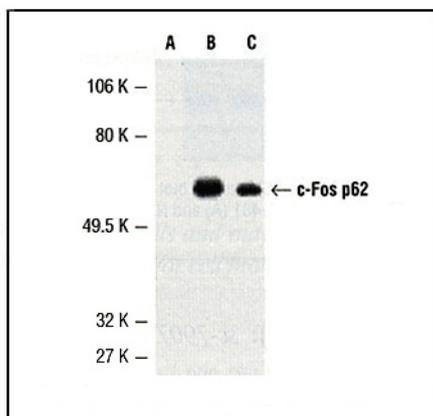
En la mayoría de tipos celulares existen niveles basales de expresión de *c-fos* relativamente bajos. Sin embargo, se ha observado que son muchos los estímulos que pueden inducir la expresión de *c-fos* en mayores cantidades, algunos relacionados con procesos de diferenciación y otros con la excitación 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 (116, 117, 119, 120).

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 (116, 118, 119, 120, 121, 122).

### 5.3.- 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 (29, 86, 123, 124, 125, 126, 127).



**Fig.1.8.** 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 (fig.1.8). 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 tipo de problema (69, 70, 88, 89, 90).

## **02 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**



## **1.- Planteamiento del Problema.**

A pesar de los estudios experimentales en animales con la pregabalina y ensayos clínicos en humanos que avalan el uso clínico de esta sustancia en dolor neuropático, todavía no se conoce en profundidad el sustrato anatómico en el que subyace el efecto analgésico de esta sustancia antiepiléptica (24, 25, 26).

El único trabajo que hemos encontrado que estudia el efecto que la administración de una de estas sustancias anticonvulsivantes, en concreto la gabapentina, tiene sobre la expresión del protooncogen c-fos a nivel de sistema nervioso central, se limita a la médula espinal dejando fuera del estudio niveles supraespinales (128). Nuestra revisión bibliográfica sobre el tema no ha ofrecido ni un solo trabajo en el que se pretenda identificar las estructuras neurales supraespinales que se activan o al menos se ven alteradas tras la administración de pregabalina en animales sanos, o con diferentes tipos de dolor neuropático. Parece, sin embargo, que la identificación de los centros troncoencefálicos que ven alterada su actividad neuronal por la administración de estas sustancias, sería de

gran utilidad para una mejor comprensión de sus mecanismos de acción, lo que permitiría mejorar su eficacia tanto empleado de forma individual como en posibles combinaciones con otros fármacos analgésicos. Basados en los datos ofrecidos por el trabajo de Cole y cols. (98), nuestro estudio se centrará en estudiar el papel que el núcleo del tracto solitario (NTS), la porción lateral del núcleo parabraquial (PBL), el locus coeruleus (LC) o el núcleo dorsal del rafe (DR) juegan en el efecto analgésico de la pregabalina.

## **2.- Hipótesis de Trabajo.**

Ante los antecedentes descritos nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

### **HIPÓTESIS 1**

La pregabalina no debe alterar el patrón de expresión de Fos en los centros troncoencefálicos implicados en el circuito de modulación del dolor en sujetos sanos.

### **HIPÓTESIS 2**

La pregabalina debería modificar el patrón de expresión de Fos en los centros troncoencefálicos implicados en el circuito de modulación del dolor en sujetos a los que se les provoca dolor neuropático.

### **HIPÓTESIS 3**

La pregabalina debe modificar o bloquear la expresión de Fos en el asta posterior de la médula inducida por el estímulo algésico neuropático aplicado.

### **3.- Objetivos**

Tras valorar estos antecedentes nos planteamos los siguientes objetivos:

#### **OBJETIVO 1**

Estudiar el efecto que sobre la expresión de Fos en los centros troncoencefálicos implicados en el circuito de modulación del dolor tendría la aplicación de un estímulo analgésico como una dosis intraperitoneal de pregabalina en animales sanos.

#### **OBJETIVO 2**

Estudiar el efecto que tendría la administración previa de una dosis intraperitoneal de pregabalina sobre la expresión de Fos inducida por un estímulo doloroso, bien nociceptivo o bien neuropático, en los centros troncoencefálicos implicados en el circuito de modulación de dolor,

#### **OBJETIVO 3**

Estudiar el efecto que tendría la administración previa de una dosis intraperitoneal de pregabalina sobre la expresión de Fos inducida por un estímulo doloroso, bien nociceptivo o bien neuropático, en el asta posterior de la médula.

El interés de alcanzar los objetivos propuestos radica en que los estudios clínicos demuestran que la pregabalina tiene un efecto analgésico en aquellos procesos en los que aparece dolor neuropático. Sin embargo, desconocemos los centros nerviosos a través de los cuales ejerce dicha

acción antihiperalgésica. Los analgésicos tradicionales ejercen sus efectos a través de modular la actividad neuronal de los diferentes centros troncoencefálicos integrados en el denominado circuito de control del dolor. Para utilizar de forma más segura y eficaz estos nuevos fármacos es importante identificar los centros nerviosos cuya actividad (medida en forma de alteración del patrón de expresión del protooncogén c-fos) cambia tras la administración de dichas sustancias. La realización del estudio en diferentes condiciones de estimulación algésica nos permitiría, además, conocer hasta qué punto la sustancia objeto de estudio puede bloquear a nivel de asta posterior de la médula la expresión de Fos debida a la llegada a ese nivel de las aferencias dolorosas de naturaleza nociceptiva.

Los objetivos del presente proyecto de investigación persiguen comprobar la veracidad o no de las hipótesis de trabajo planteadas.

# **03 MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1.- Animal de Experimentación.**

El presente trabajo se llevó a cabo en ratas albinas de la cepa Sprague-Dawley, machos, de peso aproximado de 250g (fig.3.1).

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar de laboratorio durante al menos una semana antes del comienzo de la experimentación: ciclos de 12 horas de luz/12 horas de 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.

Los animales se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales (tabla 3.1):

1) **Grupo Control Simulado Fisiológico** (CSF) (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 Pregabalina** (CPG) (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 30 mg/kg de pregabalina. Al igual que en el grupo CSF los animales fueron sacrificados 2 horas y media después del estímulo analgésico.

3) **Grupo Control Dolor Nociceptivo** (CNC) (n=5): Los animales de este grupo recibieron, al igual que los del grupo CSF 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* (129) que consiste en administrar 0,05 ml s.c. de formalina al 5% en la planta de la pata trasera derecha.

4) **Grupo Control Dolor Neuropático** (CNP) (n=5): Los animales de este grupo también reciben 1 ml de suero salino i.p. durante la primera inmovilización. A los 30 min, es decir, durante la segunda

inmovilización, se les aplicó un estímulo doloroso neuropático por constricción crónica del nervio ciático.

Como ya se comentó anteriormente, el modelo de dolor neuropático elegido en este proyecto es el propuesto por Bennet y Xie (130), que consiste en provocar una constricción mantenida del nervio ciático. Se realiza mediante 3 ligaduras separadas 1 mm entre sí en el tronco del nervio ciático a la altura del bíceps femoral, con una seda de 4-0. Los animales son sacrificados a los tres días de la intervención.

5) **Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo** (PGNC) (n=5): Los animales de este grupo reciben 1 ml de analgésico i.p. (correspondiente a una dosis de 30 mg/kg de pregabalina) durante la primera inmovilización. A los 30 minutos de la inyección i.p. del analgésico, es decir, durante la segunda inmovilización, se les aplica un estímulo doloroso nociceptivo (test de la formalina). Los animales son sacrificados a las 2 horas del estímulo doloroso.

6) **Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático** (PGNP) (n=5): Los animales de este grupo reciben 1 ml de analgésico i.p. (correspondiente a una dosis de 30 mg/kg de pregabalina) durante la primera inmovilización. A los 30 minutos de la inyección i.p. del analgésico, es decir, durante la segunda inmovilización, se les anestesia y se les aplica un estímulo doloroso neuropático consistente en la constricción crónica del nervio ciático. Los animales vuelven a recibir otra dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina a las 8 horas de la primera dosis, y continuarán así (una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina cada 8 horas) hasta el momento del sacrificio, que tendrá al tercer día de la intervención, 2 horas y media después de la última dosis de pregabalina.

La manipulación de los animales se hizo siguiendo las recomendaciones éticas para la investigación sobre dolor experimental en animales conscientes (131).

Grupo Experimental	Clave	Número de Animales	Manipulaciones	Estímulo Analgésico	Estímulo Doloroso	
				Pregabalina (mg/kg)	Inflamatorio (test de formalina)	Neuropático (ligadura del n. ciático)
Control Simulado Fisiológico	CSF	5	SÍ	NO	NO	NO
Control Pregabalina	CPG	5	SÍ	30	NO	NO
Control Dolor Nociceptivo	CNC	5	SÍ	NO	SÍ	NO
Control Dolor neuropático	CNP	5	SÍ	NO	NO	SÍ
Pregabalina Dolor Nociceptivo	PGNC	5	SÍ	30	SÍ	NO
Pregabalina Dolor Neuropático	PGNP	5	SÍ	30	NO	SÍ

**Tabla 3.1.-** Resumen global de la casuística.

### 3.- Anestesia y Perfusión

Todos 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 seguía 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 (132, 133).

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 (Modelo PERCOM-I, Selecta).

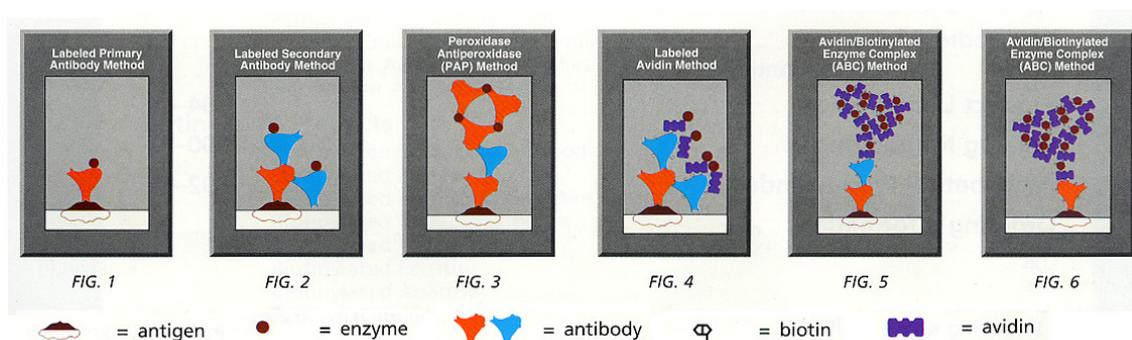
Finalizado el proceso de perfusión, los animales fueron decapitados, y se procedió al descalote y extracción del cerebro. Para ello, se incidió y se retiró la piel y periostio que cubre el cráneo mediante una incisión longitudinal en la línea media. Una vez expuesta toda la superficie del cráneo correspondiente 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 40 µm 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* (134). Los cortes pasarán por sucesivas soluciones (75), que resumimos a continuación (fig.3.2 y 3.3):



**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 peroxidases endógenas.

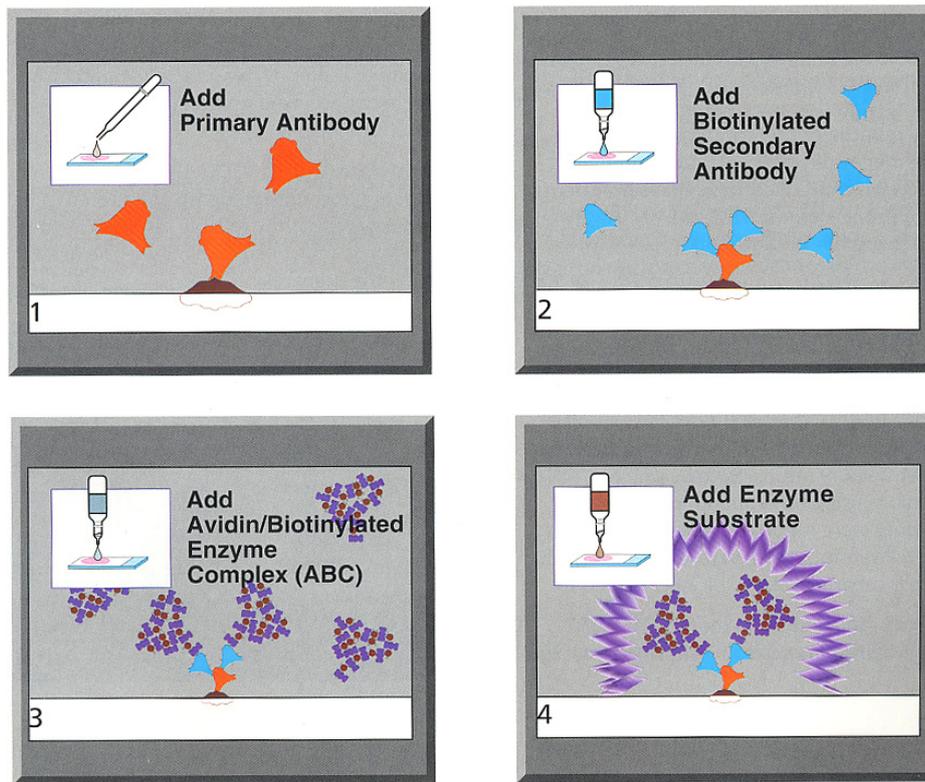
2) 2 horas en PBS con un 0,1% de tritón X-100 (PBS-T, Sigma), para facilitar la penetración de los anticuerpos a través de las membranas celulares, y con un 3% de suero normal de conejo (NRS, Vector) para evitar el marcaje inespecífico.

3) 48-72 horas en PBS-T con el anticuerpo primario anti-c-Fos (en dilución 1:10000, Calbiochem) 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 Laboratories, inc.).

5) 90 minutos en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vector Laboratories, inc.).

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.

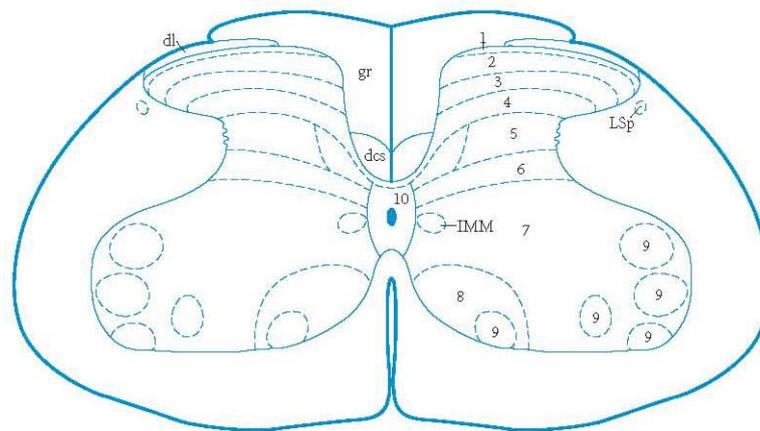
## 6.- Montaje de los Cortes

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

### 7.1.- A nivel medular

Se seleccionaron cortes horizontales de la médula lumbar, correspondientes a los niveles L4/L5 (fig.3.4). La selección se hizo con ayuda del atlas de Paxinos y Watson (40).



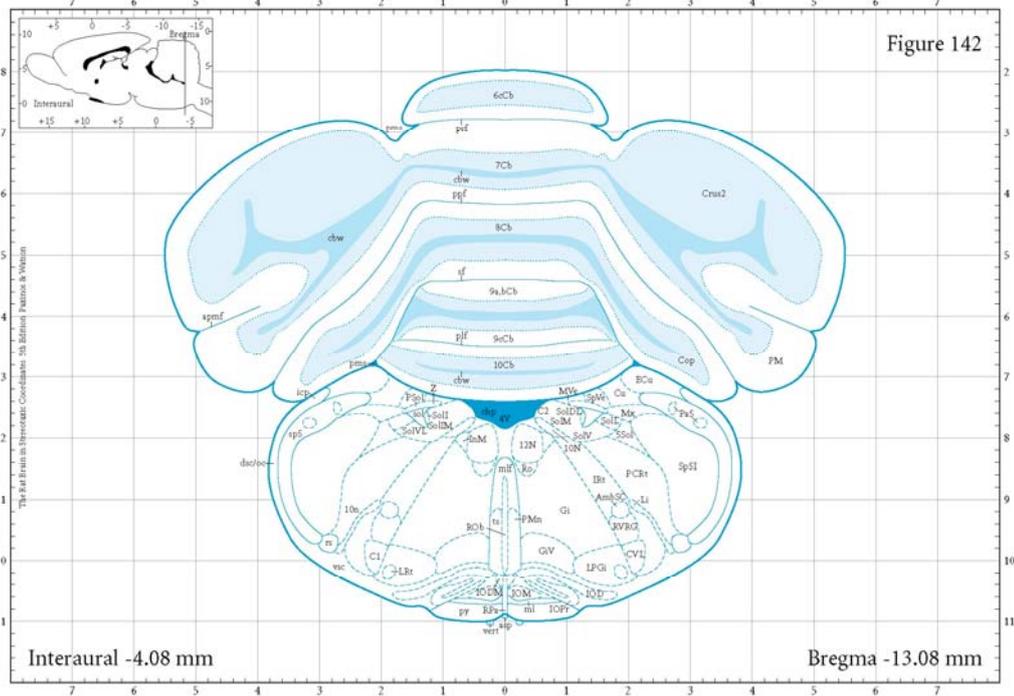
L4

**Fig. 3.4.** Esquema de una sección horizontal de la médula de una rata correspondiente al nivel lumbar cuarto (L4) (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).

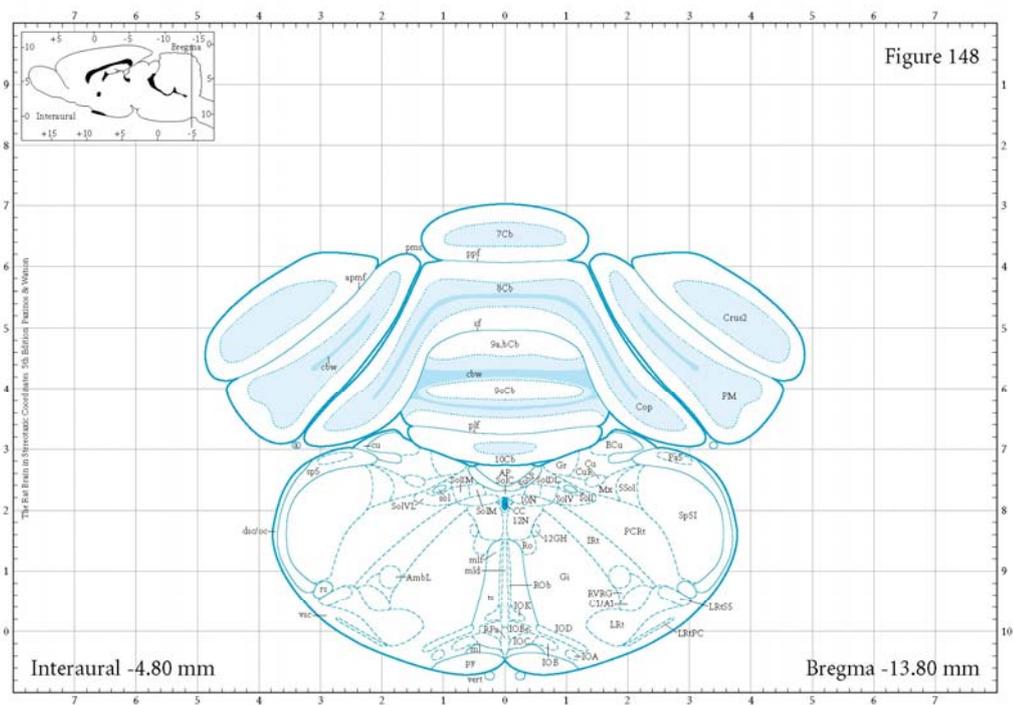
### 7.2.- A nivel troncoencefálico

Se seleccionaron cortes correspondientes al núcleo del tracto solitario, al núcleo parabraquial, al locus coeruleus y al núcleo dorsal del rafe. La selección se hizo con ayuda del atlas de Paxinos y Watson (40). Los niveles de los núcleos objeto de nuestro estudio se localizaron a nivel del tronco de encéfalo:

1) El núcleo del tracto solitario: a -13.08 y -13.80 mm de Bregma (fig.3.5 y 3.6).

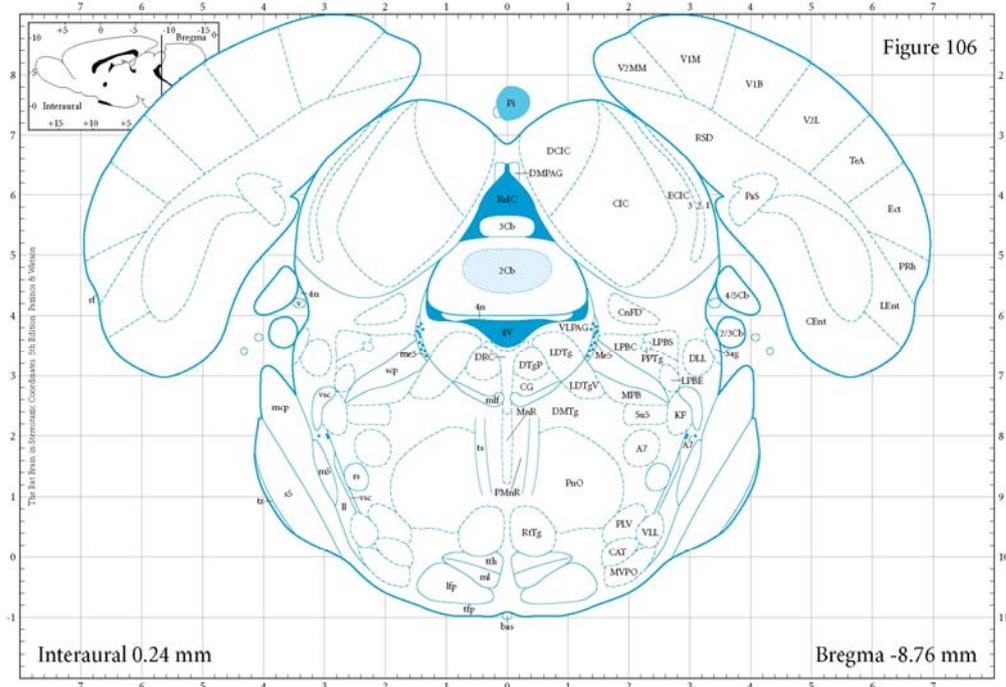


**Fig. 3.5.** Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -13.08 mm, en el que se puede localizar el nivel ROSTRAL del núcleo del tracto solitario (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).

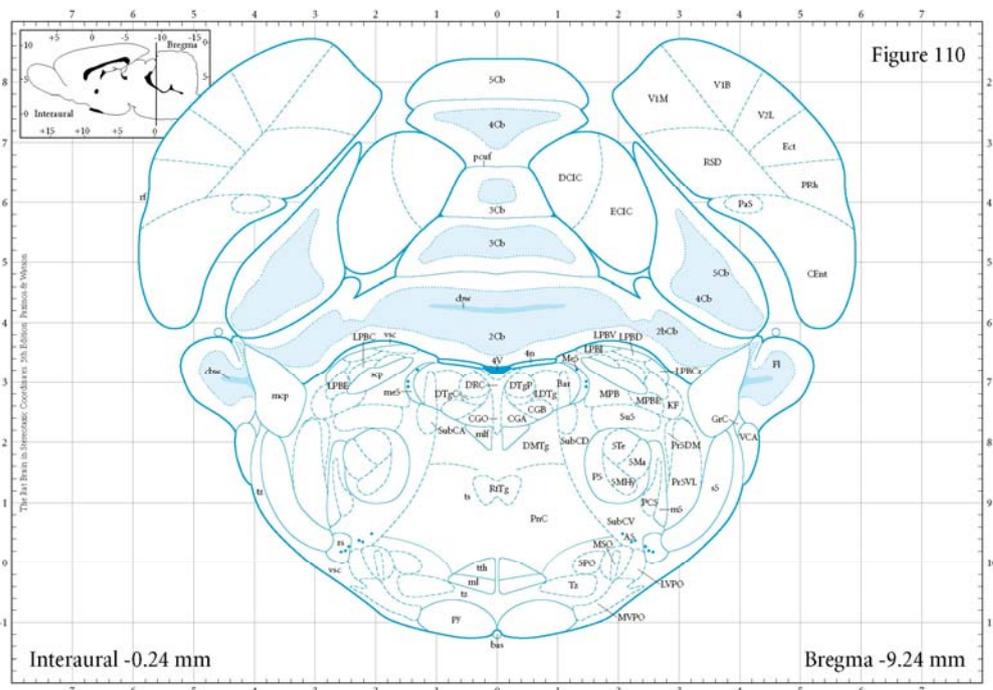


**Fig. 3.6.** Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -13.80 mm, en el que se puede localizar el nivel CAUDAL del núcleo del tracto solitario (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).

2) La porción lateral del núcleo parabraquial: a -8.76 y -9.24 mm de Bregma (fig.3.7 y 3.8).

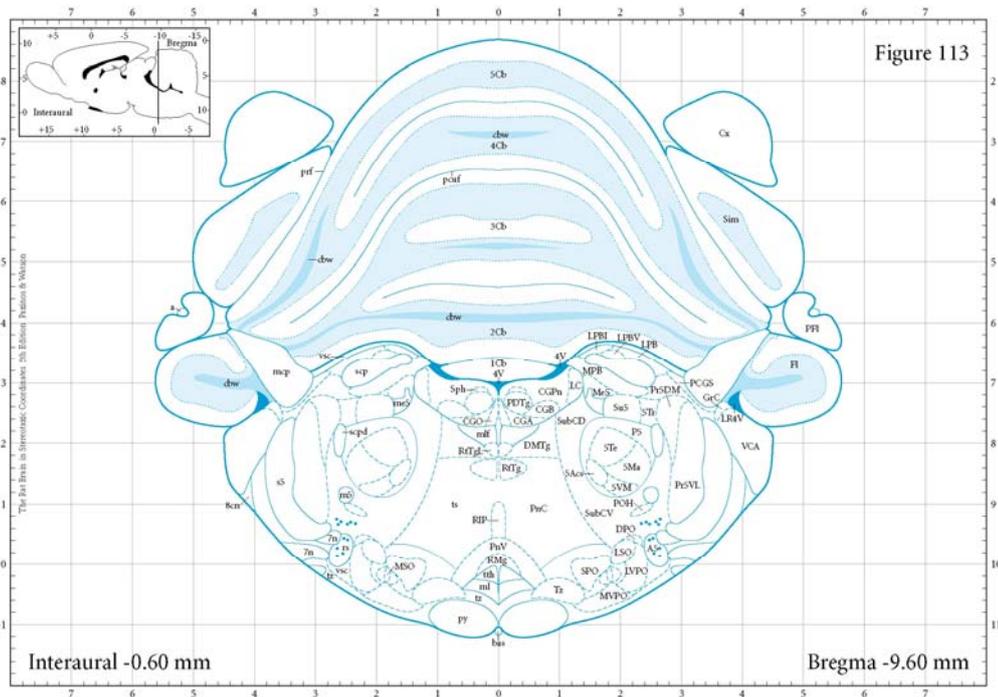


**Fig. 3.7.** Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -8.76 mm, en el que se puede localizar el nivel ROSTRAL del núcleo parabraquial (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).

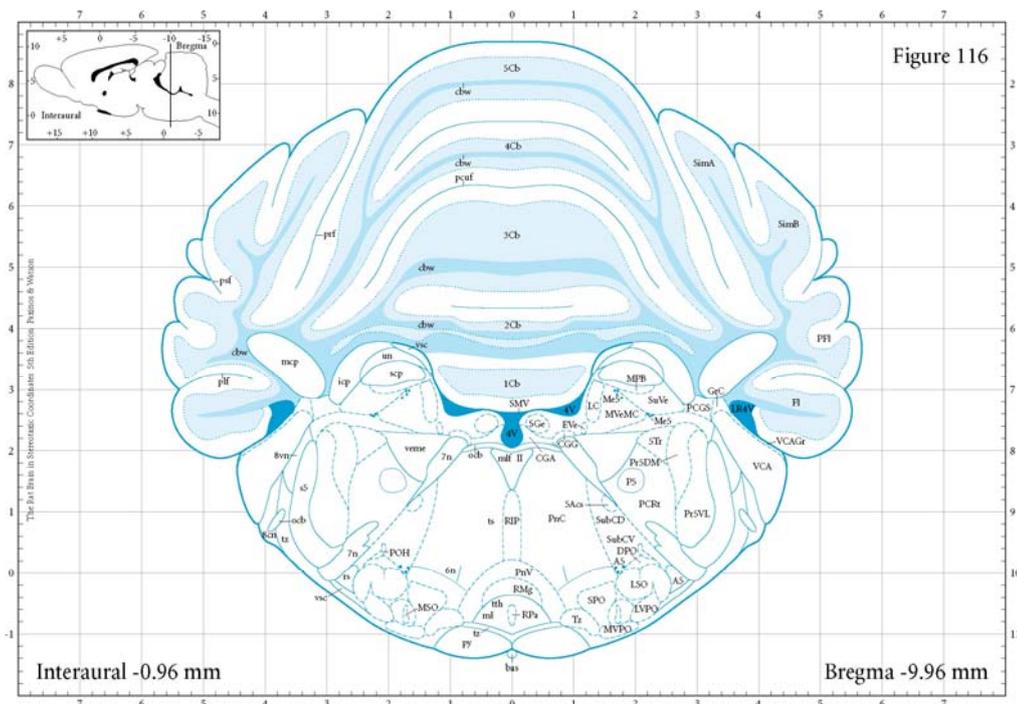


**Fig. 3.8.** Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -9.24 mm, en el que se puede localizar el nivel CAUDAL del núcleo parabraquial (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).

3) El locus coeruleus: a -9.60 y -9.96 mm de Bregma (fig.3.9 y 3.10).

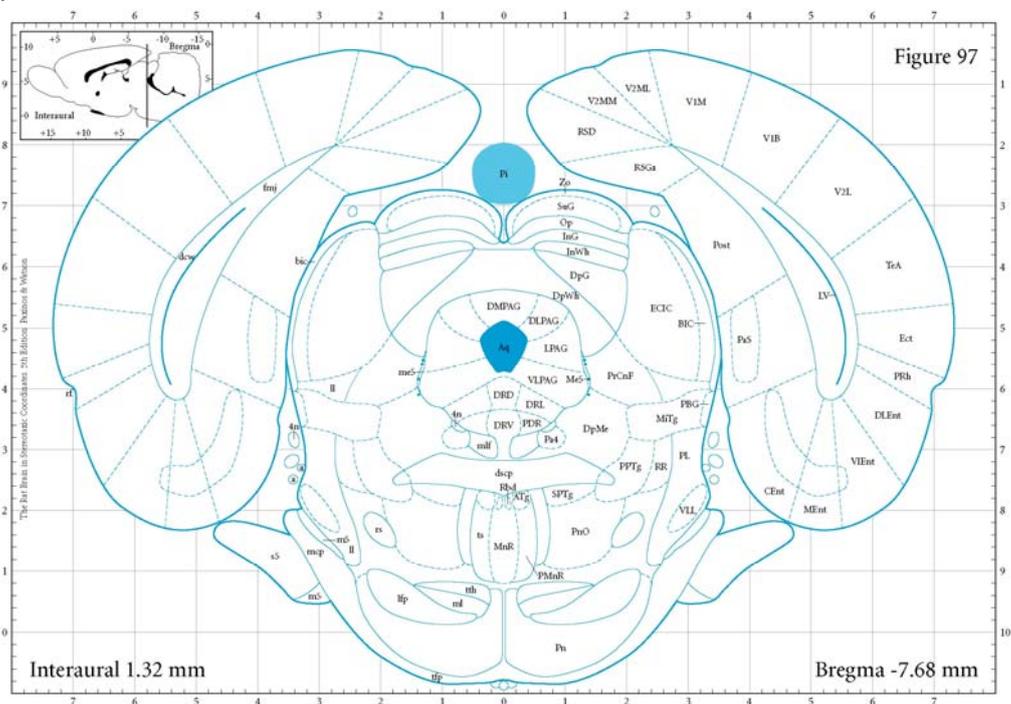


**Fig. 3.9.** Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -9.60 mm, en el que se puede localizar el nivel ROSTRAL del locus coeruleus (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).

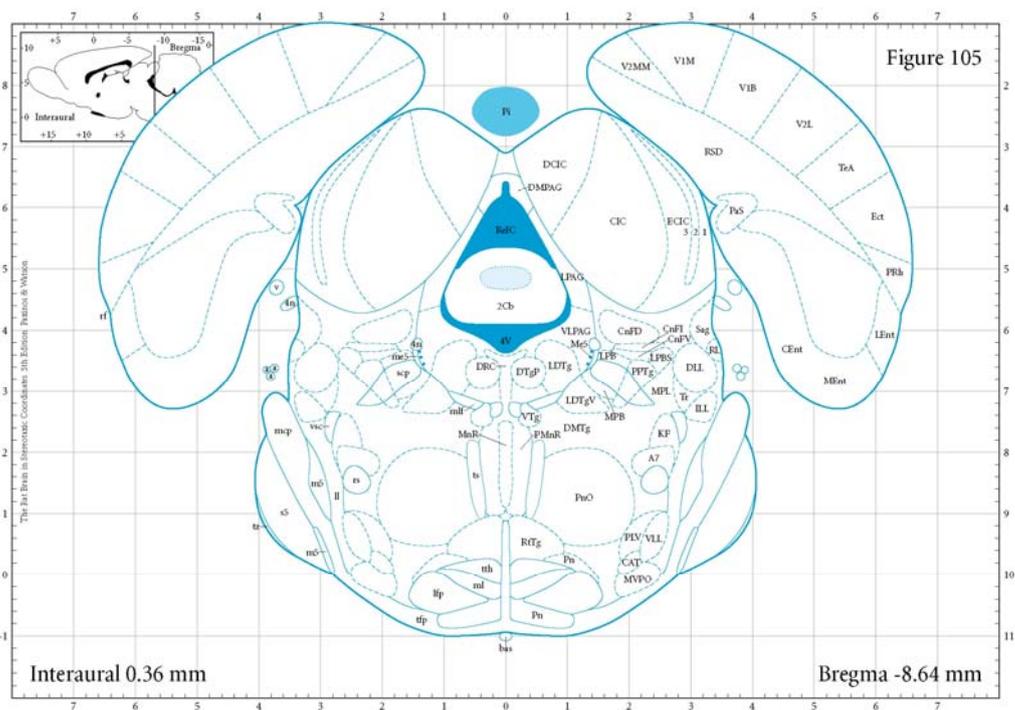


**Fig. 3.10.** Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -9.96 mm, en el que se puede localizar el nivel CAUDAL del locus coeruleus (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).

4) El núcleo dorsal del rafe: a -7.68 y -8.04 mm de Bregma (fig.3.11 y 3.12).



**Fig. 3.11.** Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -7.68 mm, en el que se puede localizar el nivel ROSTRAL del núcleo dorsal del rafe (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).



**Fig. 3.12.-** Esquema de una sección coronal del cerebro de una rata correspondiente al nivel Bregma -8.64 mm, en el que se puede localizar el nivel CAUDAL del núcleo dorsal del rafe (adaptado a partir del atlas de Paxinos y Watson (40)).

## **8.- Técnicas de Estudio Citoarquitectónico: Método de Nissl**

Para la obtención del patrón de distribución de las neuronas Fos-positivas deberemos poder delimitar con seguridad y precisión cada uno de los núcleos objeto de nuestro estudio.

Para ello, una serie de cortes (paralela a la empleada para la detección inmunohistoquímica de Fos) se teñirá 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 núcleos (e incluso subnúcleos en aquellos que sea relevante) (104, 135).

Empleamos esta técnica para completar el estudio tanto a nivel medular como a nivel troncoencefálico.

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°).

## **9.-Técnicas de Estudio Histoquímico e Inmunohistoquímico**

Con el fin de obtener más datos que nos permitan una mejor delimitación o subdivisión de alguno de los núcleos troncoencefálicos objeto de nuestro estudio, completamos el estudio citoarquitectónico con un estudio histoquímico o inmunohistoquímico, que incluyó los siguientes protocolos: la detección histoquímica de la enzima NADPH-diaforasa (para el NTS y el LPB), la detección inmunocitoquímica de la enzima tirosinhidroxilasa (para el LC) y la detección inmunocitoquímica de la serotonina (para el DR).

### 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  $\beta$ -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 inmunocitoquímica de la enzima tirosinhidroxilasa

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

1) Incubar lo cortes 30 minutos en PBS con 1% de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ , Sigma), para reducir o inhibir las peroxidasa endógenas.

2) Incubar lo cortes 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 caballo (NHS, Vector) para evitar el marcaje inespecífico.

3) Incubar lo cortes 48-72 horas en PBS-T con el anticuerpo primario de ratón antitirosinhidroxilasa (en dilución 1:10000, Sigma) y un 1,5% de NHS.

4) Incubar lo cortes 2 horas en PBS con anticuerpo de caballo biotinizado anti-IgG de ratón (en dilución 1:200, Vector).

5) Incubar lo cortes 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) 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.

### 9.3.-Protocolo para la detección inmunocitoquímica de la serotonina

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

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

2) Incubar lo cortes 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 cabra (NGS, Vector) para evitar el marcaje inespecífico.

3) Incubar lo cortes 48-72 horas en PBS-T con el anticuerpo primario de conejo antiserotonina (en dilución 1:10000, Sigma) y un 1,5% de NGS.

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

5) Incubar lo cortes 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) 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.

## 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 puntearon manualmente las neuronas Fos-positivas con ayuda de una cámara clara Zeiss acoplada a un microscopio Axioskopp de Zeiss con un objetivo de 20x (fig.3.13). Dichos dibujos fueron elaborados por un experimentador desconocedor del grupo experimental al que pertenecían las preparaciones al puntearlas.



**Fig. 3.13.** *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.3.14).



**Fig. 3.14.** 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 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. El análisis descriptivo se acompañó con una gráfica de las medias estimadas para cada variable original dentro de cada uno de los 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 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 (136).

### 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: CSF y CPG.
- Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP.
- Análisis Parcial Analgesia Dolor Nociceptivo: CSF, CNC, PGNC
- Análisis Parcial Analgesia Dolor Neuropático: CSF, CNP, PGNP

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* (136).

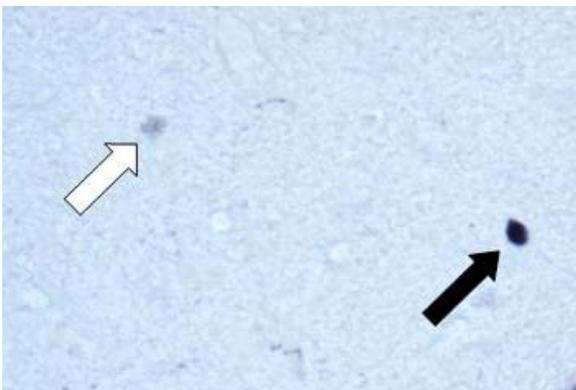
# **04 RESULTADOS**



## 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 negruzca 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  $-7.64\text{mm}$  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.

## **ESTUDIO DESCRIPTIVO**

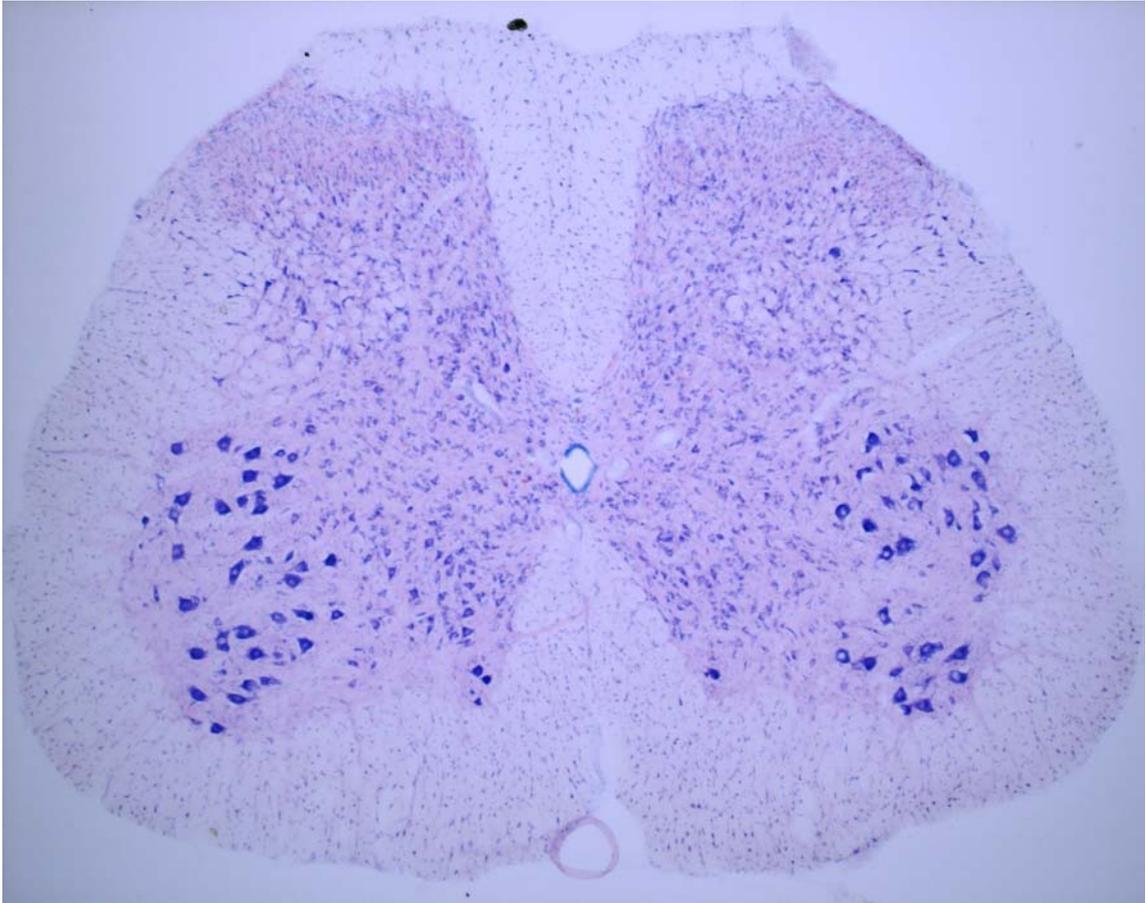
### **2.- Asta Posterior de la Médula Espinal.**

El asta posterior de la médula espina fue estudiada en el nivel L4/L5, un nivel representativo de los que forman el nervio ciático.

#### *2.1.- Estudio Citoarquitectónico*

El estudio del asta posterior de la médula espinal se llevó a cabo en secciones transversales representativas del nivel L4/L5 de la médula espinal de la rata.

Para su delimitación se procedió a teñir con el método de Nissl (citoarquitectónico) cortes seriados consecutivos a los procesados para la detección inmunohistoquímica de la proteína Fos (fig.4.2).



**Fig. 4.2.** *Microfotografía (4x) de la médula espinal de rata en un corte correspondiente al nivel L4 teñido con el método de Nissl.*

### 2.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico

Las ratas del grupo control simulado fisiológico apenas mostraron células marcadas en las láminas de Rexed del asta posterior de la médula, con independencia de la hemisección estudiada (fig.4.4 y 4.5).

### 2.3.- Grupo Control Pregabalina

La administración de 30 mg/kg de pregabalina por vía i.p. indujo una discreta aparición de células inmunopositivas de forma bilateral en todas las láminas de Rexed del asta posterior de la médula (fig.4.6 y 4.7).

### 2.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo

La aplicación del *test de la formalina* en el dorso de la pata trasera derecha de los animales de este grupo provocó un importante incremento del marcaje respecto a los grupo CSF y CPG en todas las láminas de ambas astas posteriores, pero especialmente en las láminas superficiales (I y IIo) del asta derecha (ipsilateral al estímulo aplicado) (fig.4.8 y 4.9).

### 2.5.- Grupo Control Dolor Neuropático

El modelo de dolor neuropático empleado en nuestro estudio también desencadenó en el asta posterior de la médula espinal una intensa inmunorreacción frente a Fos, igualmente de predominio ipsilateral. La *constricción del nervio ciático* provocó un incremento de células inmunorreactivas en todas las láminas del asta posterior de la médula estudiadas (fig.4.10 y 4.11).

### 2.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo

La administración previa al test de la formalina de 30 mg/kg de pregabalina por vía i.p. provocó una reducción drástica en el número de células inmunopositivas, tanto en el asta posterior derecha (ipsilateral) como en la izquierda (contralateral), especialmente en las láminas superficiales (fig.4.12 y 4.13).

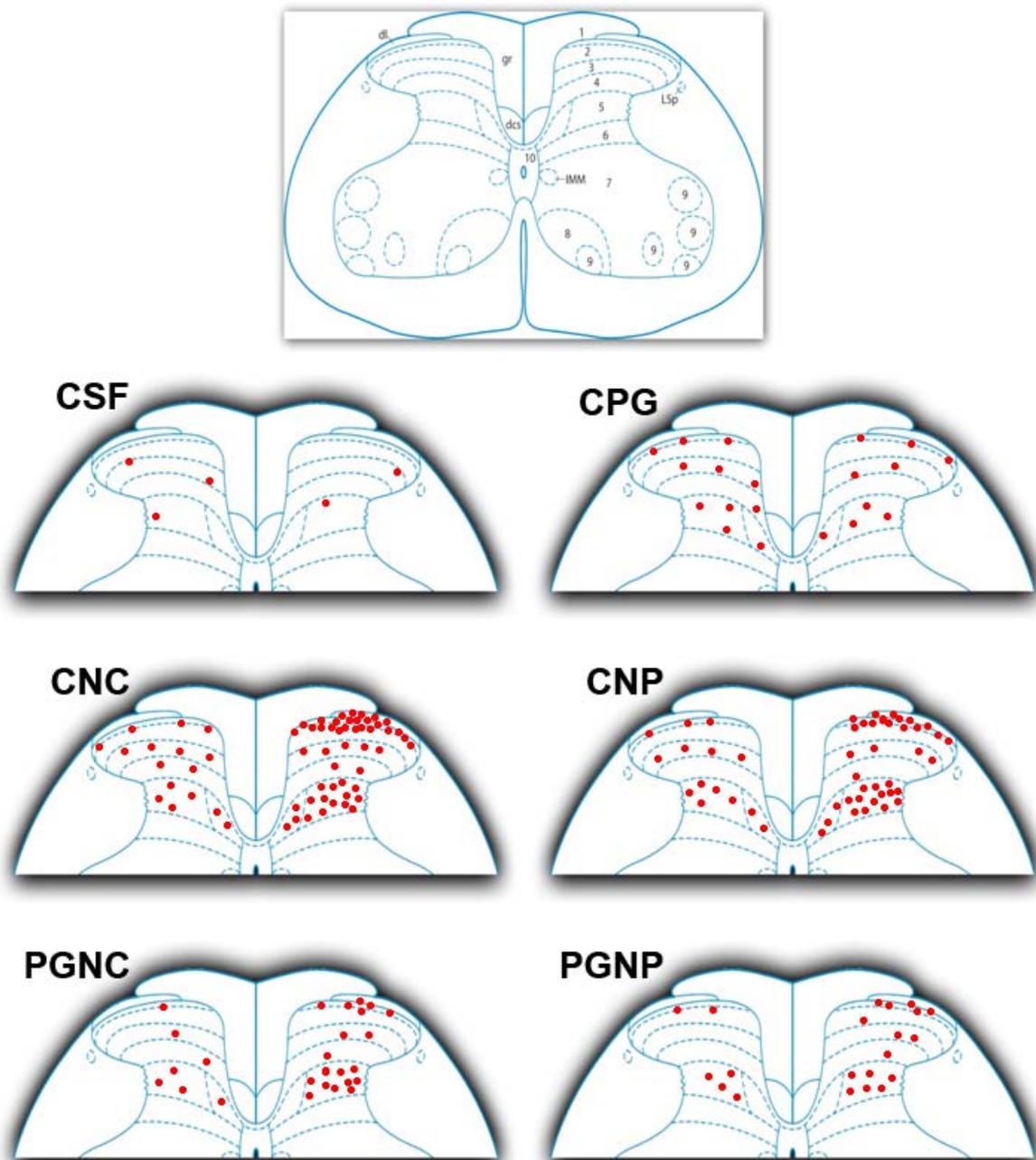
### 2.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático

La administración de pregabalina, por vía i.p. previa a la aplicación de dolor neuropático, también provocó una disminución en el número de células inmunopositivas en ambas astas posteriores (fig.4.14 y 4.15).

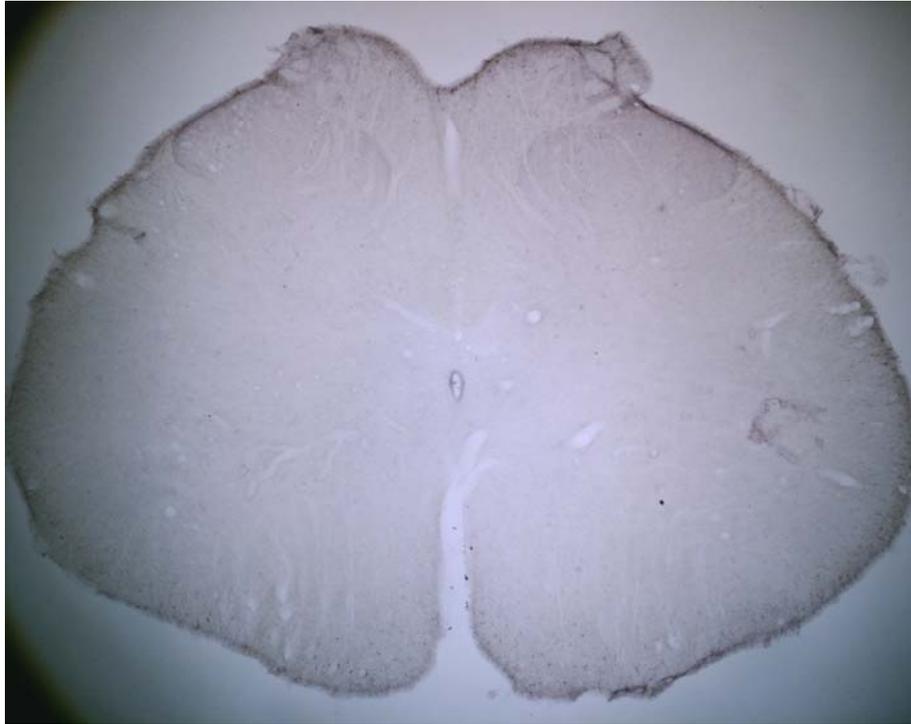
Estos resultados se resumen en la tabla 4.1 y la fig.4.3.

Niveles	Grupo Experimental					
	CSF	CPG	CNC	CNP	PGNC	PGNP
Asta Post.Der.	13±8	32±13	259±22	182±19	79±17	54±15
Asta Post.Izq.	15±7	39±15	84±18	99±16	27±9	32±11

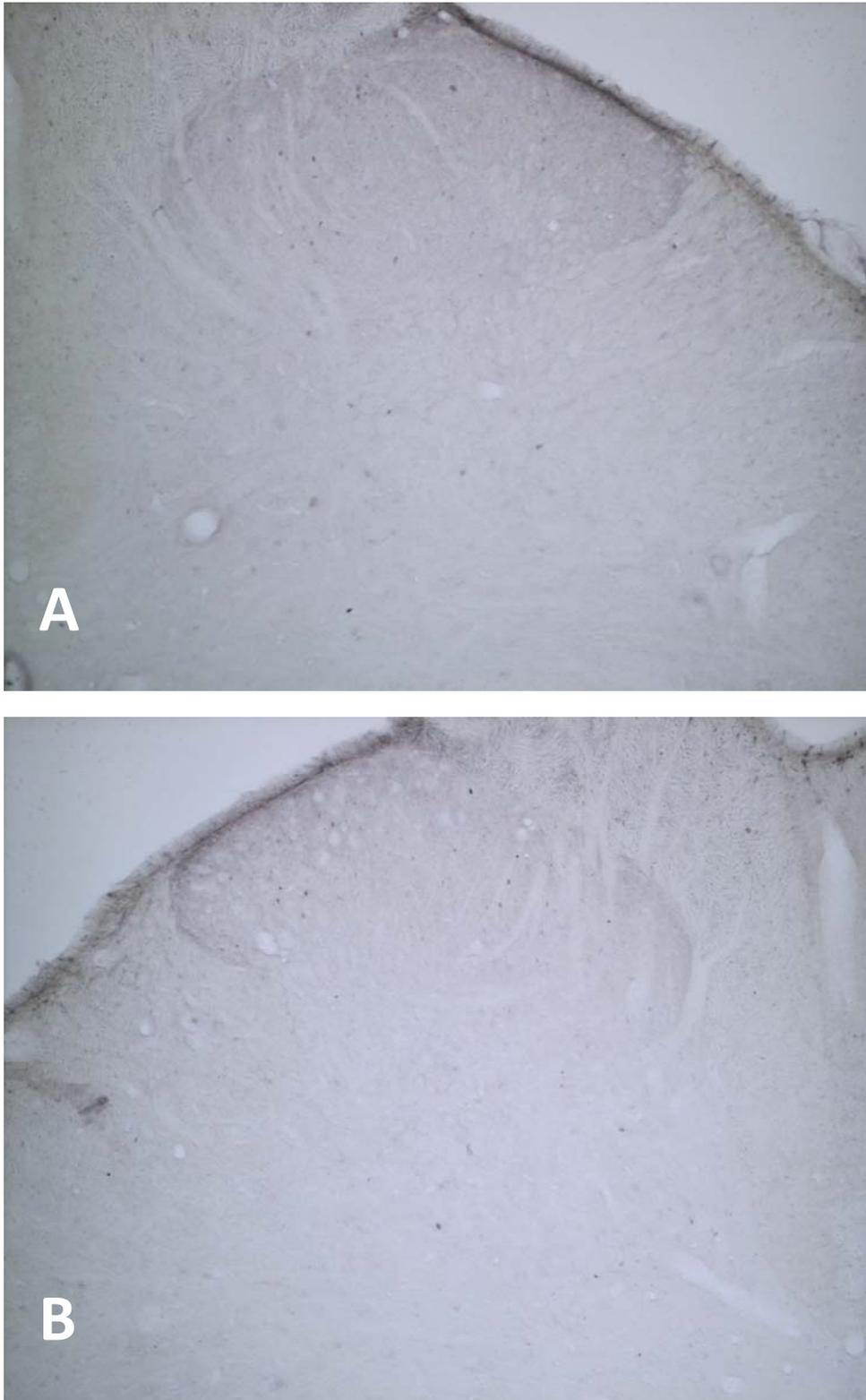
**Tabla 4.1.** Media ( $\pm$ Desviación Típica) de células inmunorreactivas por sección de 40  $\mu$ m del asta posterior (derecha e izquierda) de la médula espinal a nivel de L4 en los diferentes grupos experimentales.



**Fig. 4.3.** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al asta posterior de la médula espinal, a nivel de L4 (Paxinos y Watson) (40) del grupo control simulado mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos.



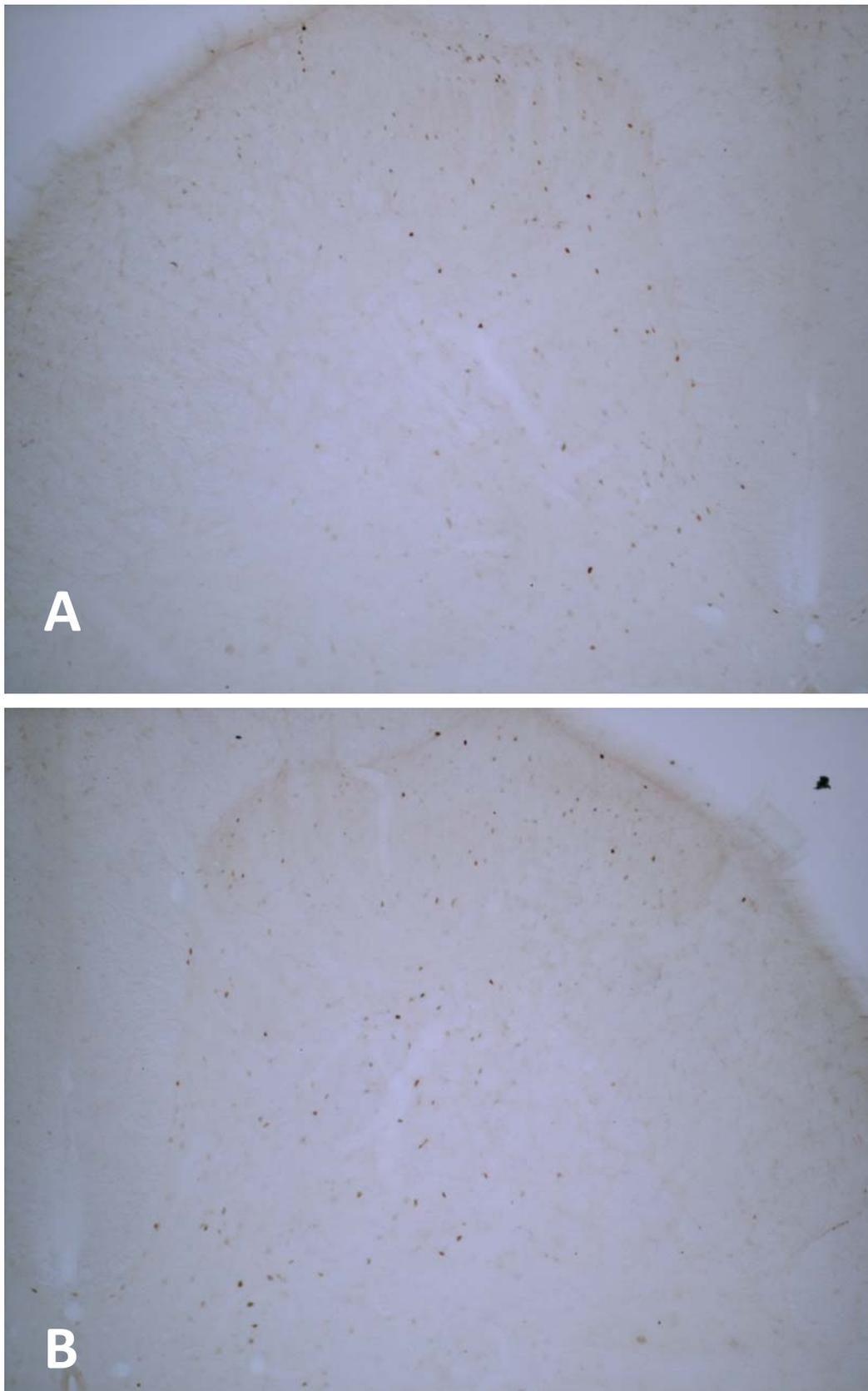
**Fig. 4.4.** Microfotografía (4x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo control suero fisiológico (CSF).



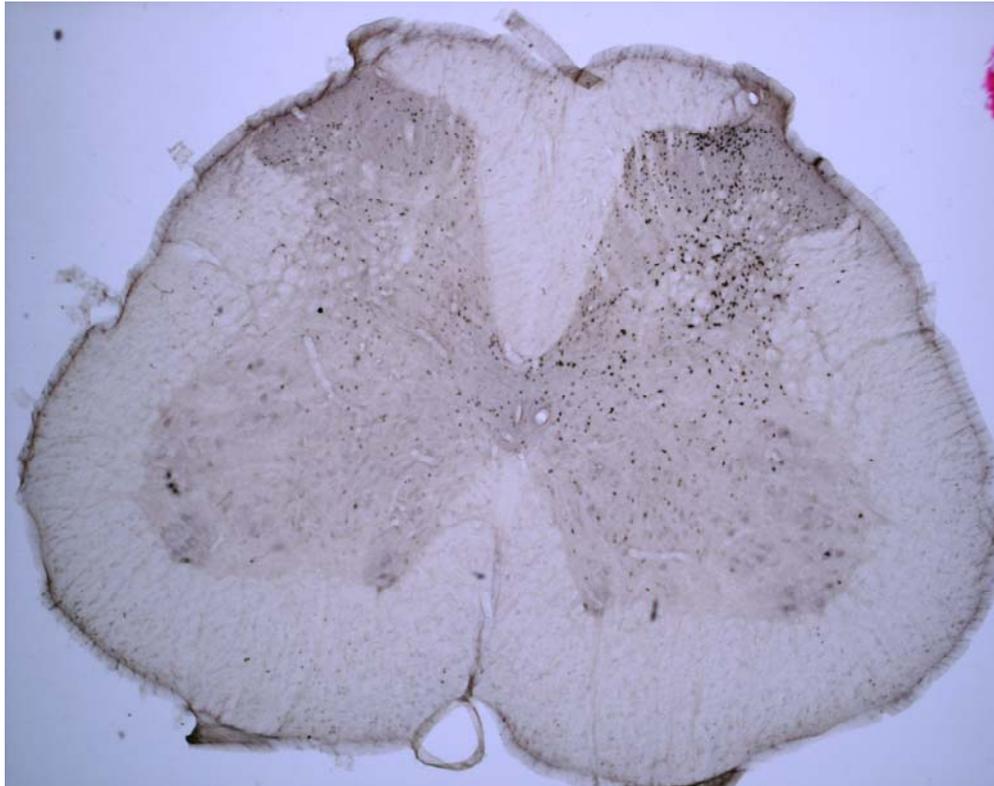
**Fig. 4.5.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior (A) derecha (B) izquierda, de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo control suero fisiológico (CSF).



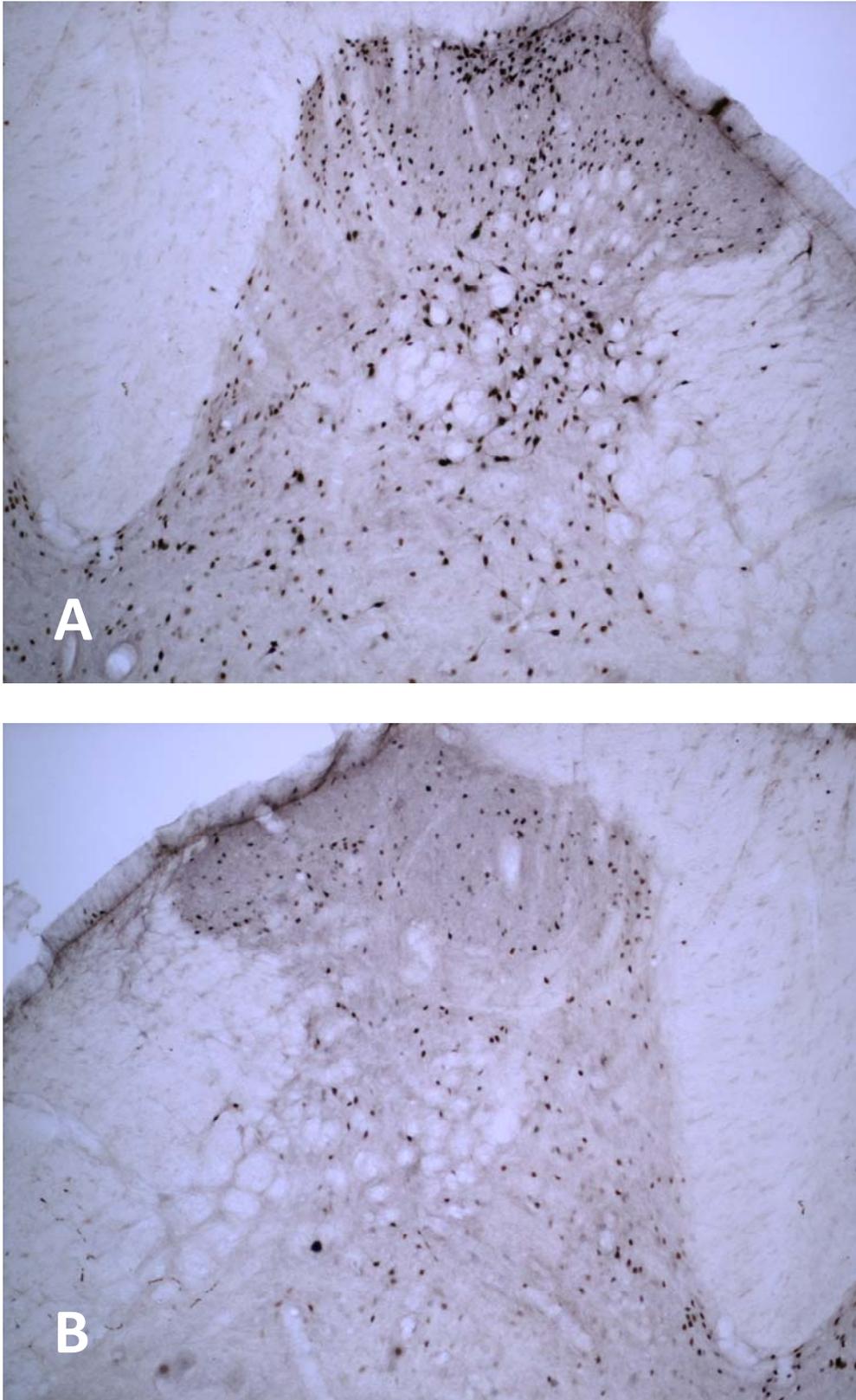
**Fig. 4.6.-** Microfotografía (4x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo control pregabalina (CPG).



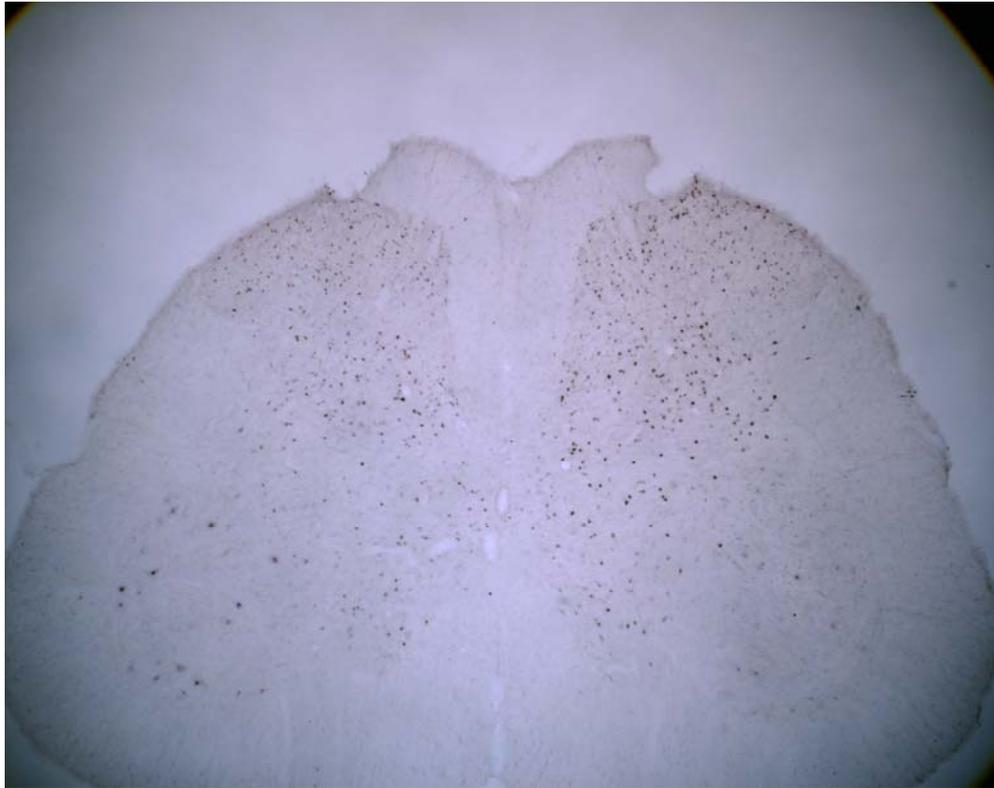
**Fig. 4.7.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior (A) derecha (B) izquierda, de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo control pregabalina (CPG).



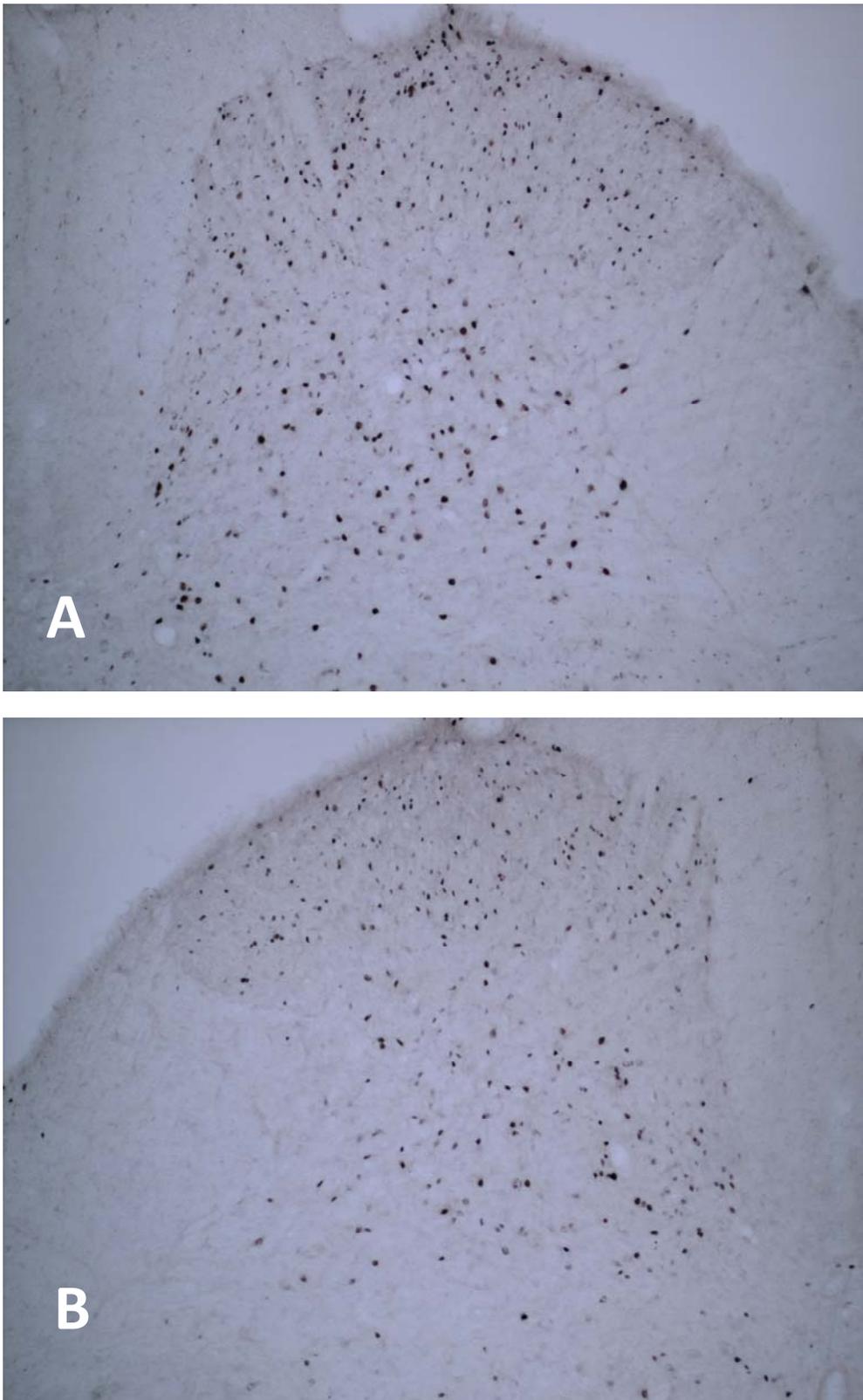
**Fig. 4.8.** *Microfotografía (4x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo control dolor nociceptivo (CNC).*



**Fig. 4.9.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior (A) derecha (B) izquierda, de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo control dolor nociceptivo (CNC).



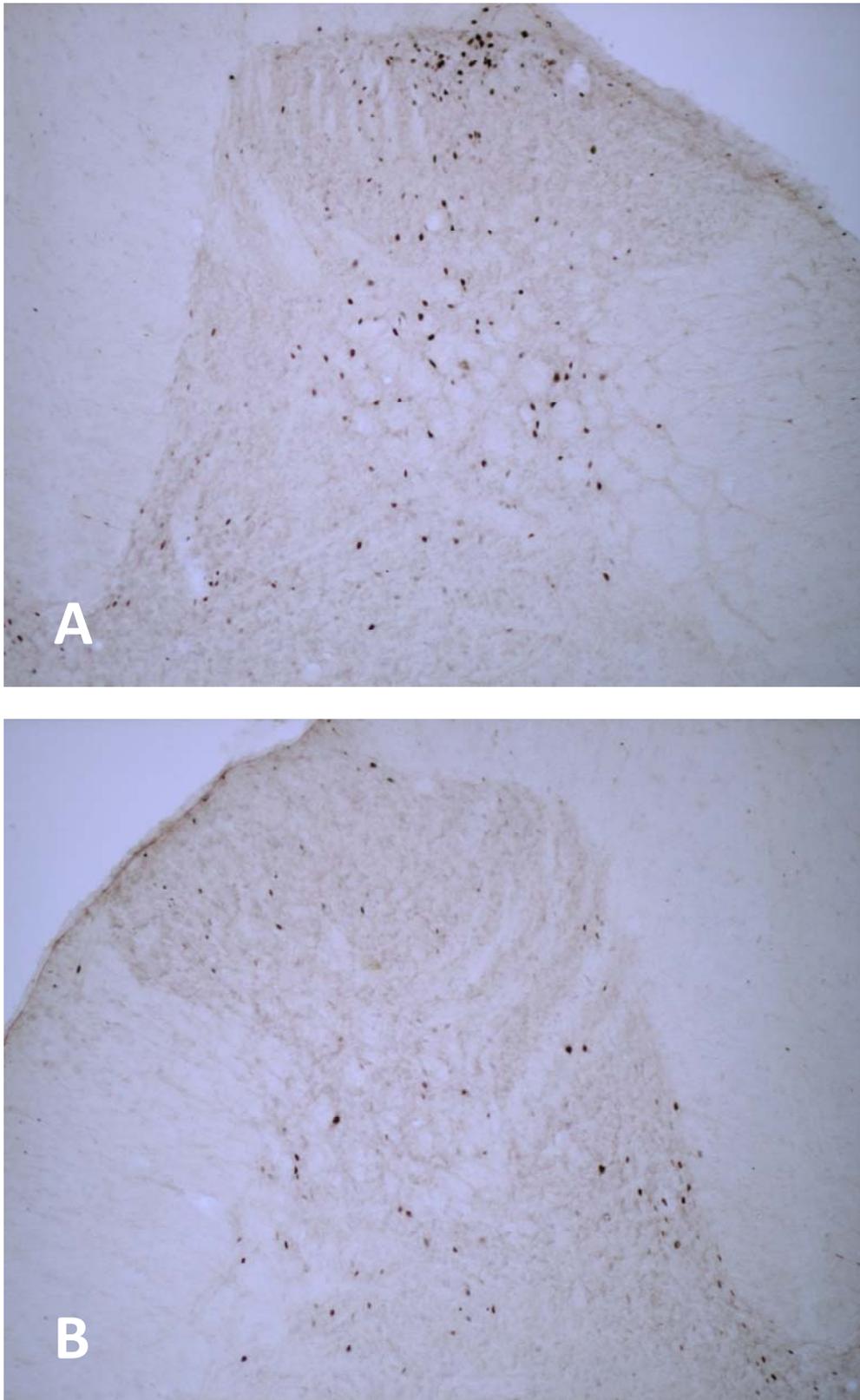
**Fig. 4.10.** *Microfotografía (4x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo control dolor neuropático (CNP).*



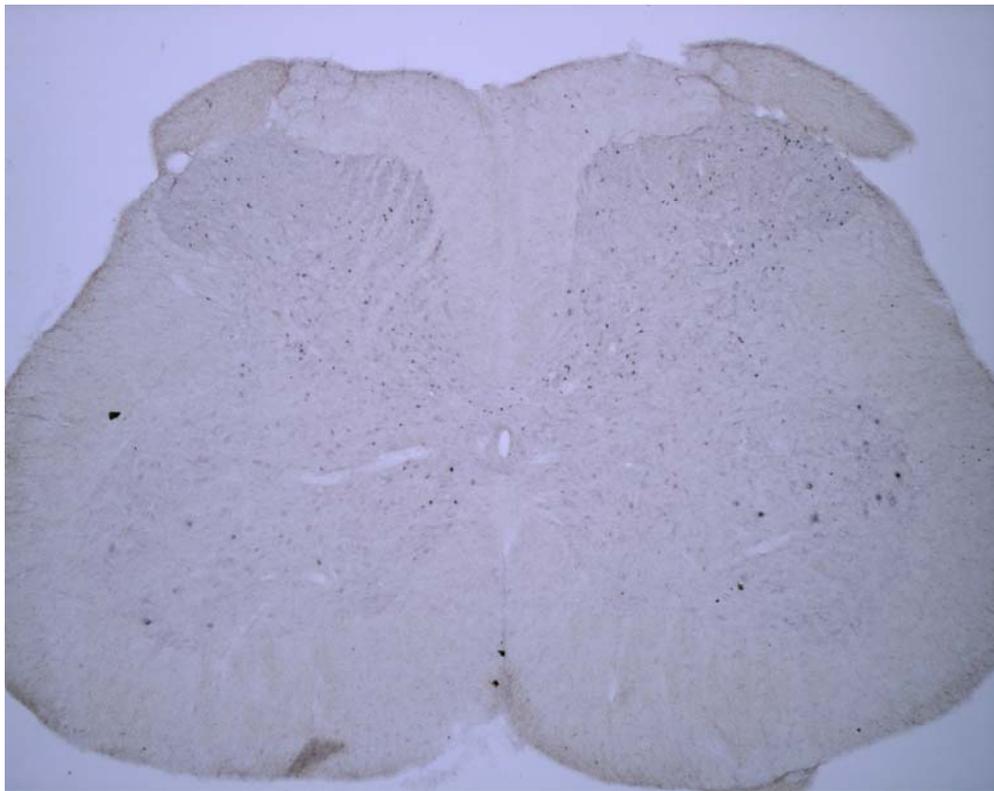
**Fig. 4.11.** Microfotografías (10x) que ilustras la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior (A) derecha (B) izquierda, de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo control dolor neuropático (CNP).



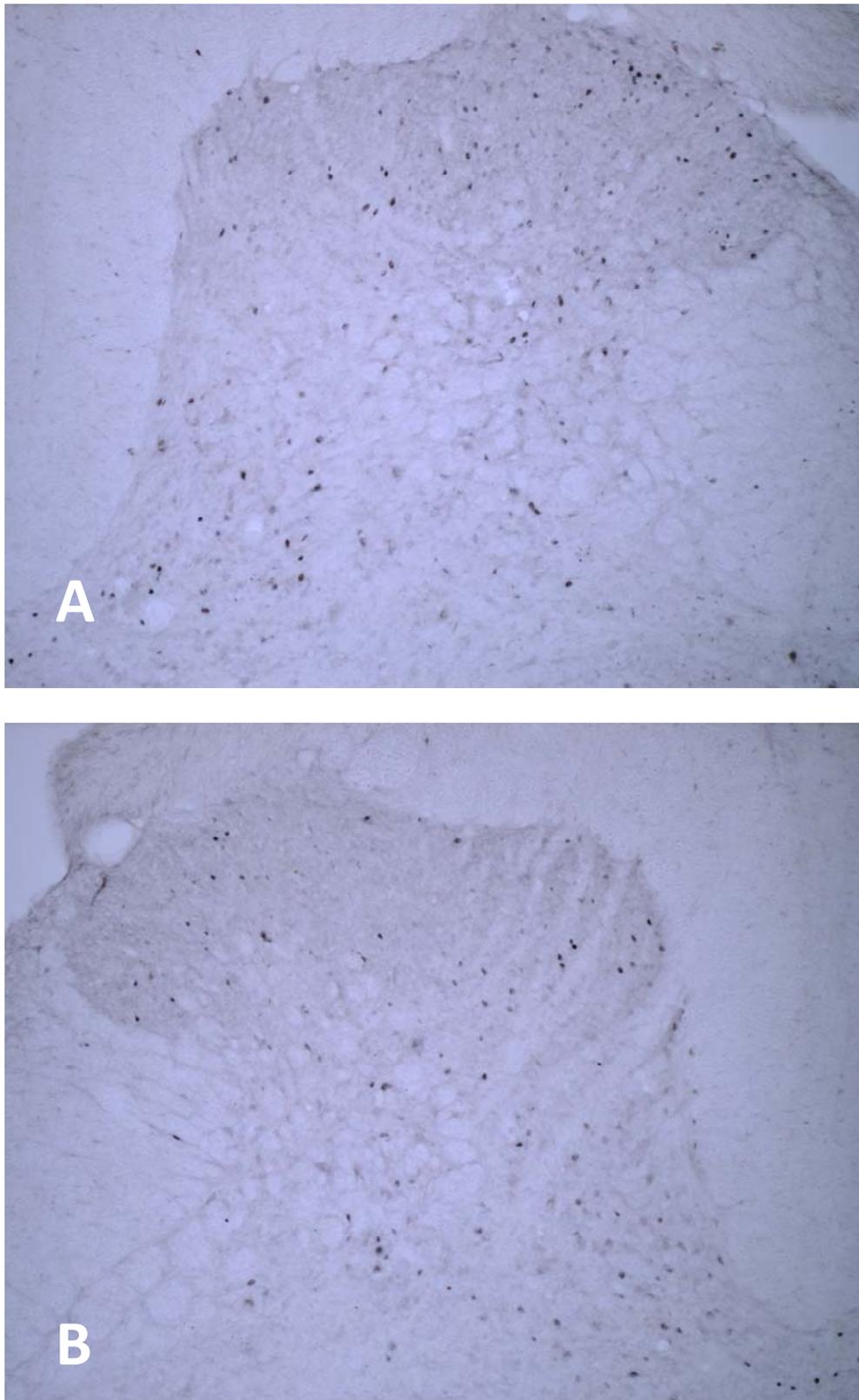
**Fig. 4.12.** Microfotografía (4x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo pregabalina dolor nociceptivo (PGNC).



**Fig. 4.13.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior (A) derecha (B) izquierda, de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo pregabalina dolor nociceptivo (PGNC).



**Fig. 4.14.** Microfotografía (4x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo pregabalina dolor neuropático (PGNP).



**Fig. 4.15.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del asta posterior (A) derecha (B) izquierda, de la médula espinal a nivel de L4 en ratas del grupo pregabalina dolor neuropático (PGNP).

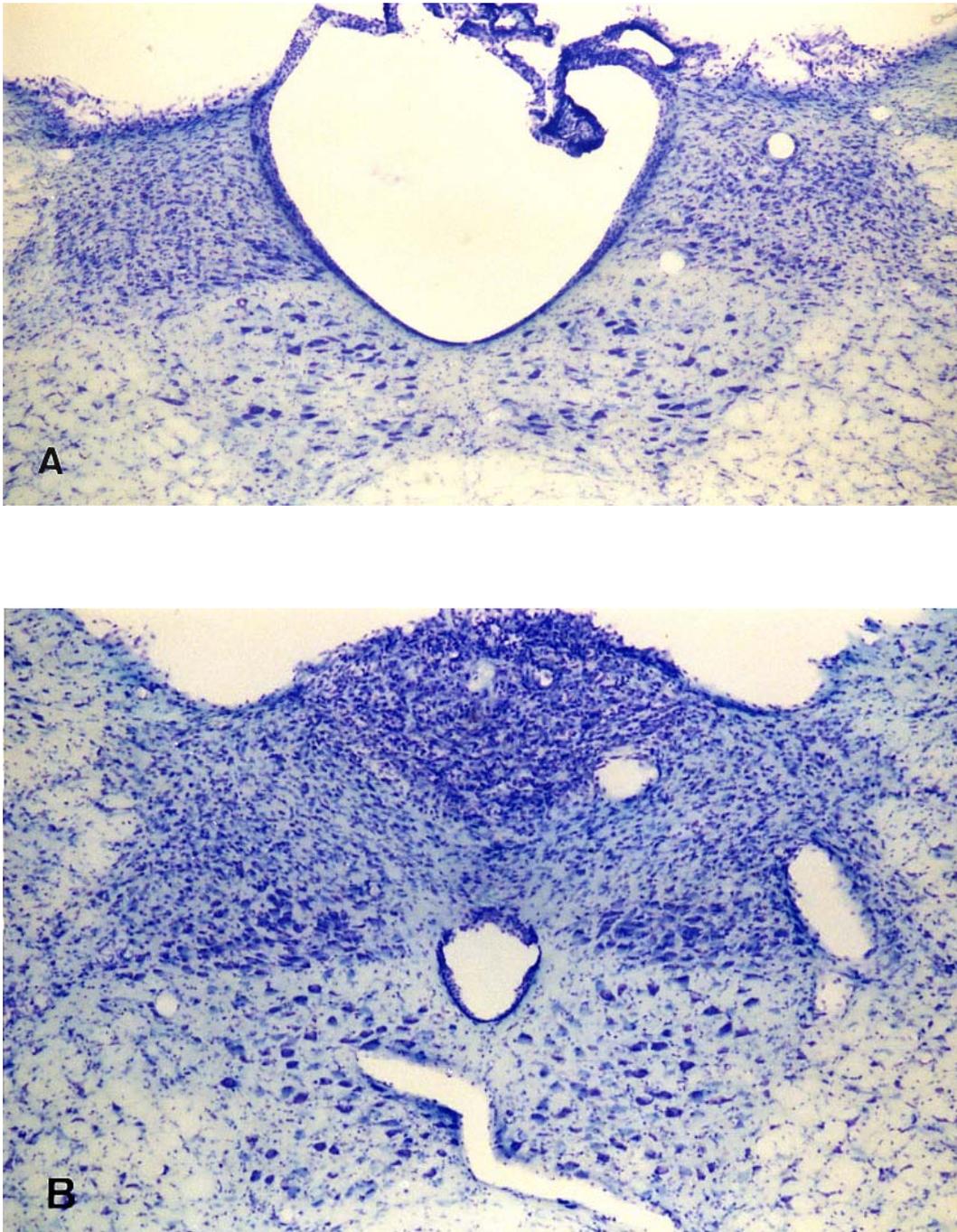
### **3.- Núcleo del Tracto Solitario.**

El núcleo del tracto solitario (NTS) fue estudiado en 2 niveles rostrocaudales diferentes, situados a -13.30 mm y -13.80 mm del punto Bregma, correspondientes a la porción sensitiva del NTS.

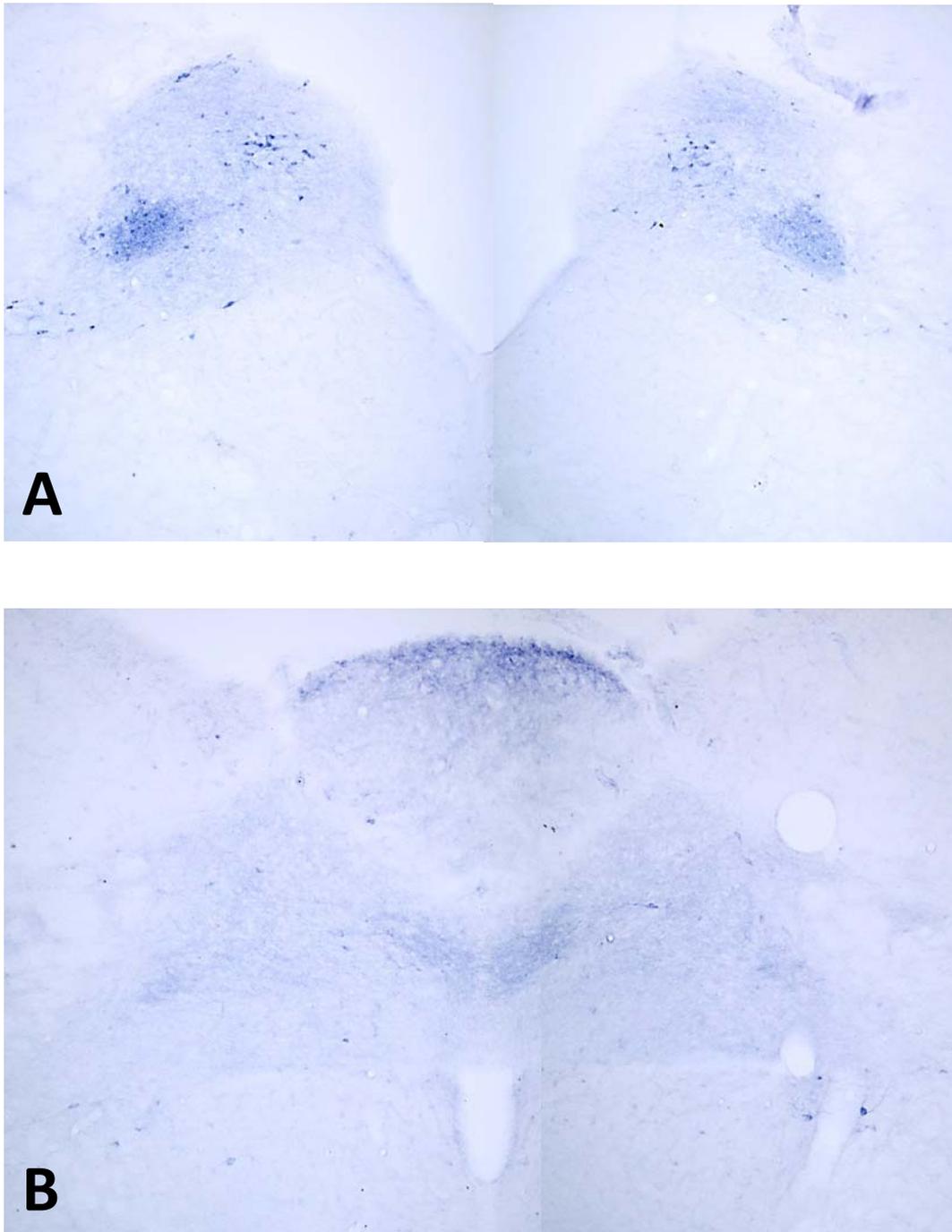
En ninguno de los grupos experimentales se observó un marcaje asimétrico.

#### *3.1.- Estudio Cito y Quimioarquitectónico*

Para su delimitación nos basamos en los resultados obtenidos tras aplicar a los cortes una técnica citoarquitectónica, el método de Nissl, y otra quimioarquitectónica, la detección histoquímica de la enzima NADPH-diaforasa (NADPHd), en cortes seriados consecutivos a los procesados para la detección inmunocitoquímica de la proteína Fos (fig.4.16 y 4.17).



**Fig. 4.16.** Microfotografías (4x) del núcleo del tracto solitario de la rata en cortes correspondientes a (A) Bregma -13.30 mm y (B) Bregma -13.80 mm teñidos con el método de Nissl.



**Fig. 4.17.** Microfotografías (4x) del núcleo del tracto solitario de la rata en cortes correspondientes a (A) Bregma -13.30 mm y (B) Bregma -13.80 mm, procesados para la detección histoquímica de la enzima NADPH-diaforasa (NADPHd).

### 3.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico.

Las ratas del grupo control simulado apenas mostraron células marcadas en ninguno de los niveles intermedio y caudal del NTS (fig.4.20).

### 3.3.- Grupo Control Pregabalina

La administración de 30 mg/kg de pregabalina por vía i.p. indujo un gran incremento en el número de células inmunopositivas en los dos niveles estudiados.

A nivel de Bregma -13.30 mm las células inmunorreactivas se observaron abundantemente en prácticamente todos los subnúcleos del NTS, destacando especialmente en los subnúcleos medial (m) y central (ce), siendo los subnúcleos intersticial (I) y dorsal motor del vago (X) los que mostraron un marcaje más escaso.

A nivel de Bregma -13.80 mm el marcaje fue, igualmente, muy intenso, principalmente localizado en los subnúcleos ventrolateral (vl), medial (m) y dorsomedial (dm), siendo el subnúcleo comisural (com) el que menos células inmunopositivas ofreció (fig.4.21).

### 3.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo

La aplicación del *test de la formalina* en la planta de la pata trasera derecha de los animales de este grupo apenas indujo la expresión de *c-fos* en las células del NTS en los niveles estudiados con respecto al grupo CSF (fig.4.22).

### *3.5.- Grupo Control Dolor Neuropático*

Tampoco el modelo de dolor neuropático desencadenó en el NTS una intensa inmunorreacción frente a Fos en el NTS. La constricción del nervio ciático provocó un discreto incremento de células inmunorreactivas en los dos niveles analizados con respecto al grupo CSF (fig.4.23).

### *3.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo*

La administración previa al test de la formalina de 30 mg/kg de pregabalina por vía i.p. también provocó un gran incremento en el número de células inmunopositivas en los dos niveles estudiados.

A nivel de Bregma -13.30 mm las células inmunorreactivas se centraron en los subnúcleos medial (m) y central (ce). También el subnúcleo ventrolateral (vl) mostró células marcadas, mientras que los subnúcleos intersticial (I) y dorsal motor del vago (X) mostraron un marcaje más escaso.

A nivel de Bregma -13.80 mm el marcaje fue, asimismo, muy intenso, destacando en la porción más ventral del subnúcleo medial (m) y en la más medial del subnúcleo ventrolateral (vl). También en el subnúcleo dorsomedial (dm) pudimos encontrar células marcadas, siendo de nuevo el subnúcleo comisural (com) el que menos células inmunopositivas ofreció (fig.4.24).

### *3.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático*

La administración de pregabalina, por vía i.p. previa a la aplicación de dolor neuropático, provocó un incremento en el número de

células inmunopositivas especialmente en el nivel más caudal de los dos niveles estudiados.

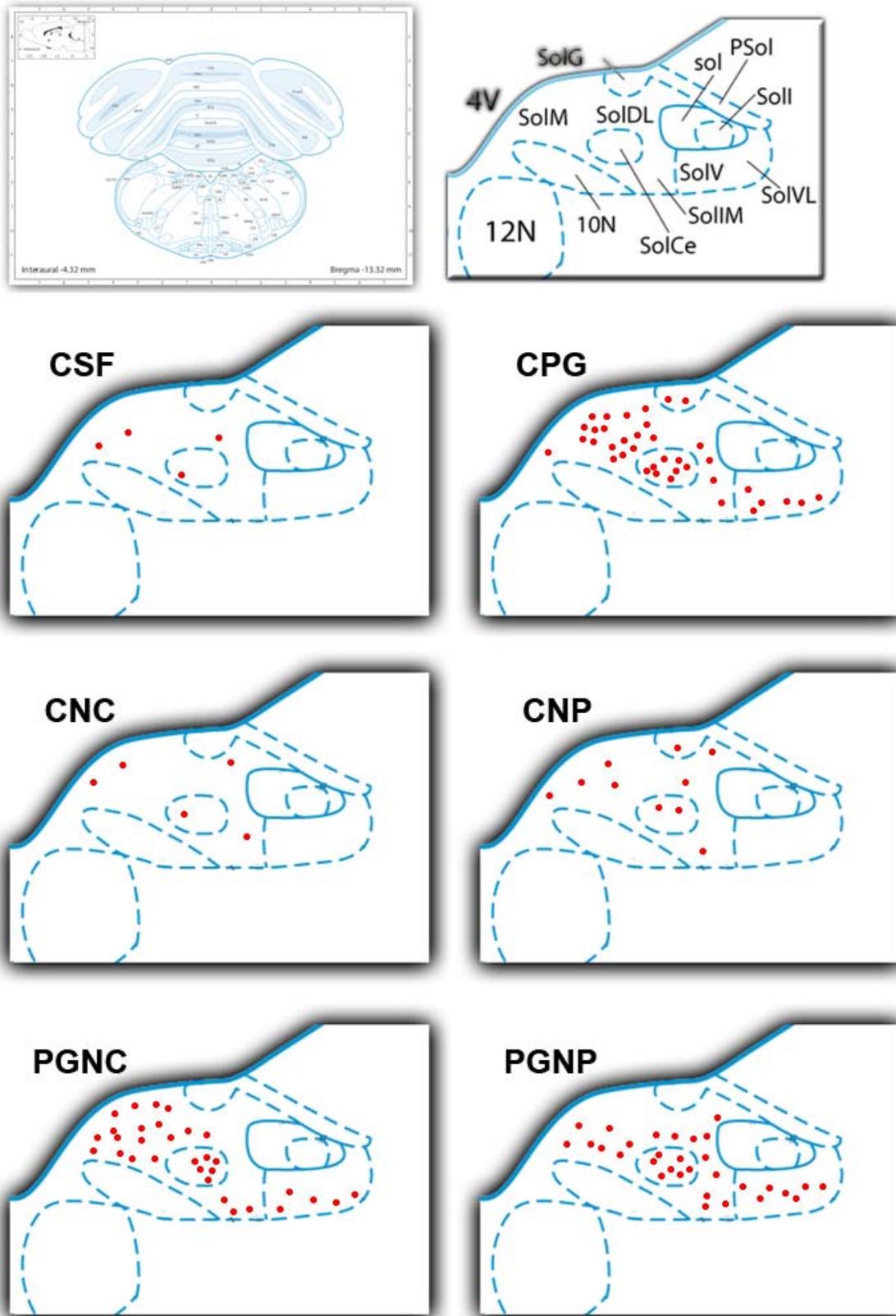
A nivel de Bregma  $-13.30$  mm las células inmunorreactivas se centraron, de nuevo, en los subnúcleos medial (m) y central (ce), y en menor medida en el subnúcleo ventrolateral (vl) mientras que en el resto de subnúcleos el marcaje fue escaso.

A nivel de Bregma  $-13.80$  mm el marcaje se concentró las células marcadas en la porción más ventral del subnúcleo medial (m) y en la más medial del subnúcleo ventrolateral (vl) (fig.4.25).

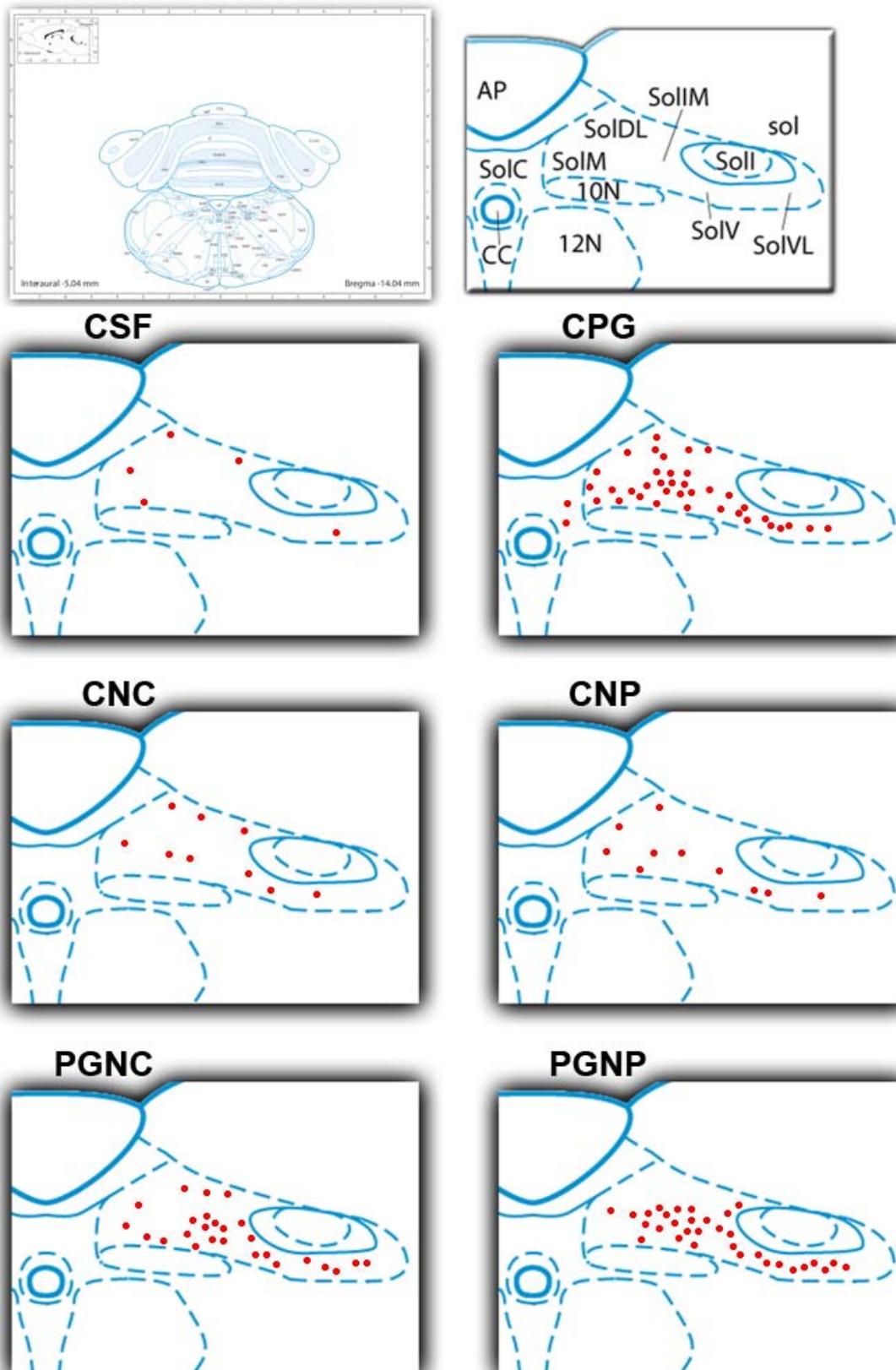
Estos resultados se resumen en la tabla 4.2 y las fig.4.18 y 4.19.

Niveles	Grupo Experimental					
	CSF	CPG	CNC	CNP	PGNC	PGNP
intermedio	9 $\pm$ 5	75 $\pm$ 25	8 $\pm$ 7	24 $\pm$ 12	65 $\pm$ 25	62 $\pm$ 23
caudal	13 $\pm$ 6	106 $\pm$ 24	13 $\pm$ 9	18 $\pm$ 10	68 $\pm$ 28	88 $\pm$ 31

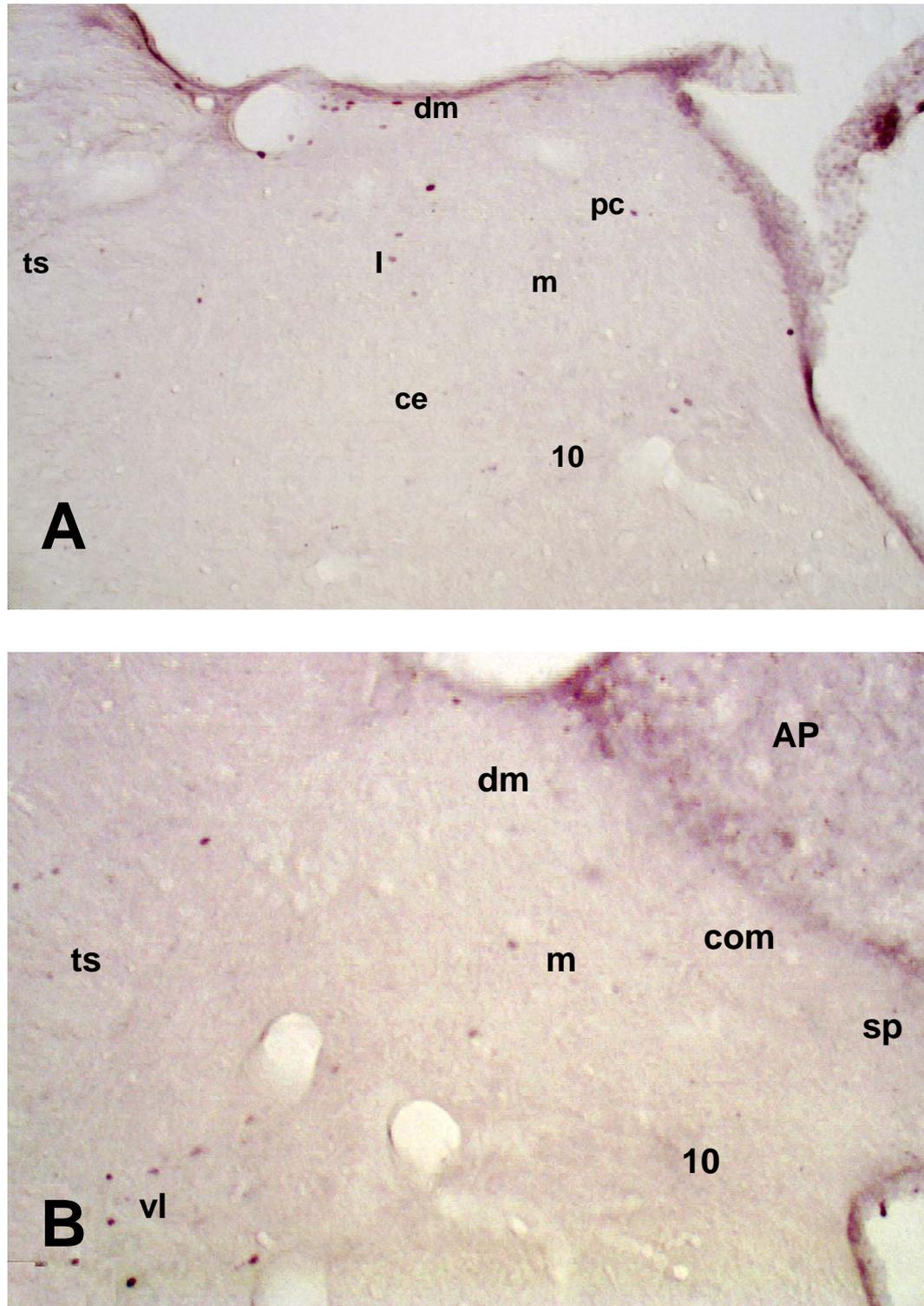
**Tabla 4.2.** Media ( $\pm$ Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de  $40 \mu\text{m}$  del NTS en los dos niveles seleccionados del grupo control simulado.



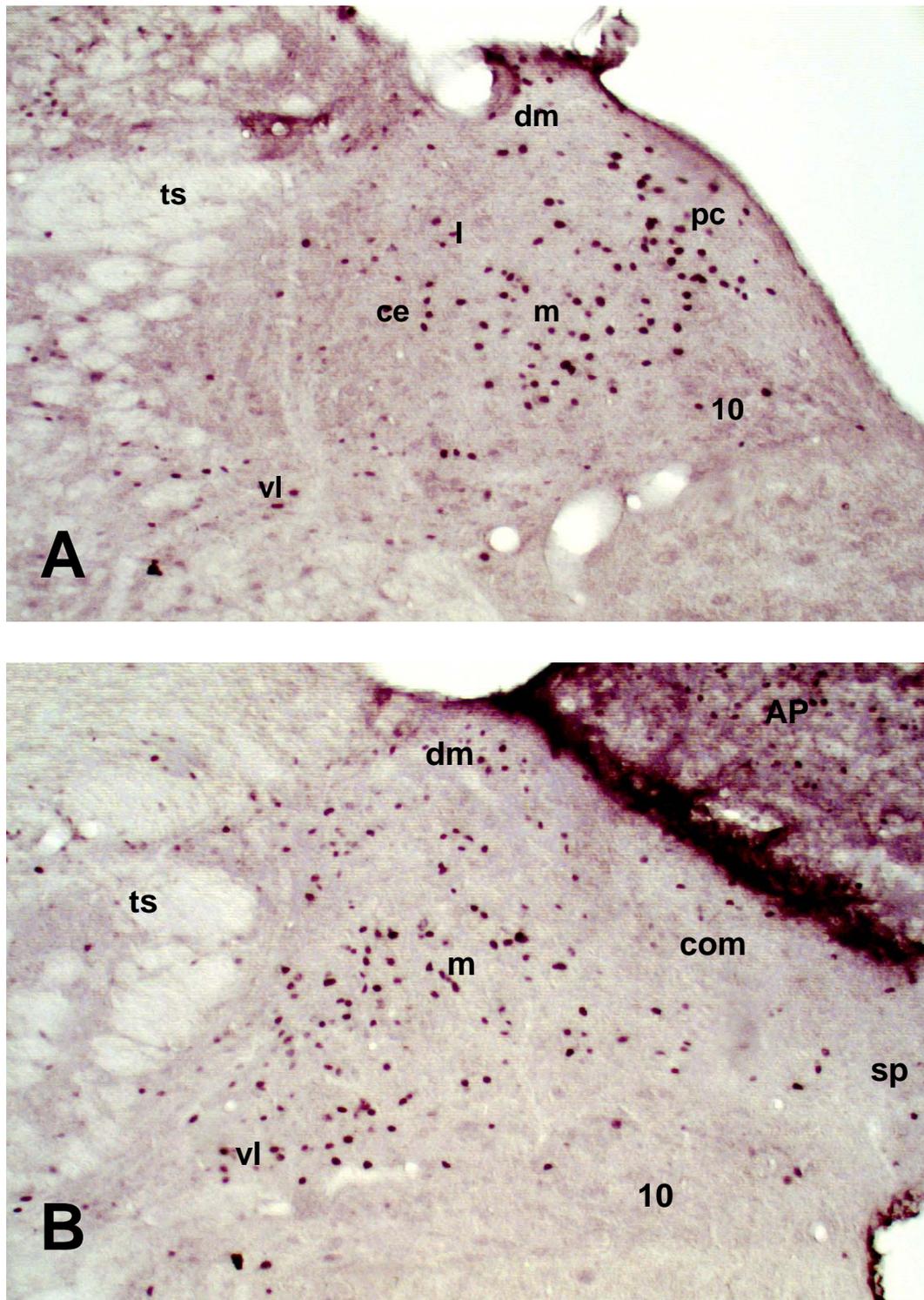
**Fig. 4.18.** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al nivel Bregma -13.30 mm) (Paxinos y Watson) (40) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el NTS, en los diferentes grupos experimentales.



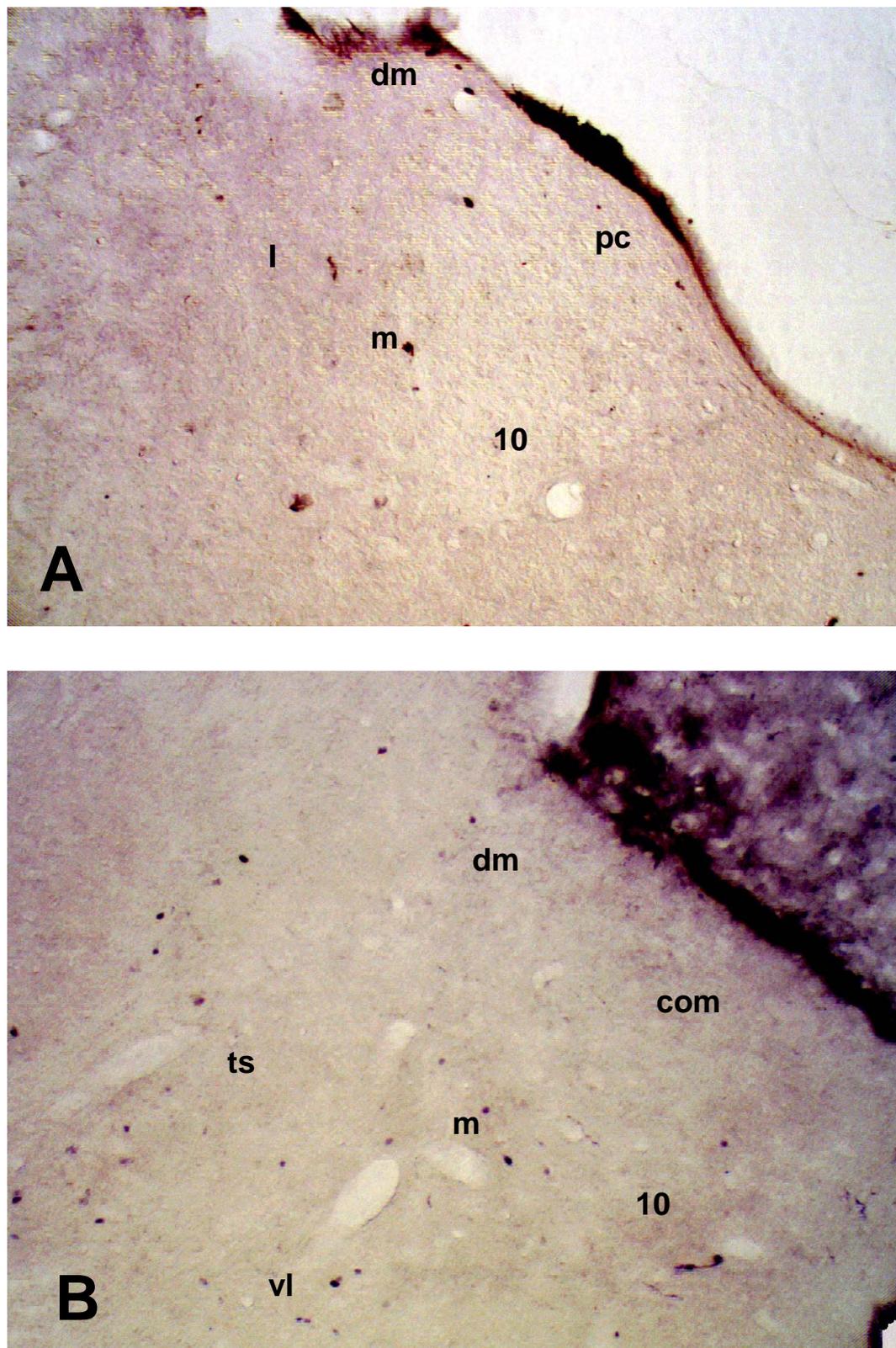
**Fig. 4.19.** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al nivel Bregma -13.80 mm (Paxinos y Watson) (40) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el NTS, en los diferentes grupos experimentales.



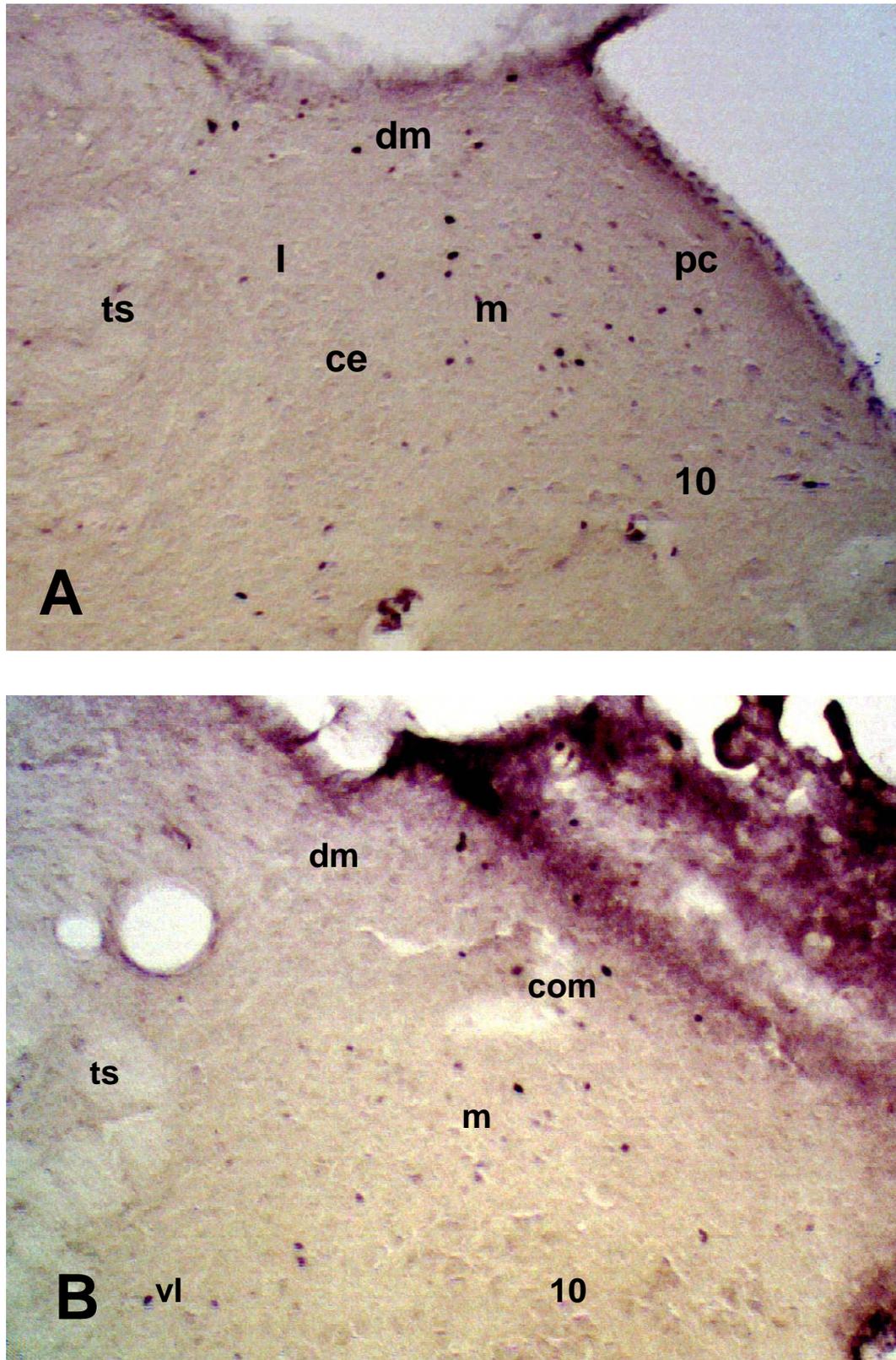
**Fig. 4.20.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del NTS a nivel de (A) Bregma -10.30 mm y (B) Bregma -10.80 mm, en ratas del grupo control simulado (CSF).



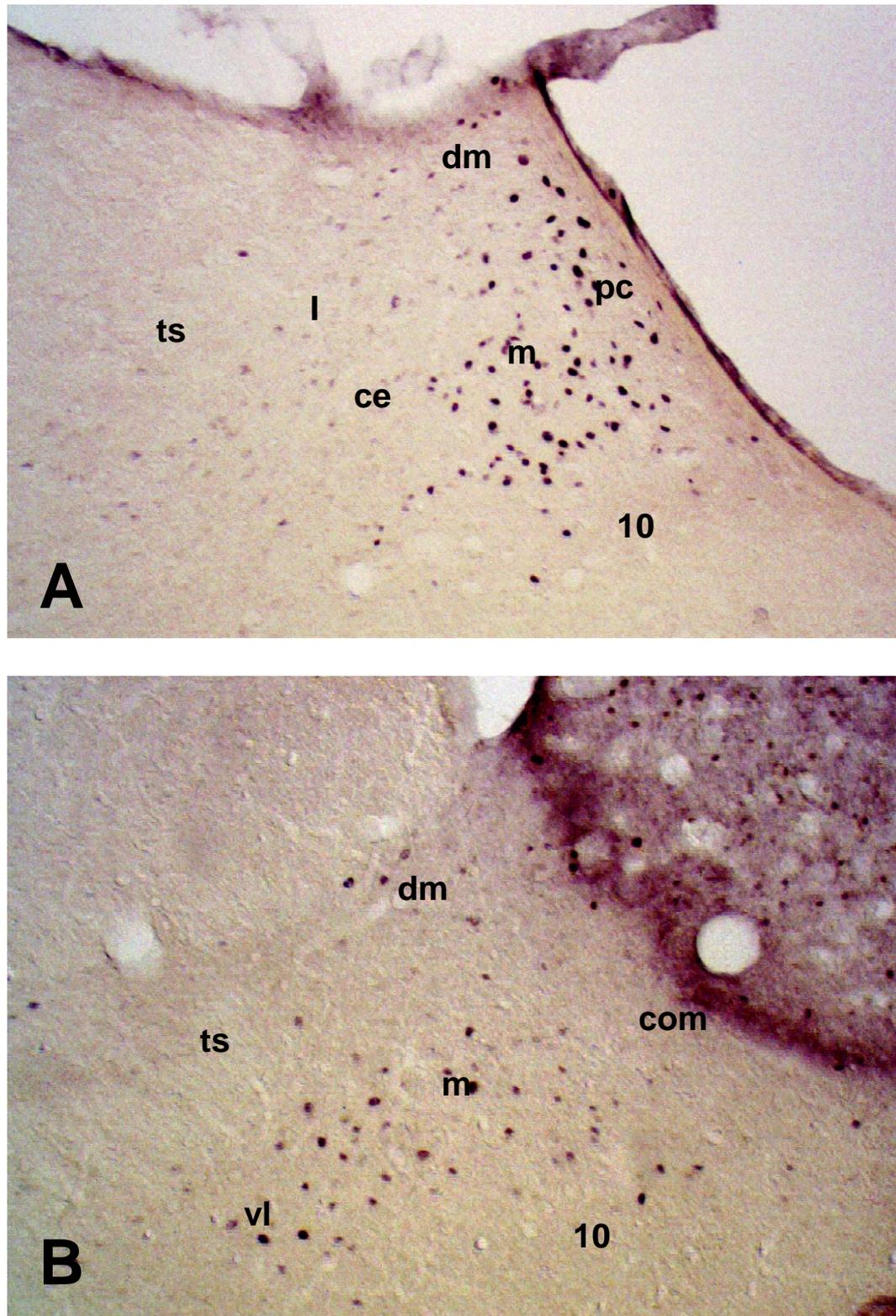
**Fig. 4.21.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del NTS a nivel de (A) Bregma -10.30 mm y (B) Bregma -10.80 mm, en ratas del grupo control pregabalina (CPG).



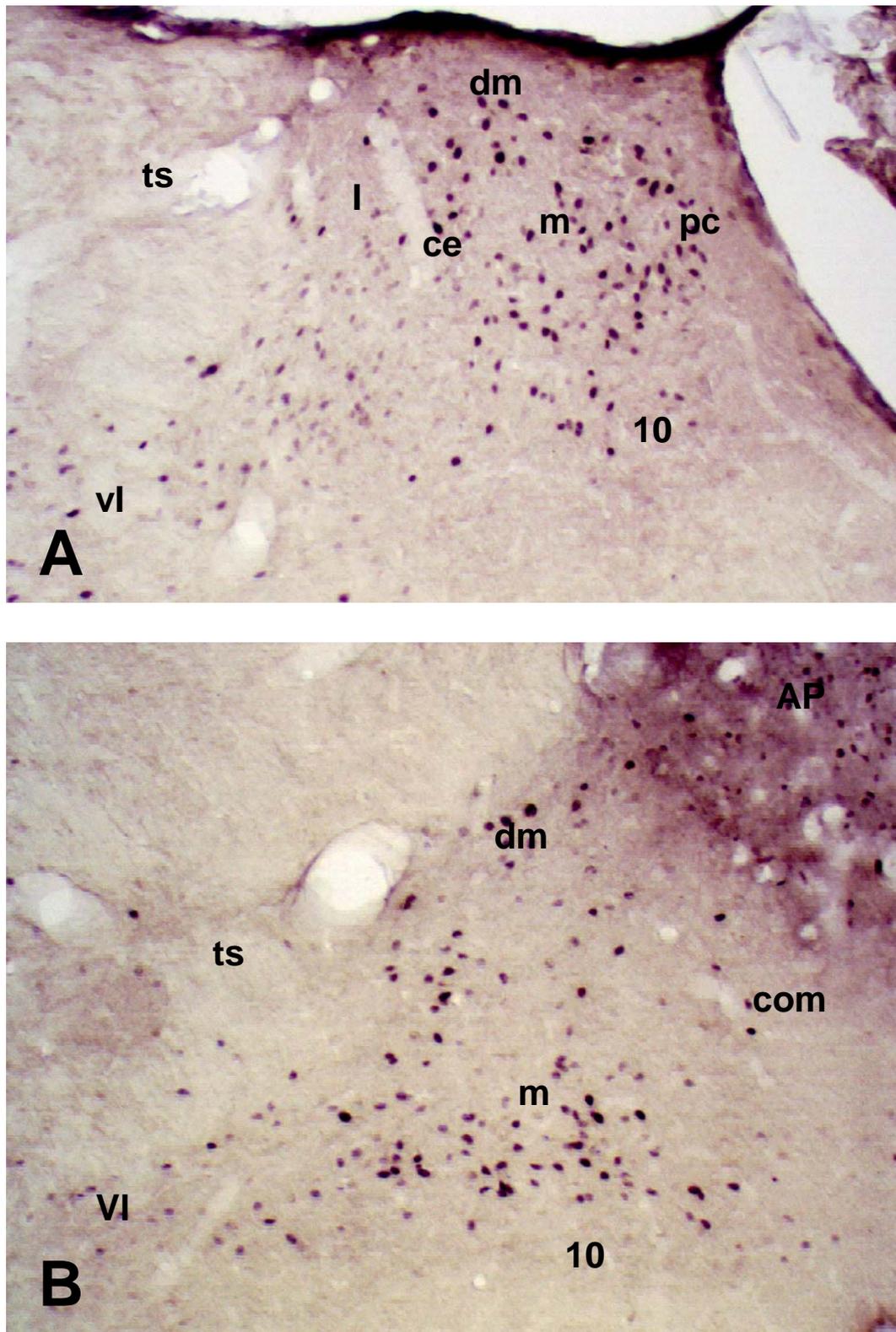
**Fig. 4.22.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del NTS a nivel de (A) Bregma -10.30 mm y (B) Bregma -10.80 mm, en ratas del grupo dolor nociceptivo (CNC).



**Fig. 4.23.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del NTS a nivel de (A) Bregma -10.30 mm y (B) Bregma -10.80 mm, en ratas del grupo dolor neuropático (CNP).



**Fig. 4.24.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del NTS a nivel de (A) Bregma -10.30 mm y (B) Bregma -10.80 mm, en ratas del grupo pregabalina dolor nociceptivo (PGNC).



**Fig. 4.25.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del NTS a nivel de (A) Bregma -10.30 mm y (B) Bregma -10.80 mm, en ratas del grupo pregabalina dolor neuropático (PGNP).

## 4.- Porción Lateral del Núcleo Parabraquial.

La Porción Lateral del Núcleo Parabraquial (LPB) fue estudiado en 2 niveles rostrocaudales diferentes, situados a  $-8.88$  mm y  $-9.24$  mm del punto Bregma, correspondientes a los tercios intermedio y caudal, respectivamente, del LPB.

En ninguno de los grupos experimentales se observó un marcaje asimétrico.

### 4.1.- Estudio Cito y Quimioarquitectónico

La porción lateral del PB se subdividió para su estudio de acuerdo a criterios citoarquitectónicos, siguiendo la subdivisión propuesta por Fulwiler y Saper (135). 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 de los tercios 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.

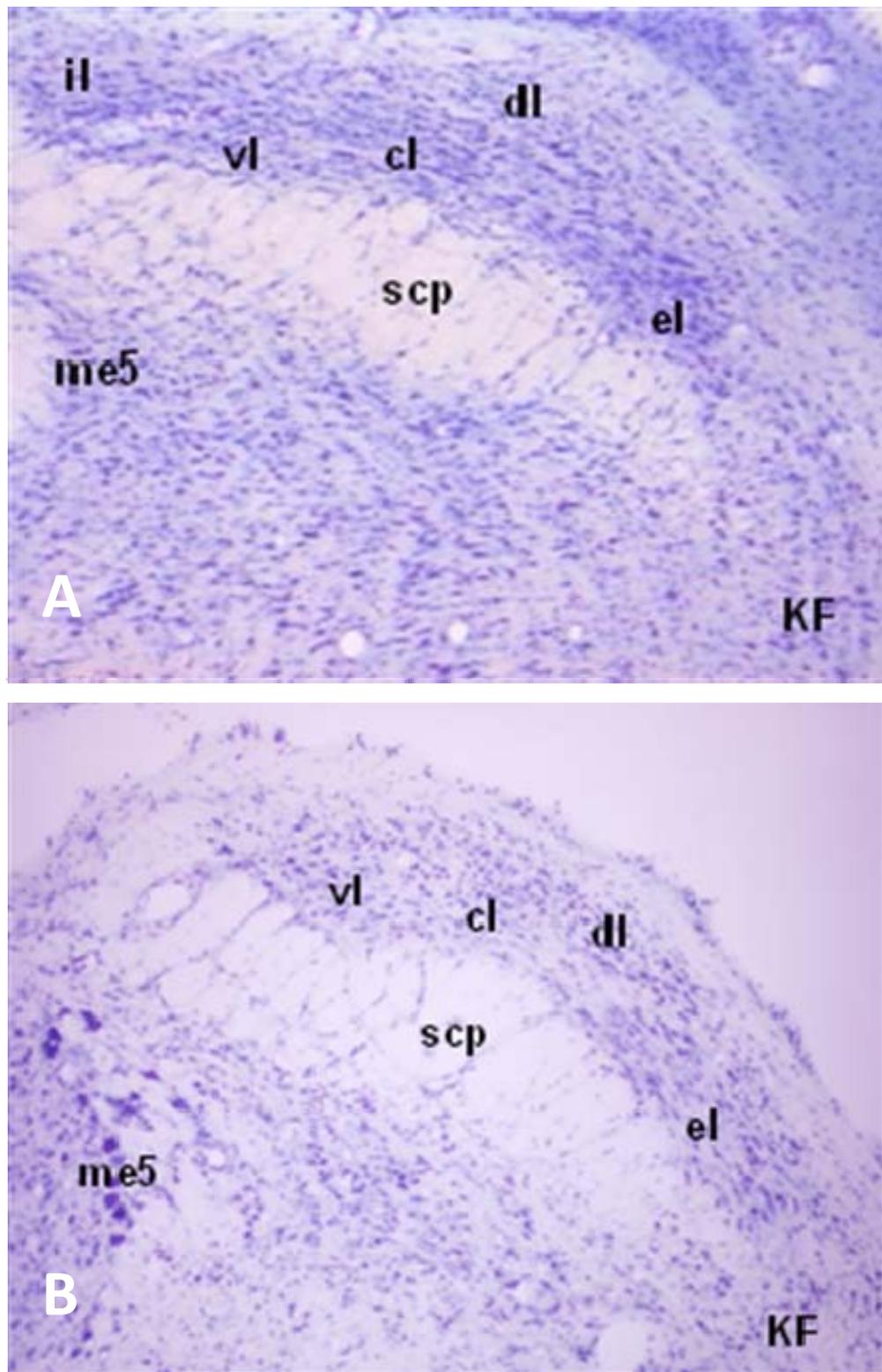
De esta forma los subnúcleos a delimitar fueron, según el tercio correspondiente:

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

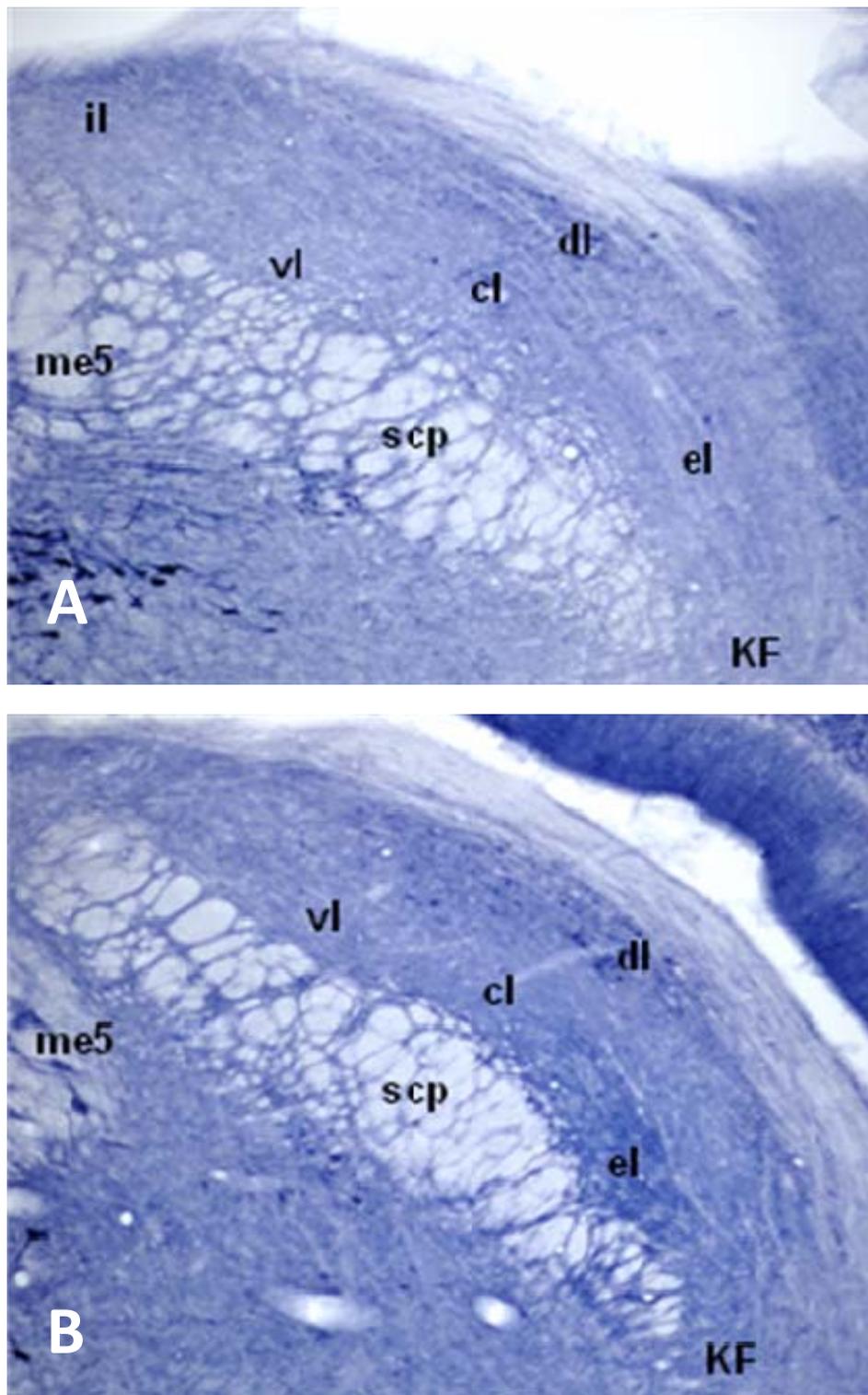
Fuse (KF).

2) *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 2 técnicas cito y quimioarquitectónica (Nissl y NADPHd) en cortes seriados consecutivos a los procesados para la detección inmunohistoquímica de la proteína Fos (fig.4.26 y 4.27).



**Fig. 4.26.** Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel de la porción lateral del PB de rata, procesados con la técnica de Nissl, en 2 niveles rostrocaudales diferentes: (A) nivel INTERMEDIO y (B) 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. 4.27.** 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 2 niveles rostrocaudales diferentes: (A) nivel INTERMEDIO y (B) 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).

#### 4.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico

Las ratas del grupo control simulado (CSF) mostraron escasa inmunorreactividad frente a Fos en la porción lateral del PB en los 2 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 INTERMEDIO (Bregma -8.88 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 (fig.4.30).

#### 4.3.- Grupo Control Pregabalina

La administración de 30 mg/kg de pregabalina por vía i.p. 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 al grupo CSF. El marcaje fue bilateral y sin diferencias estadísticamente significativas entre la hemisección derecha y la izquierda.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -8.88 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 CSF.

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 al grupo CSF. En el resto de subnúcleos también se repitió el patrón apuntado en el nivel intermedio (fig.4.31).

#### 4.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo

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 inmunorreactividad 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.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -8.88 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 CSF en el subnúcleo clPB, 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 CSF fue el dlPB, volviendo el resto de subnúcleos a valores prácticamente basales (fig.4.32).

#### 4.5.- Grupo Control Dolor Neuropático

El grupo estimulado con dolor neuropático mediante la constricción crónica del nervio ciático, presentó al igual que los ejemplares estimulados con dolor nociceptivo, un incremento bilateral, estadísticamente significativo, del número de células Fos-positivas con predominio contralateral. Asimismo, mientras que en los animales del grupo CNC era el subnúcleo dlPB el más inmunorreactivo frente a Fos, en los del grupo CNP el mayor incremento de elementos marcados lo ofreció el subnúcleo crlPB.

A nivel INTERMEDIO (Bregma -8.88 mm) ya se produjo un incremento notable del número de células marcadas, a expensas del subnúcleo dlPB y crlPB, aunque sin alcanzar los valores obtenidos en el grupo CNC.

A nivel CAUDAL (Bregma -9.24 mm) se mantuvo claramente la elevada inmunorreactividad del subnúcleo dlPB, manteniéndose discretamente por encima de los valores basales el subnúcleo crlPB (fig.4.33).

#### 4.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo

En los animales tratados con pregabalina 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 CNC. 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 INTERMEDIO (Bregma -8.88 mm), al igual que en el grupo CNC, 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 CSF y del mismo modo que el grupo CNC fue el dIPB (fig.4.34).

#### 4.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático

La administración previa al estímulo nociceptivo neuropático de pregabalina, por vía i.p., del mismo modo que en el grupo CPG, 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 INTERMEDIO (Bregma -8.88 mm) el patrón de distribución de Fos fue en todo similar al observado en los ejemplares del grupo CPG (gran expresión de c-fos en los subnúcleos cIPB y eIPB), incluida la escasa inmunorreactividad detectada en el subnúcleo dIPB

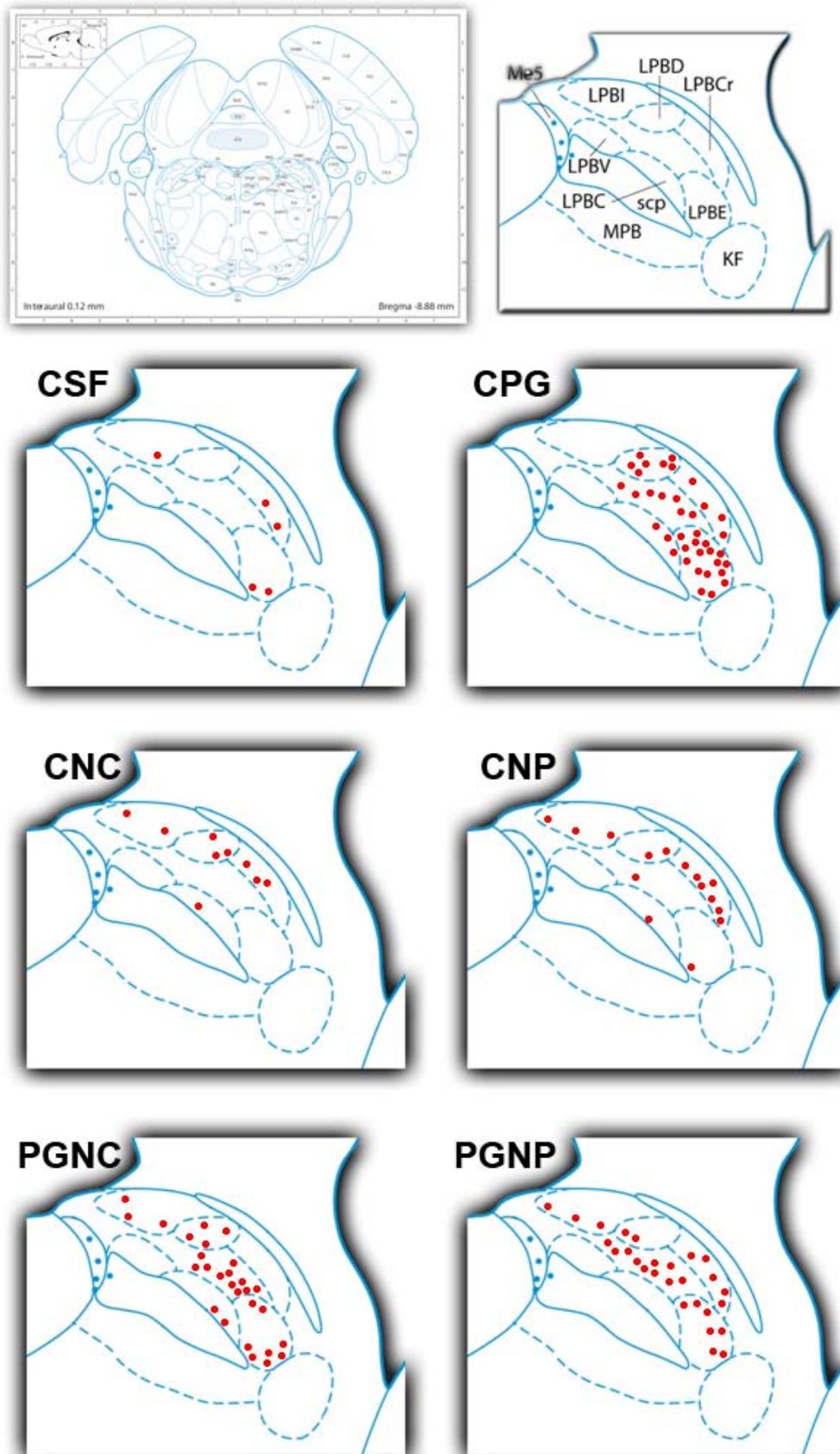
de la hemisección contralateral, que de este modo no mostró la inmunorreactividad provocada por el test de la formalina.

A nivel CAUDAL (Bregma  $-9.24$  mm) se mantuvo el mismo patrón descrito para el nivel intermedio (fig.4.35).

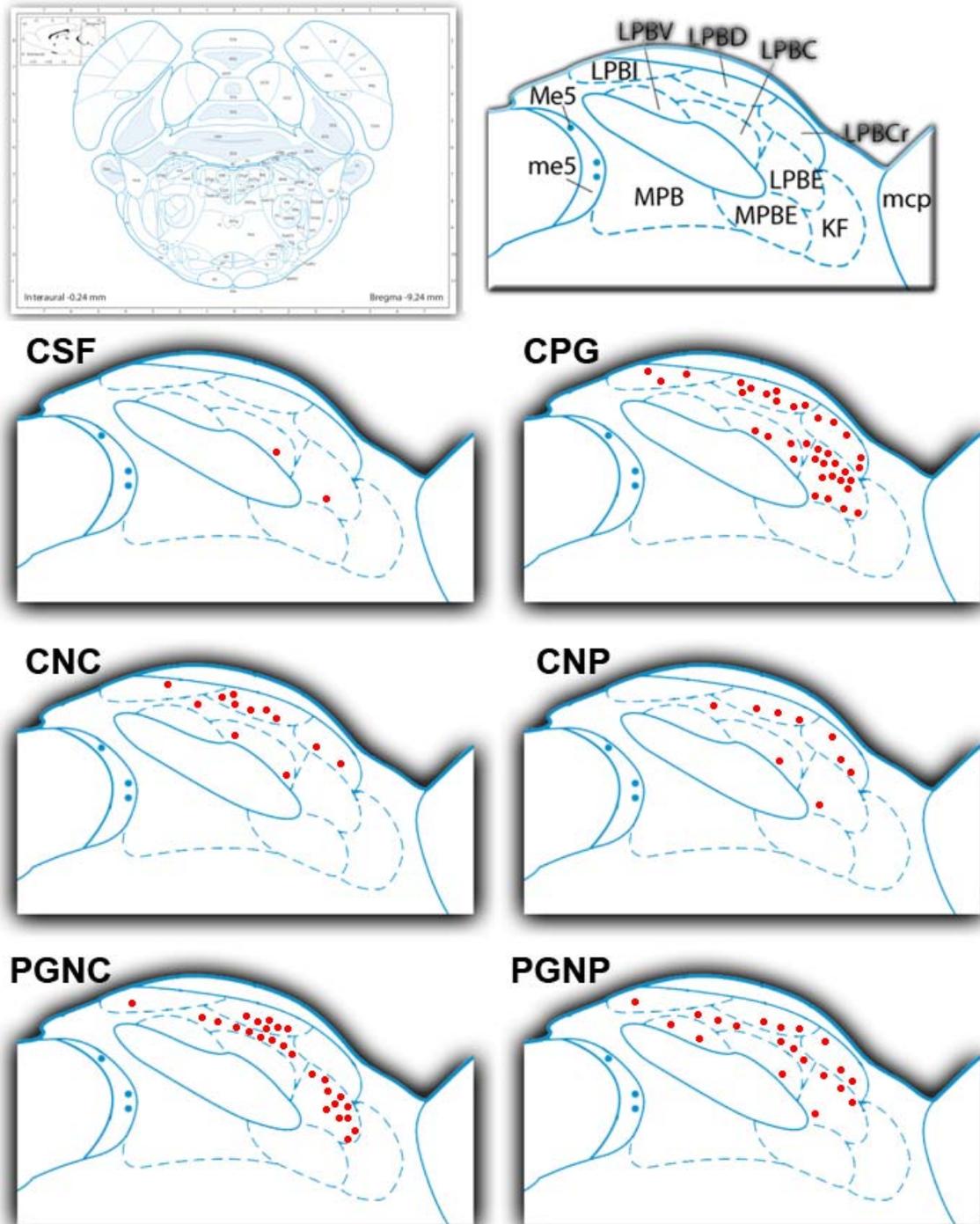
Estos resultados se resumen en la tabla 4.3 y las fig.4.28 y 4.29.

Niveles	Grupo Experimental					
	CSF	CPG	CNC	CNP	PGNC	PGNP
intermedio	9 $\pm$ 5	131 $\pm$ 19	49 $\pm$ 9	31 $\pm$ 11	65 $\pm$ 11	66 $\pm$ 13
caudal	5 $\pm$ 4	81 $\pm$ 13	31 $\pm$ 5	21 $\pm$ 8	55 $\pm$ 9	27 $\pm$ 7

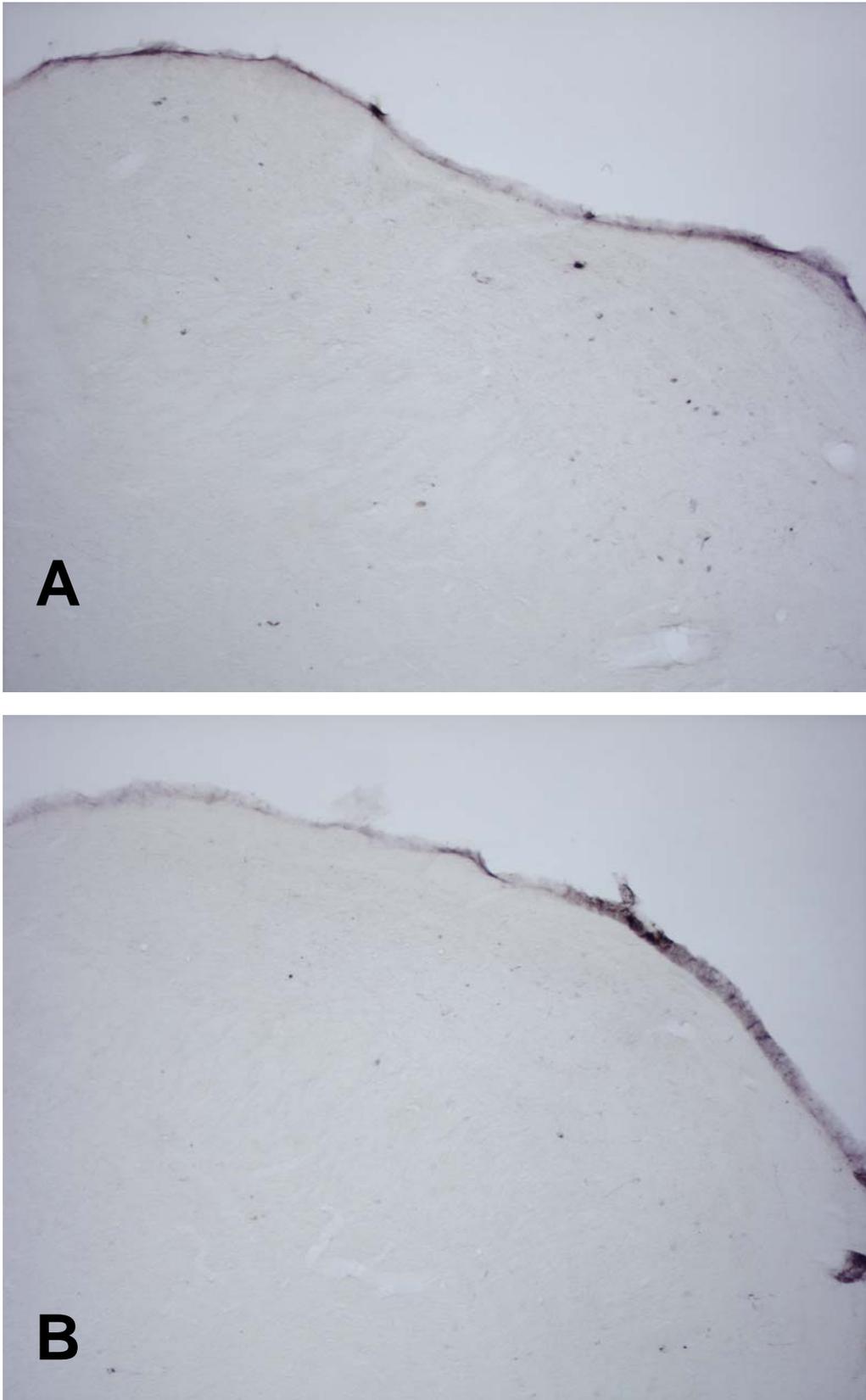
**Tabla 4.3.-** Media ( $\pm$ Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de  $40 \mu\text{m}$  del LPB en los dos niveles seleccionados.



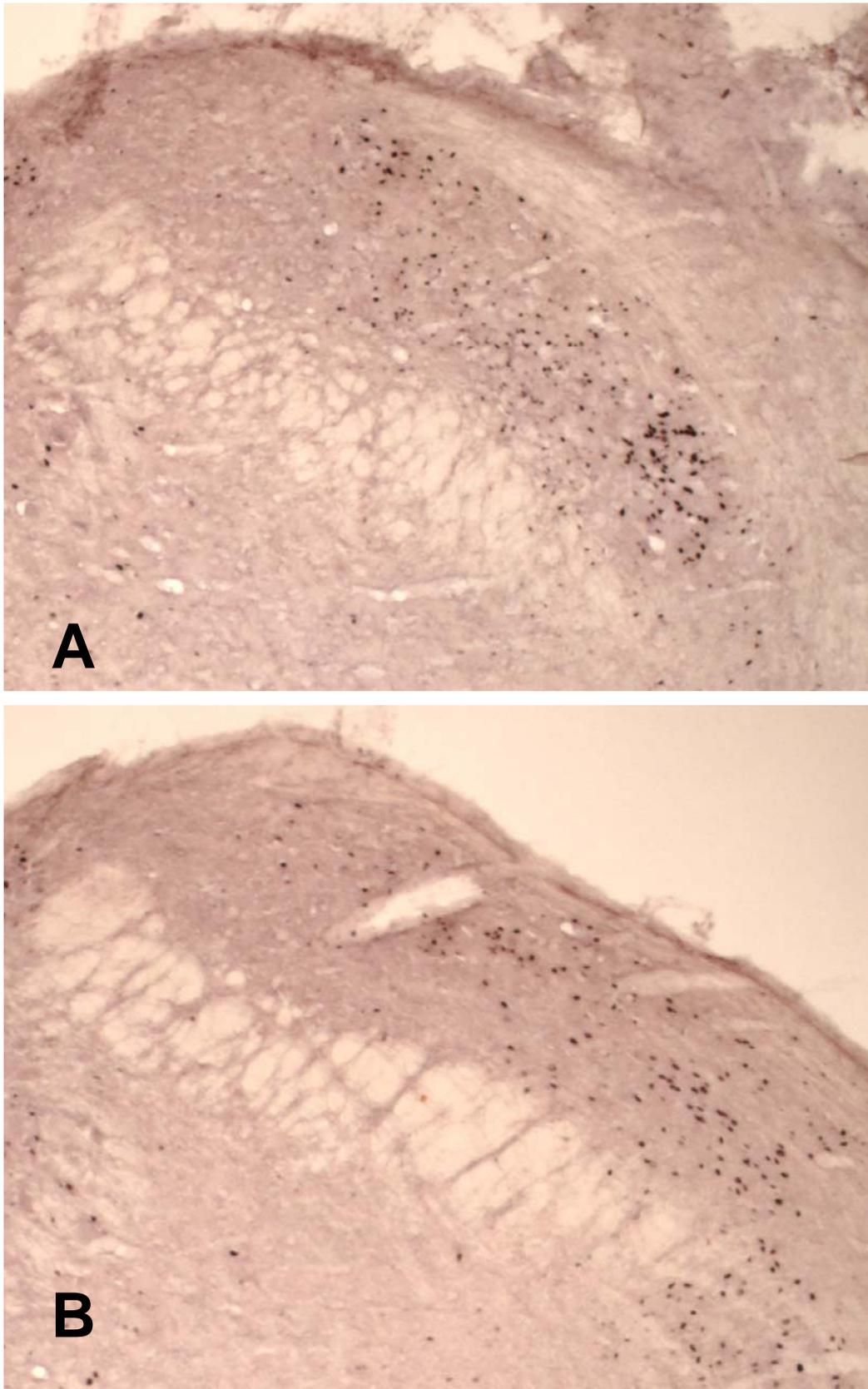
**Fig. 4.28.** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al nivel Bregma -8.88 mm (Paxinos y Watson) (40) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el LPB, en los diferentes grupos experimentales.



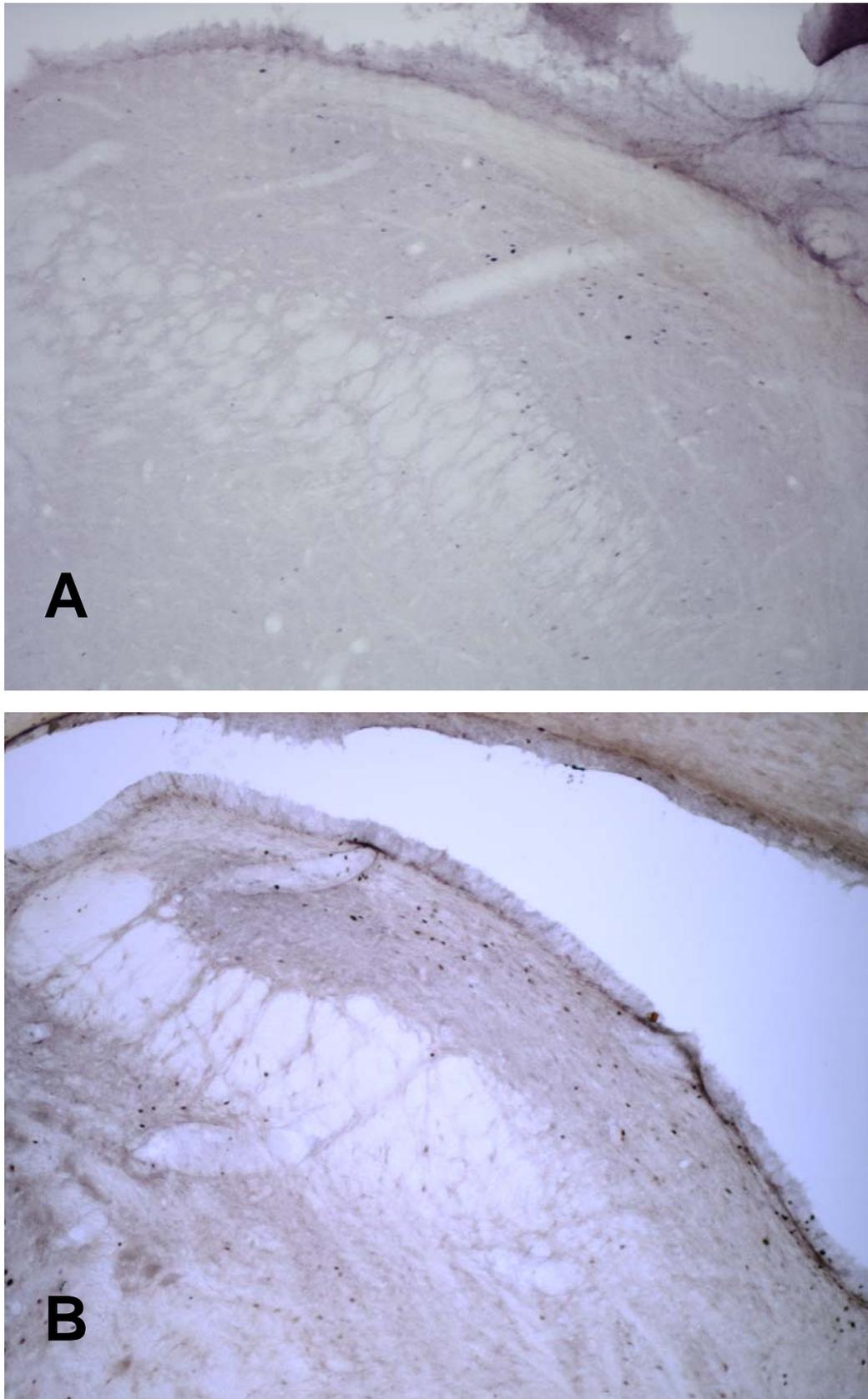
**Fig. 4.29.** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al nivel Bregma -9.24 mm (Paxinos y Watson) (40) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el LPB, en los diferentes grupos experimentales.



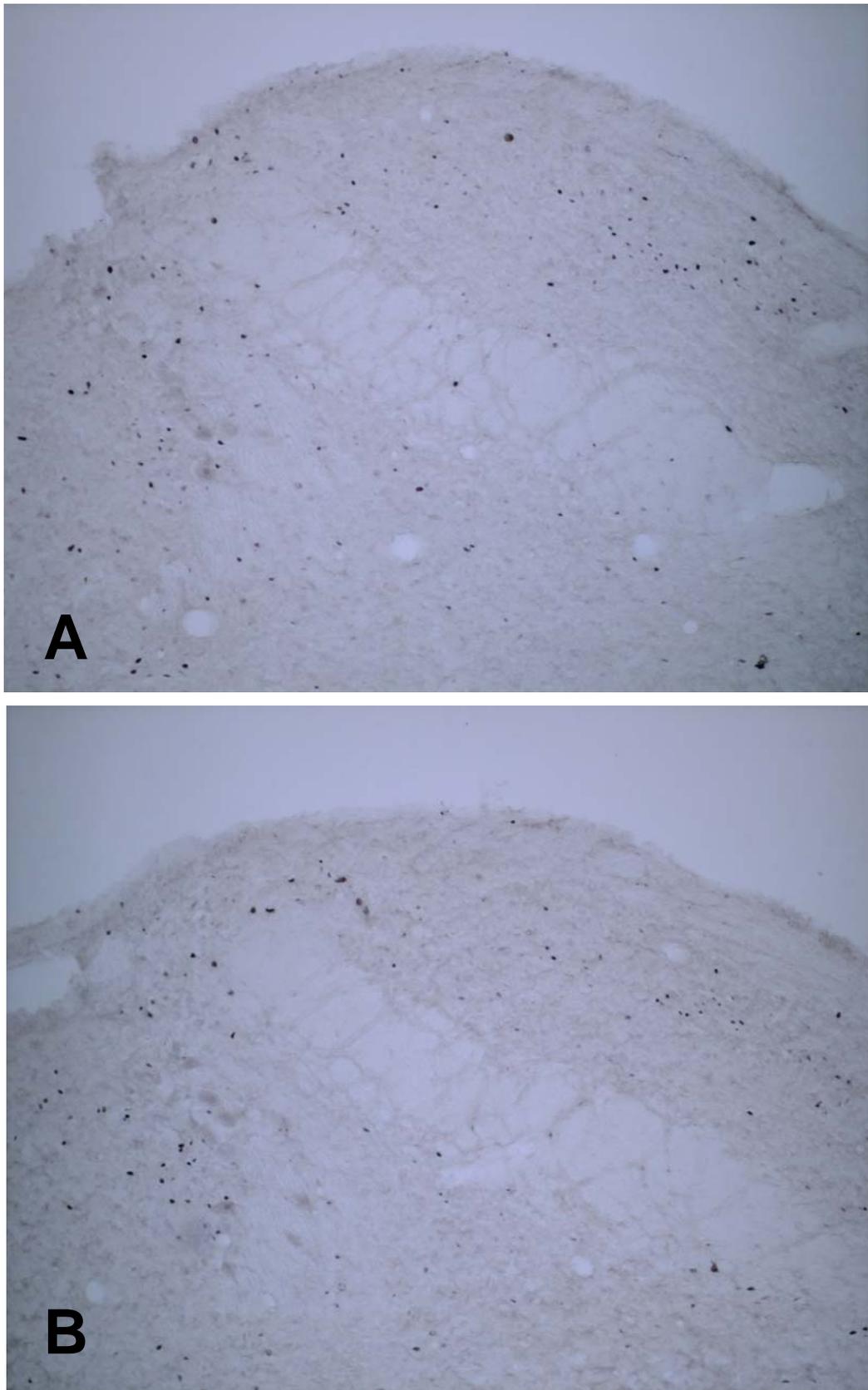
**Fig. 4.30.** Microfotografías (A) (4x) y (B) (10x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control simulado (CSF), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



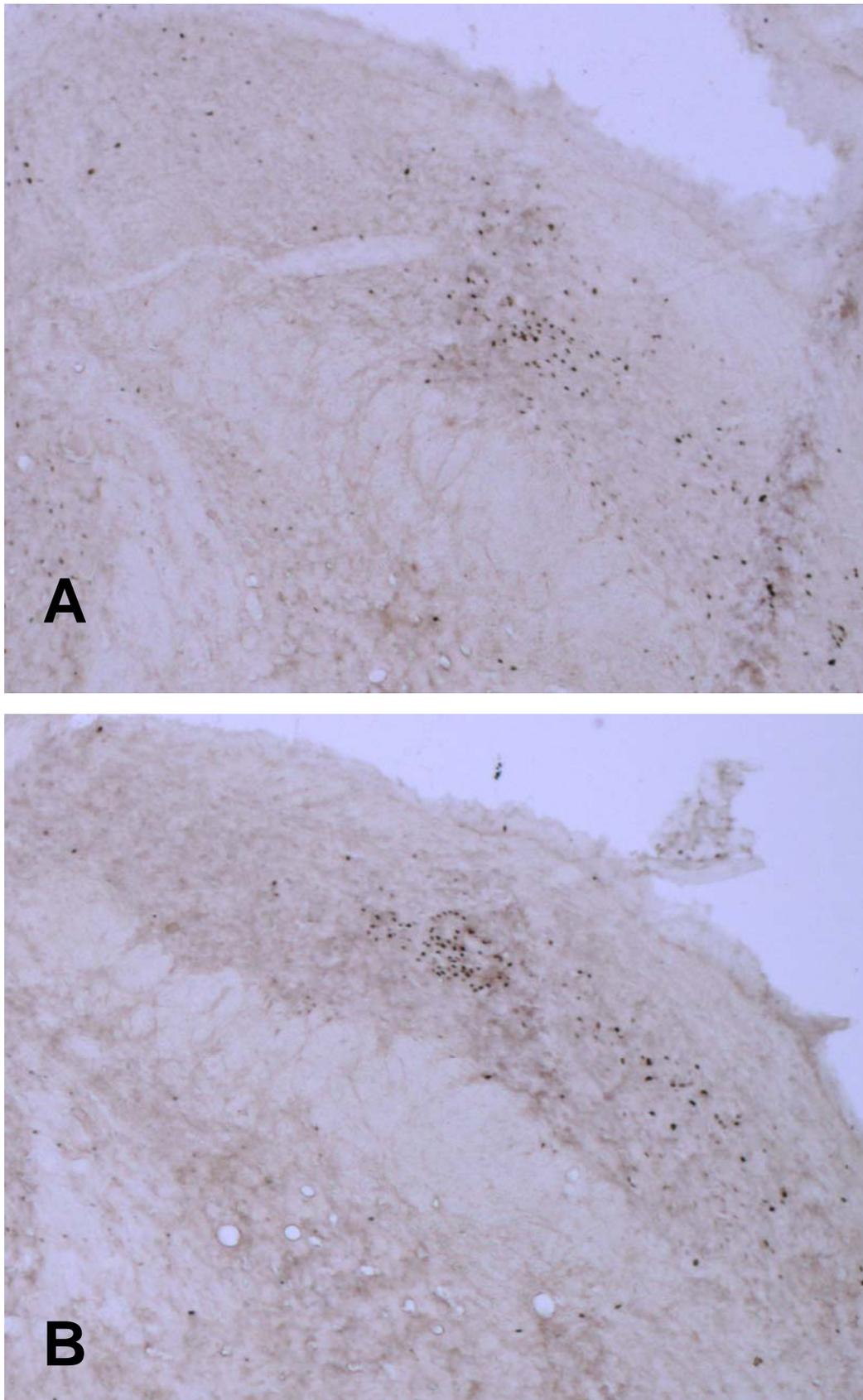
**Fig. 4.31.** Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (10x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control pregabalina (CPG), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



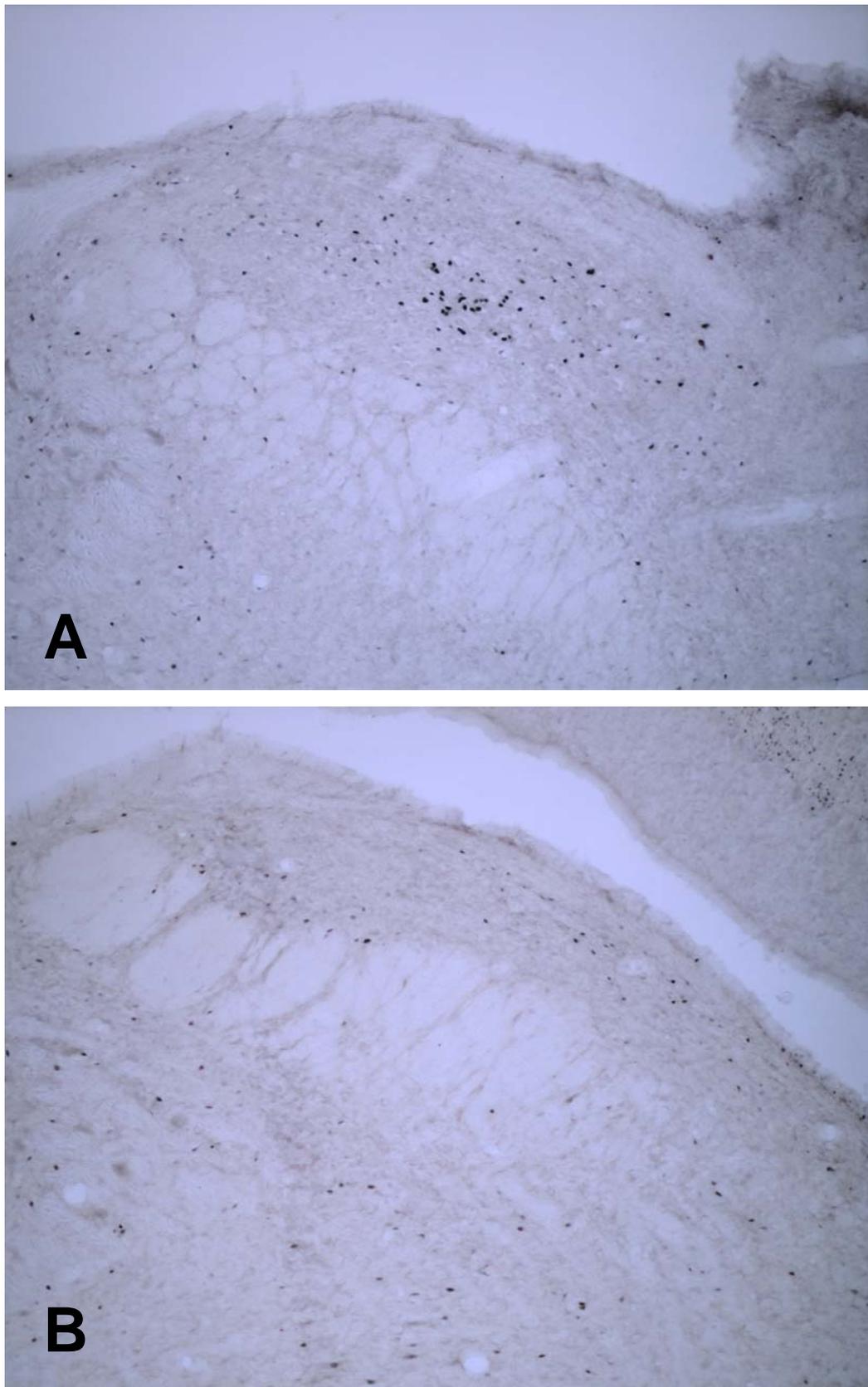
**Fig. 4.32.** Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo control dolor nociceptivo (CNC), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



**Fig. 4.33.** Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (20x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo control dolor neuropático (CNP), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



**Fig. 4.34.** Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (20x) de cortes coronales a nivel del tercio CAUDAL de la porción lateral del PB de rata del grupo pregabalina dolor nociceptivo (PGNC), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.



**Fig. 4.35.** Microfotografías **(A)** (4x) y **(B)** (20x) de cortes coronales a nivel del tercio INTERMEDIO de la porción lateral del PB de rata del grupo pregabalina dolor neuropático (PGNP), que muestran la inmunorreactividad frente a Fos.

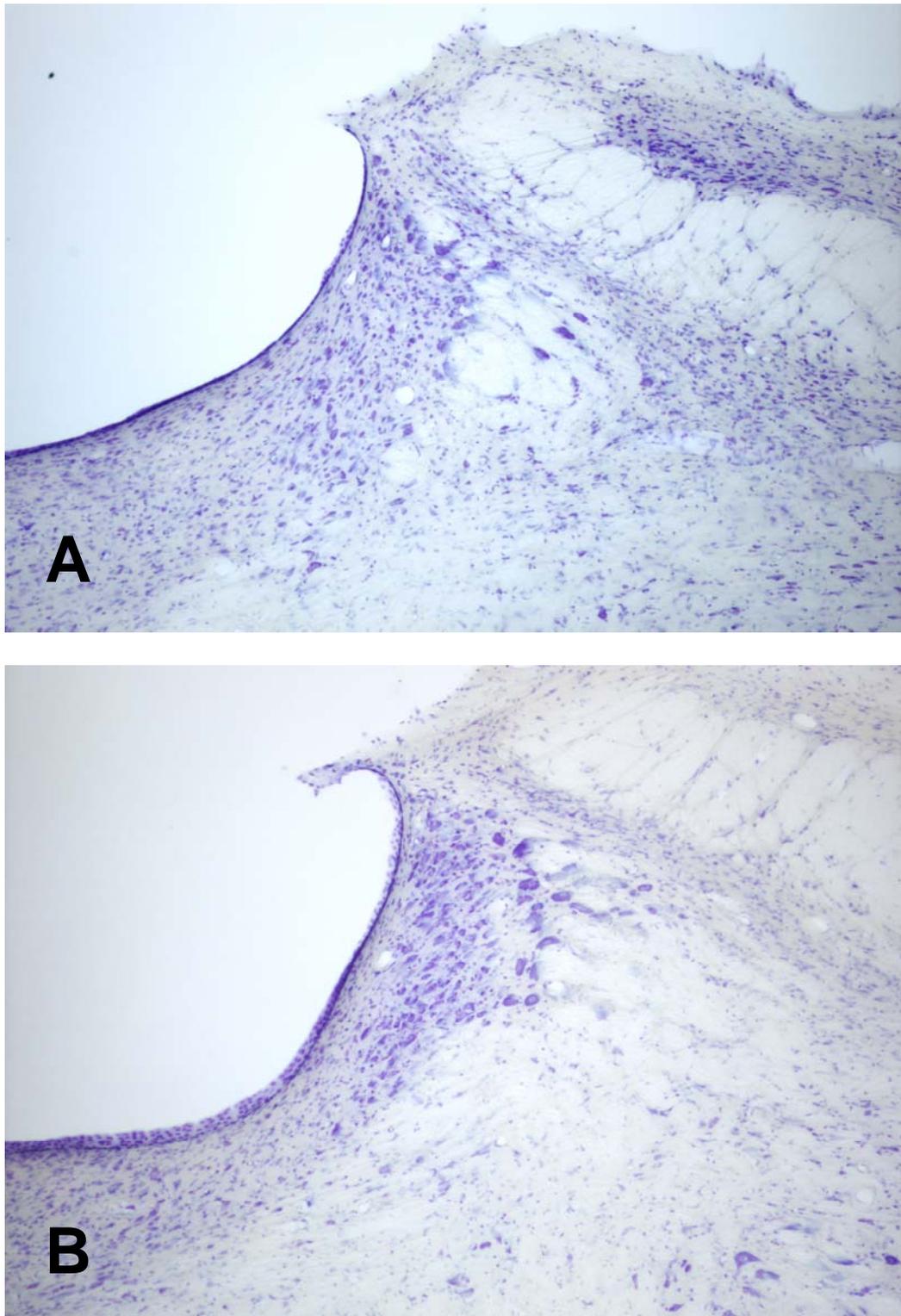
## **5.- Locus Coeruleus.**

El locus coeruleus (LC) fue estudiado en dos niveles rostrocaudales diferentes, situados a -9.60 mm y -9.96 mm de Bregma.

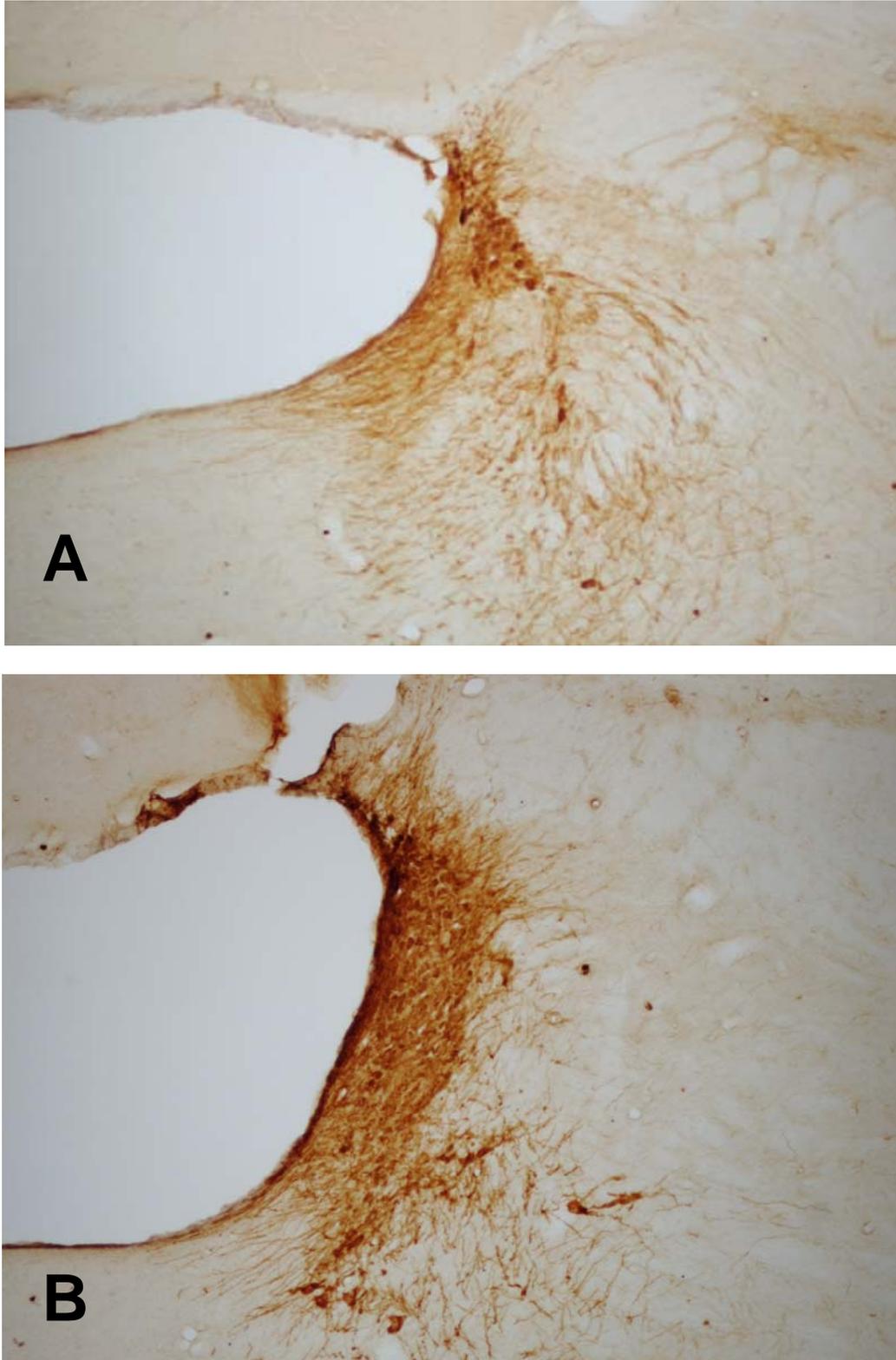
En ninguno de los grupos experimentales se observó un marcaje asimétrico.

### **5.1.- Estudio Cito e Inmunoquimioarquitectónico**

Para su delimitación se procedió a la realización de 2 técnicas cito e inmunoquimioarquitectónica (Nissl y anti-TH) en cortes seriados consecutivos a los procesados para la detección inmunohistoquímica de la proteína Fos (fig.4.36 y 4.37).



**Fig. 4.36.** *Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel del LC de rata, procesados con la técnica de Nissl, en 2 niveles rostrocaudales diferentes: (A) nivel ROSTRAL (B) nivel CAUDAL.*



**Fig. 4.37.** *Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel del LC de rata, procesados para la detección inmunocitoquímica de la enzima tyrosinhidroxilasa (TH), en 2 niveles rostrocaudales diferentes: (A) nivel ROSTRAL (B) nivel CAUDAL.*

### 5.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico (CSF)

La expresión de c-fos en el LC de los ejemplares del grupo simulado fue escasa pero consistente en ambos niveles rostrocaudales (fig.4.40).

### 5.3.- Grupo Control Pregabalina (CPG)

La administración de 30 mg/kg de pregabalina por vía i.p. indujo un incremento en el número de células inmunopositivas en los 2 niveles estudiados del LC, mucho más intenso en el nivel caudal (fig.4.41).

### 5.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo (CNC)

La aplicación del test de la formalina en el dorso de la pata trasera derecha de los animales del grupo CNC provocó un incremento generalizado del marcaje frente a Fos, observándose un número similar de elementos inmunorreactivos en ambos niveles rostrocaudales del LC (fig.4.42).

### 5.5.- Grupo Control Dolor Neuropático (CNP)

El grupo estimulado con dolor neuropático mediante la constricción crónica del nervio ciático, presentó al igual que los ejemplares del grupo simulado fisiológico, un escaso número de células Fos-positivas, más evidente en el nivel caudal (fig.4.43).

### 5.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo (PGNC)

En los animales tratados con pregabalina 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 CNC, pero de mayor magnitud (fig.4.44).

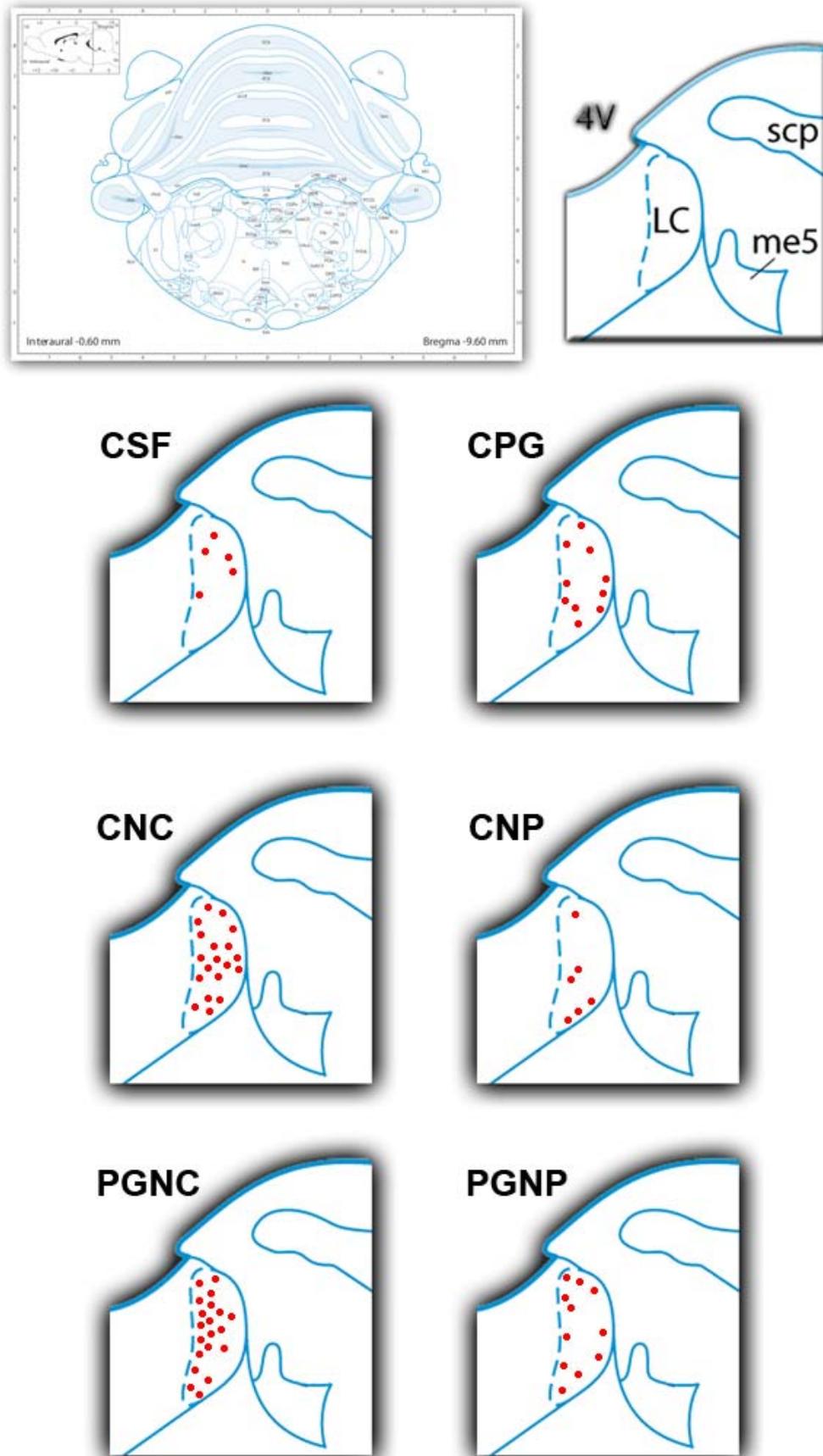
### 5.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático

La administración previa al estímulo nociceptivo neuropático de 30 mg/kg de pregabalina indujo, del mismo modo que en el grupo CPG, una fuerte inmunorreacción bilateral frente a Fos, de predominio caudal (fig.4.45).

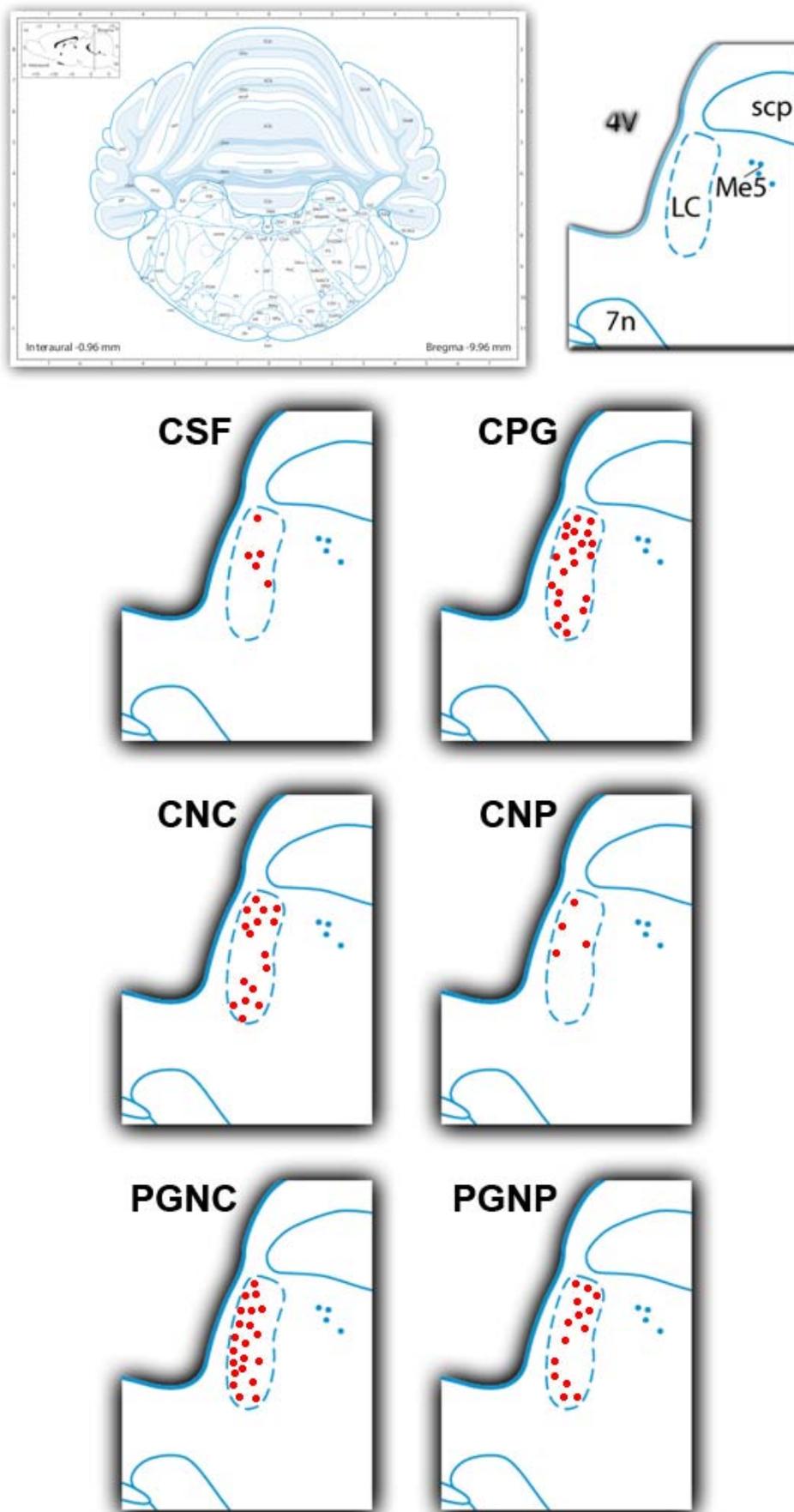
Estos resultados se resumen en la tabla 4.4 y las fig.4.38 y 4.39.

Niveles	Grupo Experimental					
	CSF	CPG	CNC	CNP	PGNC	PGNP
rostral	8±4	16±8	30±12	9±7	51±15	23±9
caudal	11±4	48±11	25±10	7±5	52±13	41±10

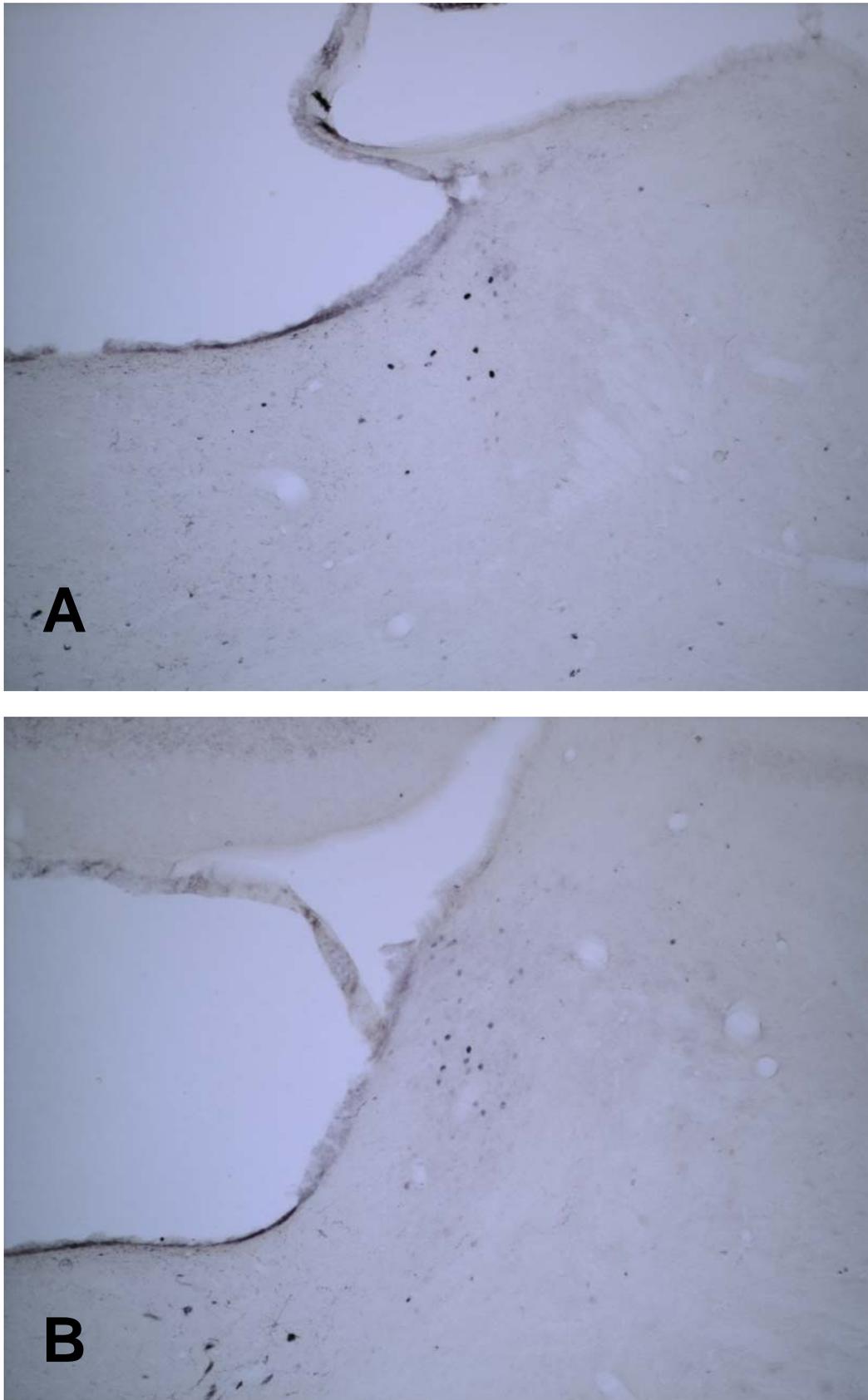
**Tabla 4.4.-** Media (±Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 µm del LC en los dos niveles seleccionados.



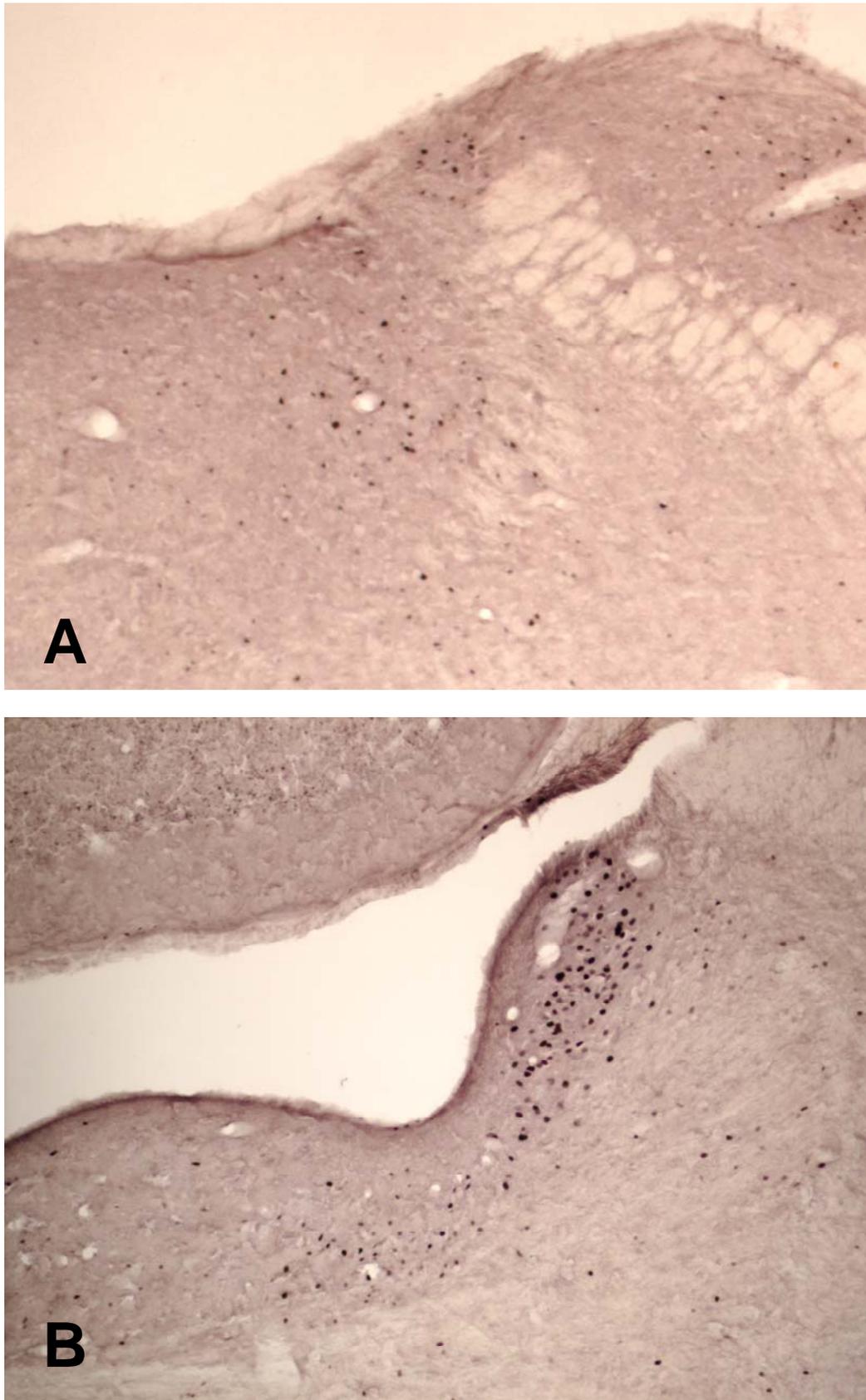
**Fig. 4.38.** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al nivel Bregma -9.60 mm (Paxinos y Watson) (40) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el LC, en los diferentes grupos experimentales.



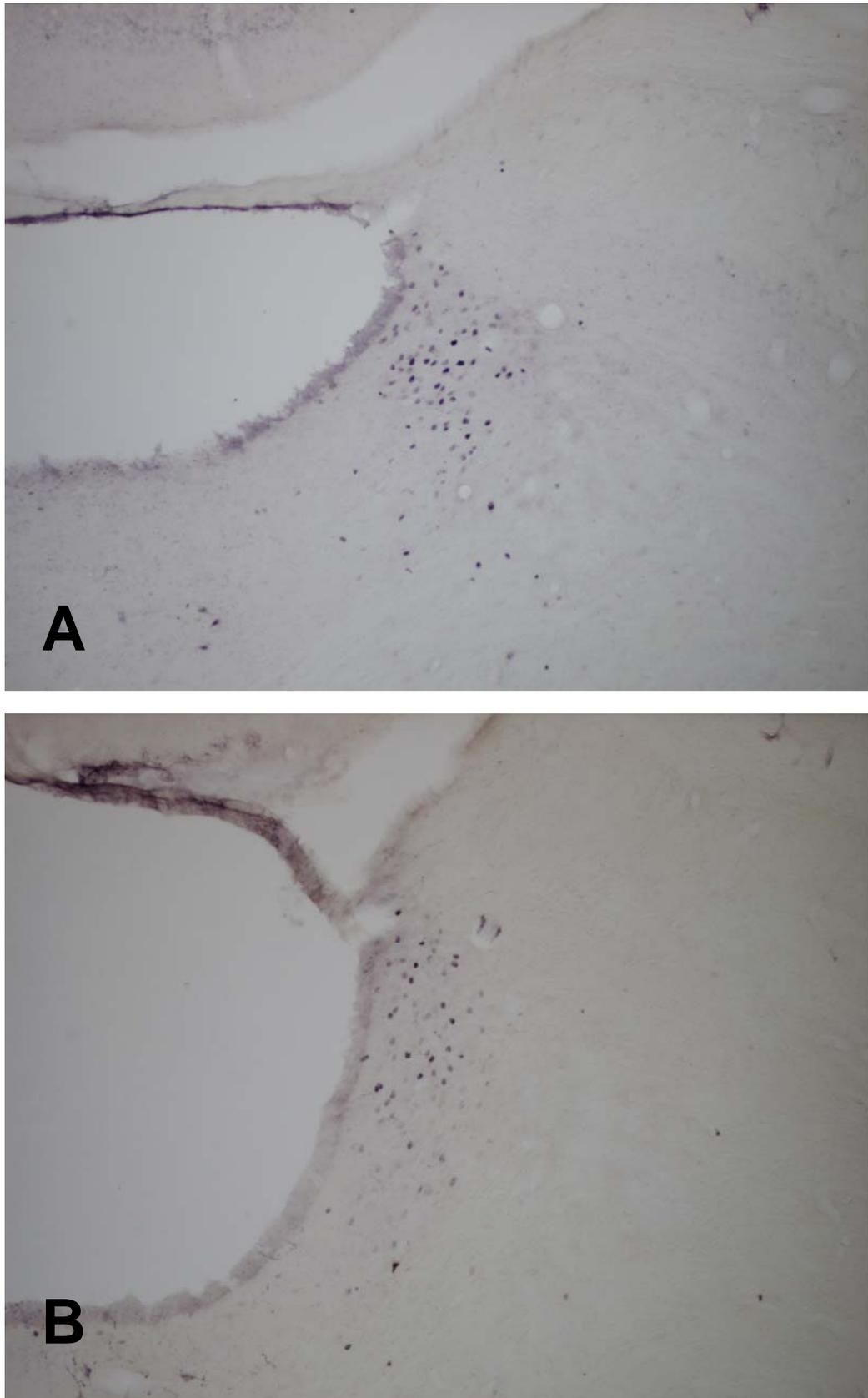
**Fig. 4.39.** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al nivel Bregma -9.96 mm (Paxinos y Watson) (40) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el LC, en los diferentes grupos experimentales.



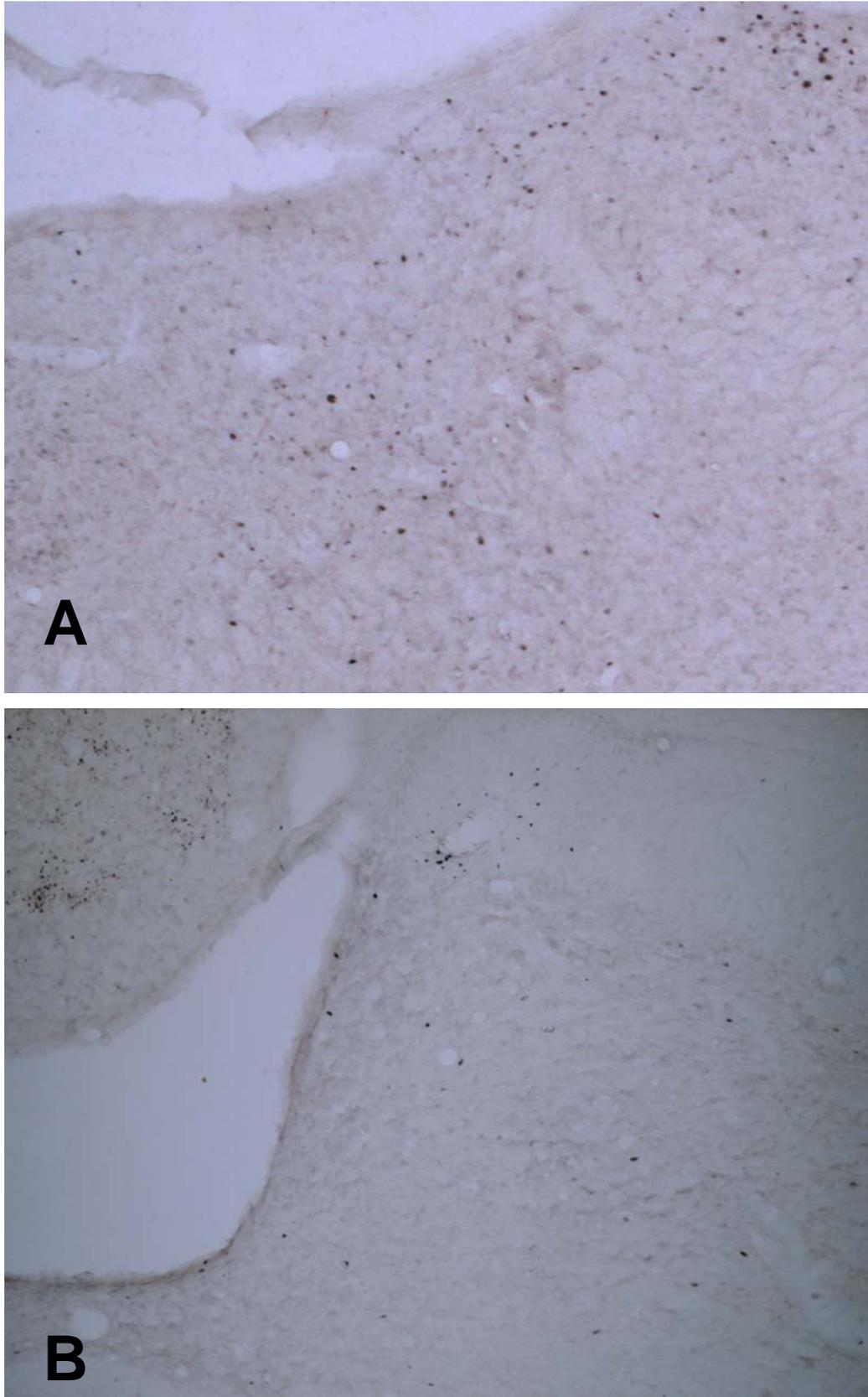
**Fig. 4.40.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del LC a nivel de (A) Bregma -9.60 mm y (B) Bregma -9.96 mm, en ratas del grupo control simulado (CSF).



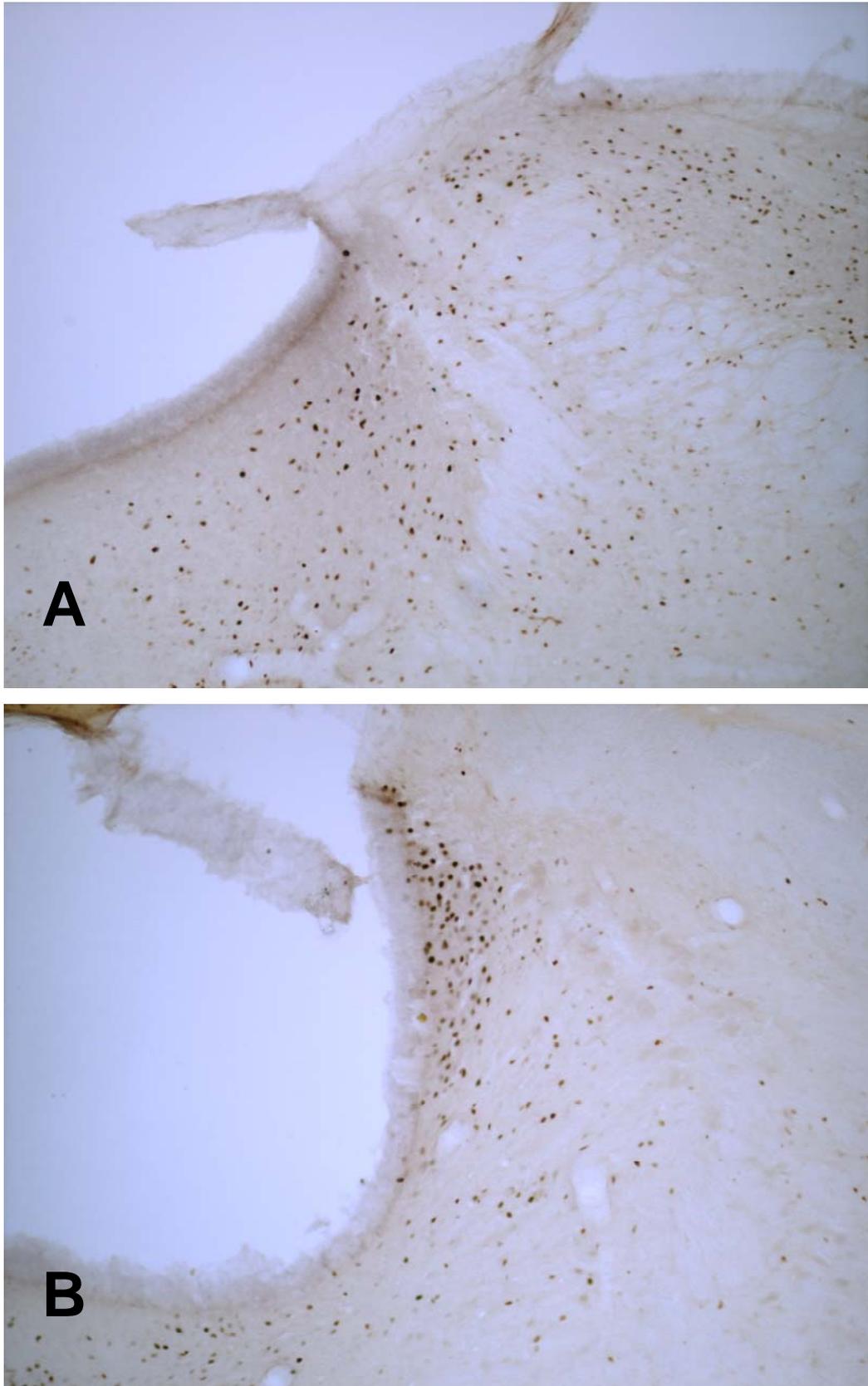
**Fig. 4.41.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del LC a nivel de (A) Bregma -9.60 mm y (B) Bregma -9.96 mm, en ratas del grupo control pregabalina (CPG).



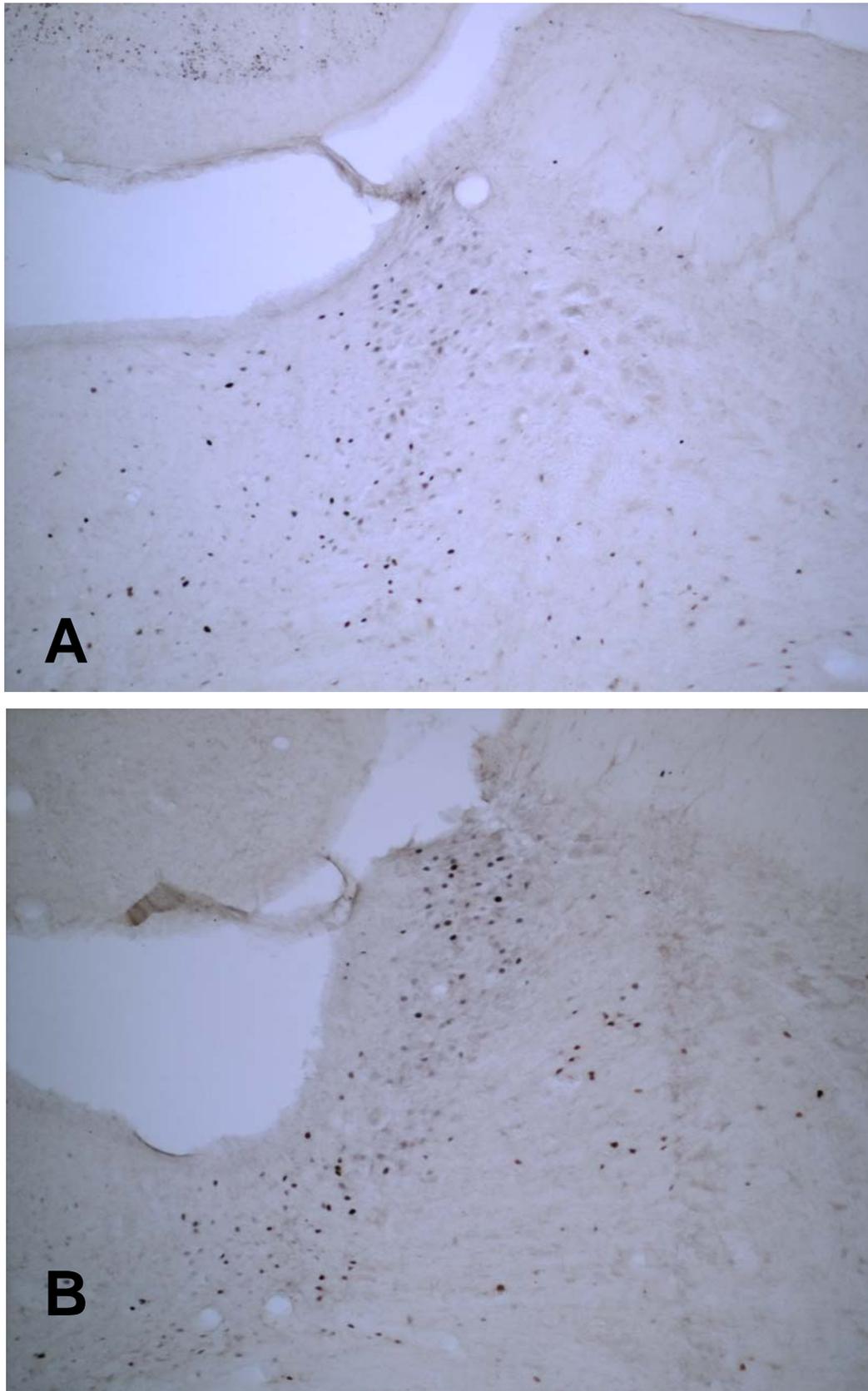
**Fig. 4.42.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del LC a nivel de (A) Bregma -9.60 mm y (B) Bregma -9.96 mm, en ratas del grupo control dolor nociceptivo (CNC).



**Fig. 4.43.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del LC a nivel de (A) Bregma -9.60 mm y (B) Bregma -9.96 mm, en ratas del grupo control dolor neuropático (CNP).



**Fig. 4.44.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del LC a nivel de (A) Bregma -9.60 mm y (B) Bregma -9.96 mm, en ratas del grupo pregabalina dolor nociceptivo (PGNC).



**Fig. 4.45.** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del LC a nivel de (A) Bregma -9.60 mm y (B) Bregma -9.96 mm, en ratas del grupo pregabalina dolor neuropático (PGNP).

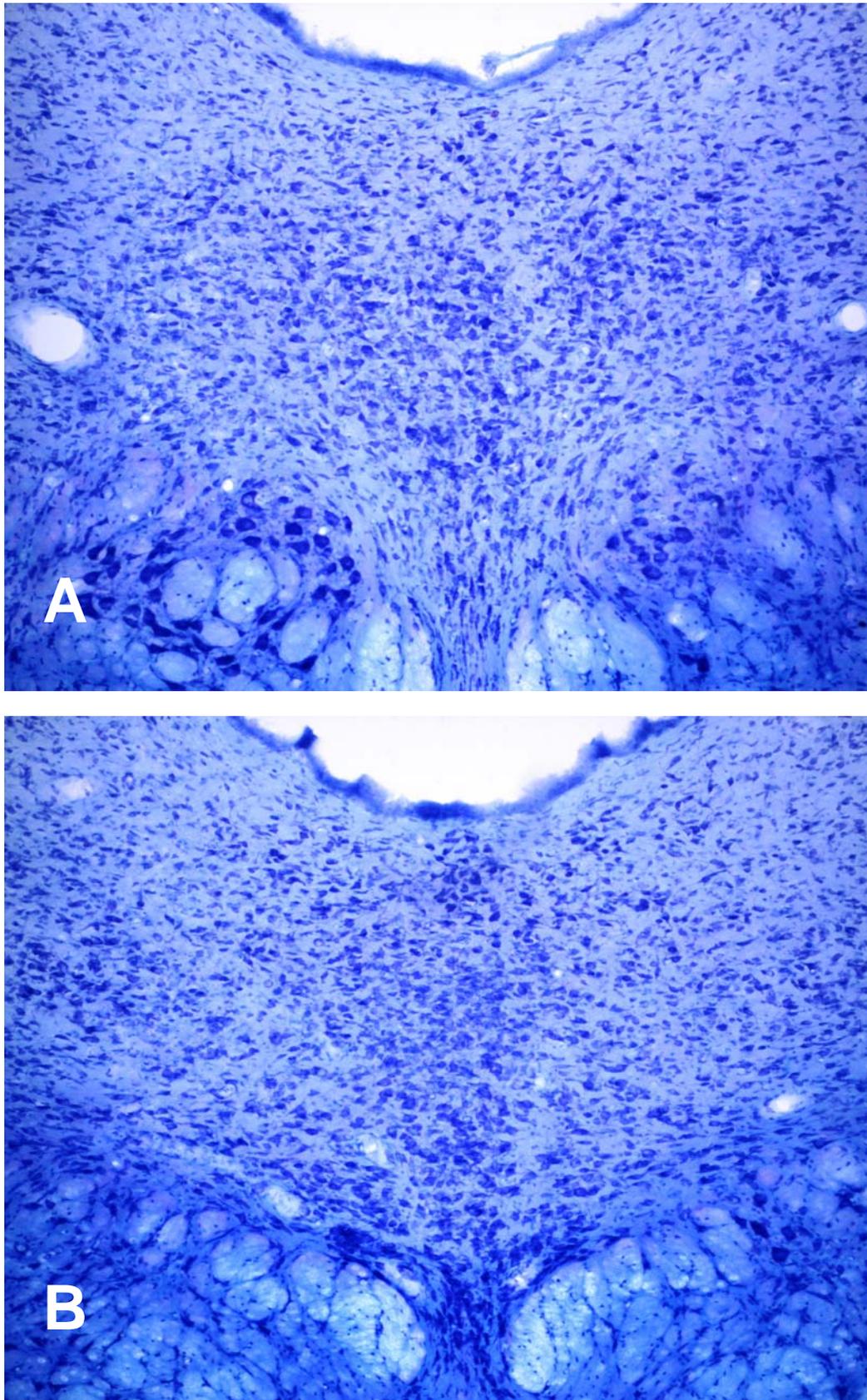
## **6.- Núcleo del Rafe Dorsal.**

El núcleo del rafe dorsal (DR) fue estudiado en 2 niveles rostrocaudales diferentes, situados a -7.20 mm y -8.04 mm de Bregma.

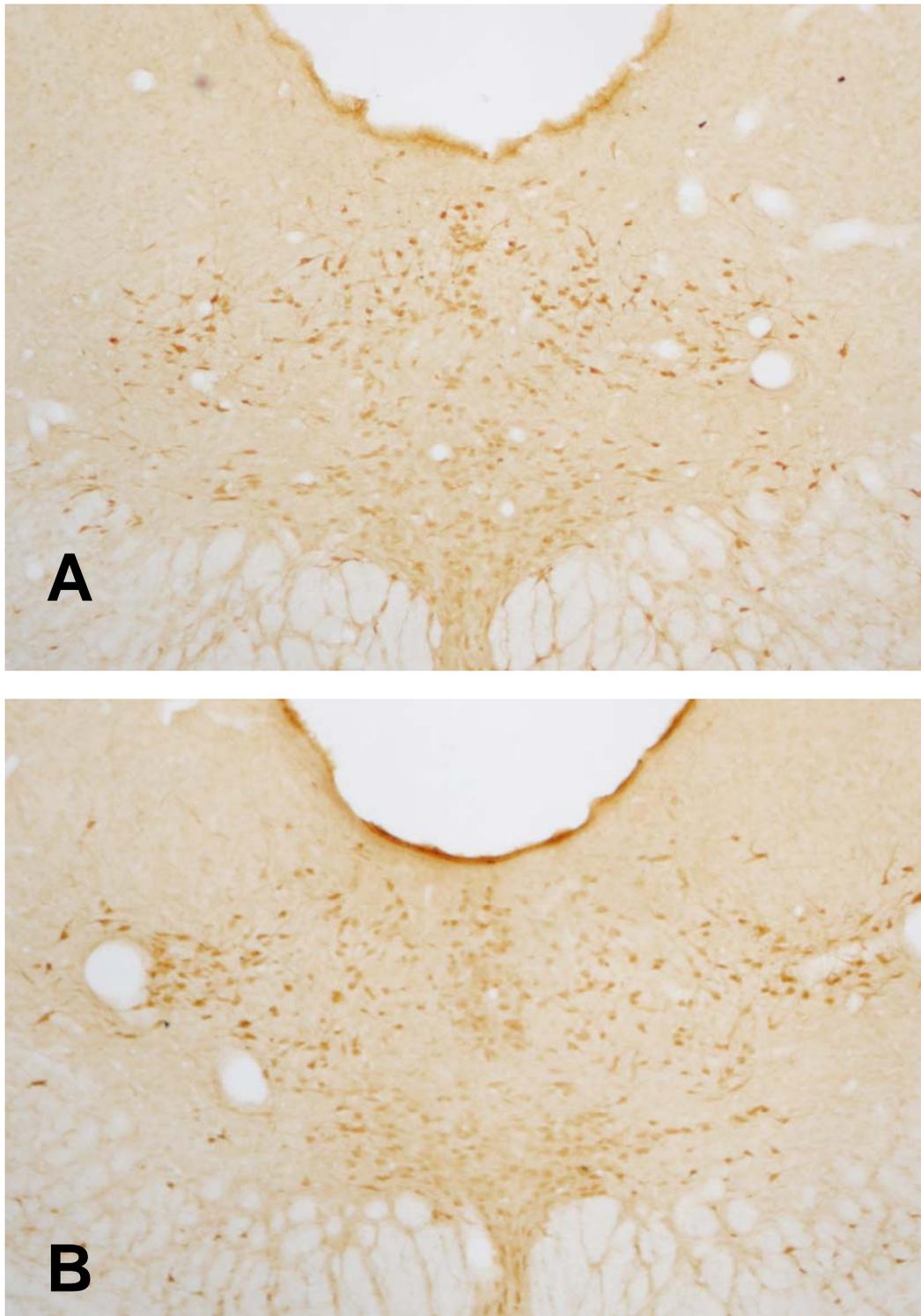
En ninguno de los grupos experimentales se observó un marcaje asimétrico.

### *6.1.- Estudio Cito e Inmunoquimioarquitectónico*

Para su delimitación se procedió a la realización de 2 técnicas cito e inmunoquimioarquitectónica (Nissl y anti-5HT) en cortes seriados consecutivos a los procesados para la detección inmunocitoquímica de la proteína Fos (fig.4.46 y 4.47).



**Fig. 4.46.** Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel del DR de rata, procesados con la técnica de Nissl, en 2 niveles rostrocaudales diferentes: (A) nivel ROSTRAL (B) nivel CAUDAL.



**Fig. 4.47.** Microfotografías (10x) de cortes coronales a nivel del DR de rata, procesados para la detección inmunocitoquímica de la serotonina (5HT), en 2 niveles rostrocaudales diferentes: (A) nivel ROSTRAL (B) nivel CAUDAL.

### 6.2.- Grupo Control Simulado Fisiológico (CSF)

En el grupo control simulado fisiológico no se observó la inducción de inmunorreactividad frente a Fos, ni en el nivel más rostral de los 2 estudiados (Bregma -7.20 mm), ni en el nivel más caudal (Bregma -8.04 mm) en el que estudiamos el DR (fig.4.50).

### 6.3.- Grupo Control Pregabalina (CPG)

La administración de pregabalina (30 mg/kg, i.p.) aumentó de forma significativa el número de células marcadas frente a Fos, especialmente en el nivel rostral (Bregma -7.20 mm) (fig.4.51).

### 6.4.- Grupo Control Dolor Nociceptivo (CNC)

La aplicación del test de la formalina indujo en el DR una intensa inmunorreactividad frente a Fos, mostrando una gran cantidad de elementos marcados especialmente en la parte lateral del DR (DRL) (fig.4.52).

### 6.5.- Grupo Control Dolor Neuropático (CNP)

La estimulación nociceptiva mediante la constricción crónica del ciático tan sólo provocó un discreto aumento de células Fos-positivas, en comparación con los ejemplares del grupo CSF, en ambos niveles rostrocaudales del DR, en las partes más laterales (fig.4.53).

### 6.6.- Grupo Pregabalina + Dolor Nociceptivo (PGNC)

El tratamiento previo al estímulo doloroso nociceptivo con pregabalina (30 mg/kg, i.p.) bloqueó la expresión de c-fos inducida por

el test de la formalina de forma significativa tanto en el nivel rostral como en el caudal del DR (fig.4.54).

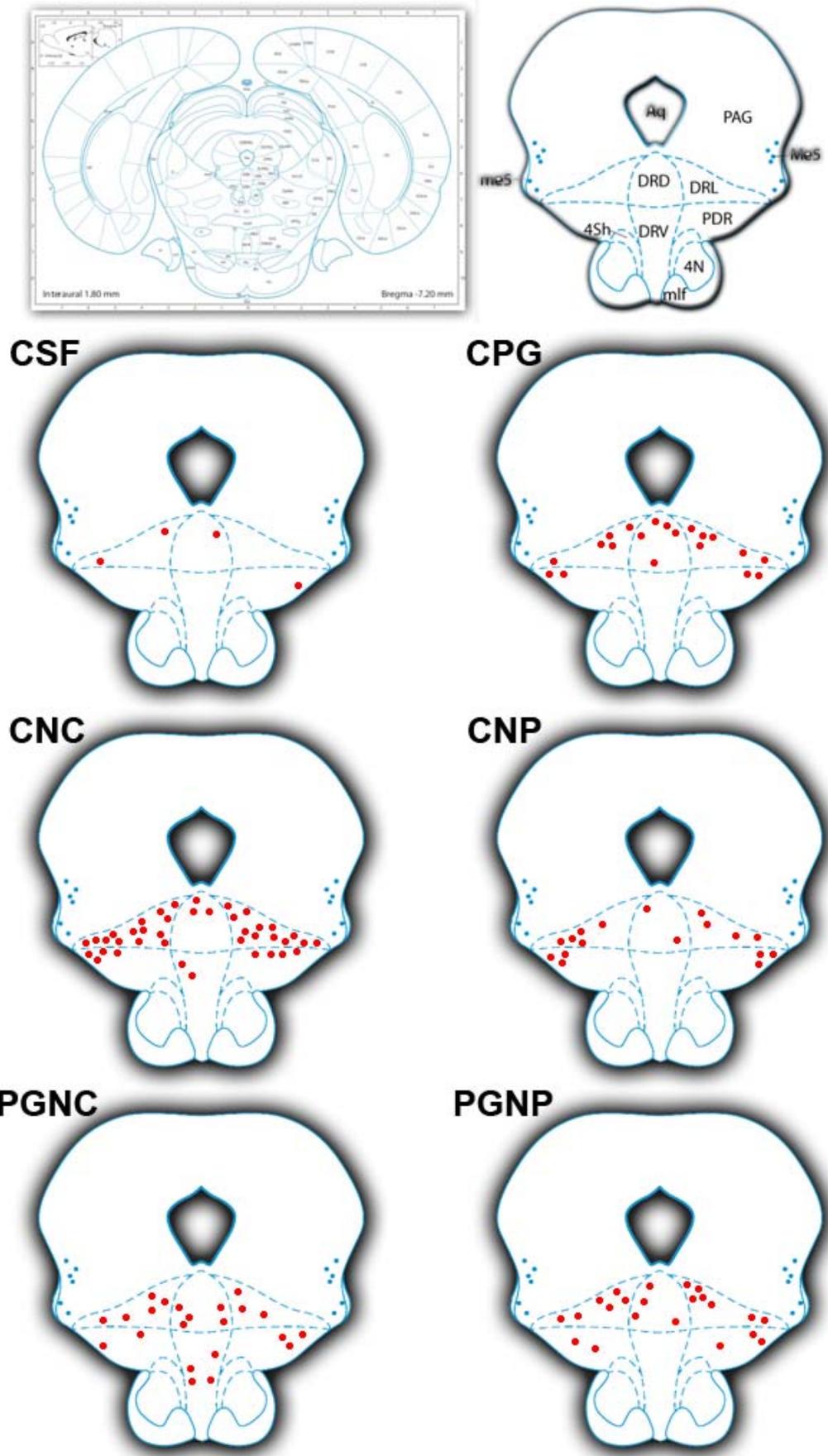
### 6.7.- Grupo Pregabalina + Dolor Neuropático (PGNP)

En el grupo PGNP, se observó un aumento del número de células inmunorreactivas en los 2 niveles del DR estudiados en comparación con el grupo CNP, similar al número de elementos marcados observados en el grupo CPG (fig.4.55).

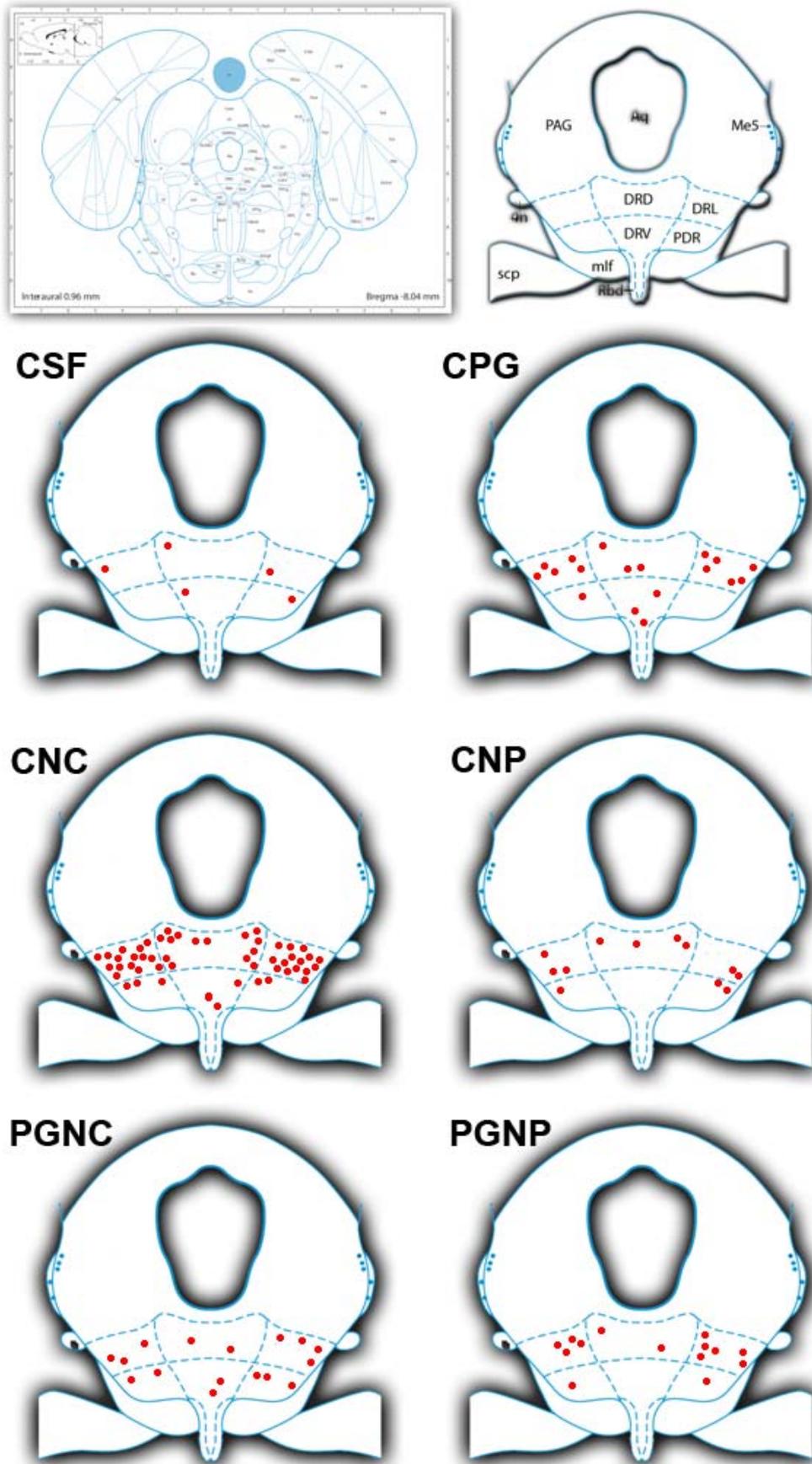
Estos resultados se resumen en la tabla 4.5 y las fig.4.48 y 4.49.

Niveles	Grupo Experimental					
	CSF	CPG	CNC	CNP	PGNC	PGNP
rostral	11±4	83±17	161±20	32±7	88±15	82±19
caudal	8±3	46±9	150±18	28±6	51±11	41±12

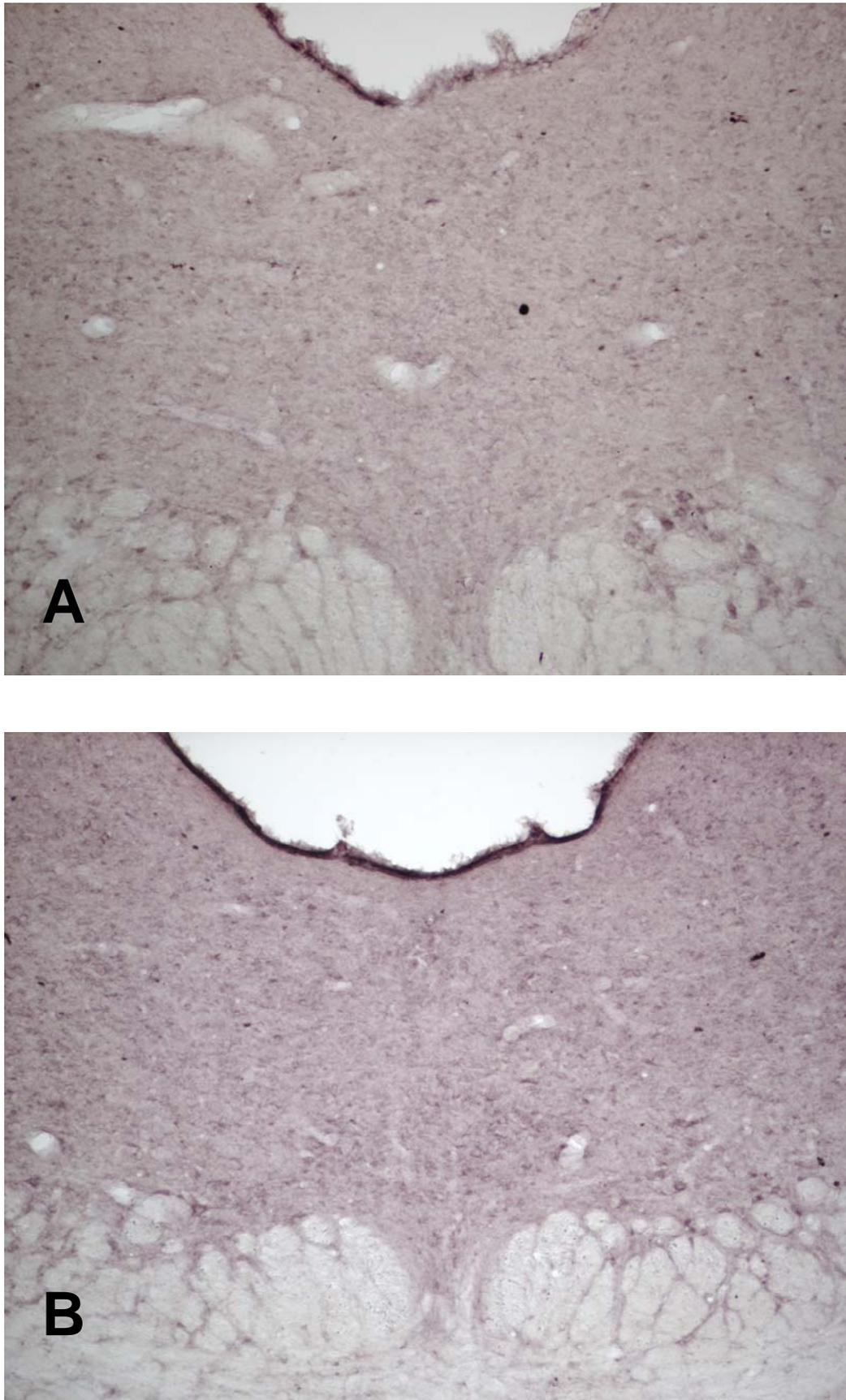
**Tabla 4.5.** Media (±Desviación Típica) de células inmunorreactivas por hemisección de 40 µm del DR en los dos niveles seleccionados del grupo control simulado.



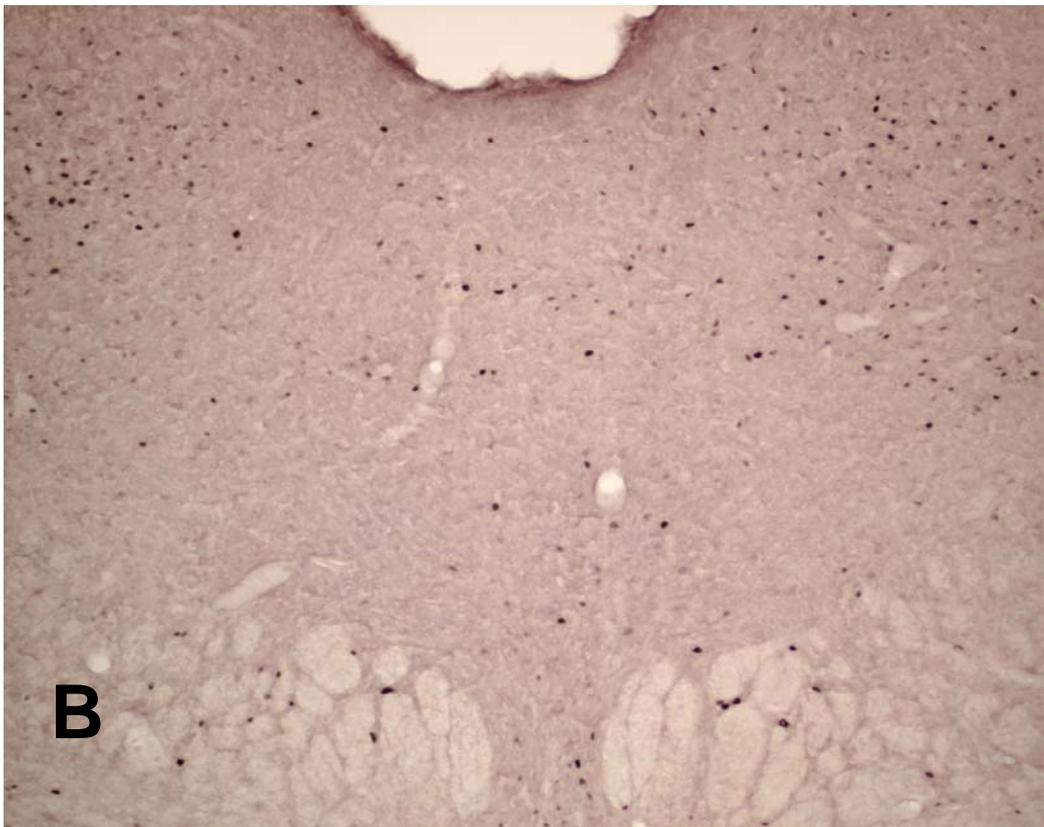
**Fig. 4.48.** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al nivel Bregma -7.20 mm (Paxinos y Watson) (40) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el DR, en los diferentes grupos experimentales.



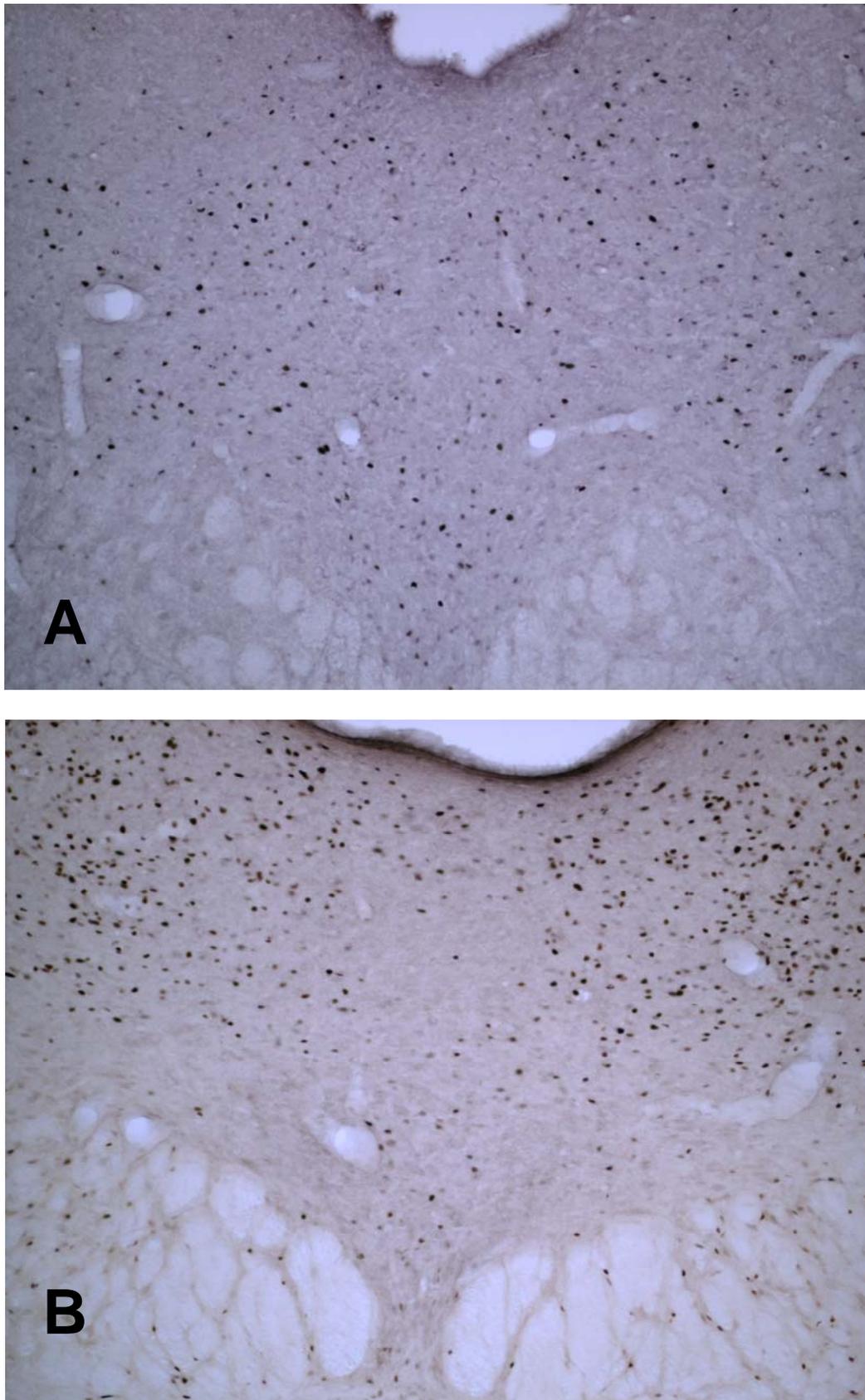
**Fig. 4.49.-** Dibujos realizados con ayuda de una cámara clara correspondientes al nivel Bregma -8.04 mm (Paxinos y Watson) (40) mostrando la distribución de las neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el DR, en los diferentes grupos experimentales.



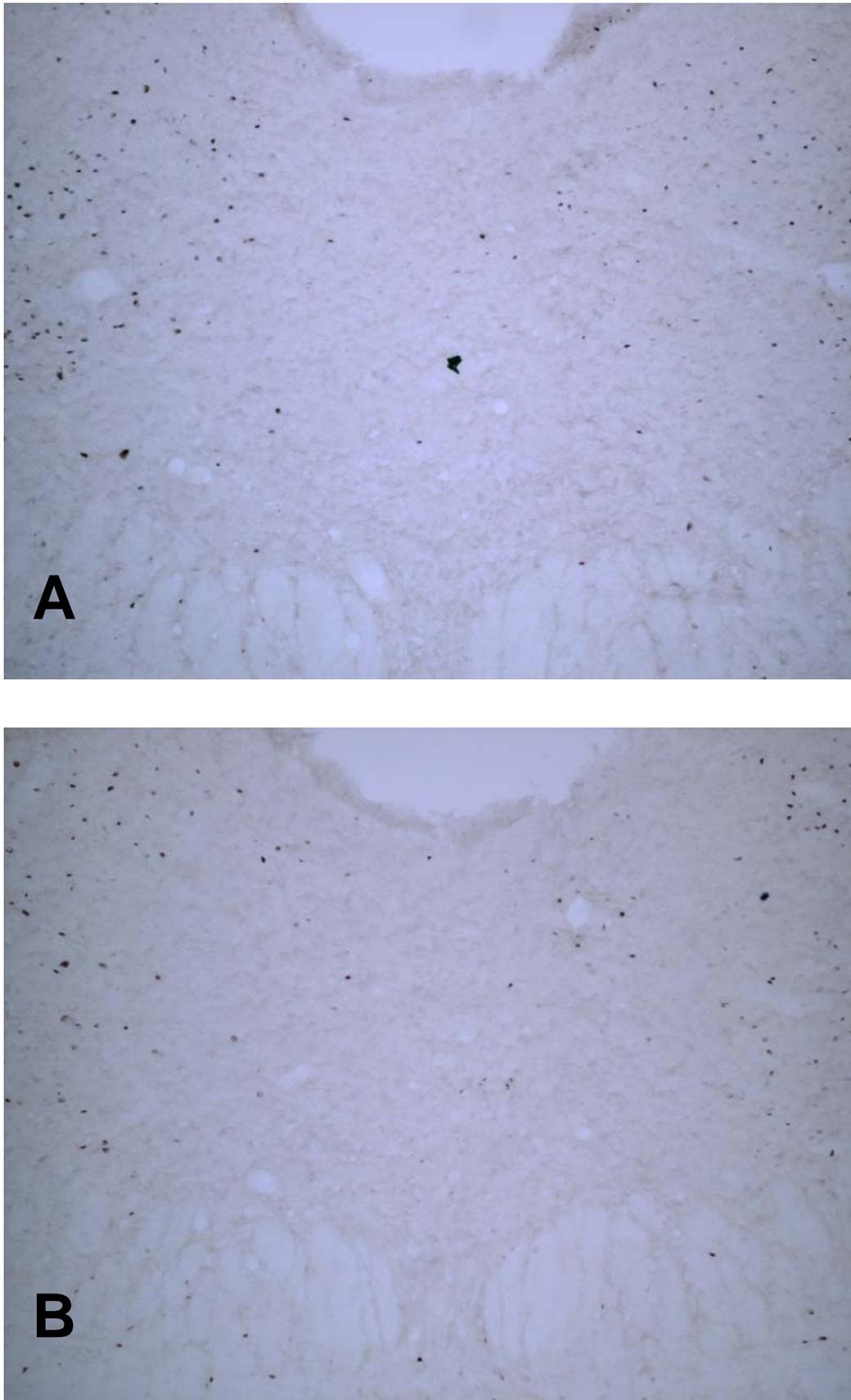
**Fig. 4.50.-** Microfotografía (10x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del DR a nivel de (A) Bregma -7.20 mm y (B) Bregma -8.04 mm, en ratas del grupo control simulado (CSF).



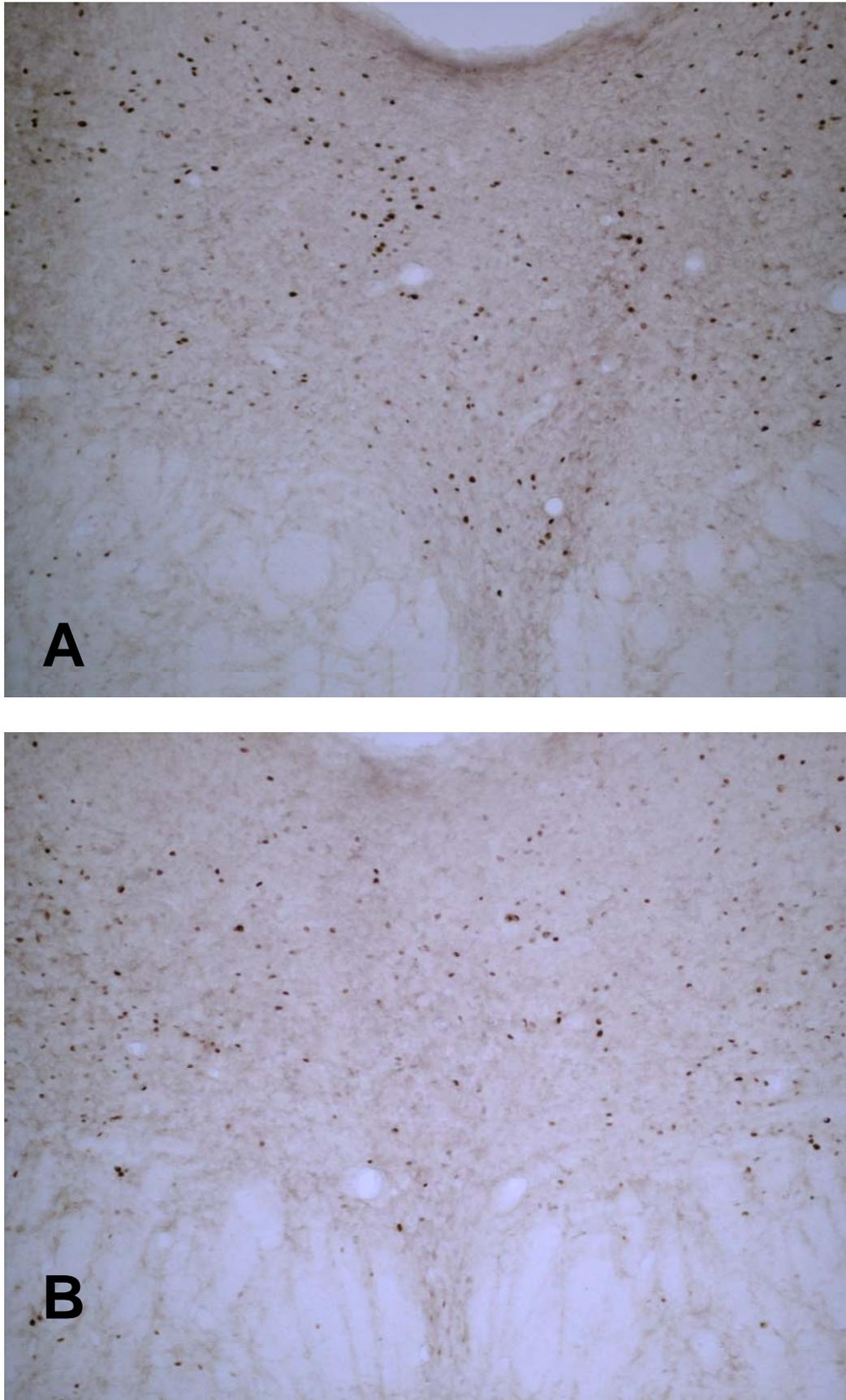
**Fig. 4.51.** Microfotografía (10x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del DR a nivel de (A) Bregma -7.20 mm y (B) Bregma -8.04 mm, en ratas del grupo control pregabalina (CPG).



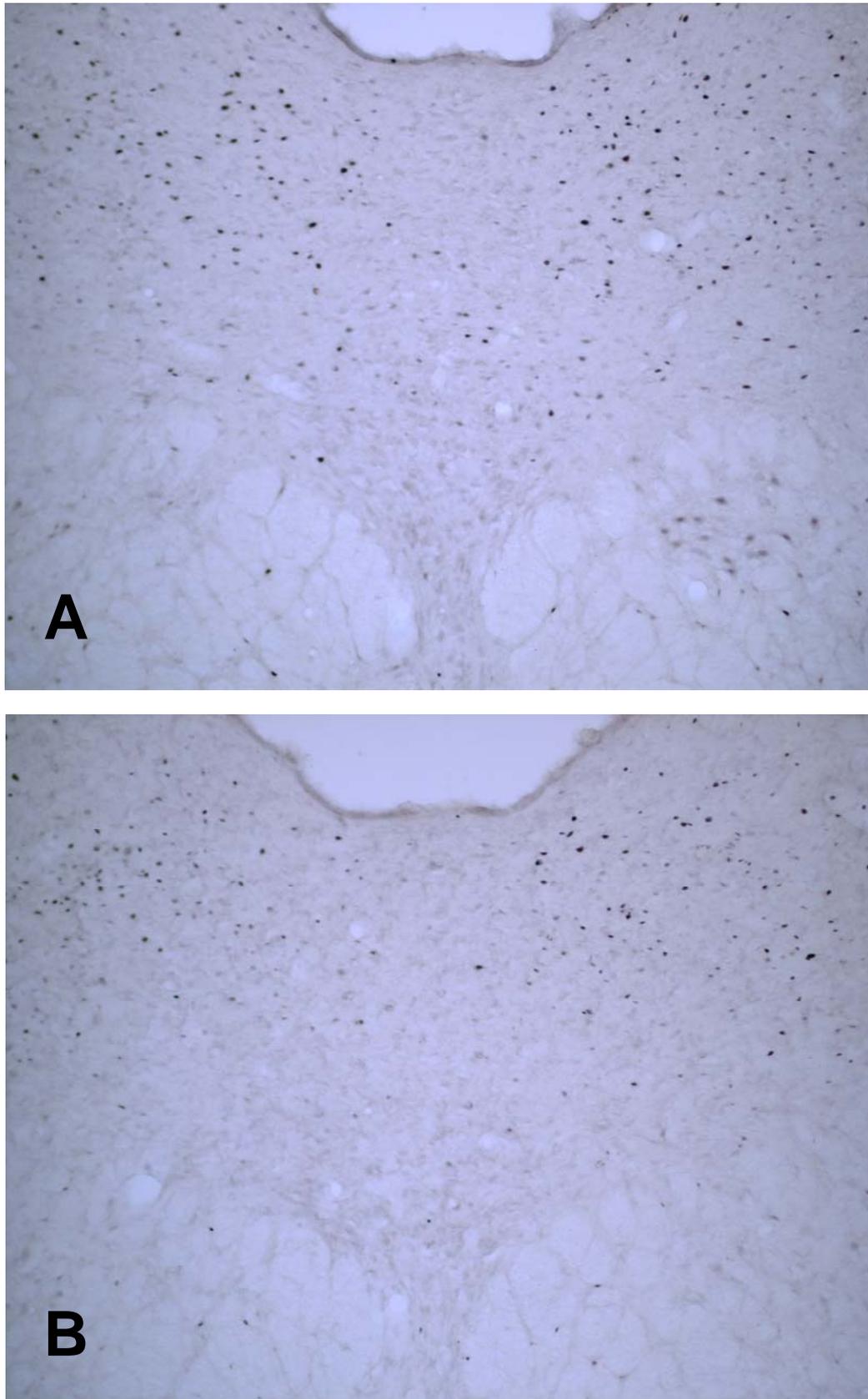
**Fig. 4.52.** Microfotografía (10x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del DR a nivel de (A) Bregma -7.20 mm y (B) Bregma -8.04 mm, en ratas del grupo control dolor nociceptivo (CNC).



**Fig. 4.53.** Microfotografía (10x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del DR a nivel de (A) Bregma -7.20 mm y (B) Bregma -8.04 mm, en ratas del grupo control dolor neuropático (CNP).



**Fig. 4.54.** Microfotografía (10x) que ilustra la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del DR a nivel de (A) Bregma -7.20 mm y (B) Bregma -8.04 mm, en ratas del grupo pregabalina dolor nociceptivo (PGNC).



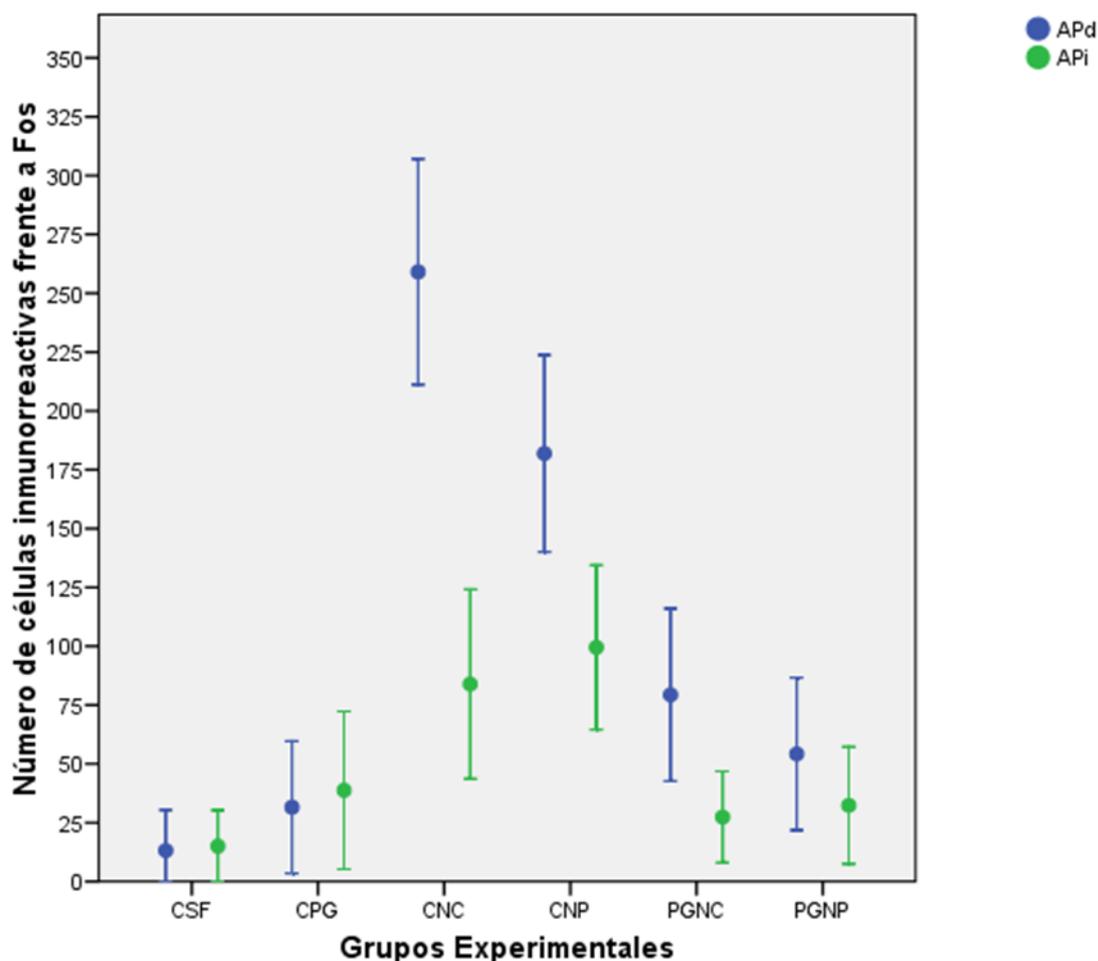
**Fig. 4.55.-** Microfotografías (10x) que ilustran la inmunorreactividad frente a Fos en neuronas del DR a nivel de (A) Bregma -7.20 mm y (B) Bregma -8.04 mm, en ratas del grupo pregabalina dolor neuropático (PGNP).

## ESTUDIO ESTADÍSTICO

### 7.- Estudio Estadístico del Asta Posterior de la Médula.

#### 7.1.- Análisis Global

En primer lugar se presentan la descriptiva (media, número de casos y desviación típica) para las variables originales Niveles Asta Posterior Derecha (APd) y Asta Posterior Izquierda (APi). 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 6 grupos (fig.4.56).



**Fig. 4.56.-** Gráfica de las medias estimadas para cada variable dentro de cada uno de los 6 grupos experimentales.

## Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
APd	CSF	18	13,17	8,618	2,031	8,88	17,45	3	24
	CPG	18	31,56	14,039	3,309	24,57	38,54	15	50
	CNC	18	259,06	23,964	5,648	247,14	270,97	225	289
	CNP	18	181,89	20,939	4,935	171,48	192,30	153	210
	PGNC	18	79,33	18,314	4,317	70,23	88,44	55	104
	PGNP	18	54,22	16,214	3,822	46,16	62,29	35	75
	Total	108	103,20	90,297	8,689	85,98	120,43	3	289
APi	CSF	18	15,00	7,639	1,801	11,20	18,80	5	25
	CPG	18	38,78	16,770	3,953	30,44	47,12	15	60
	CNC	18	83,89	20,126	4,744	73,88	93,90	52	109
	CNP	18	99,50	17,463	4,116	90,82	108,18	75	125
	PGNC	18	27,39	9,696	2,285	22,57	32,21	16	40
	PGNP	18	32,33	12,438	2,932	26,15	38,52	16	50
	Total	108	49,48	34,310	3,301	42,94	56,03	5	125

**Tabla 4.6.** Descriptivos para las variables APd y APi.

Efectuamos un análisis de la varianza de un factor para las variables APd y APi, siendo el factor el grupo experimental que presenta 6 condiciones experimentales diferentes. Los resultados se recogen en las tablas 4.6 y 4.7, que a su vez reproduce las tablas ANOVA para las 2 variables.

Se deduce de ellas que hay diferencias significativas entre los 6 grupos experimentales para las 2 variables: APd ( $F=535,758$ ;  $p<0,0001$ ) y APi ( $F=96,017$ ;  $p<0,0001$ ).

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APd	Inter-grupos	840424,741	5	168084,948	535,758	,000
	Intra-grupos	32000,778	102	313,733		
	Total	872425,519	107			
APi	Inter-grupos	103885,296	5	20777,059	96,017	,000
	Intra-grupos	22071,667	102	216,389		
	Total	125956,963	107			

**Tabla 4.7.-** Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para las variables APd y APi.

Puesto que el análisis detectó diferencias entre los grupos tenía sentido realizar comparaciones múltiples para determinar conjuntos homogéneos de grupos experimentales que compartirían la misma media (ANEXO I).

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 (tablas 4.8 y 4.9).

En el Asta Posterior Derecha (APd), el método de Tukey determinó tantos subconjuntos homogéneos como grupos experimentales, es decir 6, mientras que el de Scheffé determinó uno menos, 5:

- En los extremos de estos subconjuntos destacaron por un lado el grupo CSF y el CPG y por el otro los grupos que recibieron sólo estímulo doloroso (CNC y CNP).
- En el centro quedarían los grupos que recibieron Pregabalina previa al estímulo doloroso (PGNP y PGNC).

APd

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	6
HSD de Tukey <sup>a</sup>							
CSF	18	13,17					
CPG	18		31,56				
PGNP	18			54,22			
PGNC	18				79,33		
CNP	18					181,89	
CNC	18						259,06
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>							
CSF	18	13,17					
CPG	18	31,56					
PGNP	18		54,22				
PGNC	18			79,33			
CNP	18				181,89		
CNC	18					259,06	
Sig.		,094	1,000	1,000	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 4.8.-** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable APd.

En el Asta Posterior Izquierda (APi), sin embargo, el método de Tukey determinó 4 subconjuntos homogéneos, y el de Scheffé 3:

- En los extremos quedaron en esta ocasión el grupo CSF por un extremo y los grupos control dolor (CNC y CNP) por el otro.
- En el bloque central se situaron los grupos que recibieron Pregabalina (CPG, PGNC y PGNP).

**APi**

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
HSD de Tukey <sup>a</sup>					
CSF	18	15,00			
PGNC	18	27,39	27,39		
PGNP	18		32,33		
CPG	18		38,78		
CNC	18			83,89	
CNP	18				99,50
Sig.		,126	,195	1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>					
CSF	18	15,00			
PGNC	18	27,39	27,39		
PGNP	18		32,33		
CPG	18		38,78		
CNC	18			83,89	
CNP	18				99,50
Sig.		,280	,377	,081	

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

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

**Tabla 4.9.-** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable APi.

## 7.2.- 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.

### 7.2.a.- Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración de una dosis i.p. de 30 mg/kg de Pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en el Asta Posterior de la Médula Espinal. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF y CPG.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables APd y APi, siendo el factor el Grupo Experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 2 grupos experimentales tanto para la variable APd ( $F=22.431$ ;  $p<0,0001$ ) como para la APi ( $F=29.968$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.10).

En este caso, al incluir sólo 2 grupos experimentales en el análisis, no fue necesario llevar a cabo un estudio de comparaciones múltiples ni determinar subconjuntos homogéneos.

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 (fig. 4.57).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
APd	CSF	18	13,17	8,618	2,031	8,88	17,45	3	24
	CPG	18	31,56	14,039	3,309	24,57	38,54	15	50
	Total	36	22,36	14,790	2,465	17,36	27,37	3	50
APi	CSF	18	15,00	7,639	1,801	11,20	18,80	5	25
	CPG	18	38,78	16,770	3,953	30,44	47,12	15	60
	Total	36	26,89	17,616	2,936	20,93	32,85	5	60

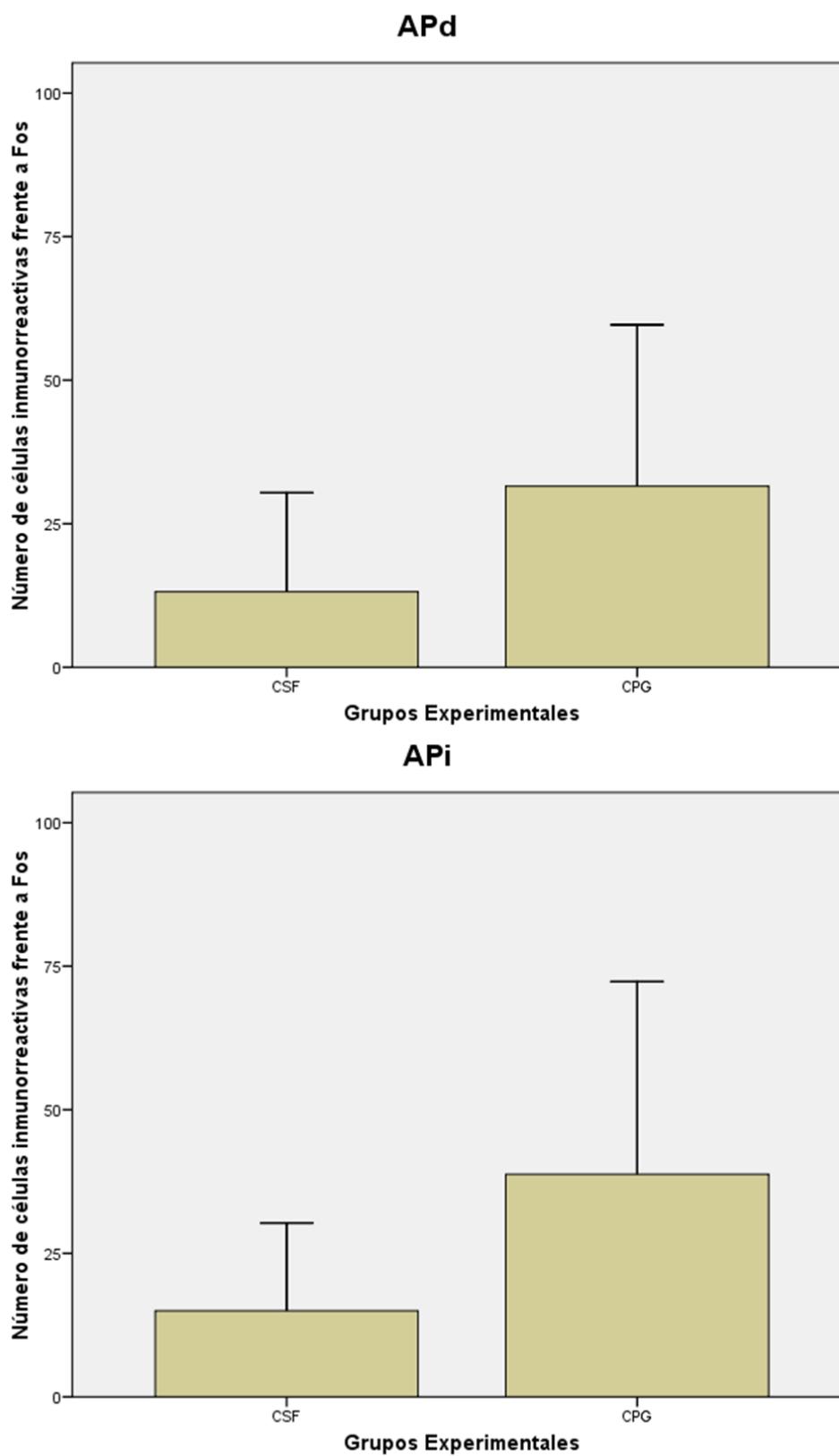
## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
APd	24,578	1	34	,000
APi	17,682	1	34	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APd	Inter-grupos	3043,361	1	3043,361	22,431	,000
	Intra-grupos	4612,944	34	135,675		
	Total	7656,306	35			
APi	Inter-grupos	5088,444	1	5088,444	29,968	,000
	Intra-grupos	5773,111	34	169,797		
	Total	10861,556	35			

**Tabla 4.10.** Resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.



**Fig. 4.57.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG).

### 7.2.b.- Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la aplicación de un estímulo nociceptivo de diferente naturaleza tendría sobre la expresión de Fos en el Asta Posterior de la Médula Espinal. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y CNP.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables APd y APi, 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 APd ( $F=785.592$ ;  $p<0,0001$ ) como para la APi ( $F=142.076$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.11).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO II) confirmó las diferencias al comparar cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y CNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y CNP, 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 (tabla 4.12).

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 (fig. 4.58).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
APd	CSF	18	13,17	8,618	2,031	8,88	17,45	3	24
	CNC	18	259,06	23,964	5,648	247,14	270,97	225	289
	CNP	18	181,89	20,939	4,935	171,48	192,30	153	210
	Total	54	151,37	105,310	14,331	122,63	180,11	3	289
APi	CSF	18	15,00	7,639	1,801	11,20	18,80	5	25
	CNC	18	83,89	20,126	4,744	73,88	93,90	52	109
	CNP	18	99,50	17,463	4,116	90,82	108,18	75	125
	Total	54	66,13	40,245	5,477	55,14	77,11	5	125

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
APd	18,587	2	51	,000
APi	17,299	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APd	Inter-grupos	569299,370	2	284649,685	785,592	,000
	Intra-grupos	18479,222	51	362,338		
	Total	587778,593	53			
APi	Inter-grupos	72777,815	2	36388,907	142,076	,000
	Intra-grupos	13062,278	51	256,123		
	Total	85840,093	53			

**Tabla 4.11.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

### Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

#### APd

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	13,17	
	CNP	18		181,89
	CNC	18		259,06
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	13,17	
	CNP	18		181,89
	CNC	18		259,06
	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.

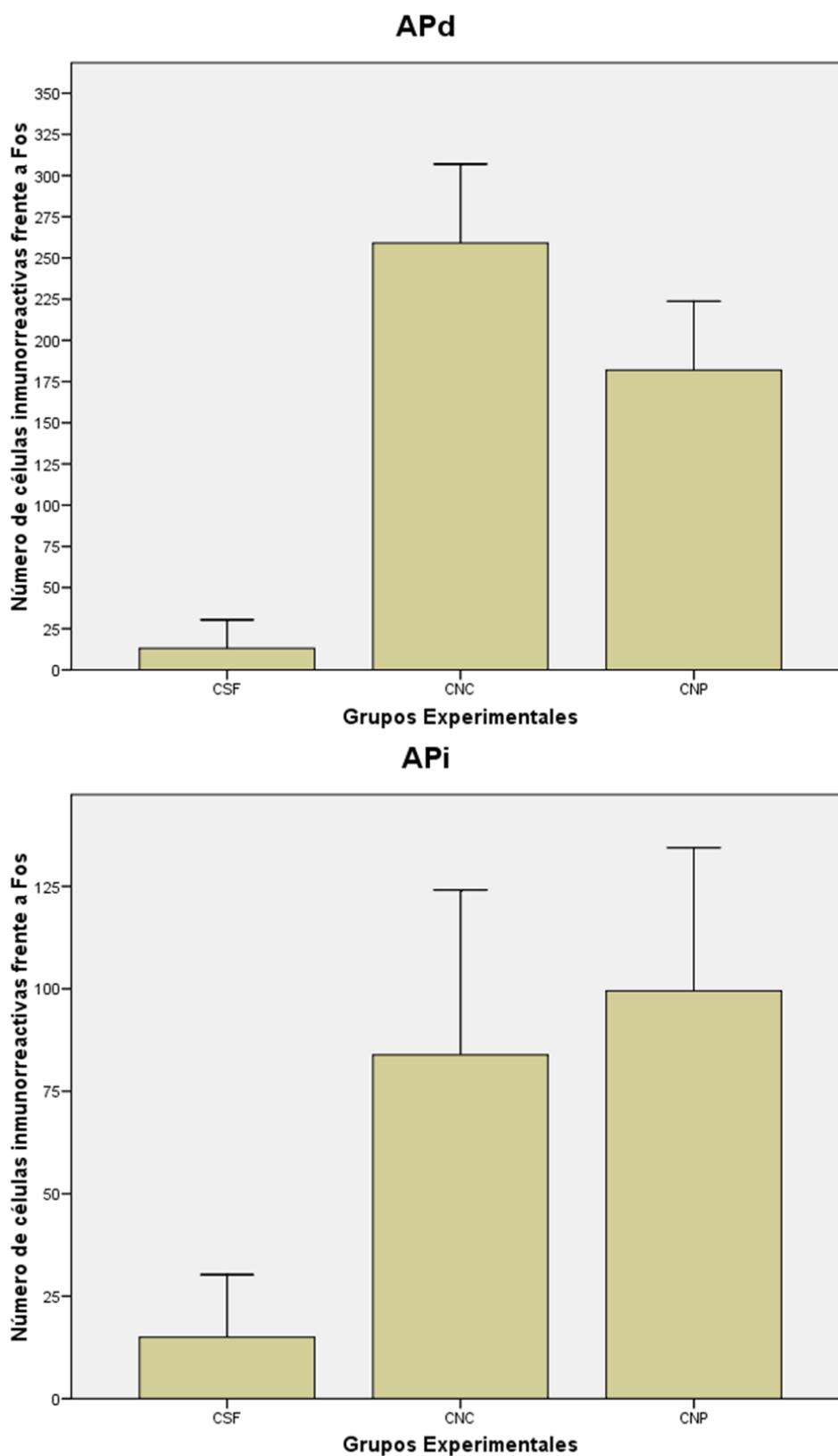
#### APi

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	15,00	
	CNC	18		83,89
	CNP	18		99,50
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	15,00	
	CNC	18		83,89
	CNP	18		99,50
	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 4.12.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.58.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP).

### 7.2.c.- Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en el Asta Posterior de la Médula Espinal por aplicación de un estímulo nociceptivo (test de la formalina). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y PGNC.

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 APd y APi, 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 APd ( $F=888.500$ ;  $p<0,0001$ ) como para la APi ( $F=130.644$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.13).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO III) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y PGNC) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y PGNC, 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 (tabla 4.14).

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 (fig. 4.59).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
APd	CSF	18	13,17	8,618	2,031	8,88	17,45	3	24
	CNC	18	259,06	23,964	5,648	247,14	270,97	225	289
	PGNC	18	79,33	18,314	4,317	70,23	88,44	55	104
	Total	54	117,19	106,360	14,474	88,15	146,22	3	289
APi	CSF	18	15,00	7,639	1,801	11,20	18,80	5	25
	CNC	18	83,89	20,126	4,744	73,88	93,90	52	109
	PGNC	18	27,39	9,696	2,285	22,57	32,21	16	40
	Total	54	42,09	33,088	4,503	33,06	51,12	5	109

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
APd	20,239	2	51	,000
APi	24,410	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APd	Inter-grupos	582836,704	2	291418,352	888,500	,000
	Intra-grupos	16727,444	51	327,989		
	Total	599564,148	53			
APi	Inter-grupos	48548,481	2	24274,241	130,644	,000
	Intra-grupos	9476,056	51	185,805		
	Total	58024,537	53			

**Tabla 4.13.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## APd

Grupo		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	13,17		
	PGNC	18		79,33	
	CNC	18			259,06
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Scheffé	CSF	18	13,17		
	PGNC	18		79,33	
	CNC	18			259,06
	Sig.		1,000	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.

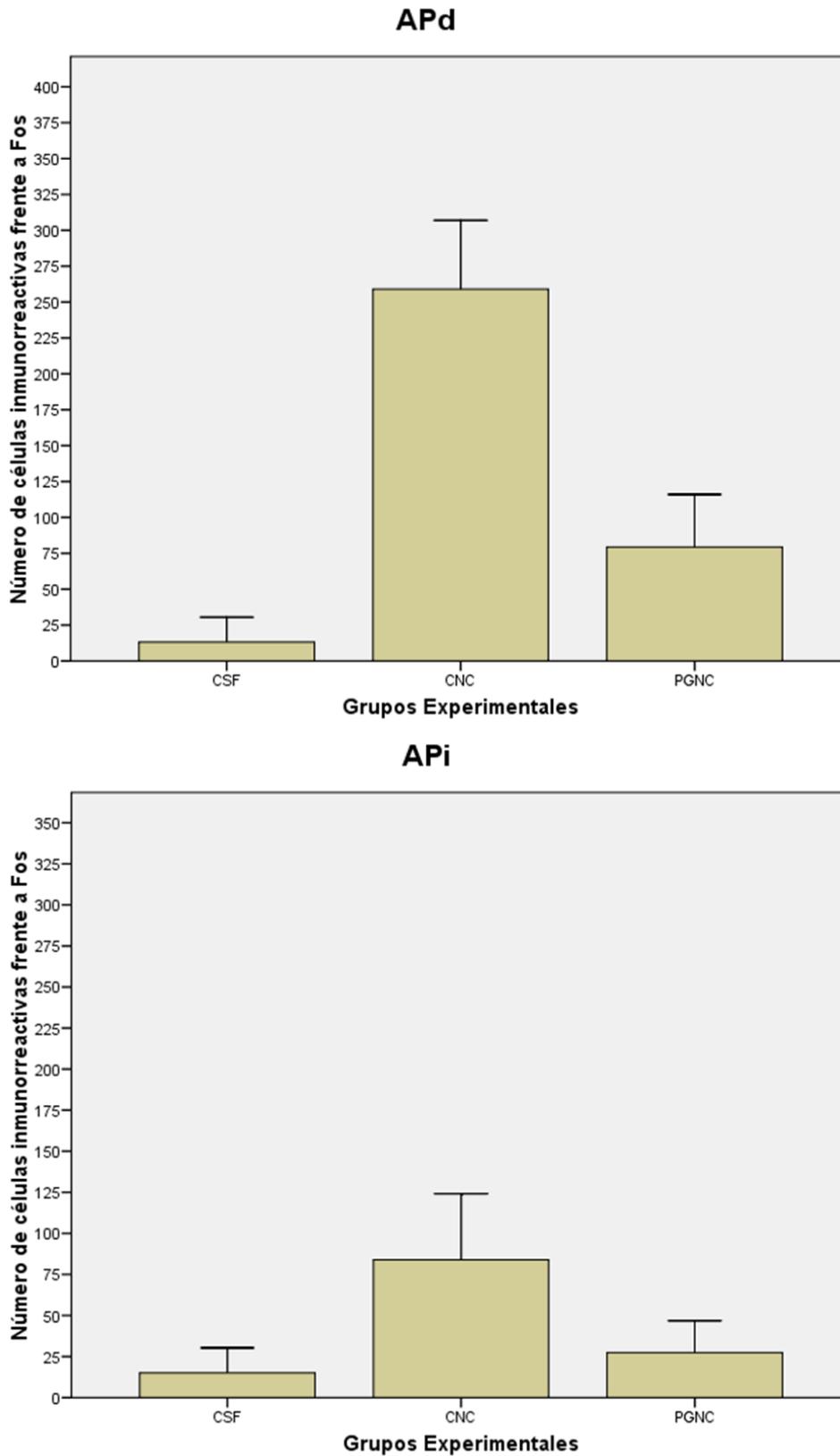
## APi

Grupo		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	15,00		
	PGNC	18		27,39	
	CNC	18			83,89
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Scheffé	CSF	18	15,00		
	PGNC	18		27,39	
	CNC	18			83,89
	Sig.		1,000	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 4.14.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.59.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC).

#### 7.2.d.- Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina cada 8 horas durante tendría sobre la expresión de Fos en el Asta Posterior de la Médula Espinal por aplicación de un estímulo neuropático (constricción crónica del ciático). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNP y PGNP.

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 APd y APi, 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 APd ( $F=539.012$ ;  $p<0,0001$ ) como para la APi ( $F=207.649$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.15).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO IV) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNP y PGNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNP y PGNP, 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 (tabla 4.16).

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 (fig. 4.60).

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
APd	CSF	18	13,17	8,618	2,031	8,88	17,45	3	24
	CNP	18	181,89	20,939	4,935	171,48	192,30	153	210
	PGNP	18	54,22	16,214	3,822	46,16	62,29	35	75
	Total	54	83,09	74,212	10,099	62,84	103,35	3	210
APi	CSF	18	15,00	7,639	1,801	11,20	18,80	5	25
	CNP	18	99,50	17,463	4,116	90,82	108,18	75	125
	PGNP	18	32,33	12,438	2,932	26,15	38,52	16	50
	Total	54	48,94	38,977	5,304	38,31	59,58	5	125

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
APd	17,544	2	51	,000
APi	12,743	2	51	,000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APd	Inter-grupos	278709,148	2	139354,574	539,012	,000
	Intra-grupos	13185,389	51	258,537		
	Total	291894,537	53			
APi	Inter-grupos	71712,333	2	35856,167	207,649	,000
	Intra-grupos	8806,500	51	172,676		
	Total	80518,833	53			

**Tabla 4.15.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

### Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

#### APd

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	13,17	
	PGNP	18		54,22
	CNP	18		181,89
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	13,17	
	PGNP	18		54,22
	CNP	18		181,89
	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.

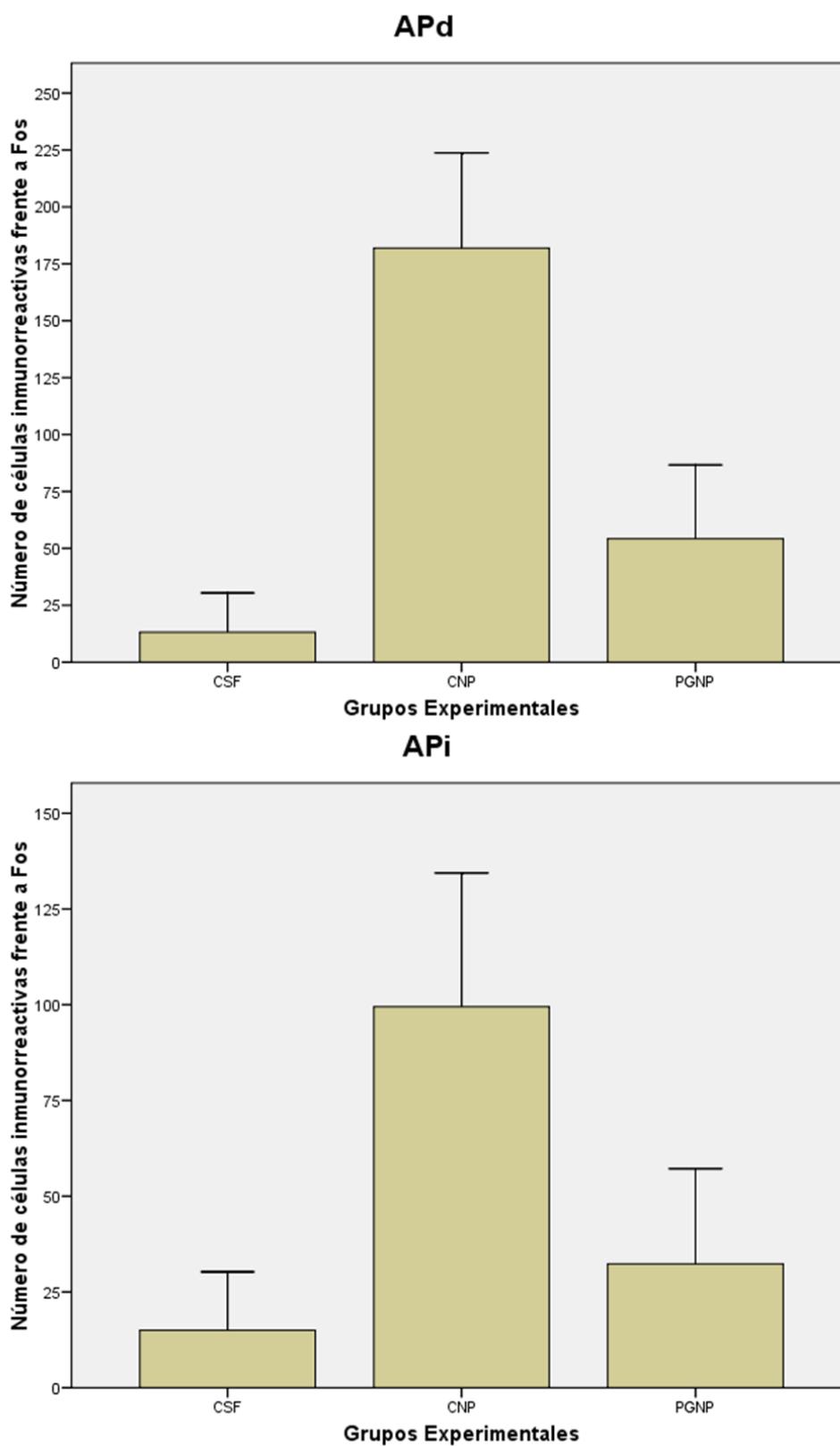
#### APi

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	15,00	
	PGNP	18		32,33
	CNP	18		99,50
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	15,00	
	PGNP	18		32,33
	CNP	18		99,50
	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 Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.60.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP).

## 7.2.e.- ANEXO I: Análisis Global

## 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		
APd	HSD de Tukey	CSF	CPG	-18,389*	5,904	,028	-35,54	-1,24	
			CNC	-245,889*	5,904	,000	-263,04	-228,74	
			CNP	-168,722*	5,904	,000	-185,87	-151,57	
			PGNC	-66,167*	5,904	,000	-83,32	-49,02	
		PGNP	-41,056*	5,904	,000	-58,20	-23,91		
		CPG	CSF	18,389*	5,904	,028	1,24	35,54	
			CNC	-227,500*	5,904	,000	-244,65	-210,35	
			CNP	-160,333*	5,904	,000	-167,48	-133,18	
			PGNC	-47,778*	5,904	,000	-64,93	-30,63	
		PGNP	-22,667*	5,904	,003	-39,82	-5,52		
		CNC	CSF	245,889*	5,904	,000	228,74	263,04	
			CPG	227,500*	5,904	,000	210,35	244,65	
			CNP	77,167*	5,904	,000	60,02	94,32	
			PGNC	179,722*	5,904	,000	162,57	196,87	
		PGNP	204,833*	5,904	,000	187,68	221,98		
		CNP	CSF	168,722*	5,904	,000	151,57	185,87	
			CPG	160,333*	5,904	,000	133,18	167,48	
			CNC	-77,167*	5,904	,000	-94,32	-60,02	
			PGNC	102,556*	5,904	,000	85,41	119,70	
		PGNP	127,667*	5,904	,000	110,52	144,82		
		PGNC	CSF	66,167*	5,904	,000	49,02	83,32	
			CPG	47,778*	5,904	,000	30,63	64,93	
			CNC	-179,722*	5,904	,000	-196,87	-162,57	
			CNP	-102,556*	5,904	,000	-119,70	-85,41	
	PGNP	25,111*	5,904	,001	7,96	42,26			
	PGNP	CSF	41,056*	5,904	,000	23,91	58,20		
		CPG	22,667*	5,904	,003	5,52	39,82		
		CNC	-204,833*	5,904	,000	-221,98	-187,68		
		CNP	-127,667*	5,904	,000	-144,82	-110,52		
	PGNC	-25,111*	5,904	,001	-42,26	-7,96			
	Schaffé	CSF	CPG	CNC	-18,389	5,904	,094	-38,43	1,65
				CNC	245,889*	5,904	,000	265,93	225,85
				CNP	-168,722*	5,904	,000	-188,76	-148,69
				PGNC	-66,167*	5,904	,000	-86,20	-46,13
			PGNP	-41,056*	5,904	,000	-61,09	-21,02	
			CPG	CSF	18,389	5,904	,094	-1,65	38,43
				CNC	-227,500*	5,904	,000	-247,54	-207,46
				CNP	-160,333*	5,904	,000	-170,37	-130,30
				PGNC	-47,778*	5,904	,000	-67,81	-27,74
			PGNP	-22,667*	5,904	,016	-42,70	-2,63	
			CNC	CSF	245,889*	5,904	,000	225,85	265,93
				CPG	227,500*	5,904	,000	207,46	247,54
				CNP	77,167*	5,904	,000	57,13	97,20
				PGNC	179,722*	5,904	,000	159,69	199,76
			PGNP	204,833*	5,904	,000	184,80	224,87	
			CNP	CSF	168,722*	5,904	,000	148,69	188,76
				CPG	160,333*	5,904	,000	130,30	170,37
				CNC	-77,167*	5,904	,000	-97,20	-57,13
PGNC				102,556*	5,904	,000	82,52	122,59	
PGNP			127,667*	5,904	,000	107,63	147,70		
PGNC			CSF	66,167*	5,904	,000	46,13	86,20	
			CPG	47,778*	5,904	,000	27,74	67,81	
			CNC	-179,722*	5,904	,000	-199,76	-159,69	
			CNP	-102,556*	5,904	,000	-122,59	-82,52	
PGNP		25,111*	5,904	,005	5,07	45,15			
PGNP		CSF	41,056*	5,904	,000	21,02	61,09		
		CPG	22,667*	5,904	,016	2,63	42,70		
		CNC	-204,833*	5,904	,000	-224,87	-184,80		
		CNP	-127,667*	5,904	,000	-147,70	-107,63		
PGNC		-25,111*	5,904	,005	-45,15	-5,07			

API	HSD de Tukey	CSF	CPG	-23,778*	4,903	,000	-38,02	-9,54	
			CNC	-68,889*	4,903	,000	-83,13	-54,65	
			CNP	-84,500*	4,903	,000	-98,74	-70,26	
			PGNC	-12,389	4,903	,126	-26,63	1,85	
			PGNP	-17,333*	4,903	,008	-31,58	-3,09	
		CPG	CSF	23,778*	4,903	,000	9,54	38,02	
			CNC	-45,111*	4,903	,000	-59,35	-30,87	
			CNP	-60,722*	4,903	,000	-74,96	-46,48	
			PGNC	11,389	4,903	,195	-2,85	25,63	
			PGNP	6,444	4,903	,777	-7,80	20,69	
		CNC	CSF	68,889*	4,903	,000	54,65	83,13	
			CPG	45,111*	4,903	,000	30,87	59,35	
			CNP	-15,611*	4,903	,023	-29,85	-1,37	
			PGNC	56,500*	4,903	,000	42,26	70,74	
			PGNP	51,556*	4,903	,000	37,31	65,80	
		CNP	CSF	84,500*	4,903	,000	70,26	98,74	
			CPG	60,722*	4,903	,000	46,48	74,96	
			CNC	15,611*	4,903	,023	1,37	29,85	
			PGNC	72,111*	4,903	,000	57,87	86,35	
			PGNP	67,167*	4,903	,000	52,92	81,41	
	PGNC	CSF	12,389	4,903	,126	-1,85	26,63		
		CPG	-11,389	4,903	,195	-25,63	2,85		
		CNC	-56,500*	4,903	,000	-70,74	-42,26		
		CNP	-72,111*	4,903	,000	-86,35	-57,87		
		PGNP	-4,944	4,903	,914	-19,19	9,30		
	PGNP	CSF	17,333*	4,903	,008	3,09	31,58		
		CPG	-6,444	4,903	,777	-20,69	7,80		
		CNC	-51,556*	4,903	,000	-65,80	-37,31		
		CNP	-67,167*	4,903	,000	-81,41	-52,92		
		PGNC	4,944	4,903	,914	-9,30	19,19		
	Scheffé	CSF	CPG	CSF	-23,778*	4,903	,001	-40,42	-7,14
				CNC	-68,889*	4,903	,000	-85,53	-52,25
				CNP	-84,500*	4,903	,000	-101,14	-67,86
				PGNC	-12,389	4,903	,280	-29,03	4,25
				PGNP	-17,333*	4,903	,035	-33,97	-6,69
			CPG	CSF	23,778*	4,903	,001	7,14	40,42
				CNC	-45,111*	4,903	,000	-61,75	-28,47
				CNP	-60,722*	4,903	,000	-77,36	-44,08
				PGNC	11,389	4,903	,377	-5,25	28,03
				PGNP	6,444	4,903	,884	-10,20	23,09
CNC			CSF	68,889*	4,903	,000	52,25	85,53	
			CPG	45,111*	4,903	,000	28,47	61,75	
			CNP	-15,611	4,903	,081	-32,25	1,03	
			PGNC	56,500*	4,903	,000	39,86	73,14	
			PGNP	51,556*	4,903	,000	34,91	60,20	
CNP			CSF	84,500*	4,903	,000	67,86	101,14	
			CPG	60,722*	4,903	,000	44,08	77,36	
			CNC	15,611	4,903	,081	-1,03	32,25	
			PGNC	72,111*	4,903	,000	55,47	88,75	
			PGNP	67,167*	4,903	,000	50,53	83,81	
PGNC		CSF	12,389	4,903	,280	-4,25	29,03		
		CPG	-11,389	4,903	,377	-28,03	5,25		
		CNC	-56,500*	4,903	,000	-73,14	-39,86		
		CNP	-72,111*	4,903	,000	-88,75	-55,47		
		PGNP	-4,944	4,903	,960	-21,59	11,70		
PGNP		CSF	17,333*	4,903	,035	,69	33,97		
		CPG	-6,444	4,903	,884	-23,09	10,20		
		CNC	-51,556*	4,903	,000	-68,20	-34,91		
		CNP	-67,167*	4,903	,000	-83,81	-50,53		
		PGNC	4,944	4,903	,960	-11,70	21,59		

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

## 7.2.f.- ANEXO II: 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	
APd	HSD de Tukey	CSF	CNC	-245,889*	6,345	,000	-261,21	-230,57
			CNP	-168,722*	6,345	,000	-184,04	-153,41
		CNC	CSF	245,889*	6,345	,000	230,57	261,21
			CNP	77,167*	6,345	,000	61,85	92,48
		CNP	CSF	168,722*	6,345	,000	153,41	184,04
			CNC	-77,167*	6,345	,000	-92,48	-61,85
	Scheffé	CSF	CNC	-245,889*	6,345	,000	-261,89	-229,89
			CNP	-168,722*	6,345	,000	-184,72	-152,72
		CNC	CSF	245,889*	6,345	,000	229,89	261,89
			CNP	77,167*	6,345	,000	61,17	93,17
		CNP	CSF	168,722*	6,345	,000	152,72	184,72
			CNC	-77,167*	6,345	,000	-93,17	-61,17
APi	HSD de Tukey	CSF	CNC	-88,889*	5,335	,000	-81,77	-58,01
			CNP	-84,500*	5,335	,000	-97,38	-71,62
		CNC	CSF	88,889*	5,335	,000	58,01	81,77
			CNP	15,611*	5,335	,014	28,49	2,73
		CNP	CSF	84,500*	5,335	,000	71,62	97,38
			CNC	15,611*	5,335	,014	2,73	28,49
	Scheffé	CSF	CNC	-88,889*	5,335	,000	-82,34	-55,44
			CNP	-84,500*	5,335	,000	-97,95	-71,05
		CNC	CSF	88,889*	5,335	,000	55,44	82,34
			CNP	-15,611*	5,335	,019	-29,06	-2,16
		CNP	CSF	84,500*	5,335	,000	71,05	97,95
			CNC	15,611*	5,335	,019	2,16	29,06

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

7.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo

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	
APd	HSD de Tukey	CSF	CNC	-245,889*	6,037	,000	-260,46	231,32
			PGNC	-66,167*	6,037	,000	-80,74	-51,59
		CNC	CSF	245,889*	6,037	,000	231,32	260,46
			PGNC	179,722*	6,037	,000	165,15	194,29
		PGNC	CSF	66,167*	6,037	,000	51,59	80,74
			CNC	-179,722*	6,037	,000	-194,29	-165,15
	Scheffé	CSF	CNC	-245,889*	6,037	,000	-261,11	-230,67
			PGNC	-66,167*	6,037	,000	-81,39	-50,95
		CNC	CSF	245,889*	6,037	,000	230,67	261,11
			PGNC	179,722*	6,037	,000	164,50	194,94
		PGNC	CSF	66,167*	6,037	,000	50,95	81,39
			CNC	179,722*	6,037	,000	194,94	164,50
APi	HSD de Tukey	CSF	CNC	-68,889*	4,544	,000	-79,86	-57,92
			PGNC	-12,389*	4,544	,023	-23,36	-1,42
		CNC	CSF	68,889*	4,544	,000	57,92	79,86
			PGNC	56,500*	4,544	,000	45,53	67,47
		PGNC	CSF	12,389*	4,544	,023	1,42	23,36
			CNC	-56,500*	4,544	,000	-67,47	-45,53
	Scheffé	CSF	CNC	-68,889*	4,544	,000	-80,35	-57,43
			PGNC	-12,389*	4,544	,031	-23,85	-,93
		CNC	CSF	68,889*	4,544	,000	57,43	80,35
			PGNC	56,500*	4,544	,000	45,04	67,96
		PGNC	CSF	12,389*	4,544	,031	,93	23,85
			CNC	-56,500*	4,544	,000	-67,96	-45,04

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

## 7.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático

Comparaciones múltiples

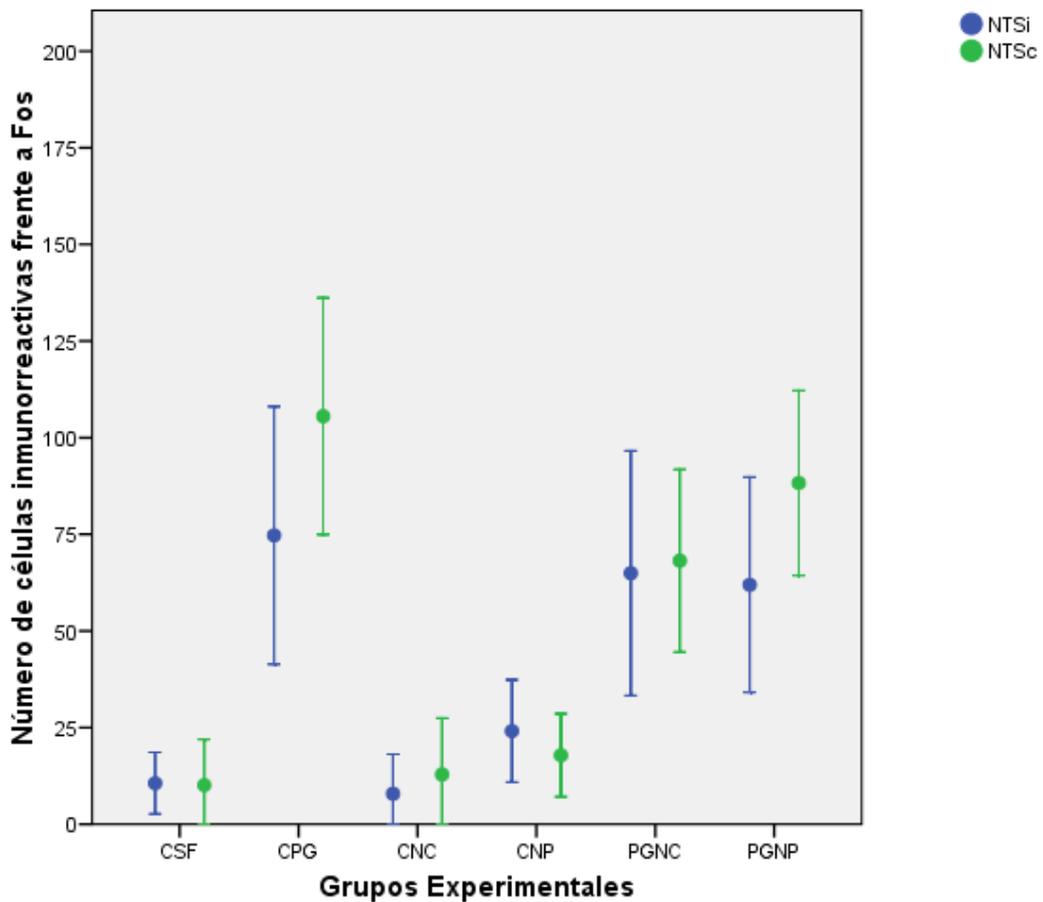
Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%				
						Límite inferior	Límite superior			
APd	HSD de Tukey	CSF	CNP	-168,722*	5,380	,000	-181,66	-155,78		
			PGNP	-41,056*	5,380	,000	-53,99	-28,12		
		CNP	CSF	168,722*	5,380	,000	155,78	181,66		
			PGNP	127,687*	5,380	,000	114,73	140,60		
		PGNP	CSF	41,056*	5,380	,000	28,12	53,99		
			CNP	-127,687*	5,380	,000	-140,60	-114,73		
	Scheffé	CSF	CNP	-168,722*	5,380	,000	-182,24	-155,21		
			PGNP	-41,056*	5,380	,000	-54,57	-27,54		
		CNP	CSF	168,722*	5,380	,000	155,21	182,24		
			PGNP	127,687*	5,380	,000	114,15	141,18		
		PGNP	CSF	41,056*	5,380	,000	27,54	54,57		
			CNP	-127,687*	5,380	,000	-141,18	-114,15		
		APi	HSD de Tukey	CSF	CNP	-84,500*	4,380	,000	-95,07	-73,93
					PGNP	-17,333*	4,380	,001	-27,91	-6,76
CNP	CSF			84,500*	4,380	,000	73,93	95,07		
	PGNP			67,187*	4,380	,000	56,59	77,74		
PGNP	CSF			17,333*	4,380	,001	6,76	27,91		
	CNP		-67,187*	4,380	,000	-77,74	-56,59			
Scheffé	CSF		CNP	-84,500*	4,380	,000	-95,54	-73,46		
			PGNP	-17,333*	4,380	,001	-28,38	-6,29		
	CNP		CSF	84,500*	4,380	,000	73,46	95,54		
			PGNP	67,187*	4,380	,000	56,12	78,21		
	PGNP	CSF	17,333*	4,380	,001	6,29	28,38			
		CNP	-67,187*	4,380	,000	-78,21	-56,12			

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

## 8.- Estudio Estadístico del Núcleo del Tracto Solitario.

### 8.1.- Análisis Global

En primer lugar se presentan la descriptiva (media, número de casos y desviación típica) para las variables originales Niveles Intermedio (NTSi) y Caudal (NTSc). 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 6 grupos (fig. 4.61).



**Fig. 4.61.** Gráfica de las medias estimadas para cada variable dentro de cada uno de los 6 grupos experimentales.

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
						NTSi	CSF		
	CPG	18	74,72	16,666	3,928	66,43	83,01	55	95
	CNC	18	7,89	5,121	1,207	5,34	10,44	2	14
	CNP	18	24,11	6,623	1,561	20,82	27,40	15	35
	PGNC	18	64,94	15,824	3,730	57,08	72,81	45	85
	PGNP	18	61,94	13,918	3,280	55,02	68,87	45	80
	Total	108	40,70	29,624	2,851	35,05	46,35	2	95
NTSc	CSF	18	10,11	5,930	1,398	7,16	13,06	3	17
	CPG	18	105,56	15,302	3,607	97,95	113,16	85	124
	CNC	18	12,89	7,267	1,713	9,28	16,50	4	22
	CNP	18	17,83	5,371	1,266	15,16	20,50	10	24
	PGNC	18	68,17	11,809	2,783	62,29	74,04	55	83
	PGNP	18	88,28	11,970	2,821	82,33	94,23	75	105
	Total	108	50,47	39,938	3,843	42,85	58,09	3	124

**Tabla 4.17.** Descriptivos para las variables NTSi y NTSc.

Efectuamos un análisis de la varianza de un factor para las variables NTSi y NTSc, siendo el factor el grupo experimental que presenta 6 condiciones experimentales diferentes. Los resultados se recogen en las Tablas 4.17 y 4.18, que a su vez reproduce las tablas ANOVA para las 2 variables.

Se deduce de ellas que hay diferencias significativas entre los 6 grupos experimentales para las 2 variables: NTSi ( $F=119,083$ ;  $p<0,0001$ ) y NTSc ( $F=302,802$ ;  $p<0,0001$ ).

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
NTSi	Inter-grupos	80167,185	5	16033,437	119,083	,000
	Intra-grupos	13733,333	102	134,641		
	Total	93900,519	107			
NTSc	Inter-grupos	159900,306	5	31980,061	302,802	,000
	Intra-grupos	10772,611	102	105,614		
	Total	170672,917	107			

**Tabla 4.18.** Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para las variables NTSi y NTSc.

Puesto que el análisis detectó diferencias entre los grupos tenía sentido realizar comparaciones múltiples para determinar conjuntos homogéneos de grupos experimentales que compartirían la misma media (ANEXO I).

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 (tabla 4.19 y 4.20).

En el nivel Intermedio del Núcleo del Tracto Solitario (NTSi), el método de Tukey determinó hasta 4 subconjuntos homogéneos, mientras que el de Scheffé determinó tan sólo 3:

- En los extremos de estos subconjuntos destacaron por un lado el grupo CSF y el CNC y por el otro los grupos que recibieron Pregabalina (CPG, PGNC y PGNP).
- En el centro quedaría el grupo CNP.

		NTSi				
Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CNC	18	7,89			
	CSF	18	10,61			
	CNP	18		24,11		
	PGNP	18			61,94	
	PGNC	18			64,94	64,94
	CPG	18				74,72
	Sig.		,981	1,000	,971	,126
Scheffé <sup>#</sup>	CNC	18	7,89			
	CSF	18	10,61			
	CNP	18		24,11		
	PGNP	18			61,94	
	PGNC	18			64,94	
	CPG	18				74,72
	Sig.		,992	1,000	,062	

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

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

**Tabla 4.19.** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable NTSi.

A nivel Caudal del Núcleo del Tracto Solitario (NTSc), tanto el método de Tukey como el de Scheffé determinaron 5 subconjuntos homogéneos:

- En los extremos quedaron en esta ocasión los grupos CSF, CNC y CNP por un extremo y el grupo CPG por el otro.
- En el bloque central se situaron los grupos que recibieron Pregabalina previa al estímulo doloroso (PGNC y PGNP).

NTSc						
Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05				
		1	2	3	4	
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	10,11			
	CNC	18	12,89			
	CNP	18	17,83			
	PGNC	18		68,17		
	PGNP	18			88,28	
	CPG	18				105,56
	Sig.		,223	1,000	1,000	1,000
Scheffé	CSF	18	10,11			
	CNC	18	12,89			
	CNP	18	17,83			
	PGNC	18		68,17		
	PGNP	18			88,28	
	CPG	18				105,56
	Sig.		,412	1,000	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 4.20.** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable NTSc.

## 8.2.- 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.

### 8.2.a.- Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en el Núcleo del Tracto Solitario. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF y CPG.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables NTSi y NTSc, siendo el factor el Grupo Experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 2 grupos experimentales tanto para la variable NTSi ( $F=251.955$ ;  $p<0,0001$ ) como para la NTSc ( $F=608.872$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.21).

En este caso, al incluir sólo 2 grupos experimentales en el análisis, no fue necesario llevar a cabo un estudio de comparaciones múltiples ni determinar subconjuntos homogéneos.

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 (fig. 4.62).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
NTSi	CSF	18	10,61	3,987	,940	8,63	12,59	6	16
	CPG	18	74,72	16,666	3,928	66,43	83,01	55	95
	Total	36	42,67	34,634	5,772	30,95	54,39	6	95
NTSc	CSF	18	10,11	5,930	1,398	7,16	13,06	3	17
	CPG	18	105,56	15,302	3,607	97,95	113,16	85	124
	Total	36	57,83	49,732	8,289	41,01	74,66	3	124

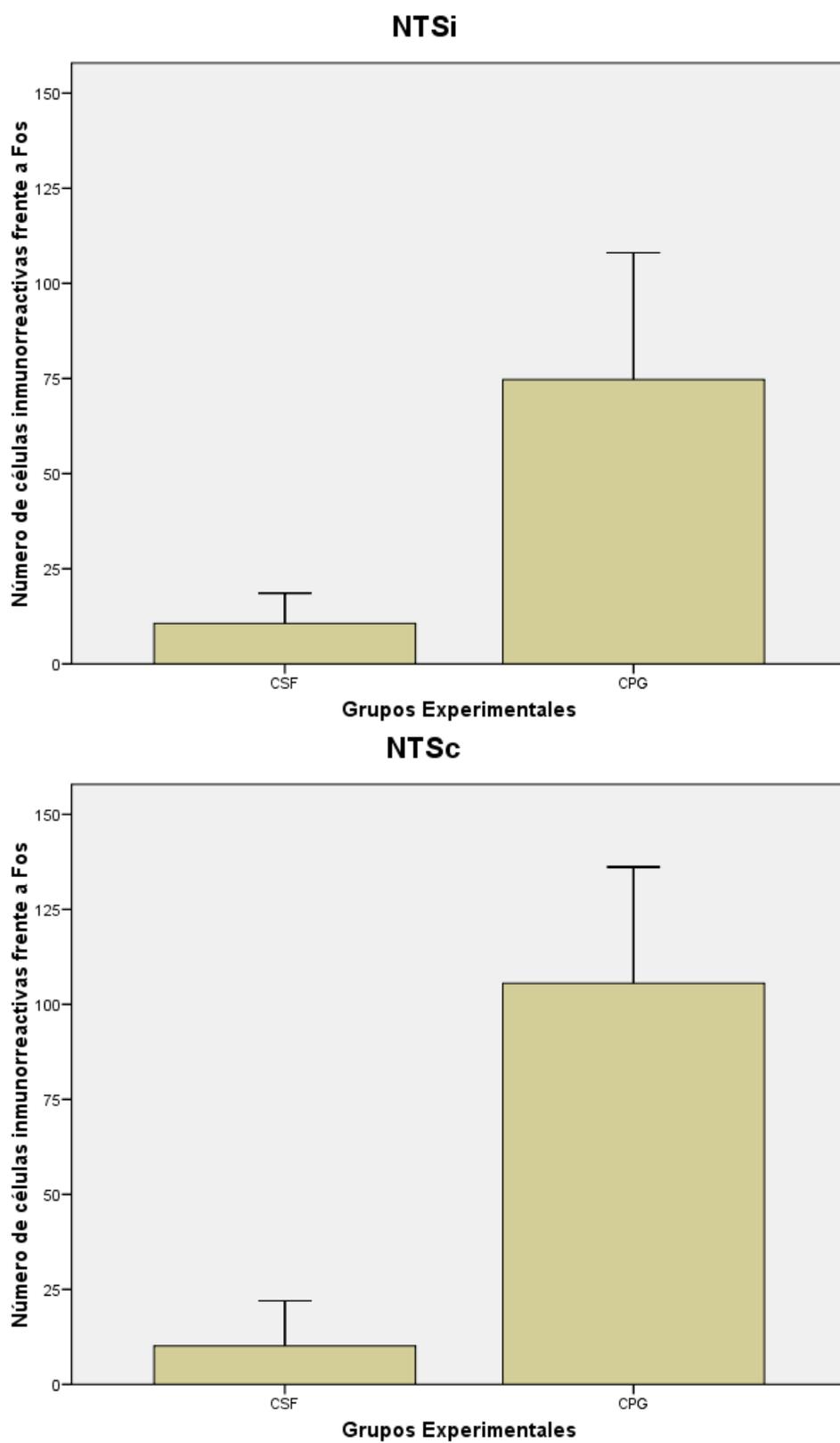
## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
NTSi	83,384	1	34	,000
NTSc	62,333	1	34	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
NTSi	Inter-grupos	36992,111	1	36992,111	251,955	,000
	Intra-grupos	4991,889	34	146,820		
	Total	41984,000	35			
NTSc	Inter-grupos	81986,778	1	81986,778	608,872	,000
	Intra-grupos	4578,222	34	134,654		
	Total	86565,000	35			

**Tabla 4.21.** Resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.



**Fig. 4.62.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG).

### 8.2.b.- Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la aplicación de un estímulo nociceptivo de diferente naturaleza tendría sobre la expresión de Fos en el Núcleo del Tracto Solitario. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y CNP.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables NTSi y NTSc, 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 NTSi ( $F=47.394$ ;  $p<0,0001$ ) como para la NTSc ( $F=7.072$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.22).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO II) confirmó las diferencias al comparar cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y CNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y CNP, 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 (tabla 4.23).

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 (fig. 4.63).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
NTSi	CSF	18	10,61	3,987	,940	8,63	12,59	6	16
	CNC	18	7,89	5,121	1,207	5,34	10,44	2	14
	CNP	18	24,11	6,623	1,561	20,82	27,40	15	35
	Total	54	14,20	8,879	1,208	11,78	16,63	2	35
NTSc	CSF	18	10,11	5,930	1,398	7,16	13,06	3	17
	CNC	18	12,89	7,267	1,713	9,28	16,50	4	22
	CNP	18	17,83	5,371	1,266	15,16	20,50	10	24
	Total	54	13,61	6,918	,941	11,72	15,50	3	24

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
NTSi	3,232	2	51	,048
NTSc	4,289	2	51	,019

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
NTSi	Inter-grupos	2716,926	2	1358,463	47,394	,000
	Intra-grupos	1461,833	51	28,663		
	Total	4178,759	53			
NTSc	Inter-grupos	550,778	2	275,389	7,072	,002
	Intra-grupos	1986,056	51	38,942		
	Total	2536,833	53			

**Tabla 4.22.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## NTSi

Grupo	N	Subconjunto para alf a = .05		
		1	2	
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CNC	18	7,89	
	CSF	18	10,61	
	CNP	18		24,11
	Sig.		,288	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CNC	18	7,89	
	CSF	18	10,61	
	CNP	18		24,11
	Sig.		,321	1,000

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

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

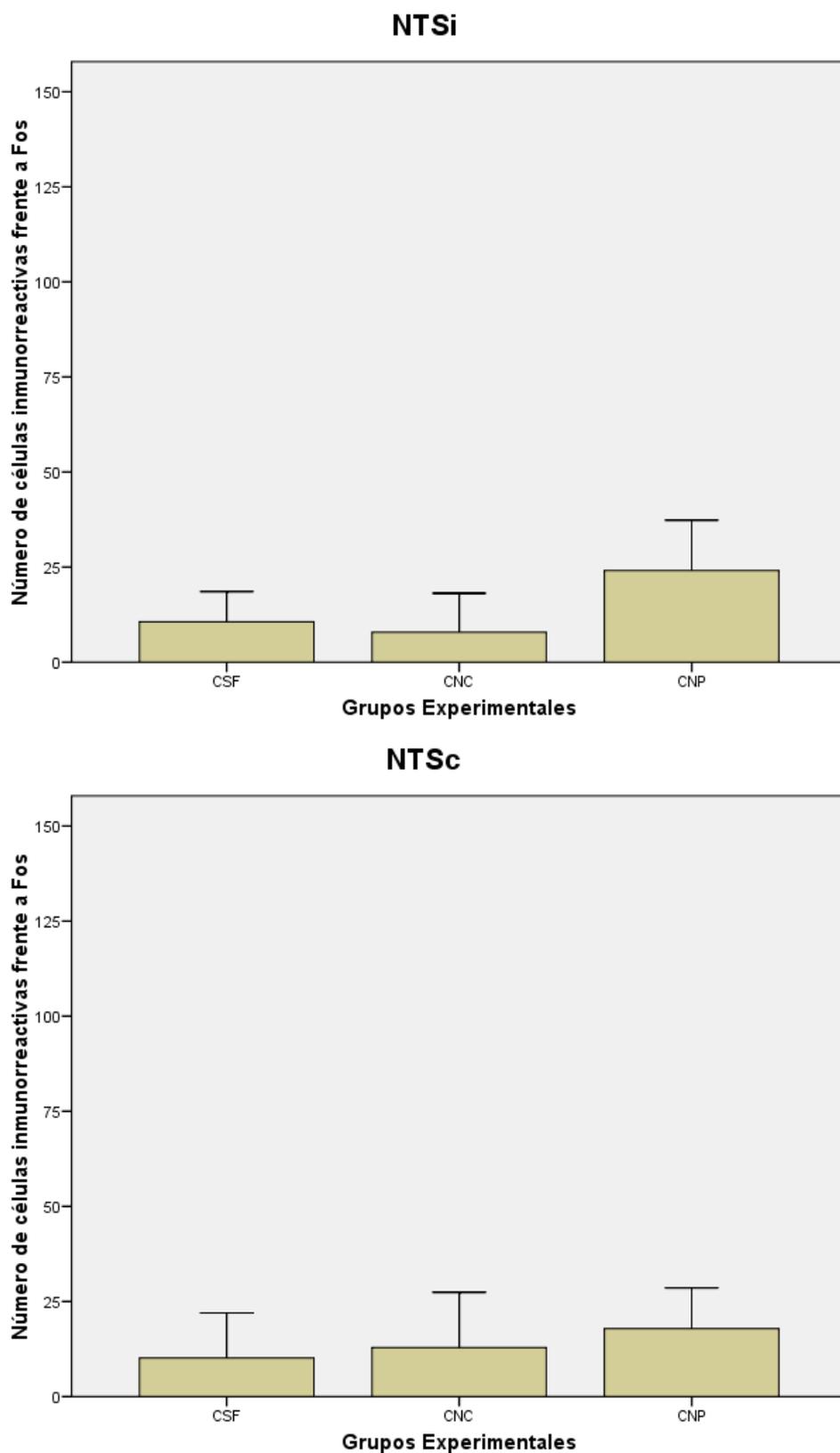
## NTSc

Grupo	N	Subconjunto para alf a = .05		
		1	2	
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	10,11	
	CNC	18	12,89	12,89
	CNP	18		17,83
	Sig.		,382	,054
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	10,11	
	CNC	18	12,89	12,89
	CNP	18		17,83
	Sig.		,416	,069

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

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

**Tabla 4.23.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.62.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP).

### 8.2.c.- Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en el Núcleo del Tracto Solitario por aplicación de un estímulo nociceptivo (test de la formalina). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y PGNC.

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 NTSi y NTSc, 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 NTSi ( $F=191.207$ ;  $p<0,0001$ ) como para la NTSc ( $F=254.619$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.24).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO III) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y PGNC) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y PGNC, 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 (tabla 4.25).

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 (fig. 4.63).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
NTSi	CSF	18	10,61	3,987	,940	8,63	12,59	6	16
	CNC	18	7,89	5,121	1,207	5,34	10,44	2	14
	PGNC	18	64,94	15,824	3,730	57,08	72,81	45	85
	Total	54	27,81	28,238	3,843	20,11	35,52	2	85
NTSc	CSF	18	10,11	5,930	1,398	7,16	13,06	3	17
	CNC	18	12,89	7,267	1,713	9,28	16,50	4	22
	PGNC	18	68,17	11,809	2,783	62,29	74,04	55	83
	Total	54	30,39	28,307	3,852	22,66	38,12	3	83

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
NTSi	70,437	2	51	,000
NTSc	15,412	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
NTSi	Inter-grupos	37289,148	2	18644,574	191,207	,000
	Intra-grupos	4973,000	51	97,510		
	Total	42262,148	53			
NTSc	Inter-grupos	38602,778	2	19301,389	254,619	,000
	Intra-grupos	3866,056	51	75,805		
	Total	42468,833	53			

**Tabla 4.24.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## NTSi

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CNC	18	7,89	64,94
	CSF	18	10,61	
	PGNC	18		
	Sig.		,688	
Scheffé <sup>a</sup>	CNC	18	7,89	64,94
	CSF	18	10,61	
	PGNC	18		
	Sig.		,712	

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

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

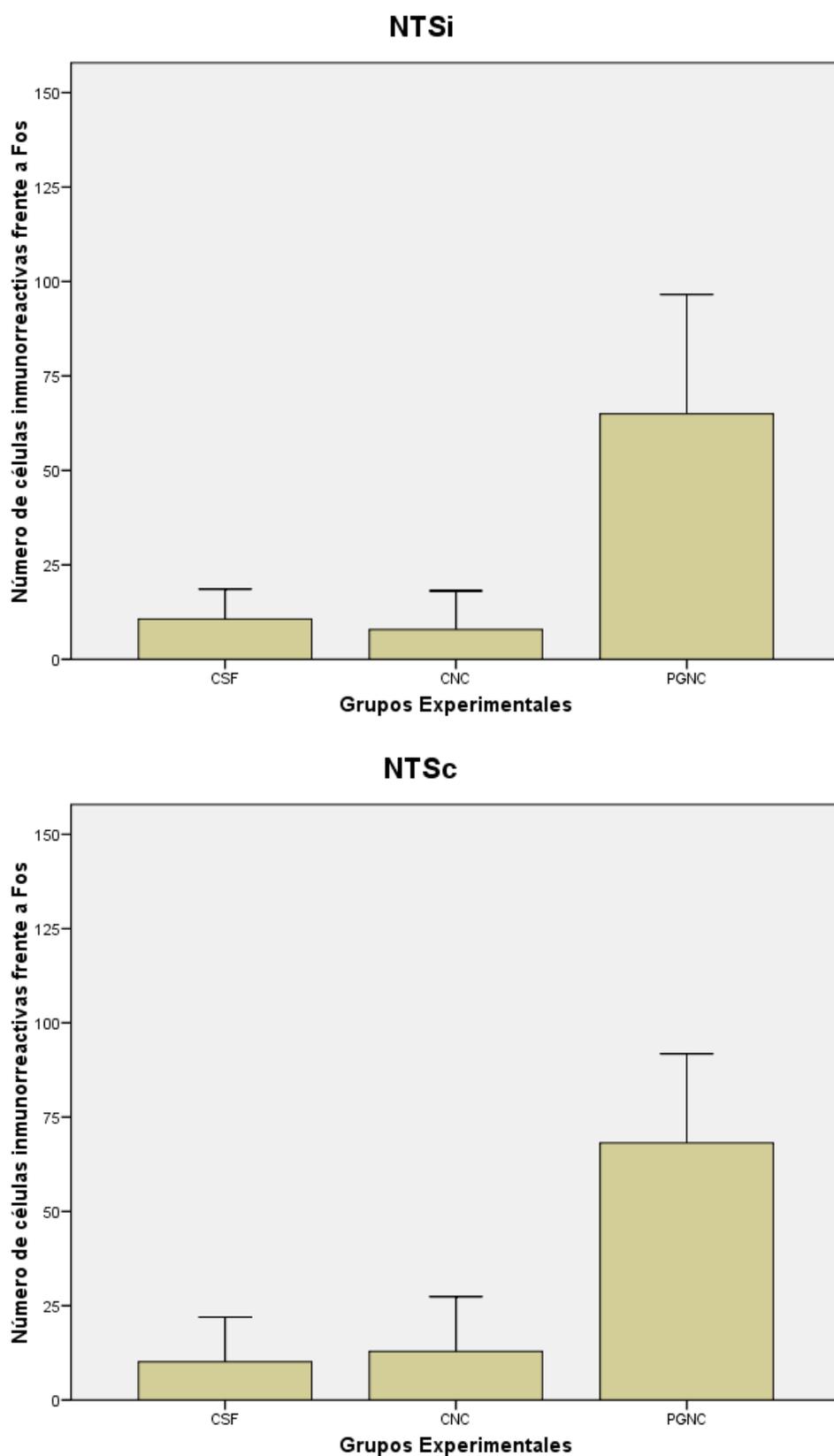
## NTSc

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	10,11	68,17
	CNC	18	12,89	
	PGNC	18		
	Sig.		,607	
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	10,11	68,17
	CNC	18	12,89	
	PGNC	18		
	Sig.		,635	

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

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

**Tabla 4.25.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.63.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC).

#### 8.2.d.- Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina cada 8 horas durante tendría sobre la expresión de Fos en el Núcleo del Tracto Solitario por aplicación de un estímulo neuropático (constricción crónica del ciático). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNP y PGNP.

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 NTSi y NTSc, 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 NTSi ( $F=150.860$ ;  $p<0,0001$ ) como para la NTSc ( $F=483.332$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.26).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO IV) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNP y PGNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNP y PGNP, 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 (tabla 4.27).

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 (fig. 4.64).

## Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
NTSi	CSF	18	10,61	3,987	,940	8,63	12,59	6	16
	CNP	18	24,11	6,623	1,561	20,82	27,40	15	35
	PGNP	18	61,94	13,918	3,280	55,02	68,87	45	80
	Total	54	32,22	23,713	3,227	25,75	38,69	6	80
NTSc	CSF	18	10,11	5,930	1,398	7,16	13,06	3	17
	CNP	18	17,83	5,371	1,266	15,16	20,50	10	24
	PGNP	18	88,28	11,970	2,821	82,33	94,23	75	105
	Total	54	38,74	36,424	4,957	28,80	48,68	3	105

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
NTSi	35,492	2	51	,000
NTSc	48,929	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
NTSi	Inter-grupos	25492,333	2	12746,167	150,860	,000
	Intra-grupos	4309,000	51	84,490		
	Total	29801,333	53			
NTSc	Inter-grupos	66792,481	2	33396,241	483,332	,000
	Intra-grupos	3523,889	51	69,096		
	Total	70316,370	53			

**Tabla 4.26.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## NTSi

Grupo	N	Subconjunto para $\alpha = .05$		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	10,61	
	CNP	18		24,11
	PGNP	18		61,94
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>b</sup>	CSF	18	10,61	
	CNP	18		24,11
	PGNP	18		61,94
	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.

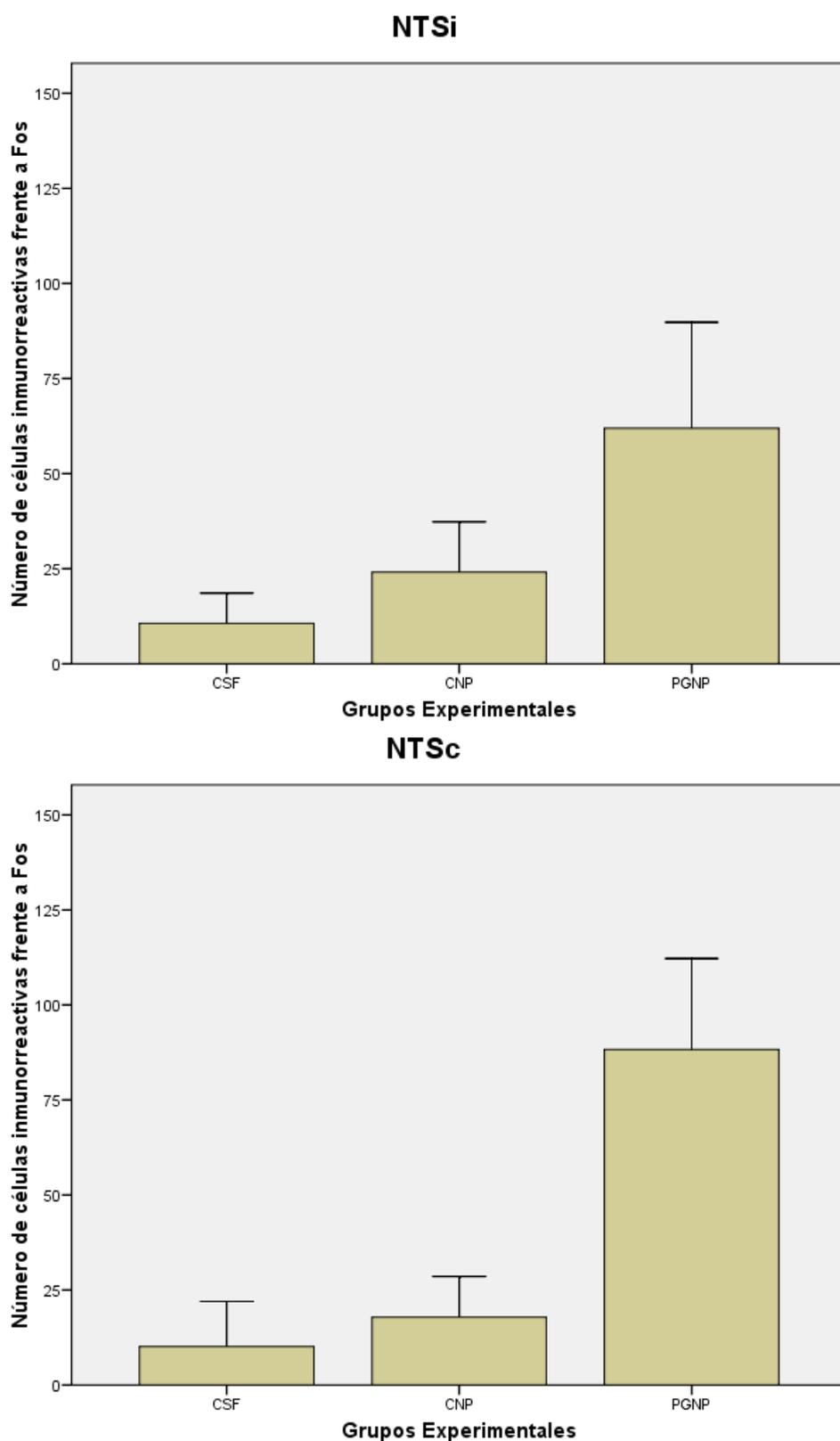
## NTSc

Grupo	N	Subconjunto para $\alpha = .05$		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	10,11	
	CNP	18		17,83
	PGNP	18		88,28
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>b</sup>	CSF	18	10,11	
	CNP	18		17,83
	PGNP	18		88,28
	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 4.27.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.64.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP).

8.2.e.- ANEXO I: Análisis Global

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			
NTSi	HSD de Tukey	CSF	CPG	-64,111*	3,868	,000	-75,35	-52,88		
			CNC	2,722	3,868	,981	-8,51	13,96		
			CNP	-13,500*	3,868	,009	-24,73	-2,27		
			PGNC	-54,333*	3,868	,000	-65,57	-43,10		
			PGNP	-51,333*	3,868	,000	-62,57	-40,10		
		CPG	CSF	64,111*	3,868	,000	52,88	75,35		
			CNC	66,833*	3,868	,000	55,60	78,07		
			CNP	50,611*	3,868	,000	39,38	61,85		
			PGNC	9,778	3,868	,126	-1,46	21,01		
			PGNP	12,778*	3,868	,016	1,54	24,01		
		CNC	CSF	-2,722	3,868	,981	-13,96	8,51		
			CPG	-66,833*	3,868	,000	-78,07	-55,60		
			CNP	-16,222*	3,868	,001	-27,46	-4,99		
			PGNC	-57,056*	3,868	,000	-68,29	-45,82		
			PGNP	-54,056*	3,868	,000	-65,29	-42,82		
		CNP	CSF	13,500*	3,868	,009	2,27	24,73		
			CPG	-50,611*	3,868	,000	-61,85	-39,38		
			CNC	16,222*	3,868	,001	4,99	27,46		
			PGNC	-40,833*	3,868	,000	-52,07	-29,60		
			PGNP	-37,833*	3,868	,000	-49,07	-26,60		
		PGNC	CSF	54,333*	3,868	,000	43,10	65,57		
			CPG	-9,778	3,868	,126	-21,01	1,46		
			CNC	57,056*	3,868	,000	45,82	68,29		
			CNP	40,833*	3,868	,000	29,60	52,07		
			PGNP	3,000	3,868	,971	-8,23	14,23		
		PGNP	CSF	51,333*	3,868	,000	40,10	62,57		
			CPG	-12,778*	3,868	,016	-24,01	-1,54		
			CNC	54,056*	3,868	,000	42,82	65,29		
			CNP	37,833*	3,868	,000	26,60	49,07		
			PGNC	-3,000	3,868	,971	-14,23	8,23		
		Scheffé	Scheffé	CSF	CPG	-64,111*	3,868	,000	-77,24	-50,98
					CNC	2,722	3,868	,992	-10,40	15,85
					CNP	-13,500*	3,868	,040	-26,63	-,37
					PGNC	-54,333*	3,868	,000	-67,46	-41,21
					PGNP	-51,333*	3,868	,000	-64,46	-38,21
				CPG	CSF	64,111*	3,868	,000	50,98	77,24
					CNC	66,833*	3,868	,000	53,71	79,96
					CNP	50,611*	3,868	,000	37,48	63,74
					PGNC	9,778	3,868	,279	-3,35	22,90
					PGNP	12,778	3,868	,062	-,35	25,90
				CNC	CSF	-2,722	3,868	,992	-15,85	10,40
					CPG	-66,833*	3,868	,000	-79,96	-53,71
					CNP	-16,222*	3,868	,006	-29,35	-3,10
					PGNC	-57,056*	3,868	,000	-70,18	-43,93
					PGNP	-54,056*	3,868	,000	-67,18	-40,93
				CNP	CSF	13,500*	3,868	,040	,37	26,63
					CPG	-50,611*	3,868	,000	-63,74	-37,48
					CNC	16,222*	3,868	,006	3,10	29,35
PGNC	-40,833*				3,868	,000	-53,96	-27,71		
PGNP	-37,833*				3,868	,000	-50,96	-24,71		
PGNC	CSF			54,333*	3,868	,000	41,21	67,46		
	CPG			-9,778	3,868	,279	-22,90	3,35		
	CNC			57,056*	3,868	,000	43,93	70,18		
	CNP			40,833*	3,868	,000	27,71	53,96		
	PGNP			3,000	3,868	,988	-10,13	16,13		
PGNP	CSF			51,333*	3,868	,000	38,21	64,46		
	CPG			-12,778	3,868	,062	-25,90	-,35		
	CNC			54,056*	3,868	,000	40,93	67,18		
	CNP			37,833*	3,868	,000	24,71	50,96		
	PGNC			-3,000	3,868	,988	-16,13	10,13		

NTSc	HSD de Tukey	CSF	CPG	-95,444*	3,426	,000	-105,39	-85,49		
			CNC	-2,778	3,426	,965	-12,73	7,17		
			CNP	-7,722	3,426	,223	-17,67	2,23		
			PGNC	-58,056*	3,426	,000	-68,01	-48,11		
			PGNP	-78,167*	3,426	,000	-88,12	-68,22		
		CPG	CSF	95,444*	3,426	,000	85,49	105,39		
			CNC	92,667*	3,426	,000	82,72	102,62		
			CNP	87,722*	3,426	,000	77,77	97,67		
			PGNC	37,389*	3,426	,000	27,44	47,34		
			PGNP	17,278*	3,426	,000	7,33	27,23		
		CNC	CSF	2,778	3,426	,965	-7,17	12,73		
			CPG	-92,667*	3,426	,000	-102,62	-82,72		
			CNP	-4,944	3,426	,701	-14,89	5,01		
			PGNC	-55,278*	3,426	,000	-65,23	-45,33		
			PGNP	-75,389*	3,426	,000	-85,34	-65,44		
		CNP	CSF	7,722	3,426	,223	-2,23	17,67		
			CPG	-87,722*	3,426	,000	-97,67	-77,77		
			CNC	4,944	3,426	,701	-5,01	14,89		
			PGNC	50,333*	3,426	,000	60,26	40,36		
			PGNP	-70,444*	3,426	,000	-80,39	-60,49		
		PGNC	CSF	58,056*	3,426	,000	48,11	68,01		
			CPG	-37,389*	3,426	,000	-47,34	-27,44		
			CNC	55,278*	3,426	,000	45,33	65,23		
			CNP	50,333*	3,426	,000	40,38	60,28		
			PGNP	-20,111*	3,426	,000	-30,06	-10,16		
		PGNP	CSF	78,167*	3,426	,000	68,22	88,12		
			CPG	-17,278*	3,426	,000	-27,23	-7,33		
			CNC	75,389*	3,426	,000	65,44	85,34		
			CNP	70,444*	3,426	,000	60,49	80,39		
			PGNC	20,111*	3,426	,999	10,16	30,06		
		Scheffé	HSD de Tukey	CSF	CPG	-95,444*	3,426	,000	-107,07	-83,82
					CNC	-2,778	3,426	,985	-14,40	8,85
					CNP	-7,722	3,426	,412	-19,35	3,90
					PGNC	-58,056*	3,426	,000	-69,68	-46,43
					PGNP	-78,167*	3,426	,000	-89,79	-66,54
				CPG	CSF	95,444*	3,426	,000	83,82	107,07
					CNC	92,667*	3,426	,000	81,04	104,29
					CNP	87,722*	3,426	,000	76,10	99,35
					PGNC	37,389*	3,426	,000	25,76	49,01
					PGNP	17,278*	3,426	,000	5,65	28,90
				CNC	CSF	2,778	3,426	,985	-8,85	14,40
					CPG	-92,667*	3,426	,000	-104,29	-81,04
					CNP	-4,944	3,426	,836	-16,57	6,68
					PGNC	-55,278*	3,426	,000	-66,90	-43,65
					PGNP	-75,389*	3,426	,000	-87,01	-63,76
				CNP	CSF	7,722	3,426	,412	-3,90	19,35
					CPG	-87,722*	3,426	,000	-99,35	-76,10
					CNC	4,944	3,426	,836	-6,66	16,57
PGNC	-50,333*				3,426	,000	-61,96	-38,71		
PGNP	-70,444*				3,426	,000	-82,07	-58,82		
PGNC	CSF			58,056*	3,426	,000	46,43	69,68		
	CPG			-37,389*	3,426	,000	-49,01	-25,76		
	CNC			55,278*	3,426	,000	43,65	66,90		
	CNP			50,333*	3,426	,000	38,71	61,96		
	PGNP			-20,111*	3,426	,000	-31,74	-8,49		
PGNP	CSF			78,167*	3,426	,000	66,54	89,79		
	CPG			-17,278*	3,426	,000	-28,90	-5,65		
	CNC			75,389*	3,426	,000	63,76	87,01		
	CNP			70,444*	3,426	,000	58,82	82,07		
	PGNC			20,111*	3,426	,000	8,49	31,74		

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

8.2.f.- ANEXO II: 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	
NTSi	HSD de Tukey	CSF	CNC	2,722	1,785	,288	-1,59	7,03
			CNP	-13,500*	1,785	,000	-17,81	-9,19
		CNC	CSF	-2,722	1,785	,288	-7,03	1,59
			CNP	-16,222*	1,785	,000	-20,53	-11,91
		CNP	CSF	13,500*	1,785	,000	9,19	17,81
			CNC	16,222*	1,785	,000	11,91	20,53
	Scheffé	CSF	CNC	2,722	1,785	,321	-1,78	7,22
			CNP	-13,500*	1,785	,000	-18,00	-9,00
		CNC	CSF	-2,722	1,785	,321	-7,22	1,78
			CNP	-16,222*	1,785	,000	-20,72	-11,72
		CNP	CSF	13,500*	1,785	,000	9,00	18,00
			CNC	16,222*	1,785	,000	11,72	20,72
NTSc	HSD de Tukey	CSF	CNC	-2,778	2,080	,382	-7,80	2,24
			CNP	-7,722*	2,080	,001	-12,74	-2,70
		CNC	CSF	2,778	2,080	,382	-2,24	7,80
			CNP	-4,944	2,080	,054	-9,97	,08
		CNP	CSF	7,722*	2,080	,001	2,70	12,74
			CNC	4,944	2,080	,054	-,08	9,97
	Scheffé	CSF	CNC	-2,778	2,080	,416	-8,02	2,47
			CNP	-7,722*	2,080	,002	-12,97	-2,48
		CNC	CSF	2,778	2,080	,416	-2,47	8,02
			CNP	-4,944	2,080	,069	-10,19	,30
		CNP	CSF	7,722*	2,080	,002	2,48	12,97
			CNC	4,944	2,080	,069	-,30	10,19

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

## 8.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo

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
NTSi	HSD de Tukey	CNC	2,722	3,292	,688	-5,22	10,67
		PGNC	-54,333*	3,292	,000	-62,28	-46,39
		CNC	-2,722	3,292	,688	-10,67	5,22
		PGNC	-57,056*	3,292	,000	-65,00	-49,11
		CNC	54,333*	3,292	,000	46,39	62,28
		PGNC	57,056*	3,292	,000	49,11	65,00
	Scheffé	CNC	2,722	3,292	,712	-5,58	11,02
		PGNC	-54,333*	3,292	,000	-62,63	-46,03
		CNC	-2,722	3,292	,712	-11,02	5,58
		PGNC	-57,056*	3,292	,000	-65,36	-48,76
		CNC	54,333*	3,292	,000	46,03	62,63
		PGNC	57,056*	3,292	,000	48,76	65,36
NTSc	HSD de Tukey	CNC	-2,778	2,902	,607	-9,78	4,23
		PGNC	-58,056*	2,902	,000	-65,06	-51,05
		CNC	2,778	2,902	,607	-4,23	9,78
		PGNC	-55,278*	2,902	,000	-62,28	-48,27
		CNC	58,056*	2,902	,000	51,05	65,06
		PGNC	55,278*	2,902	,000	48,27	62,28
	Scheffé	CNC	-2,778	2,902	,635	-10,10	4,54
		PGNC	-58,056*	2,902	,000	-65,37	-50,74
		CNC	2,778	2,902	,635	-4,54	10,10
		PGNC	-55,278*	2,902	,000	-62,60	-47,96
		CNC	58,056*	2,902	,000	50,74	65,37
		PGNC	55,278*	2,902	,000	47,96	62,60

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

8.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático

Comparaciones múltiples

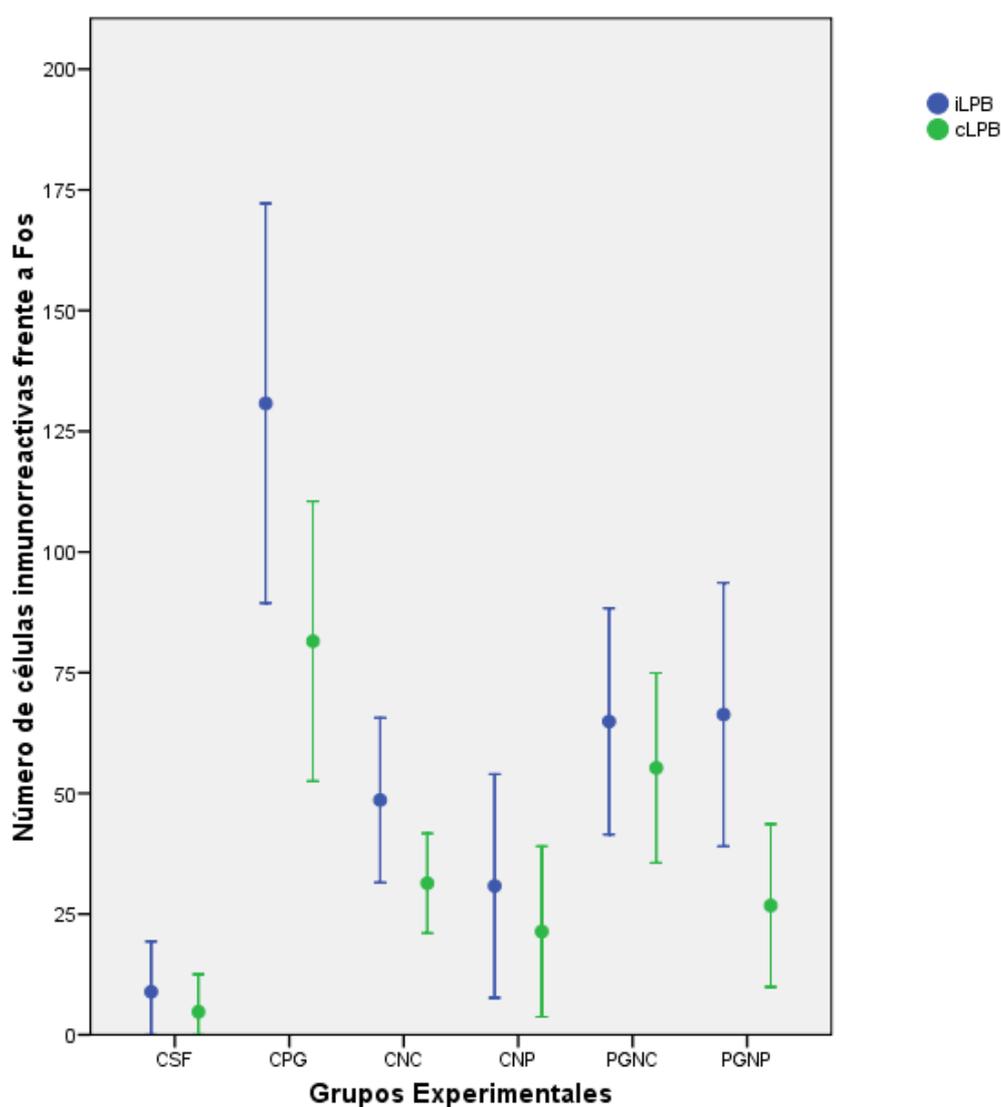
Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
NTSi	HSD de Tukey	CSF	CNP	-13,500*	3,064	,000	-20,90	-6,10
			PGNP	-51,333*	3,064	,000	-58,73	-43,94
		CNP	CSF	13,500*	3,064	,000	6,10	20,90
			PGNP	-37,833*	3,064	,000	-45,23	-30,44
		PGNP	CSF	51,333*	3,064	,000	43,94	58,73
			CNP	37,833*	3,064	,000	30,44	45,23
	Scheffé	CSF	CNP	-13,500*	3,064	,000	-21,23	-5,77
			PGNP	-51,333*	3,064	,000	-59,06	-43,61
		CNP	CSF	13,500*	3,064	,000	5,77	21,23
			PGNP	-37,833*	3,064	,000	-45,56	-30,11
		PGNP	CSF	51,333*	3,064	,000	43,61	59,06
			CNP	37,833*	3,064	,000	30,11	45,56
NTSc	HSD de Tukey	CSF	CNP	-7,722*	2,771	,020	-14,41	-1,03
			PGNP	-78,167*	2,771	,000	-84,86	-71,48
		CNP	CSF	7,722*	2,771	,020	1,03	14,41
			PGNP	-70,444*	2,771	,000	-77,13	-63,76
		PGNP	CSF	78,167*	2,771	,000	71,48	84,86
			CNP	70,444*	2,771	,000	63,76	77,13
	Scheffé	CSF	CNP	-7,722*	2,771	,027	-14,71	-,74
			PGNP	-78,167*	2,771	,000	-85,15	-71,18
		CNP	CSF	7,722*	2,771	,027	,74	14,71
			PGNP	-70,444*	2,771	,000	-77,43	-63,46
		PGNP	CSF	78,167*	2,771	,000	71,18	85,15
			CNP	70,444*	2,771	,000	63,46	77,43

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

## 9.- Estudio Estadístico de la Porción Lateral del PB.

### 9.1.- Análisis Global

En primer lugar se presentan la descriptiva (media, número de casos y desviación típica) para las variables originales Niveles Intermedio (LPBi) y Caudal (LPBc). 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 6 grupos (fig. 4.65).



**Fig. 4.65.** Gráfica de las medias estimadas para cada variable dentro de cada uno de los 6 grupos experimentales.

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LPBi	CSF	20	8,90	5,210	1,165	6,46	11,34	3	15
	CPG	18	130,78	20,695	4,878	120,49	141,07	103	160
	CNC	18	48,61	8,521	2,008	44,37	52,85	40	60
	CNP	18	30,83	11,582	2,730	25,07	36,59	16	45
	PGNC	18	64,89	11,712	2,760	59,06	70,71	50	80
	PGNP	18	66,33	13,638	3,215	59,55	73,12	50	83
	Total	110	57,49	40,332	3,846	49,87	65,11	3	160
LPBc	CSF	20	4,75	3,892	,870	2,93	6,57	0	10
	CPG	18	81,50	14,484	3,414	74,30	88,70	60	100
	CNC	18	31,39	5,158	1,216	28,82	33,95	25	38
	CNP	18	21,39	8,833	2,082	17,00	25,78	10	33
	PGNC	18	55,28	9,833	2,318	50,39	60,17	40	70
	PGNP	18	26,78	8,434	1,988	22,58	30,97	15	40
	Total	110	36,26	26,702	2,546	31,22	41,31	0	100

**Tabla 4.28.** Descriptivos para las variables LPBi y LPBc.

Efectuamos un análisis de la varianza de un factor para las variables LPBi y LPBc, siendo el factor el grupo experimental que presenta 6 condiciones experimentales diferentes. Los resultados se recogen en las Tablas 4.28 y 4.29, que a su vez reproduce las tablas ANOVA para las 2 variables.

Se deduce de ellas que hay diferencias significativas entre los 6 grupos experimentales para las 2 variables: LPBi ( $F=198,652$ ;  $p<0,0001$ ) y LPBc ( $F=169,708$ ;  $p<0,0001$ ).

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LPBi	Inter-grupos	160502,024	5	32100,405	198,652	,000
	Intra-grupos	16805,467	104	161,591		
	Total	177307,491	109			
LPBc	Inter-grupos	69233,827	5	13846,765	169,708	,000
	Intra-grupos	8485,528	104	81,592		
	Total	77719,355	109			

**Tabla 4.29.** Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para las variables LPBi y LPBc.

Puesto que el análisis detectó diferencias entre los grupos tenía sentido realizar comparaciones múltiples para determinar conjuntos homogéneos de grupos experimentales que compartirían la misma media (ANEXO I).

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 (tabla 4.30 y 4.31).

En el nivel Intermedio de la porción lateral del PB (LPBi), el método de Tukey determinó hasta 5 subconjuntos homogéneos, al igual que el de Scheffé:

- En los extremos de estos subconjuntos destacaron por un lado el grupo CSF y por el otro el grupo CPG.
- En el bloque central quedarían los grupos CNP y CNC a un lado, y los grupos PGNC y PGNP al otro.

		LPBi					
		N	Subconjunto para alfa = .05				
Grupo			1	2	3	4	5
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>	CSF	20	8,90				
	CNP	18		30,83			
	CNC	18			48,61		
	PGNC	18				64,89	
	PGNP	18				66,33	
	CPG	18					130,78
	Sig.			1,000	1,000	1,000	,999
Scheffé <sup>a,b</sup>	CSF	20	8,90				
	CNP	18		30,83			
	CNC	18			48,61		
	PGNC	18				64,89	
	PGNP	18				66,33	
	CPG	18					130,78
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,305.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Tabla 4.30.** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable LPBi.

A nivel Caudal de la porción lateral del PB (LPBc), el método de Tukey determinó de nuevo 5 subconjuntos homogéneos, mientras que el método de Scheffé determinó tan sólo 4 subconjuntos:

- En los extremos volvieron a quedar los grupos CSF y CPG, respectivamente.
- En el bloque central, sin embargo, las diferencias fueron mucho menos acusadas, con tendencia al agrupamiento de los grupos según el estímulo doloroso aplicado, con independencia de si habían recibido o no pregabalina previamente.

**LPBc**

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05					
		1	2	3	4	5	
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>	CSF	20	4,75				
	CNP	18		21,39			
	PGNP	18		26,78	26,78		
	CNC	18			31,39		
	PGNC	18				55,28	
	CPG	18					81,50
	Sig.		1,000	,467	,637	1,000	1,000
Scheffé <sup>a,b</sup>	CSF	20	4,75				
	CNP	18		21,39			
	PGNP	18		26,78			
	CNC	18		31,39			
	PGNC	18			55,28		
	CPG	18				81,50	
	Sig.		1,000	,055	1,000	1,000	

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,305.

b. Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Tabla 4.31.** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable LPBc.

## 9.2.- 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

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.

### 9.2.a.- Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF y CPG.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables LPBi y LPBc, siendo el factor el Grupo Experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 2 grupos experimentales tanto para la variable LPBi ( $F=649.752$ ;  $p<0,0001$ ) como para la LPBc ( $F=521.241$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.32).

En este caso, al incluir sólo 2 grupos experimentales en el análisis, no fue necesario llevar a cabo un estudio de comparaciones múltiples ni determinar subconjuntos homogéneos.

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 (fig. 4.66).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LPBi	CSF	20	8,90	5,210	1,165	6,46	11,34	3	15
	CPG	18	130,78	20,695	4,878	120,49	141,07	103	160
	Total	38	66,63	63,357	10,278	45,81	87,46	3	160
LPBc	CSF	20	4,75	3,892	,870	2,93	6,57	0	10
	CPG	18	81,50	14,484	3,414	74,30	88,70	60	100
	Total	38	41,11	40,155	6,514	27,91	54,30	0	100

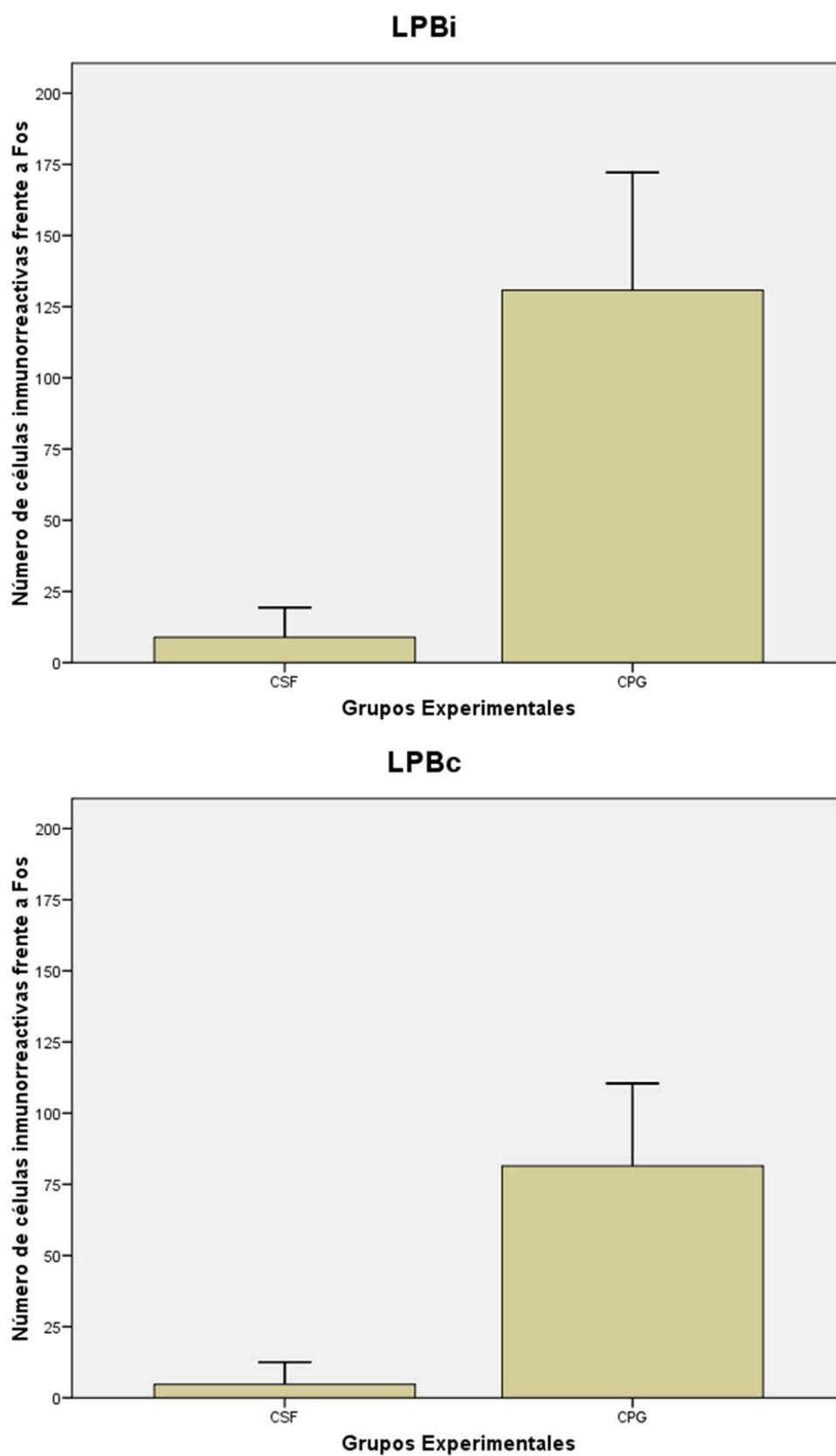
## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LPBi	67,395	1	36	,000
LPBc	41,655	1	36	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LPBi	Inter-grupos	140723,931	1	140723,931	649,752	,000
	Intra-grupos	7796,911	36	216,581		
	Total	148520,842	37			
LPBc	Inter-grupos	55805,329	1	55805,329	521,241	,000
	Intra-grupos	3854,250	36	107,063		
	Total	59659,579	37			

**Tabla 4.32.** Resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.



**Fig. 4.66.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG).

### 9.2.b.- Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la aplicación de un estímulo nociceptivo de diferente naturaleza tendría sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y CNP.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables LPBi y LPBc, 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 LPBi ( $F=99.008$ ;  $p<0,0001$ ) como para la LPBc ( $F=88.751$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.33).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO II) confirmó las diferencias al comparar cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y CNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y CNP, 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 (tabla 4.34).

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 (fig. 4.67).

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LPBi	CSF	20	8,90	5,210	1,165	6,46	11,34	3	15
	CNC	18	48,61	8,521	2,008	44,37	52,85	40	60
	CNP	18	30,83	11,582	2,730	25,07	36,59	16	45
	Total	56	28,71	18,630	2,490	23,73	33,70	3	60
LPBc	CSF	20	4,75	3,892	,870	2,93	6,57	0	10
	CNC	18	31,39	5,158	1,216	28,82	33,95	25	38
	CNP	18	21,39	8,833	2,082	17,00	25,78	10	33
	Total	56	18,66	12,782	1,708	15,24	22,08	0	38

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LPBi	20,998	2	53	,000
LPBc	23,748	2	53	,000

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LPBi	Inter-grupos	15058,851	2	7529,425	99,008	,000
	Intra-grupos	4030,578	53	76,049		
	Total	19089,429	55			
LPBc	Inter-grupos	6920,248	2	3460,124	88,751	,000
	Intra-grupos	2066,306	53	38,987		
	Total	8986,554	55			

**Tabla 4.33.** Resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

### Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

#### LPBi

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>	CSF	20	8,90	
	CNP	18		30,83
	CNC	18		48,61
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a,b</sup>	CSF	20	8,90	
	CNP	18		30,83
	CNC	18		48,61
	Sig.		1,000	1,000

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

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,621.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

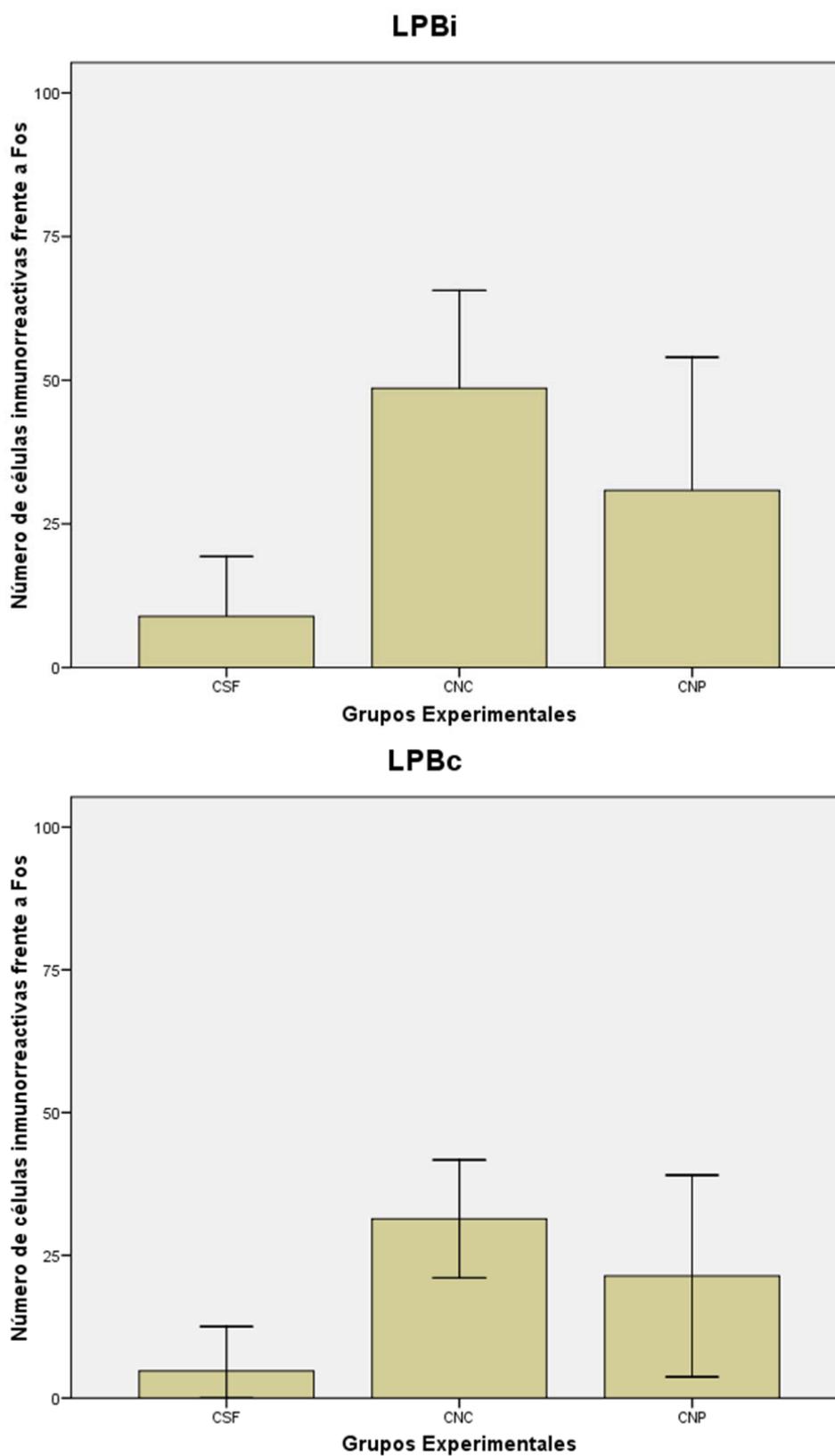
#### LPBc

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>	CSF	20	4,75	
	CNP	18		21,39
	CNC	18		31,39
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a,b</sup>	CSF	20	4,75	
	CNP	18		21,39
	CNC	18		31,39
	Sig.		1,000	1,000

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

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,621.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Tabla 4.34.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.67.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG).

### 9.2.c.- Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB por aplicación de un estímulo nociceptivo (test de la formalina). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y PGNC.

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 LPBi y LPBc, 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 LPBi ( $F=206.598$ ;  $p<0,0001$ ) como para la LPBc ( $F=269.890$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.35).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO III) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y PGNC) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y PGNC, 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 (tabla 4.36).

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 (fig. 4.68).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LPBi	CSF	20	8,90	5,210	1,165	6,46	11,34	3	15
	CNC	18	48,61	8,521	2,008	44,37	52,85	40	60
	PGNC	18	64,89	11,712	2,760	59,06	70,71	50	80
	Total	56	39,66	25,550	3,414	32,82	46,50	3	80
LPBc	CSF	20	4,75	3,892	,870	2,93	6,57	0	10
	CNC	18	31,39	5,158	1,216	28,82	33,95	25	38
	PGNC	18	55,28	9,833	2,318	50,39	60,17	40	70
	Total	56	29,55	22,016	2,942	23,66	35,45	0	70

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LPBi	26,656	2	53	,000
LPBc	17,132	2	53	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LPBi	Inter-grupos	31822,698	2	15911,349	206,598	,000
	Intra-grupos	4081,856	53	77,016		
	Total	35904,554	55			
LPBc	Inter-grupos	24276,200	2	12138,100	269,890	,000
	Intra-grupos	2383,639	53	44,974		
	Total	26659,839	55			

**Tabla 4.35.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## LPBi

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>	CSF	20	8,90	
	CNC	18		48,61
	PGNC	18		64,89
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a,b</sup>	CSF	20	8,90	
	CNC	18		48,61
	PGNC	18		64,89
	Sig.		1,000	1,000

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

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,621.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

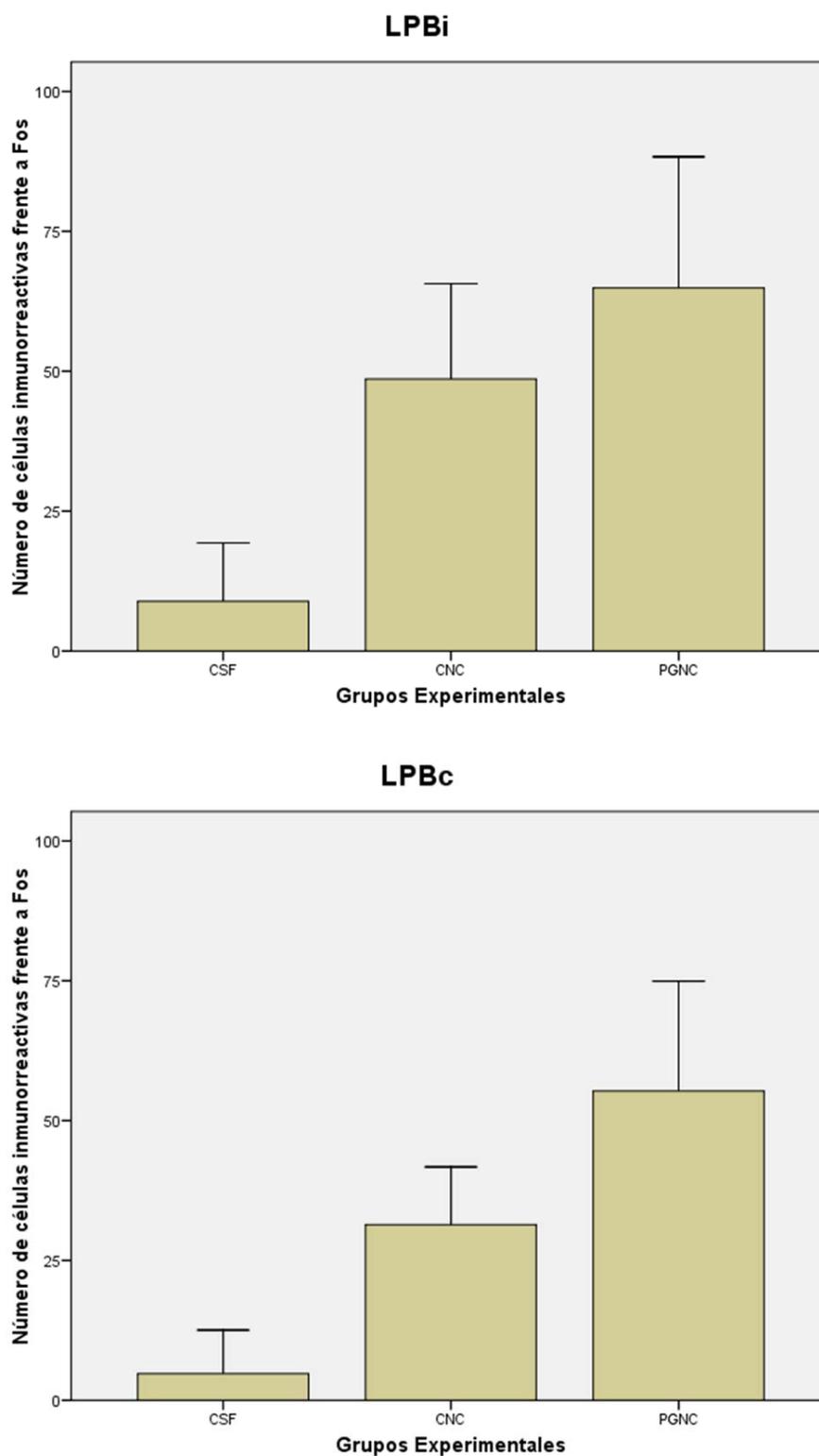
## LPBc

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>	CSF	20	4,75	
	CNC	18		31,39
	PGNC	18		55,28
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a,b</sup>	CSF	20	4,75	
	CNC	18		31,39
	PGNC	18		55,28
	Sig.		1,000	1,000

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

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,621.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Tabla 4.36.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.68.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC).

### 9.2.d.- Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina cada 8 horas durante tendría sobre la expresión de Fos en la porción lateral del PB por aplicación de un estímulo neuropático (constricción crónica del ciático). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNP y PGNP.

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 LPBi y LPBc, 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 LPBi ( $F=140.496$ ;  $p<0,0001$ ) como para la LPBc ( $F=47.563$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.37).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO IV) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNP y PGNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNP y PGNP, 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 (tabla 4.38).

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 (fig. 4.69).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LPBi	CSF	20	8,90	5,210	1,165	6,46	11,34	3	15
	CNP	18	30,83	11,582	2,730	25,07	36,59	16	45
	PGNP	18	66,33	13,638	3,215	59,55	73,12	50	83
	Total	56	34,41	26,128	3,492	27,41	41,41	3	83
LPBc	CSF	20	4,75	3,892	,870	2,93	6,57	0	10
	CNP	18	21,39	8,833	2,082	17,00	25,78	10	33
	PGNP	18	26,78	8,434	1,988	22,58	30,97	15	40
	Total	56	17,18	11,977	1,601	13,97	20,39	0	40

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LPBi	40,814	2	53	,000
LPBc	11,727	2	53	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LPBi	Inter-grupos	31589,254	2	15794,627	140,496	,000
	Intra-grupos	5958,300	53	112,421		
	Total	37547,554	55			
LPBc	Inter-grupos	5067,075	2	2533,538	47,563	,000
	Intra-grupos	2823,139	53	53,267		
	Total	7890,214	55			

**Tabla 4.37.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## LPBi

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>	CSF	20	8,90	
	CNP	18		30,83
	PGNP	18		66,33
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a,b</sup>	CSF	20	8,90	
	CNP	18		30,83
	PGNP	18		66,33
	Sig.		1,000	1,000

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

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,621.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

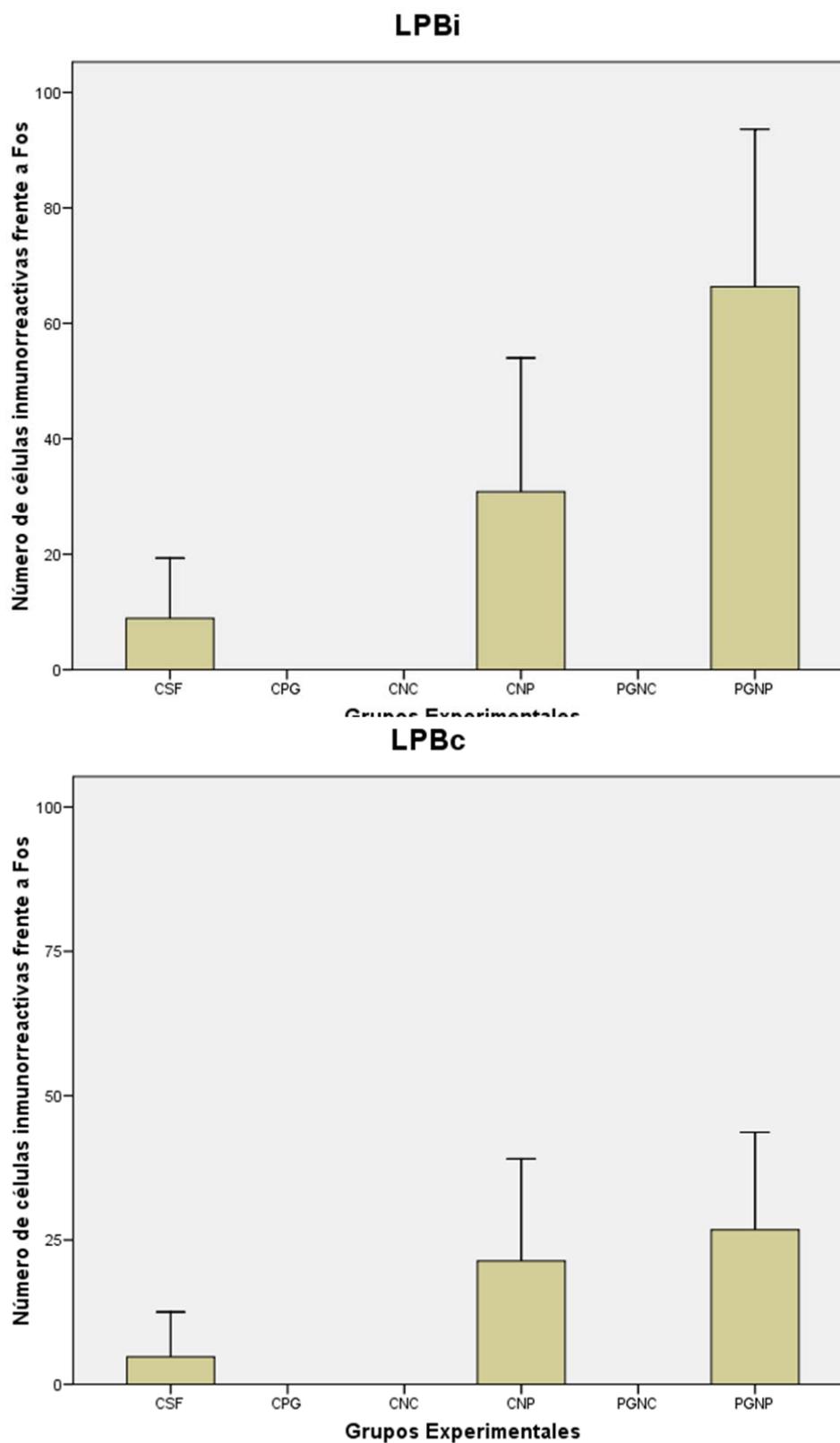
## LPBc

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey <sup>a,b</sup>	CSF	20	4,75
	CNP	18	21,39
	PGNP	18	26,78
	Sig.		1,000
Scheffé <sup>a,b</sup>	CSF	20	4,75
	CNP	18	21,39
	PGNP	18	26,78
	Sig.		1,000

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

- Usa el tamaño muestral de la media armónica = 18,621.
- Los tamaños de los grupos no son iguales. Se utilizará la media armónica de los tamaños de los grupos. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

**Tabla 4.38.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.69.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP).

## 9.2.e.- ANEXO I: Análisis Global

Comparaciones múltiples							Intervalo de confianza al 95%			
Variable dependiente		(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Límite inferior	Límite superior		
LPIB	HSD de Tukey	CSF	CPG	-121,878*	4,130	,000	-133,87	-109,89		
			CNC	-39,711*	4,130	,000	-51,70	-27,72		
			CNP	-21,933*	4,130	,000	-33,92	-9,94		
			PGNC	-55,989*	4,130	,000	-67,98	-44,00		
			PGNP	-57,433*	4,130	,000	-69,42	-45,44		
		CPG	CSF	121,878*	4,130	,000	109,89	133,87		
			CNC	82,167*	4,237	,000	69,86	94,47		
			CNP	99,944*	4,237	,000	87,64	112,25		
			PGNC	85,889*	4,237	,000	53,59	78,19		
			PGNP	64,444*	4,237	,000	52,14	76,75		
		CNC	CSF	39,711*	4,130	,000	27,72	51,70		
			CPG	-82,167*	4,237	,000	-94,47	-69,86		
			CNP	17,778*	4,237	,001	5,47	30,08		
			PGNC	-16,278*	4,237	,003	-28,58	-3,97		
			PGNP	-17,722*	4,237	,001	-30,03	-5,42		
		CNP	CSF	21,933*	4,130	,000	9,94	33,92		
			CPG	-99,944*	4,237	,000	-112,25	-87,64		
			CNC	-17,778*	4,237	,001	-30,08	-5,47		
			PGNC	-34,056*	4,237	,000	-46,36	-21,75		
			PGNP	-35,500*	4,237	,000	-47,80	-23,20		
		PGNC	CSF	55,989*	4,130	,000	44,00	67,98		
			CPG	-65,889*	4,237	,000	-78,19	-53,59		
			CNC	16,278*	4,237	,003	3,97	28,58		
			CNP	34,056*	4,237	,000	21,75	46,36		
			PGNP	-1,444	4,237	,999	-13,75	10,86		
		PGNP	CSF	57,433*	4,130	,000	45,44	69,42		
			CPG	-64,444*	4,237	,000	-76,75	-52,14		
			CNC	17,722*	4,237	,001	5,42	30,03		
			CNP	35,500*	4,237	,000	23,20	47,80		
			PGNC	1,444	4,237	,999	-10,86	13,75		
		Scheffé	Scheffé	CSF	CPG	-121,878*	4,130	,000	-135,89	-107,87
					CNC	-39,711*	4,130	,000	-53,72	-25,70
					CNP	-21,933*	4,130	,000	-35,94	-7,92
					PGNC	-55,989*	4,130	,000	-70,00	-41,98
					PGNP	-57,433*	4,130	,000	-71,44	-43,42
				CPG	CSF	121,878*	4,130	,000	107,87	135,89
					CNC	82,167*	4,237	,000	67,79	96,54
					CNP	99,944*	4,237	,000	85,57	114,32
					PGNC	85,889*	4,237	,000	51,51	80,26
					PGNP	64,444*	4,237	,000	50,07	78,82
				CNC	CSF	39,711*	4,130	,000	25,70	53,72
					CPG	-82,167*	4,237	,000	-96,54	-67,79
					CNP	17,778*	4,237	,006	3,40	32,15
					PGNC	-16,278*	4,237	,016	-30,65	-1,90
					PGNP	-17,722*	4,237	,006	-32,10	-3,35
				CNP	CSF	21,933*	4,130	,000	7,92	35,94
					CPG	-99,944*	4,237	,000	-114,32	-85,57
					CNC	-17,778*	4,237	,006	-32,15	-3,40
PGNC	-34,056*				4,237	,000	-48,43	-19,68		
PGNP	-35,500*				4,237	,000	-49,87	-21,13		
PGNC	CSF			55,989*	4,130	,000	41,98	70,00		
	CPG			-65,889*	4,237	,000	-80,26	-51,51		
	CNC			16,278*	4,237	,016	1,90	30,65		
	CNP			34,056*	4,237	,000	19,68	48,43		
	PGNP			-1,444	4,237	1,000	-15,82	12,93		
PGNP	CSF			57,433*	4,130	,000	43,42	71,44		
	CPG			-64,444*	4,237	,000	-78,82	-50,07		
	CNC			17,722*	4,237	,006	3,35	32,10		
	CNP			35,500*	4,237	,000	21,13	49,87		
	PGNC			1,444	4,237	1,000	-12,93	15,82		

LPBc	HSD de Tukey	CSF	CPG	-76,750*	2,935	,000	-85,27	-68,23		
			CNC	-26,639*	2,935	,000	-35,16	-18,12		
			CNP	-16,639*	2,935	,000	-25,16	-8,12		
			PGNC	-50,528*	2,935	,000	-59,05	-42,01		
			PGNP	-22,028*	2,935	,000	-30,55	-13,51		
		CPG	CSF	76,750*	2,935	,000	68,23	85,27		
			CNC	50,111*	3,011	,000	41,37	58,85		
			CNP	60,111*	3,011	,000	51,37	68,85		
			PGNC	26,222*	3,011	,000	17,48	34,96		
			PGNP	54,722*	3,011	,000	45,98	63,46		
		CNC	CSF	26,639*	2,935	,000	18,12	35,16		
			CPG	-50,111*	3,011	,000	-58,85	-41,37		
			CNP	10,000*	3,011	,015	1,26	18,74		
			PGNC	-23,889*	3,011	,000	-32,63	-15,15		
			PGNP	4,611	3,011	,645	-4,13	13,35		
		CNP	CSF	16,639*	2,935	,000	8,12	25,16		
			CPG	-60,111*	3,011	,000	-68,85	-51,37		
			CNC	-10,000*	3,011	,015	-18,74	-1,26		
			PGNC	-33,889*	3,011	,000	-42,63	-25,15		
			PGNP	-5,389	3,011	,477	-14,13	3,35		
		PGNC	CSF	50,528*	2,935	,000	42,01	59,05		
			CPG	-26,222*	3,011	,000	-34,96	-17,48		
			CNC	23,889*	3,011	,000	15,15	32,63		
			CNP	33,889*	3,011	,000	25,15	42,63		
			PGNP	28,500*	3,011	,000	19,76	37,24		
		PGNP	CSF	22,028*	2,935	,000	13,51	30,55		
			CPG	-54,722*	3,011	,000	-63,46	-45,98		
			CNC	-4,611	3,011	,645	-13,35	4,13		
			CNP	5,389	3,011	,477	-3,35	14,13		
			PGNC	-28,500*	3,011	,000	-37,24	-19,76		
		Scheffé	Scheffé	CSF	CPG	-76,750*	2,935	,000	-86,71	-66,79
					CNC	-26,639*	2,935	,000	-36,59	-16,68
					CNP	-16,639*	2,935	,000	-26,59	-6,68
					PGNC	-50,528*	2,935	,000	-60,48	-40,57
					PGNP	-22,028*	2,935	,000	-31,98	-12,07
				CPG	CSF	76,750*	2,935	,000	66,79	86,71
					CNC	50,111*	3,011	,000	39,90	60,33
					CNP	60,111*	3,011	,000	49,90	70,33
					PGNC	26,222*	3,011	,000	16,01	36,44
					PGNP	54,722*	3,011	,000	44,51	64,94
				CNC	CSF	26,639*	2,935	,000	16,68	36,59
					CPG	-50,111*	3,011	,000	-60,33	-39,90
					CNP	10,000	3,011	,059	-,21	20,21
					PGNC	-23,889*	3,011	,000	-34,10	-13,67
					PGNP	4,611	3,011	,799	-5,60	14,83
				CNP	CSF	16,639*	2,935	,000	6,68	26,59
					CPG	-60,111*	3,011	,000	-70,33	-49,90
					CNC	-10,000	3,011	,059	-20,21	-,21
PGNC	-33,889*				3,011	,000	-44,10	-23,67		
PGNP	-5,389				3,011	,669	-15,60	4,83		
PGNC	CSF			50,528*	2,935	,000	40,57	60,48		
	CPG			-26,222*	3,011	,000	-36,44	-16,01		
	CNC			23,889*	3,011	,000	13,67	34,10		
	CNP			33,889*	3,011	,000	23,67	44,10		
	PGNP			28,500*	3,011	,000	18,29	38,71		
PGNP	CSF			22,028*	2,935	,000	12,07	31,98		
	CPG			-54,722*	3,011	,000	-64,94	-44,51		
	CNC			-4,611	3,011	,799	-14,83	5,60		
	CNP			5,389	3,011	,669	-4,83	15,60		
	PGNC			-28,500*	3,011	,000	-38,71	-18,29		

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

## 9.2.f.- ANEXO II: 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	
LPBi	HSD de Tukey	CSF	CNC	-39,711*	2,833	,000	-46,54	-32,88
		CNC	CNP	-21,933*	2,833	,000	-28,77	-15,10
		CNC	CSF	39,711*	2,833	,000	32,88	46,54
		CNP	CNP	17,778*	2,907	,000	10,77	24,79
		CNP	CSF	21,933*	2,833	,000	15,10	28,77
		CNC	CNC	-17,778*	2,907	,000	-24,79	-10,77
	Scheffé	CSF	CNC	-39,711*	2,833	,000	-46,85	-32,58
		CNC	CNP	-21,933*	2,833	,000	-29,07	-14,80
		CNC	CSF	39,711*	2,833	,000	32,58	46,85
		CNP	CNP	17,778*	2,907	,000	10,46	25,10
		CNP	CSF	21,933*	2,833	,000	14,80	29,07
		CNC	CNC	17,778*	2,907	,000	25,10	10,46
LPBc	HSD de Tukey	CSF	CNC	-26,639*	2,029	,000	-31,53	-21,75
		CNC	CNP	-16,639*	2,029	,000	-21,53	-11,75
		CNC	CSF	26,639*	2,029	,000	21,75	31,53
		CNP	CNP	10,000*	2,081	,000	4,98	15,02
		CNP	CSF	16,639*	2,029	,000	11,75	21,53
		CNC	CNC	-10,000*	2,081	,000	-15,02	-4,98
	Scheffé	CSF	CNC	-26,639*	2,029	,000	-31,75	-21,53
		CNC	CNP	-16,639*	2,029	,000	-21,75	-11,53
		CNC	CSF	26,639*	2,029	,000	21,53	31,75
		CNP	CNP	10,000*	2,081	,000	4,76	15,24
		CNP	CSF	16,639*	2,029	,000	11,53	21,75
		CNC	CNC	-10,000*	2,081	,000	-15,24	-4,76

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

9.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo

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	
LPBi	HSD de Tukey	CSF	CNC	-39,711*	2,851	,000	-46,59	-32,84
			PGNC	-55,989*	2,851	,000	-62,86	-49,11
		CNC	CSF	39,711*	2,851	,000	32,84	46,59
			PGNC	-16,278*	2,925	,000	-23,33	-9,22
		PGNC	CSF	55,989*	2,851	,000	49,11	62,86
			CNC	16,278*	2,925	,000	9,22	23,33
	Scheffé	CSF	CNC	-39,711*	2,851	,000	-46,89	-32,53
			PGNC	-55,989*	2,851	,000	-63,17	-48,81
		CNC	CSF	39,711*	2,851	,000	32,53	46,89
			PGNC	-16,278*	2,925	,000	-23,65	-3,91
		PGNC	CSF	55,989*	2,851	,000	48,81	63,17
			CNC	16,278*	2,925	,000	8,91	23,65
LPBc	HSD de Tukey	CSF	CNC	-26,639*	2,179	,000	-31,89	-21,39
			PGNC	-50,528*	2,179	,000	-55,78	-45,27
		CNC	CSF	26,639*	2,179	,000	21,39	31,89
			PGNC	-23,889*	2,235	,000	-29,28	-18,50
		PGNC	CSF	50,528*	2,179	,000	45,27	55,78
			CNC	23,889*	2,235	,000	18,50	29,28
	Scheffé	CSF	CNC	-26,639*	2,179	,000	-32,13	-21,15
			PGNC	-50,528*	2,179	,000	-56,02	-45,04
		CNC	CSF	26,639*	2,179	,000	21,15	32,13
			PGNC	-23,889*	2,235	,000	-29,52	-18,26
		PGNC	CSF	50,528*	2,179	,000	45,04	56,02
			CNC	23,889*	2,235	,000	18,26	29,52

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

## 9.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático

Comparaciones múltiples

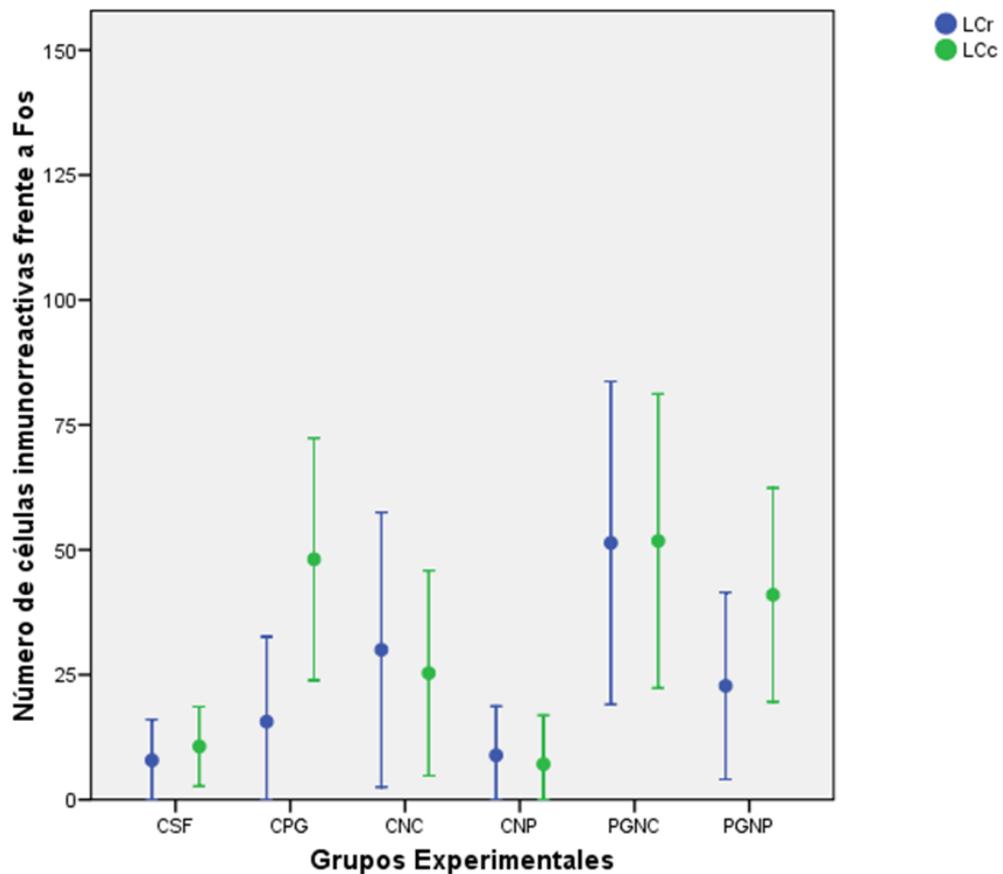
Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
LPDi	HSD de Tukey	CSF	CNP	-21,933*	3,445	,000	-30,24	-13,63
			PGNP	-57,433*	3,445	,000	-65,74	-49,13
		CNP	CSF	21,933*	3,415	,000	13,63	30,21
			PGNP	-35,500*	3,534	,000	-44,02	-26,98
		PGNP	C.SF	57,433*	3,445	,000	49,13	65,74
			CNP	35,500*	3,534	,000	26,98	44,02
	Scheffé	CSF	CNP	-21,933*	3,445	,000	-30,61	-13,26
			PGNP	-57,433*	3,445	,000	-66,11	-48,76
		CNP	CSF	21,933*	3,445	,000	13,26	30,61
			PGNP	-35,500*	3,534	,000	-44,40	-26,60
		PGNP	CSF	57,433*	3,445	,000	48,76	66,11
			CNP	35,500*	3,534	,000	26,60	44,40
LPBc	HSD de Tukey	CSF	CNP	-16,639*	2,371	,000	-22,36	-10,92
			PGNP	-22,028*	2,371	,000	-27,75	-16,31
		CNP	CSF	16,639*	2,371	,000	10,92	22,36
			PGNP	-5,389	2,433	,078	-11,26	,48
		PGNP	CSF	22,028*	2,371	,000	16,31	27,75
			CNP	5,389	2,433	,078	-,48	11,26
	Scheffé	CSF	CNP	-16,639*	2,371	,000	-22,61	-10,67
			PGNP	-22,028*	2,371	,000	-28,00	-16,06
		CNP	CSF	16,639*	2,371	,000	10,67	22,61
			PGNP	-5,389	2,433	,096	-11,52	,74
		PGNP	CSF	22,028*	2,371	,000	16,06	28,00
			CNP	5,389	2,433	,096	-,74	11,52

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

## 10.- Estudio Estadístico del Locus Coeruleus.

### 10.1.- Análisis Global

En primer lugar se presentan la descriptiva (media, número de casos y desviación típica) para las variables originales Niveles Rostral (LCr) y Caudal (LCc). 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 6 grupos (fig. 4.70).



**Fig. 4.70.** Gráfica de las medias estimadas para cada variable dentro de cada uno de los 6 grupos experimentales.

		Descriptivos							
		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LCr	CSF	18	7,89	4,071	,960	5,86	9,91	3	13
	CPG	18	15,61	8,500	2,003	11,38	19,84	5	25
	CNC	18	30,00	13,737	3,238	23,17	36,83	10	50
	CNP	18	8,89	4,910	1,157	6,45	11,33	3	15
	PGNC	18	51,39	16,158	3,808	43,35	59,42	30	70
	PGNP	18	22,78	9,347	2,203	18,13	27,43	10	35
	Total	108	22,76	18,115	1,743	19,30	26,21	3	70
LCc	CSF	18	10,67	3,985	,939	8,68	12,65	5	15
	CPG	18	48,11	12,117	2,856	42,09	54,14	32	63
	CNC	18	25,33	10,261	2,419	20,23	30,44	12	38
	CNP	18	7,11	4,898	1,154	4,68	9,55	1	13
	PGNC	18	51,78	14,727	3,471	44,45	59,10	30	69
	PGNP	18	41,00	10,705	2,523	35,68	46,32	25	55
	Total	108	30,67	20,214	1,945	26,81	34,52	1	69

**Tabla 4.39.** Descriptivos para las variables LCr y LCc.

Efectuamos un análisis de la varianza de un factor para las variables LCr y LCc, siendo el factor el grupo experimental que presenta 6 condiciones experimentales diferentes. Los resultados se recogen en las Tablas 4.39 y 4.40, que a su vez reproduce las tablas ANOVA para las 2 variables.

Se deduce de ellas que hay diferencias significativas entre los 6 grupos experimentales para las 2 variables: LCr ( $F=44,415$ ;  $p<0,0001$ ) y LCc ( $F=63,751$ ;  $p<0,0001$ ).

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LCr	Inter-grupos	24060,519	5	4812,104	44,415	,000
	Intra-grupos	11051,222	102	108,345		
	Total	35111,741	107			
LCc	Inter-grupos	33121,333	5	6624,267	63,751	,000
	Intra-grupos	10598,667	102	103,908		
	Total	43720,000	107			

**Tabla 4.40.** Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para las variables LCr y LCc.

Puesto que el análisis detectó diferencias entre los grupos tenía sentido realizar comparaciones múltiples para determinar conjuntos homogéneos de grupos experimentales que compartirían la misma media (ANEXO I).

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 (tabla 4.41 y 4.42).

En el nivel Rostral del Locus Coeruleus (LCr), tanto el método de Tukey como el de Scheffé determinaron hasta 4 subconjuntos homogéneos:

- En los extremos de estos subconjuntos destacaron por un lado el grupo CSF y el CNP y por el otro los grupos que recibieron estímulo doloroso nociceptivo (CNC y PGNC).
- En el centro quedarían los grupos CPG y PGNP.

		LCr				
		N	Subconjunto para alfa = .05			
Grupo			1	2	3	4
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	7,89			
	CNP	18	8,89			
	CPG	18	15,61	15,61		
	PGNP	18		22,78	22,78	
	CNC	18			30,00	
	PGNC	18				51,39
	Sig.			,235	,314	,305
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	7,89			
	CNP	18	8,89			
	CPG	18	15,61	15,61		
	PGNP	18		22,78	22,78	
	CNC	18			30,00	
	PGNC	18				51,39
	Sig.			,427	,515	,506

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

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

**Tabla 4.41.** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable LCr.

A nivel Caudal del Locus Coeruleus (LCc), el método de Tukey determinó de nuevo 4 subconjuntos homogéneos, mientras que el de Scheffé determinó tan sólo 3:

- En los extremos quedaron en esta ocasión los grupos CSF y CNP por un extremo y los grupos que recibieron Pregabalina (CPG, PGNC y PGNP) por el otro.
- En el bloque central se situó el grupo CNC.

		LCc				
		N	Subconjunto para alfa = .05			
Grupo			1	2	3	4
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CNP	18	7,11			
	CSF	18	10,67			
	CNC	18		25,33		
	PGNP	18			41,00	
	CPG	18			48,11	48,11
	PGNC	18				51,78
	Sig.			,901	1,000	,299
Scheffé	CNP	18	7,11			
	CSF	18	10,67			
	CNC	18		25,33		
	PGNP	18			41,00	
	CPG	18			48,11	
	PGNC	18				51,78
	Sig.			,954	1,000	,083

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

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

**Tabla 4.42.** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable LCc.

## 10.2.- 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.

### 10.2.a.- Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en el Locus Coeruleus. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF y CPG.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables LCr y LCc, siendo el factor el Grupo Experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 2 grupos experimentales tanto para la variable LCr ( $F=12.084$ ;  $p<0,001$ ) como para la LCc ( $F=155.124$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.43).

En este caso, al incluir sólo 2 grupos experimentales en el análisis, no fue necesario llevar a cabo un estudio de comparaciones múltiples ni determinar subconjuntos homogéneos.

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 (fig. 4.71).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LCr	CSF	18	7,89	4,071	,960	5,86	9,91	3	13
	CPG	18	15,61	8,500	2,003	11,38	19,84	5	25
	Total	36	11,75	7,647	1,275	9,16	14,34	3	25
LCc	CSF	18	10,67	3,985	,939	8,68	12,65	5	15
	CPG	18	48,11	12,117	2,856	42,09	54,14	32	63
	Total	36	29,39	20,966	3,494	22,30	36,48	5	63

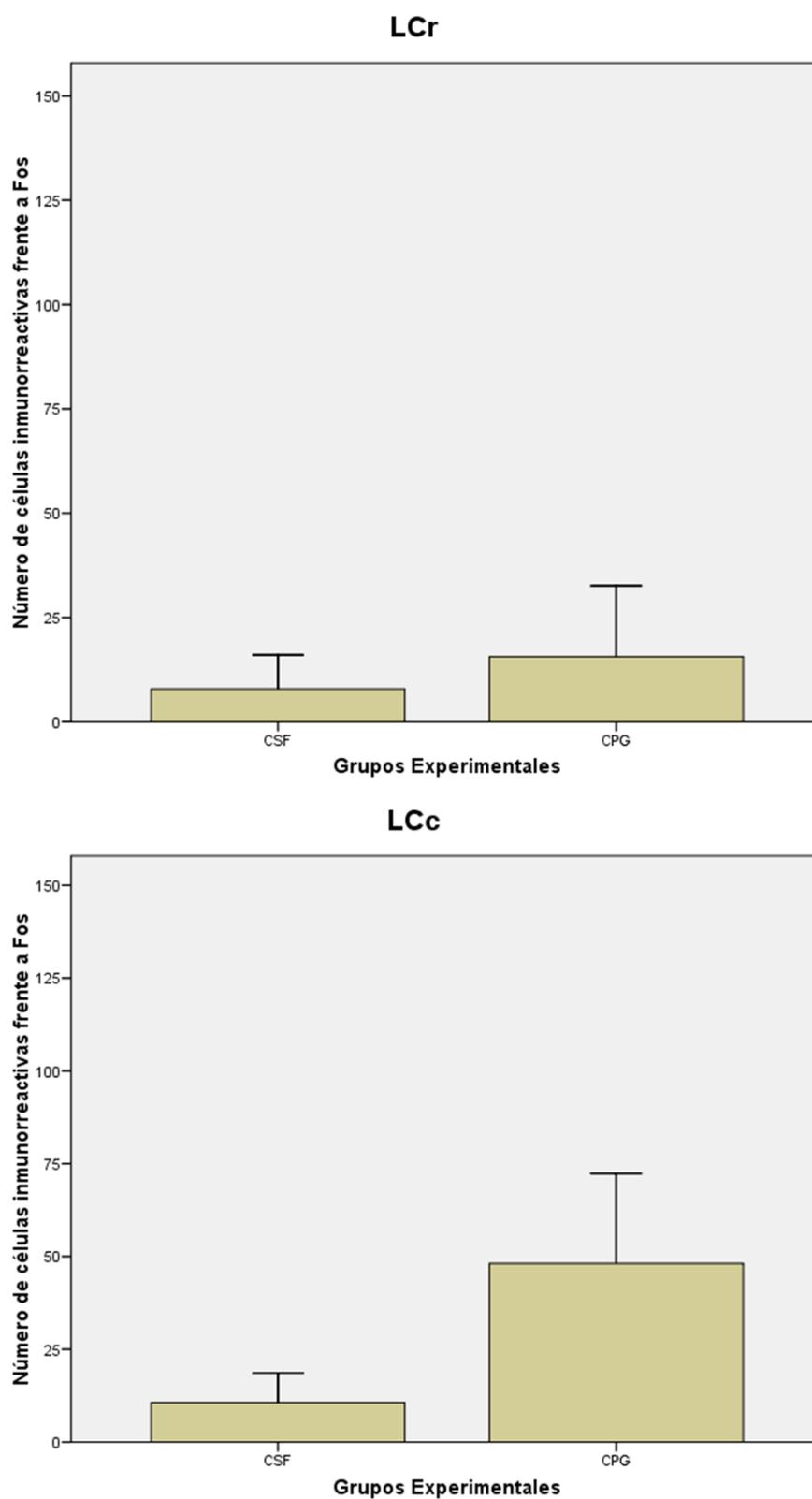
## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LCr	51,788	1	34	,000
LCc	36,176	1	34	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LCr	Inter-grupos	536,694	1	536,694	12,084	,001
	Intra-grupos	1510,056	34	44,413		
	Total	2046,750	35			
LCc	Inter-grupos	12618,778	1	12618,778	155,124	,000
	Intra-grupos	2765,778	34	81,346		
	Total	15384,556	35			

**Tabla 4.43.** Resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.



**Fig. 4.71.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG).

### 10.2.b.- Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la aplicación de un estímulo nociceptivo de diferente naturaleza tendría sobre la expresión de Fos en el Locus Coeruleus. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y CNP.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables LCr y LCc, 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 LCr ( $F=36.708$ ;  $p<0,0001$ ) como para la LCc ( $F=34.707$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.44).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO II) confirmó las diferencias al comparar cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y CNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y CNP, 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 (tabla 4.45).

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 (fig. 4.72).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
LCr	CSF	18	7,89	4,071	,960	5,86	9,91	3	13
	CNC	18	30,00	13,737	3,238	23,17	36,83	10	50
	CNP	18	8,89	4,910	1,157	6,45	11,33	3	15
	Total	54	15,59	13,397	1,823	11,94	19,25	3	50
LCc	CSF	18	10,67	3,985	,939	8,68	12,65	5	15
	CNC	18	25,33	10,261	2,419	20,23	30,44	12	38
	CNP	18	7,11	4,898	1,154	4,68	9,55	1	13
	Total	54	14,37	10,485	1,427	11,51	17,23	1	38

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LCr	34,538	2	51	,000
LCc	41,987	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LCr	Inter-grupos	5613,481	2	2806,741	36,708	,000
	Intra-grupos	3899,556	51	76,462		
	Total	9513,037	53			
LCc	Inter-grupos	3358,815	2	1679,407	34,707	,000
	Intra-grupos	2467,778	51	48,388		
	Total	5826,593	53			

**Tabla 4.44.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## LCr

Grupo		N	Subconjunto para alfa = .05	
			1	2
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	7,89	
	CNP	10	8,89	
	CNC	18		30,00
	Sig.		,937	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	7,89	
	CNP	18	8,89	
	CNC	18		30,00
	Sig.		,943	1,000

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

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

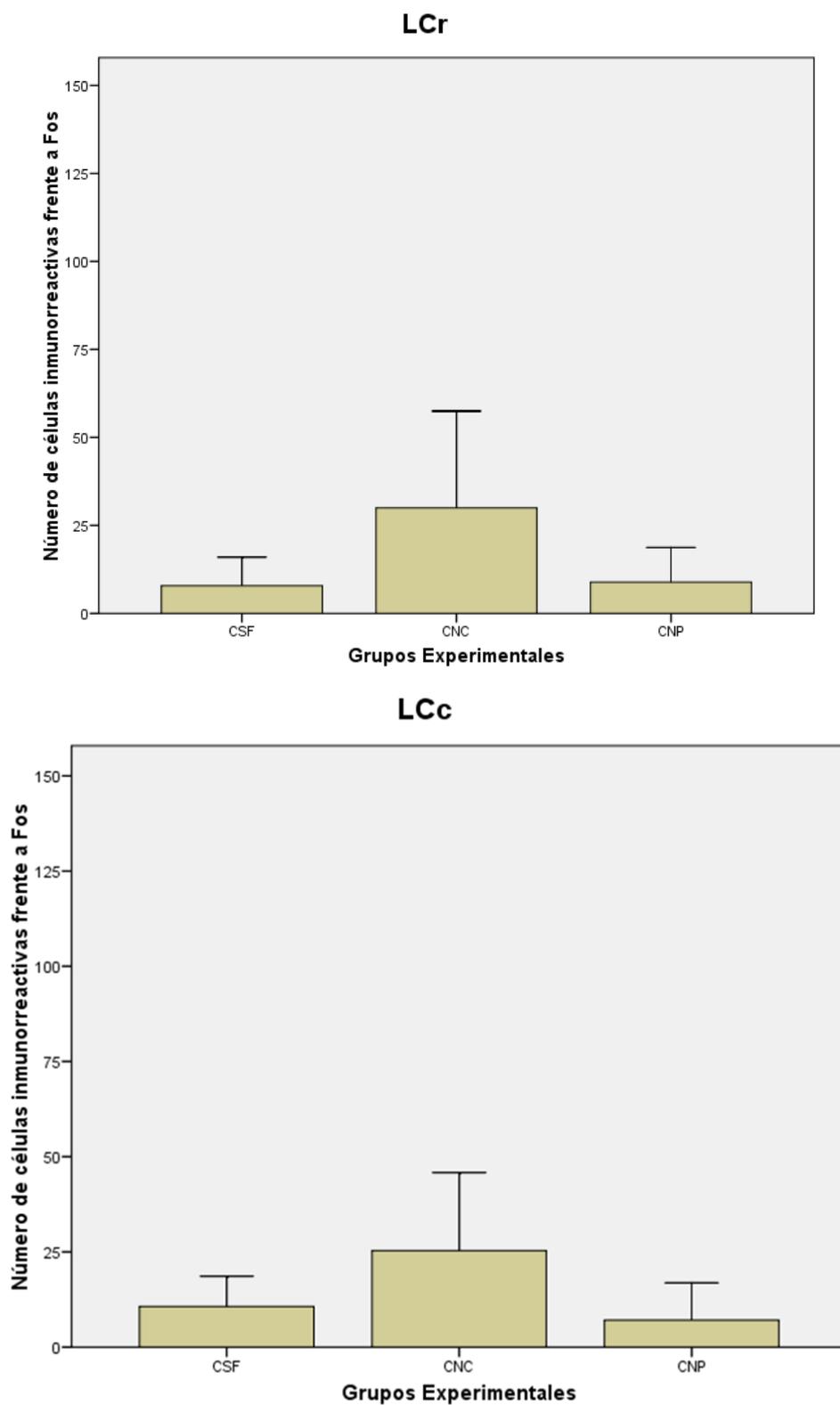
## LCc

Grupo		N	Subconjunto para alfa = .05	
			1	2
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CNP	18	7,11	
	CSF	18	10,67	
	CNC	18		25,33
	Sig.		,284	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CNP	18	7,11	
	CSF	18	10,67	
	CNC	10		25,33
	Sig.		,317	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 4.45.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.72.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP).

### 10.2.c.- Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en el Locus Coeruleus por aplicación de un estímulo nociceptivo (test de la formalina). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y PGNC.

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 LCr y LCc, 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 LCr ( $F=191.207$ ;  $p<0,0001$ ) como para la LCc ( $F=254.619$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.46).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO III) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y PGNC) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y PGNC, 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 (tabla 4.47).

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 (fig. 4.73).

## Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
LCr	CSF	18	7,89	4,071	,960	5,86	9,91	3	13
	CNC	18	30,00	13,737	3,238	23,17	36,83	10	50
	PGNC	18	51,39	16,158	3,808	43,35	59,42	30	70
	Total	54	29,76	21,701	2,953	23,84	35,68	3	70
LCc	CSF	18	10,67	3,985	,939	8,68	12,65	5	15
	CNC	18	25,33	10,261	2,419	20,23	30,44	12	38
	PGNC	18	51,78	14,727	3,471	44,45	59,10	30	69
	Total	54	29,26	20,082	2,733	23,78	34,74	5	69

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LCr	32,344	2	51	,000
LCc	25,212	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LCr	Inter-grupos	17031,815	2	8515,907	54,782	,000
	Intra-grupos	7928,056	51	155,452		
	Total	24959,870	53			
LCc	Inter-grupos	15627,259	2	7813,630	69,338	,000
	Intra-grupos	5747,111	51	112,688		
	Total	21374,370	53			

**Tabla 4.46.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## LCr

Grupo		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	7,89		
	CNC	18		30,00	
	PGNC	18			51,39
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Scheffé	CSF	18	7,89		
	CNC	18		30,00	
	PGNC	18			51,39
	Sig.		1,000	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.

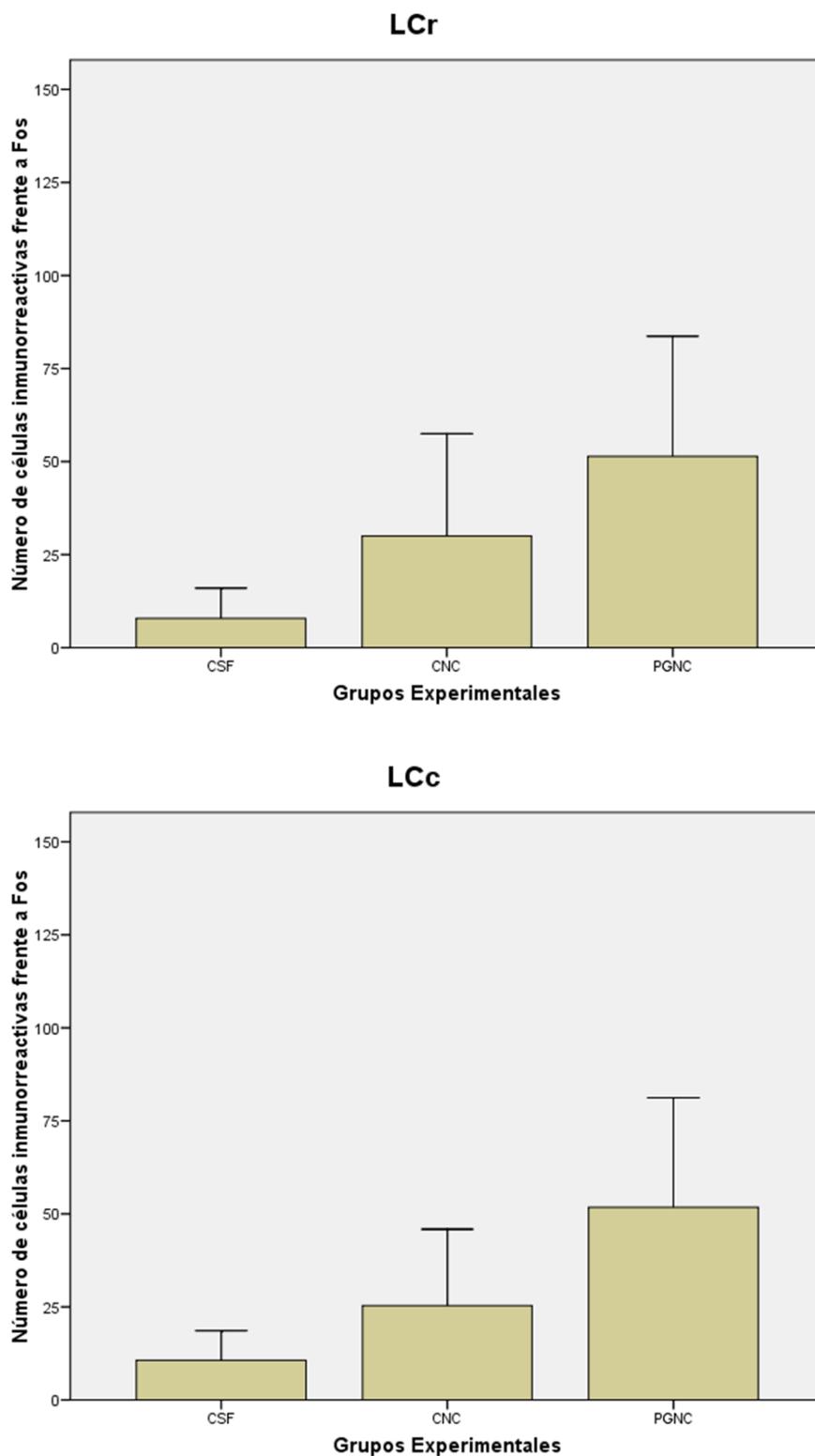
## LCc

Grupo		N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	10,67		
	CNC	18		25,33	
	PGNC	18			51,78
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Scheffé	CSF	18	10,67		
	CNC	18		25,33	
	PGNC	18			51,78
	Sig.		1,000	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 4.47.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.73.-** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC).

#### 10.2.d.- Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de pregabalina cada 8 horas durante tendría sobre la expresión de Fos en el Locus Coeruleus por aplicación de un estímulo neuropático (constricción crónica del ciático). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNP y PGNP.

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 LCr y LCc, 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 LCr ( $F=29.212$ ;  $p<0,0001$ ) como para la LCc ( $F=121.269$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.48).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO IV) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNP y PGNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNP y PGNP, 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 (tabla 4.49).

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 (tabla 4.74).

## Descriptivos

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
LCr	CSF	18	7,89	4,071	,960	5,86	9,91	3	13
	CNP	18	8,89	4,910	1,157	6,45	11,33	3	15
	PGNP	18	22,78	9,347	2,203	18,13	27,43	10	35
	Total	54	13,19	9,387	1,277	10,62	15,75	3	35
LCc	CSF	18	10,67	3,985	,939	8,68	12,65	5	15
	CNP	18	7,11	4,898	1,154	4,68	9,55	1	13
	PGNP	18	41,00	10,705	2,523	35,68	46,32	25	55
	Total	54	19,59	16,886	2,298	14,98	24,20	1	55

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LCr	26,566	2	51	,000
LCc	24,793	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LCr	Inter-grupos	2493,481	2	1246,741	29,212	,000
	Intra-grupos	2176,667	51	42,680		
	Total	4670,148	53			
LCc	Inter-grupos	12487,259	2	6243,630	121,269	,000
	Intra-grupos	2625,778	51	51,486		
	Total	15113,037	53			

**Tabla 4.48.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

LCr

Grupo		N	Subconjunto para alfa = .05	
			1	2
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	7,89	
	CNP	18	8,89	
	PGNP	18		22,78
	Sig.		,891	1,000
Scheffé	CSF	18	7,89	
	CNP	18	8,89	
	PGNP	18		22,78
	Sig.		,900	1,000

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

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

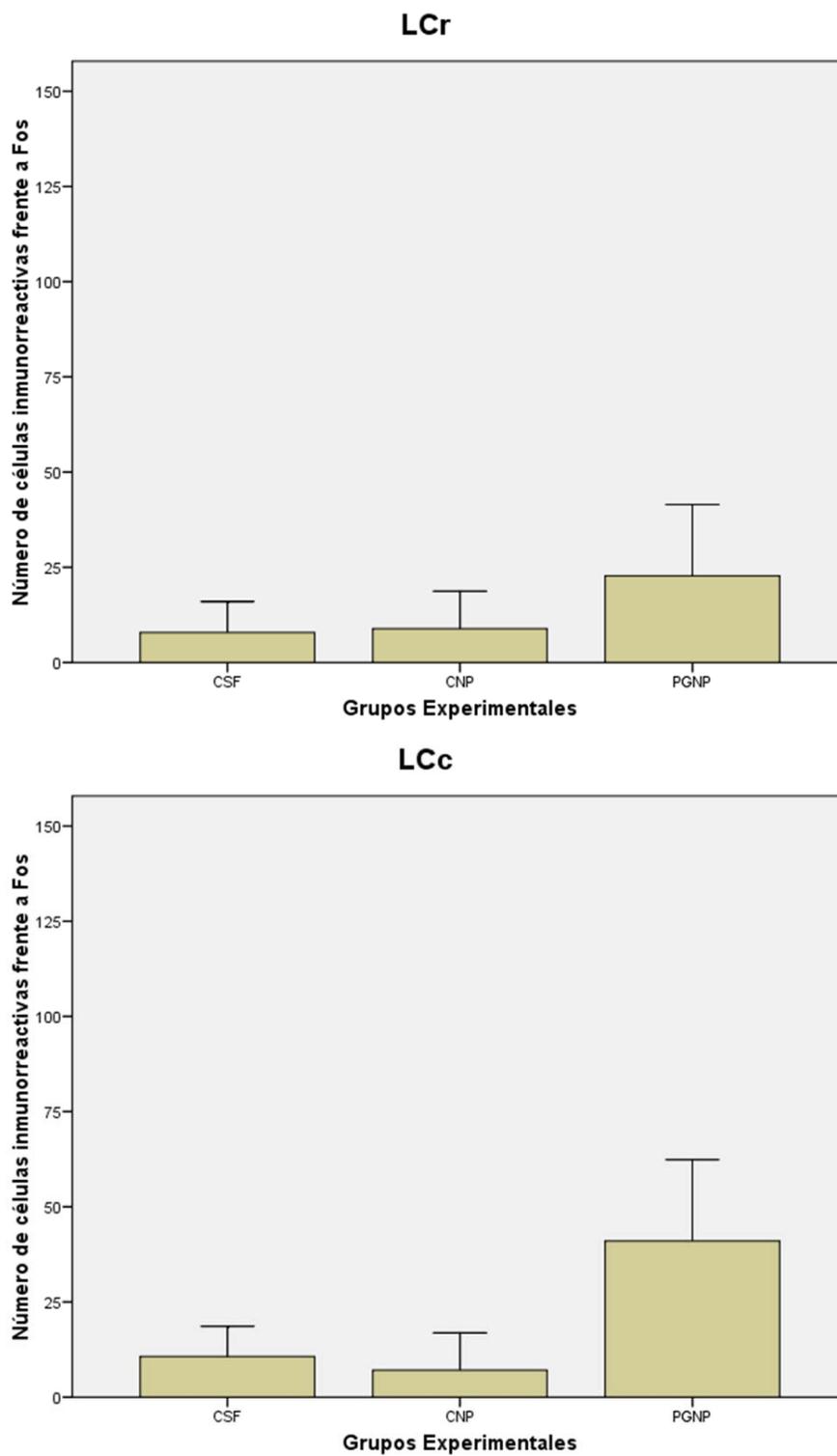
LCc

Grupo		N	Subconjunto para alfa = .05	
			1	2
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CNP	10	7,11	
	CSF	18	10,67	
	PGNP	18		41,00
	Sig.		,306	1,000
Scheffé	CNP	18	7,11	
	CSF	18	10,67	
	PGNP	18		41,00
	Sig.		,339	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 4.49.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.74.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP).

10.2.e.- ANEXO I: Análisis Global

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		
I Cr	HSD de Tukey	CSF	CPG	-7,722	3,470	,235	-17,80	2,36	
			CNC	-22,111*	3,470	,000	-32,19	-12,03	
			CNF	-1,000	3,470	1,000	-11,08	9,08	
			PGNC	-43,500*	3,470	,000	-53,58	-33,42	
			PGNP	-14,889*	3,470	,001	-24,97	-4,81	
		CPG	CSF	7,722	3,470	,235	-2,36	17,80	
			CNC	-14,389*	3,470	,001	-24,47	-4,31	
			CNF	6,722	3,470	,386	-3,36	16,80	
			PGNC	-35,778*	3,470	,000	-45,86	-25,70	
			PGNP	-7,167	3,470	,314	-17,24	2,91	
		CNC	CSF	22,111*	3,470	,000	12,03	32,19	
			CPG	14,389*	3,470	,001	4,31	24,47	
			CNF	21,111*	3,470	,000	11,03	31,19	
			PGNC	-21,389*	3,470	,000	-31,47	-11,31	
			PGNP	7,222	3,470	,305	-2,86	17,30	
		CNP	CSF	1,000	3,470	1,000	-9,08	11,08	
			CPG	-6,722	3,470	,386	-10,80	3,30	
			CNC	-21,111*	3,470	,000	-31,19	-11,03	
			PGNC	42,500*	3,470	,000	52,58	32,42	
			PGNP	-13,889*	3,470	,002	-23,97	-3,81	
	PGNC	CSF	43,500*	3,470	,000	33,42	53,58		
		CPG	35,778*	3,470	,000	25,70	45,86		
		CNC	21,389*	3,470	,000	11,31	31,47		
		CNF	42,500*	3,470	,000	32,42	52,58		
		PGNP	28,611*	3,470	,000	18,53	38,69		
	PGNP	CSF	14,889*	3,470	,001	4,81	24,97		
		CPG	7,167	3,470	,314	-2,91	17,24		
		CNC	-7,222	3,470	,305	-17,30	2,86		
		CNF	13,889*	3,470	,002	3,81	23,97		
		PGNC	-28,611*	3,470	,000	-38,69	-18,53		
	Scheffé	CSF	CPG	-7,722	3,470	,427	-19,50	4,05	
				CNC	-22,111*	3,470	,000	-33,89	-10,34
				CNF	-1,000	3,470	1,000	-12,78	10,78
				PGNC	-43,500*	3,470	,000	-55,28	-31,72
				PGNP	-14,889*	3,470	,004	-26,86	-3,11
			CPG	CSF	7,722	3,470	,427	-4,05	19,50
				CNC	-14,389*	3,470	,007	-26,16	-2,61
				CNF	6,722	3,470	,587	-5,05	18,50
				PGNC	35,778*	3,470	,000	17,55	24,00
				PGNP	-7,167	3,470	,515	-18,94	4,61
CNC			CSF	22,111*	3,470	,000	10,34	33,89	
			CPG	14,389*	3,470	,007	2,61	26,16	
			CNF	21,111*	3,470	,000	9,34	32,89	
			PGNC	-21,389*	3,470	,000	-33,16	-9,61	
			PGNP	7,222	3,470	,506	-4,55	19,00	
CNP			CSF	1,000	3,470	1,000	-10,78	12,78	
			CPG	-6,722	3,470	,587	-18,50	5,05	
			CNC	-21,111*	3,470	,000	-32,89	-9,34	
			PGNC	-42,500*	3,470	,000	-54,28	-30,72	
			PGNP	-13,889*	3,470	,010	-25,66	-2,11	
PGNC		CSF	43,500*	3,470	,000	31,72	55,28		
		CPG	35,778*	3,470	,000	24,00	47,55		
		CNC	21,389*	3,470	,000	9,61	33,16		
		CNF	42,500*	3,470	,000	30,72	54,28		
		PGNP	28,611*	3,470	,000	18,84	40,39		
PGNP		CSF	14,889*	3,470	,004	3,11	26,66		
		CPG	7,167	3,470	,515	-4,61	18,94		
		CNC	7,222	3,470	,506	19,00	4,55		
		CNF	13,889*	3,470	,010	2,11	25,66		
		PGNC	-28,611*	3,470	,000	-40,39	-16,84		

LCc	HSD de Tukey	CSF	CPG	-37,444*	3,398	,000	-47,31	-27,57		
			CNC	-14,667*	3,398	,001	-24,54	-4,80		
			CNP	3,556	3,398	,901	-6,31	13,43		
			PGNC	-41,111*	3,398	,000	-50,98	-31,24		
			PGNP	-30,333*	3,398	,000	-40,20	-20,46		
		CPG	CSF	37,444*	3,398	,000	27,57	47,31		
			CNC	22,778*	3,398	,000	12,91	32,65		
			CNP	41,000*	3,398	,000	31,13	50,87		
			PGNC	-3,667	3,398	,889	-13,54	6,20		
			PGNP	7,111	3,398	,299	-2,76	16,98		
		CNC	CSF	14,667*	3,398	,001	4,80	24,54		
			CPG	-22,778*	3,398	,000	-32,65	-12,91		
			CNP	18,222*	3,398	,000	8,35	28,09		
			PGNC	-26,444*	3,398	,000	-36,31	-16,57		
			PGNP	-15,667*	3,398	,000	-25,54	-5,80		
		CNP	CSF	-3,556	3,398	,901	-13,43	6,31		
			CPG	-41,000*	3,398	,000	-50,87	-31,13		
			CNC	-18,222*	3,398	,000	-28,09	-8,35		
			PGNC	-44,667*	3,398	,000	-54,54	-34,80		
			PGNP	-33,889*	3,398	,000	-43,76	-24,02		
		PGNC	CSF	41,111*	3,398	,000	31,24	50,98		
			CPG	3,667	3,398	,889	-6,20	13,54		
			CNC	26,444*	3,398	,000	16,57	36,31		
			CNP	44,667*	3,398	,000	34,80	54,54		
			PGNP	10,778*	3,398	,024	,91	20,65		
		PGNP	CSF	30,333*	3,398	,000	20,46	40,20		
			CPG	-7,111	3,398	,299	-16,98	2,76		
			CNC	15,667*	3,398	,000	5,80	25,54		
			CNP	33,889*	3,398	,000	24,02	43,76		
			PGNC	-10,778*	3,398	,024	-20,65	-,91		
		Scheffé	CSF	CPG	CSF	-37,444*	3,398	,000	-48,98	-25,91
					CNC	-14,667*	3,398	,004	-26,20	-3,14
					CNP	3,556	3,398	,954	-7,98	15,09
					PGNC	-41,111*	3,398	,000	-52,64	-29,58
					PGNP	-30,333*	3,398	,000	-41,86	-18,80
				CPG	CSF	37,444*	3,398	,000	25,91	48,98
					CNC	22,778*	3,398	,000	11,25	34,31
					CNP	41,000*	3,398	,000	29,47	52,53
					PGNC	-3,667	3,398	,947	-15,20	7,86
					PGNP	7,111	3,398	,500	-4,42	18,64
				CNC	CSF	14,667*	3,398	,004	3,14	26,20
					CPG	-22,778*	3,398	,000	-34,31	-11,25
					CNP	18,222*	3,398	,000	6,69	29,75
					PGNC	-26,444*	3,398	,000	-37,98	-14,91
					PGNP	-15,667*	3,398	,001	-27,20	-4,14
CNP	CSF			-3,556	3,398	,954	-15,09	7,98		
	CPG			-41,000*	3,398	,000	-52,53	-29,47		
	CNC			-18,222*	3,398	,000	-29,75	-6,69		
	PGNC			-44,667*	3,398	,000	-56,20	-33,14		
	PGNP			-33,889*	3,398	,000	-45,42	-22,36		
PGNC	CSF			41,111*	3,398	,000	29,58	52,64		
	CPG			3,667	3,398	,947	-7,86	15,20		
	CNC			26,444*	3,398	,000	14,91	37,98		
	CNP			44,667*	3,398	,000	33,14	56,20		
	PGNP			10,778	3,398	,083	-,75	22,31		
PGNP	CSF			30,333*	3,398	,000	18,80	41,86		
	CPG			-7,111	3,398	,500	-18,64	4,42		
	CNC			15,667*	3,398	,001	4,14	27,20		
	CNP			33,889*	3,398	,000	22,36	45,42		
	PGNC			-10,778	3,398	,083	-22,31	-,75		

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

10.2.f.- ANEXO II: 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	
LCr	HSD de Tukey	CSF	CNC	-22,111*	2,915	,000	-29,15	-15,07
			CNP	-1,000	2,915	,937	-8,04	6,04
		CNC	CSF	22,111*	2,915	,000	15,07	29,15
			CNP	21,111*	2,915	,000	14,07	28,15
		CNP	CSF	1,000	2,915	,937	6,04	8,04
			CNC	-21,111*	2,915	,000	-28,15	-14,07
	Scheffé	CSF	CNC	-22,111*	2,915	,000	-29,46	-14,76
			CNP	-1,000	2,915	,943	-8,35	6,35
		CNC	CSF	22,111*	2,915	,000	14,76	29,46
			CNP	21,111*	2,915	,000	13,76	28,46
		CNP	CSF	1,000	2,915	,943	-6,35	8,35
			CNC	-21,111*	2,915	,000	-28,46	-13,76
LCc	HSD de Tukey	CSF	CNC	-14,667*	2,319	,000	-20,26	-9,07
			CNP	3,556	2,319	,284	-2,04	9,15
		CNC	CSF	14,667*	2,319	,000	9,07	20,26
			CNP	18,222*	2,319	,000	12,62	23,82
		CNP	CSF	-3,556	2,319	,284	-9,15	2,04
			CNC	-18,222*	2,319	,000	-23,82	-12,62
	Scheffé	CSF	CNC	-14,667*	2,319	,000	-20,51	-8,82
			CNP	3,556	2,319	,317	-2,29	9,40
		CNC	CSF	14,667*	2,319	,000	8,82	20,51
			CNP	18,222*	2,319	,000	12,38	24,07
		CNP	CSF	-3,556	2,319	,317	-9,40	2,29
			CNC	-18,222*	2,319	,000	-24,07	-12,38

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

## 10.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sg.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
LCr	HSD de Tukey	CSF	CNC	-22,111*	4,156	,000	-32,14	-12,08
			PGNC	-43,500*	4,156	,000	-53,53	-33,47
		CNC	CSF	22,111*	4,156	,000	12,08	32,14
			PGNC	-21,389*	4,156	,000	-31,42	-11,36
		PGNC	CSF	43,500*	4,156	,000	33,47	53,53
			CNC	21,389*	4,156	,000	11,36	31,42
	Scheffé	CSF	CNC	-22,111*	4,156	,000	-32,59	-11,63
			PGNC	43,500*	4,156	,000	53,98	33,02
		CNC	CSF	22,111*	4,156	,000	11,63	32,59
			PGNC	21,389*	4,156	,000	31,87	10,91
		PGNC	CSF	43,500*	4,156	,000	33,02	53,98
			CNC	21,389*	4,156	,000	10,91	31,87
LCc	HSD de Tukey	CSF	CNC	-14,667*	3,538	,000	-23,21	-6,12
			PGNC	-41,111*	3,538	,000	-49,65	-32,57
		CNC	CSF	14,667*	3,538	,000	6,12	23,21
			PGNC	-26,444*	3,538	,000	-34,99	-17,90
		PGNC	CSF	41,111*	3,538	,000	32,57	49,65
			CNC	26,444*	3,538	,000	17,90	34,99
	Scheffé	CSF	CNC	-14,667*	3,538	,001	-23,59	-5,74
			PGNC	-41,111*	3,538	,000	-50,03	-32,19
		CNC	CSF	14,667*	3,538	,001	5,74	23,59
			PGNC	-26,444*	3,538	,000	-35,37	-17,52
		PGNC	CSF	41,111*	3,538	,000	32,19	50,03
			CNC	26,444*	3,538	,000	17,52	35,37

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

10.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático

Comparaciones múltiples

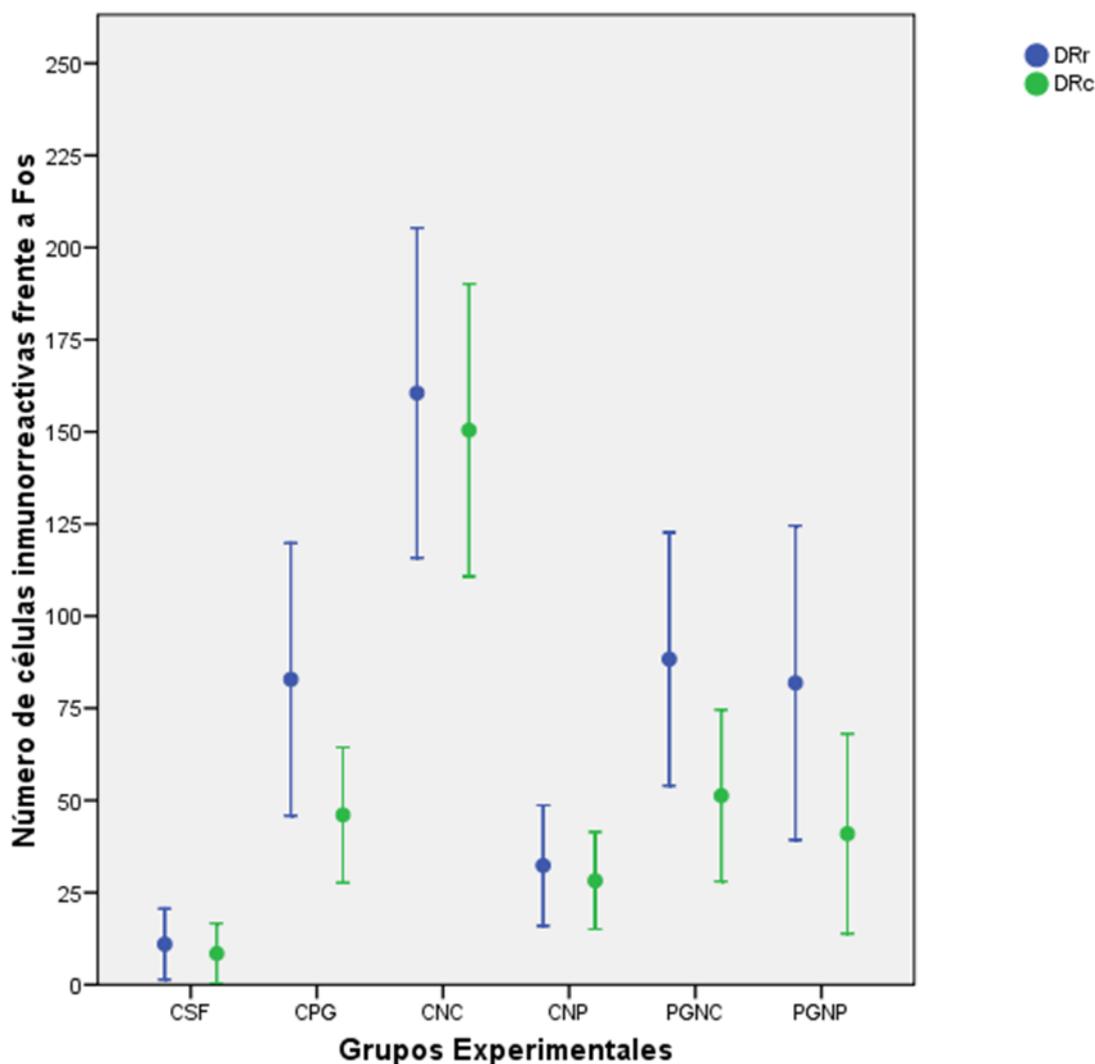
Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
LCr	HSD de Tukey	CSF	CNP	-1,000	2,178	,891	-6,26	4,26
			PGNP	-14,889*	2,178	,000	-20,15	-9,63
		CNP	CSF	1,000	2,178	,891	-4,26	6,26
			PGNP	-13,889*	2,178	,000	-19,15	-8,63
		PGNP	CSF	14,889*	2,178	,000	9,63	20,15
			CNP	13,889*	2,178	,000	8,63	19,15
	Scheffé	CSF	CNP	-1,000	2,178	,900	-6,49	4,49
			PGNP	-14,889*	2,178	,000	-20,38	-9,40
		CNP	CSF	1,000	2,178	,900	-4,49	6,49
			PGNP	-13,889*	2,178	,000	-19,38	-8,40
		PGNP	CSF	14,889*	2,178	,000	9,40	20,38
			CNP	13,889*	2,178	,000	8,40	19,38
LCc	HSD de Tukey	CSF	CNP	3,556	2,392	,306	-2,22	9,33
			PGNP	-30,333*	2,392	,000	-36,11	-24,56
		CNP	CSF	-3,556	2,392	,306	-9,33	2,22
			PGNP	-33,889*	2,392	,000	-39,66	-28,12
		PGNP	CSF	30,333*	2,392	,000	24,56	36,11
			CNP	33,889*	2,392	,000	28,12	39,66
	Scheffé	CSF	CNP	3,556	2,392	,339	-2,48	9,59
			PGNP	-30,333*	2,392	,000	-36,36	-24,30
		CNP	CSF	-3,556	2,392	,339	-9,59	2,48
			PGNP	-33,889*	2,392	,000	-39,92	-27,86
		PGNP	CSF	30,333*	2,392	,000	24,30	36,36
			CNP	33,889*	2,392	,000	27,86	39,92

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

## 11.- Estudio Estadístico del Núcleo del Rafe Dorsal.

### 11.1.- Análisis Global

En primer lugar se presentan la descriptiva (media, número de casos y desviación típica) para las variables originales Niveles Rostral (DRr) y Caudal (DRc). 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 6 grupos (fig. 4.75).



**Fig. 4.75.** Gráfica de las medias estimadas para cada variable dentro de cada uno de los 6 grupos experimentales.

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
DRr	CSF	18	11,00	4,814	1,135	8,61	13,39	2	18
	CPG	18	82,83	18,497	4,360	73,63	92,03	60	105
	CNC	18	160,56	22,380	5,275	149,43	171,68	132	189
	CNP	18	32,33	8,182	1,928	28,26	36,40	20	45
	PGNC	18	88,33	17,174	4,048	79,79	96,87	60	106
	PGNP	18	81,89	21,307	5,022	71,29	92,48	55	110
	Total	108	76,16	50,406	4,850	66,54	85,77	2	189
DRc	CSF	18	8,44	4,076	,961	6,42	10,47	2	15
	CPG	18	46,06	9,187	2,165	41,49	50,62	36	59
	CNC	18	150,44	19,850	4,679	140,57	160,32	125	174
	CNP	18	28,22	6,594	1,554	24,94	31,50	20	40
	PGNC	18	51,28	11,646	2,745	45,49	57,07	36	64
	PGNP	18	40,94	13,558	3,196	34,20	47,69	25	60
	Total	108	54,23	46,930	4,516	45,28	63,18	2	174

**Tabla 4.50.** Descriptivos para las variables DRr y DRc.

Efectuamos un análisis de la varianza de un factor para las variables DRr y DRc, siendo el factor el grupo experimental que presenta 6 condiciones experimentales diferentes. Los resultados se recogen en las Tablas 4.50 y 4.51, que a su vez reproduce las tablas ANOVA para las 2 variables.

Se deduce de ellas que hay diferencias significativas entre los 6 grupos experimentales para las 2 variables: DRr ( $F=173,550$ ;  $p<0,0001$ ) y DRc ( $F=309,207$ ;  $p<0,0001$ ).

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DRr	Inter-grupos	243265,602	5	48653,120	173,550	,000
	Intra-grupos	28594,722	102	280,340		
	Total	271860,324	107			
DRc	Inter-grupos	221075,713	5	44215,143	309,207	,000
	Intra-grupos	14585,500	102	142,995		
	Total	235661,213	107			

**Tabla 4.51.** Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para las variables DRr y DRc.

Puesto que el análisis detectó diferencias entre los grupos tenía sentido realizar comparaciones múltiples para determinar conjuntos homogéneos de grupos experimentales que compartirían la misma media (ANEXO I).

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 (tabla 4.52 y 4.53).

En el nivel Rostral del Núcleo del Rafe Dorsal (DRr), tanto el método de Tukey como el de Scheffé determinaron hasta 4 subconjuntos homogéneos:

- En los extremos de estos subconjuntos destacaron por un lado el grupo CSF y el CNP y por el otro el grupo que recibió el estímulo doloroso nociceptivo (CNC).
- En el centro quedarían los grupos que recibieron Pregabalina (CPG, PGNC y PGNP).

		DRr				
		N	Subconjunto para alfa = .05			
Grupo			1	2	3	4
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	11,00			
	CNP	18		32,33		
	PGNP	18			81,89	
	CPG	18			82,83	
	PGNC	18			88,33	
	CNC	18				160,56
	Sig		1,000	1,000	,857	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	11,00			
	CNP	18		32,33		
	PGNP	18			81,89	
	CPG	18			82,83	
	PGNC	18			88,33	
	CNC	18				160,56
	Sig		1,000	1,000	,930	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 4.52.** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable DRr.

A nivel Caudal del Núcleo del Rafe Dorsal (DRc), los métodos de Tukey y Scheffé determinaron de nuevo 4 subconjuntos homogéneos, con similar distribución que en el Nivel Rostral:

- En los extremos se situaron por un lado el grupo CSF y el CNP y por el otro el grupo CNC.
- En el centro quedaron los grupos que recibieron Pregabalina (CPG, PGNC y PGNP).

**DRc**

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	4
HSD de Tukey <sup>a</sup>					
CSF	18	8,44			
CNP	18		28,22		
PGNP	18			40,94	
CPG	18			46,06	
PGNC	18			51,28	
CNC	18				150,44
Sig.		1,000	1,000	,109	1,000
Scheffé <sup>a</sup>					
CSF	18	8,44			
CNP	18		28,22		
PGNP	18		40,94	40,94	
CPG	18			46,06	
PGNC	18			51,28	
CNC	18				150,44
Sig.		1,000	,080	,252	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 4.53.** Pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Scheffé para determinar subconjuntos homogéneos para la variable DRc.

### 11.2.- 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.

### 11.2.a.- Análisis Parcial Analgesia: CSF y CPG

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración de una dosis i.p. de 30 mg/kg de Pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en el Núcleo del Rafe Dorsal. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF y CPG.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables DRr y DRc, siendo el factor el Grupo Experimental. De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias significativas entre los 2 grupos experimentales tanto para la variable DRr ( $F=254.242$ ;  $p<0,001$ ) como para la DRc ( $F=252.049$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.54).

En este caso, al incluir sólo 2 grupos experimentales en el análisis, no fue necesario llevar a cabo un estudio de comparaciones múltiples ni determinar subconjuntos homogéneos.

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 (fig. 4.76).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
DRr	CSF	18	11,00	4,814	1,135	8,61	13,39	2	18
	CPG	18	82,83	18,497	4,360	73,63	92,03	60	105
	Total	36	46,92	38,785	6,464	33,79	60,04	2	105
DRc	CSF	18	8,44	4,076	,961	6,42	10,47	2	15
	CPG	18	46,06	9,187	2,165	41,49	50,62	36	59
	Total	36	27,25	20,318	3,386	20,38	34,12	2	59

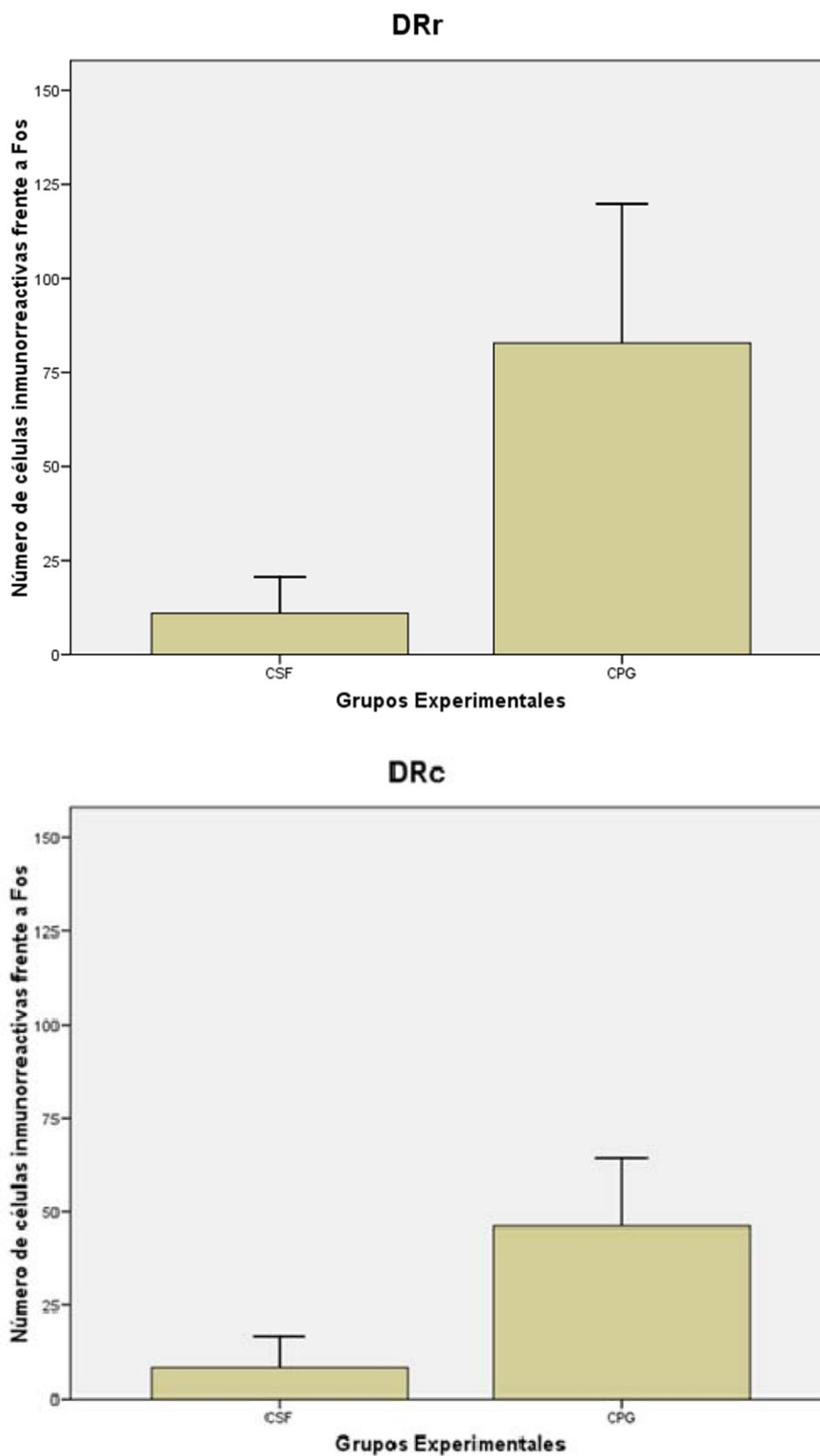
## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
DRr	99,403	1	34	,000
DRc	47,972	1	34	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DRr	Inter-grupos	46440,250	1	46440,250	254,242	,000
	Intra-grupos	6210,500	34	182,662		
	Total	52650,750	35			
DRc	Inter-grupos	12731,361	1	12731,361	252,049	,000
	Intra-grupos	1717,389	34	50,511		
	Total	14448,750	35			

**Tabla 4.54.** Resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.



**Fig. 4.76.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Analgesia (CSF y CPG).

### 11.2.b.- Análisis Parcial Dolor: CSF, CNC y CNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la aplicación de un estímulo nociceptivo de diferente naturaleza tendría sobre la expresión de Fos en el Núcleo del Rafe Dorsal. Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y CNP.

El análisis estadístico incluyó la obtención de los descriptivos, la prueba de homogeneidad de las varianzas y el análisis de la varianza de un factor para las variables DRr y DRc, 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 DRr ( $F=597.945$ ;  $p<0,0001$ ) como para la DRc ( $F=703.432$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.55).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO II) confirmó las diferencias al comparar cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y CNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y CNP, 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 (tabla 4.56).

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 (fig. 4.77).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
DRr	CSF	18	11,00	4,814	1,135	8,61	13,39	2	18
	CNC	18	160,56	22,380	5,275	149,43	171,68	132	189
	CNP	18	32,33	8,182	1,928	28,26	36,40	20	45
	Total	54	67,96	68,077	9,264	49,38	86,54	2	189
DRc	CSF	18	8,44	4,076	,961	6,42	10,47	2	15
	CNC	18	150,44	19,850	4,679	140,57	160,32	125	174
	CNP	18	28,22	6,594	1,554	24,94	31,50	20	40
	Total	54	62,37	64,527	8,781	44,76	79,98	2	174

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
DRr	45,498	2	51	,000
DRc	57,386	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DRr	Inter-grupos	235577,481	2	117788,741	597,945	,000
	Intra-grupos	10046,444	51	196,989		
	Total	245623,926	53			
DRc	Inter-grupos	212960,593	2	106480,296	703,432	,000
	Intra-grupos	7720,000	51	151,373		
	Total	220680,593	53			

**Tabla 4.55.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

### Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

#### DRr

Grupo	N	Subconjunto para $\alpha = .05$		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	11,00	
	CNP	18		32,33
	CNC	18		160,56
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	11,00	
	CNP	18		32,33
	CNC	18		160,56
	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.

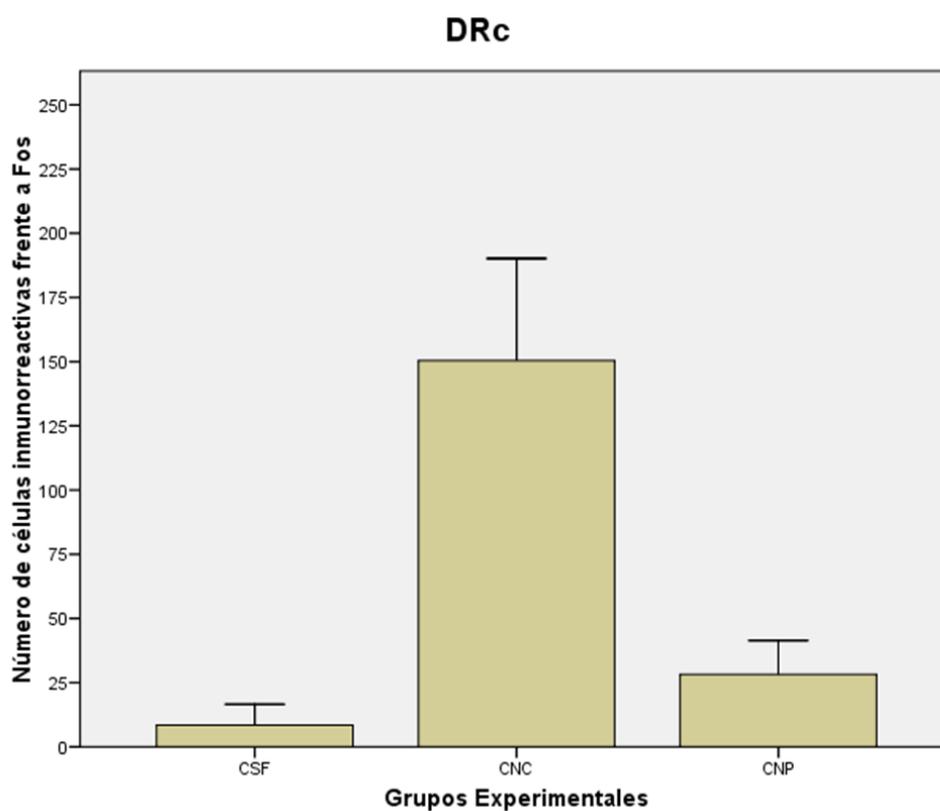
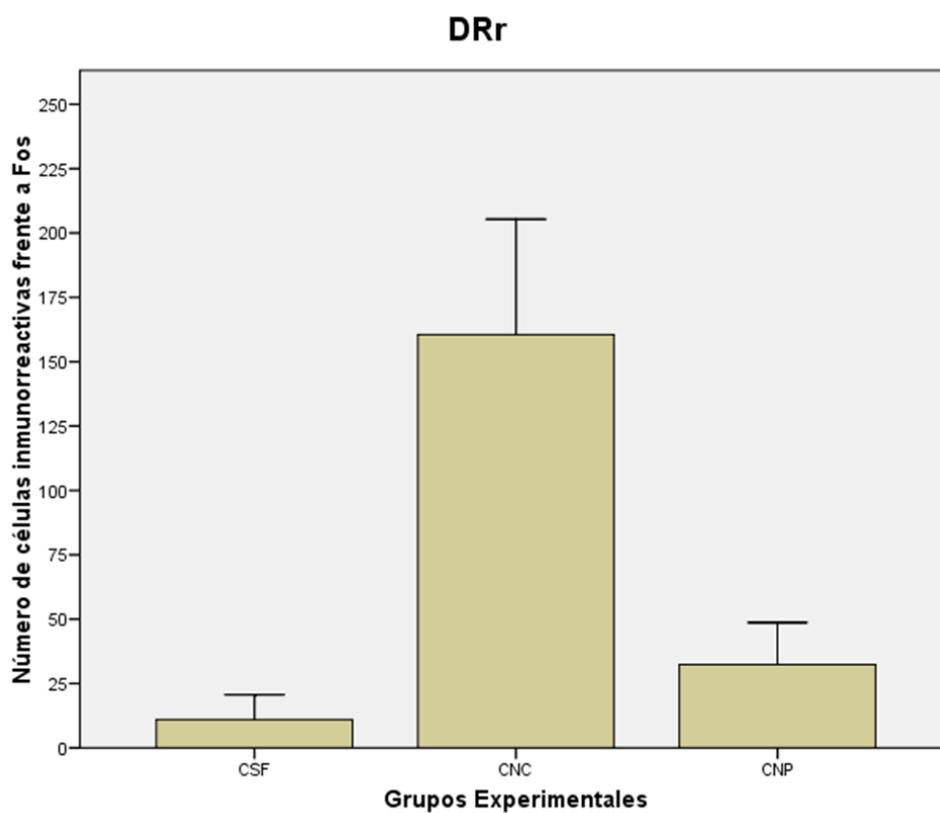
#### DRc

Grupo	N	Subconjunto para $\alpha = .05$		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	8,44	
	CNP	18		28,22
	CNC	18		150,44
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	8,44	
	CNP	18		28,22
	CNC	18		150,44
	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 4.56.** Resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.77.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Dolor (CSF, CNC y CNP).

### 11.2.c.- Análisis Parcial Nociceptivo: CSF, CNC y PGNC

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de Pregabalina tendría sobre la expresión de Fos en el Núcleo del Rafe Dorsal por aplicación de un estímulo nociceptivo (test de la formalina). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNC y PGNC.

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 DRr y DRc, 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 DRr ( $F=368.843$ ;  $p<0,0001$ ) como para la DRc ( $F=524.461$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.57).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO III) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNC y PGNC) que cuando se compararon entre sí los grupos CNC y PGNC, 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 (tabla 4.58).

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 (fig. 4.78).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
DRr	CSF	18	11,00	4,814	1,135	8,61	13,39	2	18
	CNC	18	160,56	22,380	5,275	149,43	171,68	132	189
	PGNC	18	88,33	17,174	4,048	79,79	96,87	60	106
	Total	54	86,63	63,736	8,673	69,23	104,03	2	189
DRc	CSF	18	8,44	4,076	,961	6,42	10,47	2	15
	CNC	18	150,44	19,850	4,679	140,57	160,32	125	174
	PGNC	18	51,28	11,646	2,745	45,49	57,07	36	64
	Total	54	70,06	61,473	8,365	53,28	86,83	2	174

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
DRr	27,968	2	51	,000
DRc	53,118	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DRr	Inter-grupos	201380,148	2	100690,074	368,843	,000
	Intra-grupos	13922,444	51	272,989		
	Total	215302,593	53			
DRc	Inter-grupos	190996,333	2	95498,167	524,461	,000
	Intra-grupos	9286,500	51	182,088		
	Total	200282,833	53			

**Tabla 4.57.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## DRr

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	11,00	
	PGNC	18		88,33
	CNC	18		160,56
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>b</sup>	CSF	18	11,00	
	PGNC	18		88,33
	CNC	18		160,56
	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.

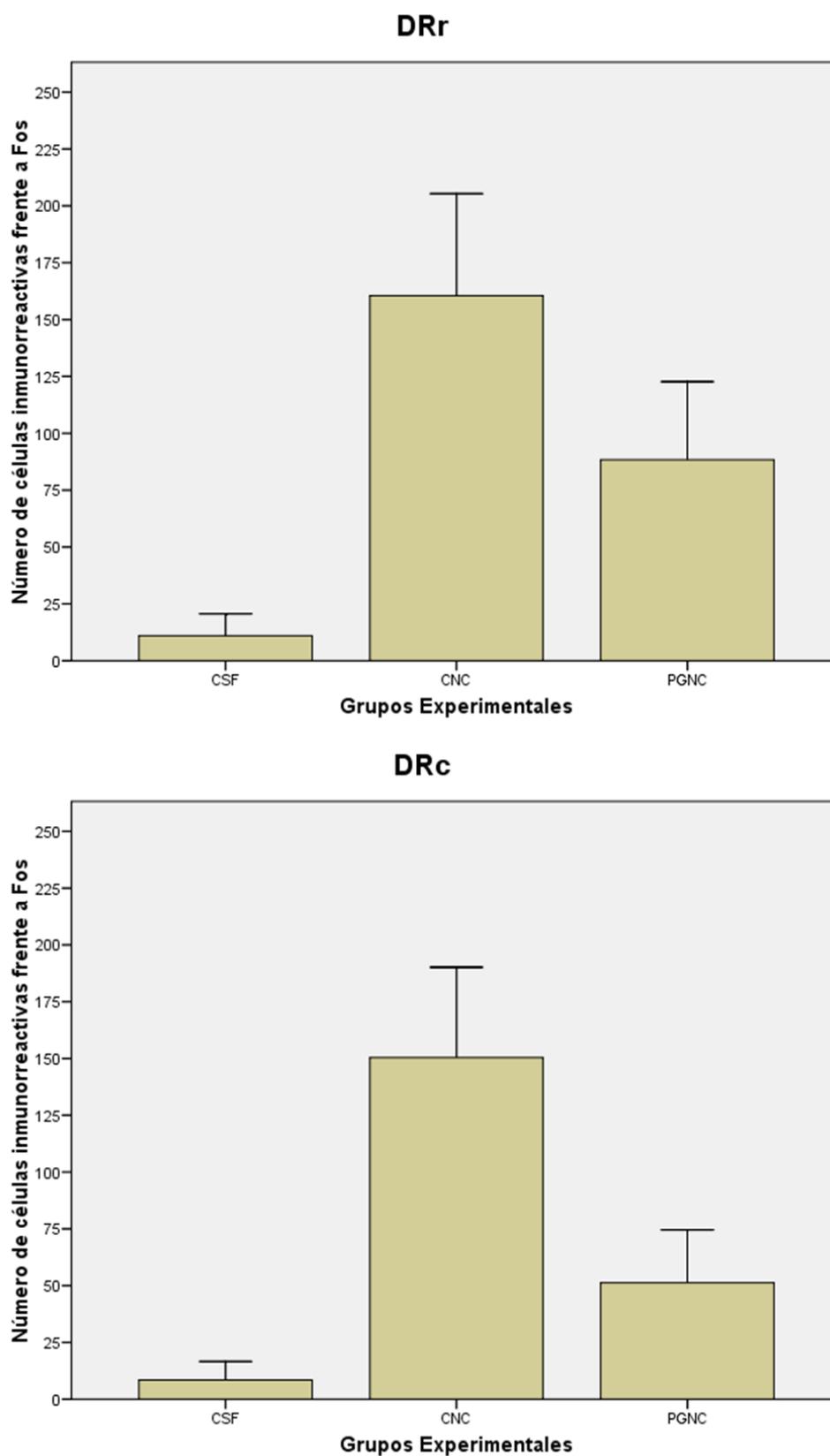
## DRc

Grupo	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	8,44	
	PGNC	18		51,28
	CNC	18		150,44
	Sig.		1,000	1,000
Scheffé <sup>b</sup>	CSF	18	8,44	
	PGNC	18		51,28
	CNC	18		150,44
	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 4.58.** Resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.78.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Nociceptivo (CSF, CNC y PGNC).

### 11.2.d.- Análisis Parcial Neuropático: CSF, CNP y PGNP

El objetivo de este análisis fue analizar el efecto que la administración previa de una dosis i.p. de 30 mg/kg de Pregabalina cada 8 horas durante tendría sobre la expresión de Fos en el Núcleo del Rafe Dorsal por aplicación de un estímulo neuropático (constricción crónica del ciático). Para ello comparamos entre sí los grupos CSF, CNP y PGNP.

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 DRr y DRc, 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 DRr ( $F=131.271$ ;  $p<0,0001$ ) como para la DRc ( $F=59.380$ ;  $p<0,0001$ ) (tabla 4.59).

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (ANEXO IV) confirmó las diferencias al comparamos cualquier grupo entre sí, aunque las diferencias siempre fueron mayores al comparar el grupo control (CSF) con cualquiera de los grupos estimulados dolorosamente (CNP y PGNP) que cuando se compararon entre sí los grupos CNP y PGNP, 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 (tabla 4.60).

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 (fig. 4.79).

## Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
DRr	CSF	18	11,00	4,814	1,135	8,61	13,39	2	18
	CNP	18	32,33	8,182	1,928	28,26	36,40	20	45
	PGNP	18	81,89	21,307	5,022	71,29	92,48	55	110
	Total	54	41,74	32,756	4,458	32,80	50,68	2	110
DRc	CSF	18	8,44	4,076	,961	6,42	10,47	2	15
	CNP	18	28,22	6,594	1,554	24,94	31,50	20	40
	PGNP	18	40,94	13,558	3,196	34,20	47,69	25	60
	Total	54	25,87	16,137	2,196	21,47	30,28	2	60

## Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
DRr	37,159	2	51	,000
DRc	29,398	2	51	,000

## ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DRr	Inter-grupos	47616,593	2	23808,296	131,271	,000
	Intra-grupos	9249,778	51	181,368		
	Total	56866,370	53			
DRc	Inter-grupos	9655,593	2	4827,796	59,380	,000
	Intra-grupos	4146,500	51	81,304		
	Total	13802,093	53			

**Tabla 4.59.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Descriptivos, prueba de homogeneidad de las varianzas y ANOVA de un factor.

## Pruebas post hoc de Tukey y Scheffé

## DRr

	Grupo	N	Subconjunto para $\alpha = .05$		
			1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	11,00		
	CNP	18		32,33	
	PGNP	18			81,89
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	11,00		
	CNP	18		32,33	
	PGNP	18			81,89
	Sig.		1,000	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.

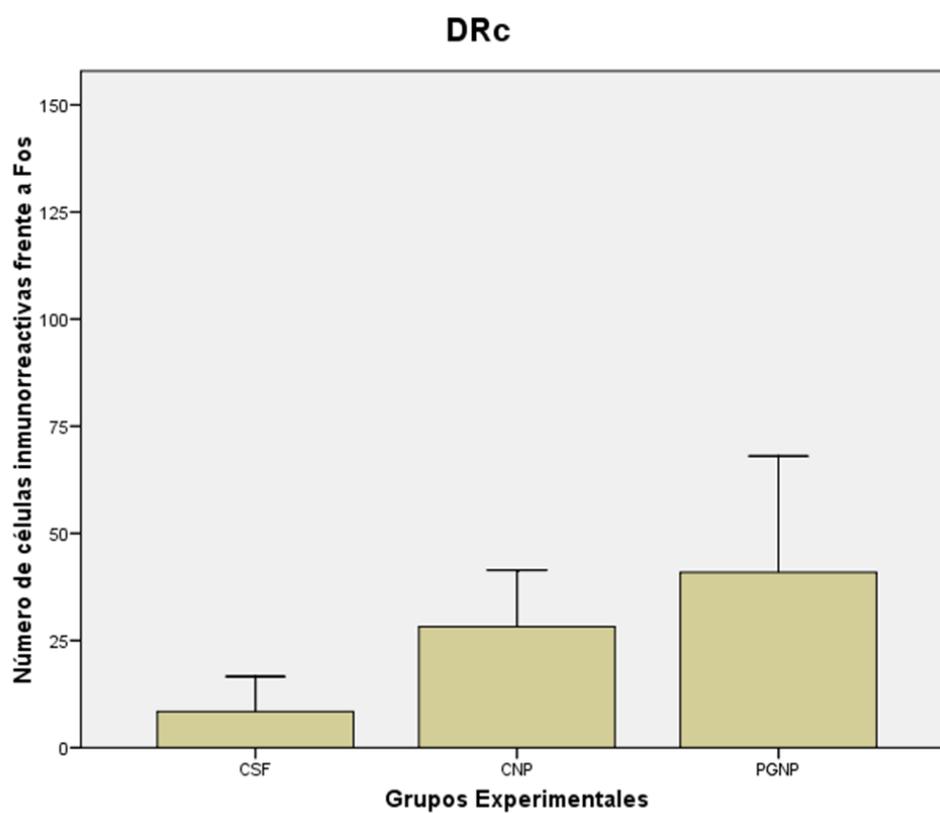
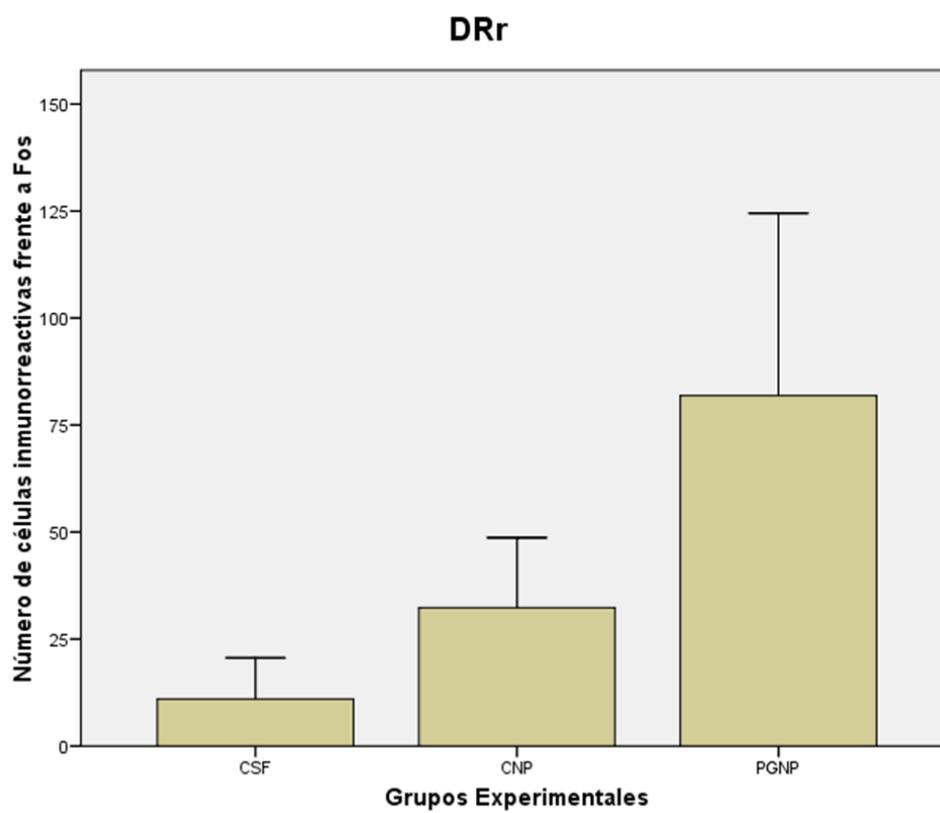
## DRc

	Grupo	N	Subconjunto para $\alpha = .05$		
			1	2	3
HSD de Tukey <sup>a</sup>	CSF	18	8,44		
	CNP	18		28,22	
	PGNP	18			40,94
	Sig.		1,000	1,000	1,000
Scheffé <sup>a</sup>	CSF	18	8,44		
	CNP	18		28,22	
	PGNP	18			40,94
	Sig.		1,000	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 4.60.** Resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP): Pruebas post-hoc de Tukey y Scheffé de comparaciones múltiples.



**Fig. 4.79.** Representación gráfica de los resultados del Análisis Parcial Neuropático (CSF, CNP y PGNP).

## 11.2.e.- ANEXO I: Análisis Global

## 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	
DRr	HSD de Tukey	CSF	CPG	-71,833*	5,581	,000	-88,04	-55,62
			CNC	-149,556*	5,581	,000	-165,77	-133,34
			CNP	-21,333*	5,581	,003	-37,54	-5,12
			PGNC	-77,333*	5,581	,000	-93,54	-61,12
			PGNP	-70,889*	5,581	,000	-87,10	-54,68
		CPG	CSF	71,833*	5,581	,000	55,62	88,04
			CNC	-11,122*	5,581	,000	-93,93	-61,51
			CNP	60,500*	5,581	,000	34,29	66,71
			PGNC	-5,500	5,581	,922	-21,71	10,71
			PGNP	,944	5,581	1,000	-15,27	17,16
		CNC	CSF	140,556*	5,581	,000	133,34	165,77
			CPG	77,722*	5,581	,000	61,51	93,93
			CNP	128,222*	5,581	,000	112,01	144,43
			PGNC	72,222*	5,581	,000	56,01	88,43
			PGNP	78,667*	5,581	,000	62,46	94,88
		CNP	CSF	21,333*	5,581	,003	5,12	37,54
			CPG	-60,500*	5,581	,000	-66,71	-34,29
			CNC	-128,222*	5,581	,000	-144,43	-112,01
			PGNC	-66,000*	5,581	,000	-72,21	-39,79
			PGNP	-49,556*	5,581	,000	-65,77	-33,34
		PGNC	CSF	77,333*	5,581	,000	61,12	93,54
			CPG	5,500	5,581	,922	-10,71	21,71
			CNC	-72,222*	5,581	,000	-88,43	-56,01
			CNP	66,000*	5,581	,000	39,79	72,21
			PGNP	6,444	5,581	,857	-9,11	22,66
	PGNP	CSF	70,889*	5,581	,000	54,68	87,10	
		CPG	-,944	5,581	1,000	-17,16	15,27	
		CNC	-78,667*	5,581	,000	-94,88	-62,40	
		CNP	40,556*	5,581	,000	33,34	65,77	
		PGNC	6,444	5,581	,857	22,66	9,77	
	Scheffé	CSF	CPG	-71,833*	5,581	,000	-90,77	-52,89
			CNC	-149,556*	5,581	,000	-168,50	-130,61
			CNP	-21,333*	5,581	,017	-40,27	-2,39
			PGNC	-77,333*	5,581	,000	-96,27	-58,39
			PGNP	-70,889*	5,581	,000	-89,83	-51,95
		CPG	CSF	71,833*	5,581	,000	52,89	90,77
			CNC	-77,722*	5,581	,000	-96,66	-58,78
			CNP	60,500*	5,581	,000	31,56	69,44
			PGNC	-5,500	5,581	,964	-24,44	13,44
			PGNP	,944	5,581	1,000	-18,00	19,89
		CNC	CSF	149,556*	5,581	,000	130,61	168,50
			CPG	11,122*	5,581	,000	58,78	96,66
			CNP	128,222*	5,581	,000	109,28	147,16
			PGNC	72,222*	5,581	,000	53,28	91,16
			PGNP	78,667*	5,581	,000	59,73	97,61
		CNP	CSF	21,333*	5,581	,017	2,39	40,27
			CPG	-60,500*	5,581	,000	-69,44	-31,56
			CNC	128,222*	5,581	,000	147,16	109,28
			PGNC	-66,000*	5,581	,000	-74,94	-37,06
			PGNP	-49,556*	5,581	,000	-68,50	-30,61
PGNC		CSF	77,333*	5,581	,000	58,39	96,27	
		CPG	5,500	5,581	,964	-13,44	24,44	
		CNC	-72,222*	5,581	,000	-91,16	-53,28	
		CNP	66,000*	5,581	,000	37,06	74,94	
		PGNP	6,444	5,581	,930	-12,50	25,39	
PGNP	CSF	70,889*	5,581	,000	51,95	89,83		
	CPG	-,944	5,581	1,000	-19,89	18,00		
	CNC	-78,667*	5,581	,000	-97,61	-59,73		
	CNP	49,556*	5,581	,000	30,61	68,50		
	PGNC	6,444	5,581	,930	-25,39	12,50		

DRc	HSD de Tukey	CSF	CPG	-37,611*	3,986	,000	-49,19	-26,03		
			CNC	-142,000*	3,986	,000	-153,58	-130,42		
			CNP	-19,778*	3,986	,000	-31,36	-8,20		
			PGNC	-42,833*	3,986	,000	-54,41	-31,26		
			PGNP	-32,500*	3,986	,000	-44,08	-20,92		
		CPG	CSF	37,611*	3,986	,000	26,03	49,19		
			CNC	-104,389*	3,986	,000	-115,97	-92,81		
			CNP	17,833*	3,986	,000	6,26	29,41		
			PGNC	-5,222	3,986	,779	-16,80	6,36		
			PGNP	5,111	3,986	,794	-6,47	16,69		
		CNC	CSF	142,000*	3,986	,000	130,42	153,58		
			CPG	104,389*	3,986	,000	92,81	115,97		
			CNP	122,222*	3,986	,000	110,64	133,80		
			PGNC	99,167*	3,986	,000	87,59	110,74		
			PGNP	109,500*	3,986	,000	97,92	121,08		
		CNP	CSF	19,770*	3,906	,000	0,20	31,36		
			CPG	-17,833*	3,986	,000	-29,41	-6,26		
			CNC	-122,222*	3,986	,000	-133,80	-110,64		
			PGNC	-23,056*	3,986	,000	-34,63	-11,48		
			PGNP	-12,722*	3,986	,023	-24,30	-1,14		
		PGNC	CSF	42,833*	3,986	,000	31,26	54,41		
			CPG	5,222	3,986	,779	-6,36	16,80		
			CNC	-99,167*	3,906	,000	-110,74	-07,59		
			CNP	23,056*	3,986	,000	11,48	34,63		
			PGNP	10,333	3,986	,109	-1,24	21,91		
		PGNP	CSF	32,500*	3,986	,000	20,92	44,08		
			CPG	-5,111	3,986	,794	-16,69	6,47		
			CNC	-109,500*	3,986	,000	-121,08	-97,92		
			CNP	12,722*	3,986	,023	1,14	24,30		
			PGNC	-10,333	3,986	,109	-21,91	1,24		
		Scheffé	CSF	CPG	CNC	-37,611*	3,986	,000	-51,14	-24,08
					CNC	-142,000*	3,986	,000	-155,53	-128,47
					CNP	-19,778*	3,986	,000	-33,31	-6,25
					PGNC	-42,833*	3,986	,000	-56,36	-29,31
					PGNP	-32,500*	3,986	,000	-46,03	-18,97
				CPG	CSF	37,611*	3,986	,000	24,08	51,14
					CNC	-104,389*	3,986	,000	-117,92	-90,86
					CNP	17,833*	3,986	,002	4,31	31,36
					PGNC	-5,222	3,986	,885	-18,75	8,31
					PGNP	5,111	3,986	,895	-8,42	18,64
				CNC	CSF	142,000*	3,986	,000	128,47	155,53
					CPG	104,389*	3,986	,000	90,86	117,92
					CNP	122,222*	3,986	,000	108,69	135,75
					PGNC	99,167*	3,986	,000	85,64	112,69
					PGNP	109,500*	3,986	,000	95,97	123,03
				CNP	CSF	19,778*	3,986	,000	6,25	33,31
					CPG	-17,833*	3,986	,002	-31,36	-4,31
					CNC	-122,222*	3,986	,000	-135,75	-108,69
PGNC	-23,056*				3,906	,000	-36,50	-9,53		
PGNP	-12,722				3,986	,080	-26,25	,81		
PGNC	CSF			42,833*	3,986	,000	29,31	56,36		
	CPG			5,222	3,986	,885	-8,31	18,75		
	CNC			-99,167*	3,906	,000	-112,69	-05,64		
	CNP			23,056*	3,986	,000	9,53	36,58		
	PGNP			10,333	3,986	,252	-3,19	23,86		
PGNP	CSF			32,500*	3,986	,000	18,97	46,03		
	CPC			-5,111	3,906	,095	-10,64	0,42		
	CNC			-109,500*	3,986	,000	-123,03	-95,97		
	CNP			12,722	3,986	,080	-,81	26,25		
	PGNC			-10,333	3,986	,252	-23,86	3,19		

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

## 11.2.f.- ANEXO II: 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	
DRr	HSD de Tukey	CSF	CNC	-149,556*	4,678	,000	-160,85	-138,26
			CNP	-21,333*	4,678	,000	-32,63	-10,04
		CNC	CSF	149,556*	4,678	,000	138,26	160,85
			CNP	128,222*	4,678	,000	116,93	139,52
		CNP	CSF	21,333*	4,078	,000	10,04	32,63
			CNC	-128,222*	4,678	,000	-139,52	-116,93
	Scheffé	CSF	CNC	-149,556*	4,678	,000	-161,35	-137,76
			CNP	-21,333*	4,678	,000	-33,13	-9,54
		CNC	CSF	149,556*	4,678	,000	137,76	161,35
			CNP	128,222*	4,678	,000	116,43	140,02
		CNP	CSF	21,333*	4,678	,000	9,54	33,13
			CNC	-128,222*	4,678	,000	-140,02	-116,43
DRc	HSD de Tukey	CSF	CNC	-142,000*	4,101	,000	-151,90	-132,10
			CNP	-19,778*	4,101	,000	-29,68	-9,88
		CNC	CSF	142,000*	4,101	,000	132,10	151,90
			CNP	122,222*	4,101	,000	112,32	132,12
		CNP	CSF	19,778*	4,101	,000	9,88	29,68
			CNC	-122,222*	4,101	,000	-132,12	-112,32
	Scheffé	CSF	CNC	-142,000*	4,101	,000	-152,34	-131,66
			CNP	-19,778*	4,101	,000	-30,12	-9,44
		CNC	CSF	142,000*	4,101	,000	131,66	152,34
			CNP	122,222*	4,101	,000	111,88	132,56
		CNP	CSF	19,778*	4,101	,000	9,44	30,12
			CNC	-122,222*	4,101	,000	-132,56	-111,88

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

11.2.g.- ANEXO III: Análisis Parcial Nociceptivo

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sg.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
DR <sup>a</sup>	HSD de Tukey	CSF	CNC	-149,556 <sup>a</sup>	5,507	,000	-162,85	-136,26
			PGNC	-77,333 <sup>a</sup>	5,507	,000	-90,63	-64,04
		CNC	CSF	149,556 <sup>a</sup>	5,507	,000	136,26	162,85
			PGNC	72,222 <sup>a</sup>	5,507	,000	58,93	85,52
		PGNC	CSF	77,333 <sup>a</sup>	5,507	,000	64,04	90,63
			CNC	-72,222 <sup>a</sup>	5,507	,000	-85,52	-58,93
	Scheffé	CSF	CNC	-149,556 <sup>a</sup>	5,507	,000	-163,44	-135,67
			PGNC	-77,333 <sup>a</sup>	5,507	,000	-91,22	-63,45
		CNC	CSF	149,556 <sup>a</sup>	5,507	,000	135,67	163,44
			PGNC	72,222 <sup>a</sup>	5,507	,000	58,34	86,11
		PGNC	CSF	77,333 <sup>a</sup>	5,507	,000	63,45	91,22
			CNC	-72,222 <sup>a</sup>	5,507	,000	-86,11	-58,34
DR <sub>c</sub>	HSD de Tukey	CSF	CNC	-142,000 <sup>a</sup>	4,498	,000	-152,86	-131,14
			PGNC	-42,833 <sup>a</sup>	4,498	,000	-53,69	-31,98
		CNC	CSF	142,000 <sup>a</sup>	4,498	,000	131,14	152,86
			PGNC	99,167 <sup>a</sup>	4,498	,000	88,31	110,02
		PGNC	CSF	42,833 <sup>a</sup>	4,498	,000	31,98	53,69
			CNC	-99,167 <sup>a</sup>	4,498	,000	-110,02	-88,31
	Scheffé	CSF	CNC	-142,000 <sup>a</sup>	4,498	,000	-153,34	-130,66
			PGNC	-42,833 <sup>a</sup>	4,498	,000	-54,17	-31,49
		CNC	CSF	142,000 <sup>a</sup>	4,498	,000	130,66	153,34
			PGNC	99,167 <sup>a</sup>	4,498	,000	87,83	110,51
		PGNC	CSF	42,833 <sup>a</sup>	4,498	,000	31,49	54,17
			CNC	-99,167 <sup>a</sup>	4,498	,000	-110,51	-87,83

<sup>a</sup>. La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

## 11.2.h.- ANEXO IV: Análisis Parcial Neuropático

## 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
DRi	HSD de Tukey	CSF	CNP	-21,333*	4,489	,000	-32,17	-10,50
			PGNP	-70,889*	4,489	,000	-81,73	-60,05
		CNP	CSF	21,333*	4,489	,000	10,50	32,17
			PGNP	-49,556*	4,489	,000	-60,39	-30,72
		PGNP	CSF	70,889*	4,489	,000	60,05	81,73
			CNP	49,556*	4,489	,000	38,72	60,39
	Scheffé	CSF	CNP	-21,333*	4,489	,000	-32,65	-10,01
			PGNP	-70,889*	4,489	,000	-82,21	-59,57
		CNP	CSF	21,333*	4,489	,000	10,01	32,65
			PGNP	-49,556*	4,489	,000	-60,87	-38,24
		PGNP	CSF	70,889*	4,489	,000	59,57	82,21
			CNP	49,556*	4,489	,000	38,24	60,87
DRc	HSD de Tukey	CSF	CNP	-19,778*	3,006	,000	-27,03	-12,52
			PGNP	-32,500*	3,006	,000	-39,76	-25,24
		CNP	CSF	19,778*	3,006	,000	12,52	27,03
			PGNP	-12,722*	3,006	,000	-19,98	-5,47
		PGNP	CSF	32,500*	3,006	,000	25,24	39,76
			CNP	12,722*	3,006	,000	5,47	19,98
	Scheffé	CSF	CNP	-19,778*	3,006	,000	-27,36	-12,20
			PGNP	-32,500*	3,006	,000	-40,08	-24,92
		CNP	CSF	19,778*	3,006	,000	12,20	27,36
			PGNP	-12,722*	3,006	,000	-20,30	-5,14
		PGNP	CSF	32,500*	3,006	,000	21,92	40,08
			CNP	12,722*	3,006	,000	5,14	20,30

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

# **05 DISCUSIÓN**



## **1.- Consideraciones metodológicas.**

Nuestro trabajo de investigación se ha centrado en estudiar el sustrato anatómico del efecto analgésico de la pregabalina. Asimismo, nuestro estudio ha profundizado en el papel que distintos centros troncoencefálicos podrían jugar el mecanismo de acción de fármacos analgésicos como la pregabalina.

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 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 (137, 138, 139, 140, 141).

La mayoría de estos trabajos se han llevado a cabo en animales en mayor o menor medida anestesiados (142, 143, 144), 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* (133).

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) (145), basado en la medición de la glucosa utilizada localmente en el cerebro (146), y el estudio de la expresión del proto-oncogén *c-fos* como marcador de actividad neuronal (29, 86, 123, 124, 125, 126, 147).

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 (148).

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 (69, 70, 90, 124, 126, 139, 140, 141, 146, 147, 149).

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, o incluso, el hecho de que el animal de experimentación fue de una especie diferente (150).

## **2.- Asta Posterior de la Médula Espinal.**

La expresión del proto-oncogen *c-fos* en el asta posterior de la médula espinal ha sido, probablemente, uno de los hechos más estudiados desde que a finales de la década de los 80 Hunt y cols. (147) comprobaron que podía ser inducida su expresión a este nivel tras la aplicación de un estímulo nociceptivo. Resultados similares fueron obtenidos independientemente de que el estímulo nociceptivo aplicado fuese somático superficial (151, 152, 153, 154, 155, 156), somático profundo (124, 157) o visceral (124, 158, 159).

Del mismo modo, un estímulo doloroso neuropático, como la constricción crónica del nervio ciático, también provocó un incremento ipsilateral de la expresión de la proteína Fos (160, 161, 162).

Nuestros resultados son coincidentes con todos ellos, confirmando el papel principal de las láminas superficiales (I y II) y del cuello del asta posterior (V) en la recepción de la información algésica que ingresa por las raíces posteriores al interior de la médula espinal.

Asimismo, los datos obtenidos confirman que el proto-oncogen c-fos se expresa en el asta posterior o dorsal de la médula espinal de forma consistente y proporcionada al estímulo doloroso aplicado. Nuestros datos, por tanto, apoyan aquellos trabajos previos que sostenían que el estudio inmunocitoquímico de la proteína Fos es un método eficaz y fidedigno de actividad celular (123). Especialmente, los que han apoyado el uso de esta herramienta neurocientífica para detectar actividad neuronal inducida por un estímulo doloroso en el asta posterior de la médula espinal (29, 86, 124, 125, 126, 147, 149).

La validez de esta técnica ha permitido que numerosos trabajos previos hayan demostrado que la administración de sustancias analgésicas de forma previa a la aplicación del estímulo algésico, inhibe la expresión de c-fos inducida por el estímulo nociceptivo en el asta posterior de la médula. Aunque el analgésico más estudiado ha sido la morfina (151, 157, 159, 163, 164), también se ha investigado el efecto que sobre la expresión de Fos inducida por dolor tenían otros analgésicos como el peroxicam (153), el diclofenaco (165), el metamizol (31) o el tramadol (159).

También en este caso, nuestros resultados coincidieron con los de estos estudios previos, de manera que la administración de pregabalina

30 minutos antes de la aplicación de la estimulación dolorosa consiguió atenuar la expresión de Fos inducida por el estímulo doloroso.

Este efecto de la pregabalina inhibiendo la expresión de Fos en el asta posterior de la médula era esperable cuando se administraba de forma previa a la aplicación de dolor neuropático, ya que la pregabalina está indicada en el tratamiento de patologías que cursan con esta modalidad de dolor.

Sin embargo, la inhibición de Fos inducida por un estímulo doloroso nociceptivo somático superficial, como el test de la formalina, fue un hallazgo más inesperado. Según nuestros datos, el nuestro es el primer estudio en evaluar la efectividad de la pregabalina para bloquear la expresión de c-fos en el asta posterior de la médula.

Nuestros resultados apoyan, de este modo, la teoría de que el estudio de la expresión de c-fos a nivel de la médula espinal es un buen método para evaluar tanto la capacidad algésica de una sustancia o proceder como la potencia analgésica de un fármaco, y apuntan al asta posterior de la médula como punto eficaz de bloqueo de la información nociceptiva por parte del sistema antinociceptivo endógeno: un mayor bloqueo de la expresión de Fos a nivel del asta posterior de la médula, se correlacionaría con una mayor potencia analgésica del fármaco testado.

En nuestro caso, los datos obtenidos a nivel de asta posterior de la médula espinal sugieren que la pregabalina sería eficaz para el tratamiento no sólo del dolor neuropático sino también del nociceptivo somático superficial.

### 3.- Núcleo del Tracto Solitario.

El núcleo del tracto solitario (NTS), situado en el bulbo raquídeo, ha sido una estructura asociada clásicamente a la sensibilidad visceral general (108). Las diferentes aferencias sensitivas terminarían distribuidas, de forma más o menos general, con las del sistema gustativo en su mitad más rostral (108, 166), las gastrointestinales en su porción intermedia (108) y las cardiovasculares y respiratorias en su porción más caudal (108, 112, 113).

Sin embargo, su inclusión en este estudio sobre el sustrato anatómico del efecto analgésico de la pregabalina ha sido porque es uno de los centros troncoencefálicos donde más intensamente se localiza la subunidad  $\alpha_2\delta-1$  (98) que ha sido involucrado tanto en el circuito nociceptivo (114, 139, 141, 167) como en el antinociceptivo (109, 110, 111, 112, 113, 114, 115).

Por lo que respecta al papel del NTS en el circuito nociceptivo somático superficial, nuestros resultados no mostraron un incremento significativo de la expresión de Fos en el NTS tras la inyección subcutánea de formalina al 5% en la planta de la pata trasera derecha (test de la formalina) de los animales del grupo control dolor nociceptivo con respecto de los animales del grupo control simulado fisiológico, lo que en principio no apoyaría la participación del NTS en la conducción de un estímulo nociceptivo somático superficial.

En este mismo sentido, otros estudios previos, mucho más globales y no específicos del NTS, en los que también se empleó un estímulo nociceptivo somático superficial, como el test de la formalina, (137, 140) no apreciaron incremento de actividad neuronal en el NTS.

Porro y cols. (137) llevaron a cabo un estudio del consumo de 2-DG en todo el tronco del encéfalo tras aplicación del test de la formalina sin observar incrementos significativos del consumo en el NTS, acorde con nuestros resultados.

Lantéri-Minet y cols. (140) llevaron a cabo un estudio amplio de la expresión de varios proto-oncogenes o genes de expresión inmediata (principalmente c-fos) en todo el tronco de encéfalo tras estímulo somático superficial y profundo. Sin embargo, no pudieron obtener datos del NTS debido a que no observaron variaciones del importante marcaje “constitutivo” detectado en los animales control no estimulados frente a los estimulados con dolor somático. Sus resultados contrastan con los nuestros de los grupos simulado y dolor somático en los que apenas observamos expresión de Fos. Sin embargo, hay dos datos concretos que pueden provocar tales diferencias. Por un lado, en el trabajo de Lantéri-Minet y cols. (140) la estimulación se realiza con los animales bajo una leve anestesia con halotano que puede interferir en la expresión de c-fos en el NTS, mientras que en nuestro estudio no se emplea ningún tipo de anestesia previa a la estimulación dolorosa. Y por otro, el anticuerpo empleado para detectar la proteína Fos tampoco es el mismo en los dos trabajos, lo que también podría contribuir a la diferencia de resultados observada.

Una amplia revisión sobre las estructuras activadas en el sistema nervioso central tras la aplicación del test de la formalina, detectadas tanto por el método de la 2-DG como por la detección inmunocitoquímica de genes de expresión inmediata (146), confirmó, de nuevo, la falta de reactividad del NTS ante una estimulación dolorosa somática superficial, a pesar de que comentan, sin dar ninguna cita, que hay evidencias preliminares de expresión de c-fos en el núcleo del tracto solitario.

Más recientemente, y en esta misma línea, se demostró que el NTS no era necesario para inducir hiperalgesia mediante la aplicación del test de la formalina (115), lo que vuelve a incidir en el papel poco o nada significativo del NTS en el circuito que media el dolor somático superficial inducido tras el test de la formalina, reforzando, nuevamente, nuestras observaciones.

Similares resultados a los ya comentados fueron observados en el NTS cuando se emplearon otros métodos para producir un estímulo nociceptivo somático superficial, distintos al test de la formalina (168, 169).

En estos dos estudios la estimulación dolorosa somática superficial se llevó a cabo mediante la inmersión de la pata trasera de los animales de experimentación en agua caliente a temperaturas que oscilaron entre los 55-60°C (168) o los 33-52°C (169). En ningún caso apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales del grupo estimulado y los del grupo control, aunque, de nuevo aquí hay que resaltar el hecho de que los animales fueron mantenidos bajo anestesia con pentobarbital sódico (168) o con una mezcla de halotano, oxígeno y óxido nitroso (169) mientras duró la estimulación.

El análisis de los datos recogidos en la bibliografía, así como de nuestros propios resultados, apuntan a que el NTS no intervendría en el circuito nociceptivo somático superficial.

Del mismo modo, cuando el estímulo algésico aplicado consistió en una constricción crónica del nervio ciático, es decir, en provocar dolor neuropático, nuestros resultados tampoco mostraron una intensa inmunorreacción frente a Fos en el NTS.

Aunque sí se constató un ligero incremento en ambos niveles rostrocaudales del NTS del grupo control dolor neuropático frente al

CSF y al CNC, este no fue de intensidad suficiente para permitirnos afirmar la participación del NTS en la transmisión ascendente del dolor neuropático.

Trabajos previos en nuestro laboratorio sí constataron un incremento significativo de la expresión de Fos en los niveles intermedio y caudal del NTS cuando el estímulo nociceptivo fue de naturaleza visceral (test de las contracciones abdominales).

Estos datos propios eran, además, congruentes con los datos publicados en la bibliografía en los que se observaba expresión de Fos en el NTS tras la administración intraperitoneal de ácido acético, tanto en ratas no anestesiadas (114) como en ratas previamente anestesiadas con pentobarbital (124).

Sin embargo, otros trabajos (141) en los que se empleó el mismo estímulo algésico visceral fracasaron en su intento de observar un incremento estadísticamente significativo en el número de células inmunorreactivas frente a Fos en el NTS, quedando como una posible explicación el dato de que los animales fueron anestesiados previamente con metoxifluorano.

El mismo problema de la anestesia enmascarando posibles datos acerca de la expresión de c-fos tras estímulo nociceptivo visceral a nivel del NTS también lo encontramos en otro trabajo previo (139). 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 (N<sub>2</sub>O) fue probablemente la causa de que no pudieran demostrar el papel del NTS en el procesamiento de la información dolorosa visceral inducida, tanto por la inyección i.p. de ácido acético como por la distensión colorrectal.

Los resultados observados en la presente investigación en el NTS de los ejemplares del grupo CNP están a caballo entre los observados en este mismo estudio cuando el estímulo aplicado fue nociceptivo somático superficial (donde no se indujo Fos) y los de un trabajo previo de nuestro equipo en el que se aplicó un estímulo doloroso visceral (donde sí se indujo Fos). Esto nos permite afirmar que el NTS no es una estructura clave en el circuito nociceptivo somático superficial (como sí demostramos anteriormente que lo era en el visceral), pero no nos ofrece datos suficientes para implicar o descartar al NTS en los circuitos de dolor neuropático.

Respecto al papel del NTS en el circuito antinociceptivo, existen desde hace tiempo indicios del posible papel que el NTS jugaría en el circuito inhibitorio descendente, apoyados, en un principio, por la suma de datos indirectos tanto de conexiones anatómicas (107, 170), como de respuestas fisiológicas de las neuronas del NTS (109).

Estas primeras aproximaciones se vieron reforzadas por posteriores estudios en los que se conseguía inhibir reflejos nociceptivos mediante la estimulación eléctrica directa (112, 171, 172, 173) o indirecta (174) del NTS, o mediante la microinyección de glutamato en el mismo (111).

En nuestro estudio, la administración de pregabalina provocó una masiva expresión de Fos por todo el NTS en los dos niveles estudiados, con independencia de la aplicación o no posterior de un estímulo algésico, lo que apuntaría a que el NTS jugaría un papel importante en el mecanismo de acción de la pregabalina. Como ya hemos señalado, datos previos relacionaban al NTS con el control del dolor, por lo que la activación de éste por parte de la pregabalina sugiere que el NTS estaría involucrado en el efecto analgésico de la misma.

Nuestro estudio, es el primero, según nuestra revisión bibliográfica, en estudiar la repercusión que la administración de la pregabalina provoca en el NTS.

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 NTS por la pregabalina, junto con las evidencias del efecto analgésico que tiene la estimulación eléctrica o química del NTS, apoyaría la hipótesis de que el efecto analgésico de la pregabalina estaría mediado, al menos en parte, por el NTS.

Sin embargo, la confluencia en el NTS de información procedente de la región peritoneal y el papel del NTS en la regulación de diferentes funciones autonómicas, hace que no podamos descartar que la intensa inducción de Fos en el NTS por la pregabalina obedezca a otras explicaciones. Por un lado, la pregabalina, que se administró en todos los animales por vía i.p., podría estimular territorios inervados por fibras del vago. Pero, por otro lado, tampoco se deberían descartar cambios muy acusados en la presión arterial provocados por la pregabalina, que incluso podrían ser causa de analgesia (115, 156). Para averiguar si la activación del NTS por parte de la pregabalina es debida a su vía de administración o a su mecanismo de acción serían necesarios posteriores estudios en los que se utilizase una vía de administración diferente (como por ejemplo la i.v. o la s.c.). Del mismo modo el control de la presión arterial antes y después de la administración de la pregabalina descartaría la influencia de este parámetro en la expresión de Fos detectada.

Finalmente, señalar que los resultados observados en el NTS en el presente estudio son similares a los obtenidos previamente por nuestro laboratorio en un trabajo similar tras la administración de metamizol.

En ese mismo estudio, sin embargo, la administración de morfina no provocó cambios significativos en la expresión de Fos con respecto al grupo simulado, es decir, que, según nuestros resultados, la morfina no es capaz de inducir la expresión de c-fos en el NTS. Esta falta de expresión de Fos inducida por la morfina no descarta, como sugiere el trabajo de Hammond *y cols.* (158), que el NTS se vea afectado por la administración i.p. de morfina: que no provoque activación/expresión de Fos, no descarta que la morfina pueda inhibir la actividad neuronal/expresión de Fos en el NTS, bloqueando, por ejemplo, la entrada de información nociceptiva de naturaleza fundamentalmente visceral.

#### **4.- La porción lateral del PB.**

La porción lateral del núcleo parabraquial (LPB) es otra de las estructuras implicadas tanto en la facilitación de la transmisión nociceptiva como en los mecanismos de control del dolor (90, 104, 142, 143, 144, 169, 175, 176, 177), que presentó una intensa reacción frente al mRNA de la subunidad  $\alpha_2\delta$  (98).

La LPB se sitúa en la porción dorsolateral de la protuberancia, alrededor del pedúnculo cerebeloso superior. Clásicamente ha sido asociado con una amplia variedad de funciones autonómicas como, por ejemplo, la regulación cardiovascular (178, 179, 180), y funciones del sistema gustativo (181), y del respiratorio (182).

Hemos observado en nuestros animales del grupo control simulado fisiológico (CSF) 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 del animal) que no estuvieran directamente bajo nuestro control.

El LPB no es la primera estructura troncoencefálica que encontramos en nuestro laboratorio, que muestra expresión basal de *c-fos*. En 1996, Valverde-Navarro *y cols.* (75), 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.* (183), 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 PBL 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 (90, 104, 142, 143, 144, 169, 175, 176, 177).

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

La mayor presencia de elementos marcados en los grupos control simulados se detectó en aquellos estudios que se llevaron a cabo con los animales expuestos en mayor o menor medida a los anestésicos (90, 142).

En el resto de trabajos analizados (104, 143, 144, 176) los autores coinciden en restar importancia al marcaje observado en el LPB de sus grupos control.

La escasa expresión de *c-fos* observada en el LPB 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 (104, 143), y difiere tanto más cuanto mayor es el contacto previo con el anestésico (90, 143, 144, 176).

Evidentemente, las neuronas Fos-positivas observadas en el LPB de nuestro grupo CSF 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 (132), es muy improbable que el marcaje apreciado se deba a la inducción iatrogénica de *c-fos* por efecto de la propia anestesia (133).

Pensamos, asimismo, que, aunque factible, tampoco es probable que el marcaje sea atribuible a posibles factores ambientales incontrolados, como señalan Bellavance y Beitz (142), 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* (184, 185, 186).

La inmunorreactividad en el LPB 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 LPB (187).

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

Por lo que respecta al papel del LPB 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 LPB, 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 (DIP) con respecto al LPB de los animales del grupo control simulado, lo que en principio apoyaría la participación del LPB en la conducción de un estímulo nociceptivo somático superficial.

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 LPB de rata tras estímulo somático superficial nos ofreció unos cuantos resultados (104, 142, 144, 169, 176, 177).

Bellavance y Beitz (142) 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, 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 LPB 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 (104) 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 LPB 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.* (169) 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 LPB 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 LPB 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 LPB.

Buritova *y cols.* (176) 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 LPB 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.* (177) confirmaron los resultados observados con anterioridad, volviendo a señalar a los subnúcleos slPB, elPB, clPB y, sobretodo, al dlPB 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 LPB de ratas tras un estímulo nociceptivo superficial, estriba en la mayor o menor relevancia

que se le concede al subnúcleo elPB. Mientras que el grupo de investigadores sueco (104, 177) lo relega a un papel secundario respecto de otros subnúcleos como el slPB, el clPB y el dlPB, el laboratorio francés (169, 176) lo señala como el principal subnúcleo del LPB 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 LPB, 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 LPB 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 (Ilo) 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 (37). Uno de los principales destinos de las proyecciones ascendentes originadas en las neuronas de las láminas I y Ilo de la médula espinal que responden a la información nociceptiva es el LPB (188, 189, 190, 191, 192). Mayoritariamente, estas proyecciones ascendentes desde las láminas I y Ilo al LPB se decusan y ascienden contralateralmente, aunque una significativa proporción de las mismas son bilaterales (193), lo que explicaría que el marcaje de Fos observado en el LPB tras estímulo doloroso sea, habitualmente, bilateral con predominio contralateral. Esta es, de hecho, la explicación que Jergova *y cols.* (144) dan al hecho de que en su estudio sobre la expresión de *c-fos* en el LPB tras lesión nerviosa periférica unilateral, el estudio sobre

el patrón de distribución de Fos en el LPB más reciente que hemos encontrado en la literatura, mostrase un incremento de la inmunorreactividad 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 LPB 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 (194). Finalmente, la existencia de proyecciones desde el LPB 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 (135, 195, 196, 197).

Las evidencias anatómicas fueron corroboradas por experimentos electrofisiológicos en los que se registraba activación neuronal en el LPB tras estímulos nociceptivos (195, 198).

Nuestros datos sobre el patrón de distribución de Fos en el LPB de rata tras estimulación nociceptiva somática superficial, coincide fundamentalmente con los resultados ofrecidos por Richard *y cols.* (177). 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

dorsolateral del LPB intervendría en el circuito nociceptivo somático superficial.

Los resultados fueron muy similares cuando el estímulo aplicado fue dolor neuropático. En este caso no hemos encontrado en la bibliografía ningún trabajo que estudiase la expresión de Fos inducida por constricción crónica del nervio ciático en el LPB. Nuestros hallazgos al aplicar dolor neuropático volvieron a señalar a los subnúcleos dlPB y elPB como más activos tras un estímulo doloroso neuropático.

Estos datos, junto con los hallazgos previos de nuestro laboratorio aplicando dolor nociceptivo visceral, confirman que el LPB participaría en la transmisión ascendente de la información dolorosa, aunque con matices entre subnúcleos del LPB dependiendo del subnúcleo.

La administración de pregabalina nos ofreció, al analizar el patrón de distribución de Fos inducido en el LPB, un dramático aumento de la inmunorreactividad frente a Fos de forma bilateral, especialmente en la mitad caudal o pontina del LPB, en la porción externa del elPB. Este incremento del número de elementos marcados fue observado en todo los grupos que recibieron pregabalina, independientemente de si fueron estimulados o no de forma dolorosa posteriormente.

Tan sólo hemos encontrado un trabajo en la literatura que estudió el efecto que, sobre el patrón de distribución de Fos en el LPB inducido por un estímulo algésico, tendría la administración previa al estímulo nociceptivo de una sustancia analgésica (199). 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 LPB 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 LPB 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 este trabajo que dificulta la comparación de sus resultados con los nuestros. Por un lado existen diferencias metodológicas que por sí mismas ya podrían justificar diferencias en los resultados: nuestro estudio se ha llevado a cabo sobre cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  de grosor, mientras que el de Hiroshima *y cols.* (199) se ha practicado sobre cortes de 50  $\mu\text{m}$ , 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 LPB 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 LPB fue para indicar que “apoya la participación de varias vías nociceptivas en la inducción de neuronas inmunorreactivas frente a Fos en el LPB 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 LPB 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 LPB.

El LPB está estratégicamente situado desde el punto de vista anatómico para influir en el circuito antinociceptivo descendente. A modo de ejemplo, recordaremos que el LPB envía y recibe proyecciones de la sustancia gris periacueductal (PAG) (93, 200), considerada la principal estructura del circuito endógeno de modulación de la transmisión nociceptiva (201). La relación entre la PAG y el LPB queda confirmada con el dato de que la estimulación tanto eléctrica como química de la PAG provoca incremento de Fos en el LPB (202).

Pero, la PAG no ha sido la única estructura del circuito analgésico endógeno que se ha relacionado con el LPB. Holstege (203) describió la existencia de proyecciones desde el LPB hasta el núcleo del rafe magno, otro de los centros principales del circuito antinociceptivo descrito por Basbaum y Fields (48), 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 LPB con el sistema endógeno de analgesia. Dicha hipótesis se vería reforzada por los datos ofrecidos por Katayama *y cols.* (204) quienes concluyen que la estimulación del LPB activaría el sistema descendente de supresión del dolor excitando las neuronas del núcleo del rafe magno.

En el mismo sentido, Petrov *y cols.* (205, 206) demostraron la existencia de conexiones recíprocas entre el LPB y el núcleo dorsal del rafe, el cual también ha sido, posteriormente, implicado en el circuito de control de la información nociceptiva (101).

A las evidencias anatómicas se sumaron los estudios electrofisiológicos que comprobaron en humanos (207) como 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 (208). Finalmente, tras la estimulación mediante microelectrodos del LPB 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 (209, 210).

Además de los trabajos anatómicos y electrofisiológicos, los estudios funcionales también han aportado datos apoyando el papel del LPB en la modulación de la información nociceptiva. De hecho, uno de los primeros datos indirectos de la participación del LPB en la producción de analgesia se obtuvo al comprobar que, la microinyección de carbacol, un agonista de la acetilcolina, en el LPB 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 (211).

A pesar de que algunos trabajos previos señalaban la posible participación del LPB en el circuito analgésico mediado por opiáceos a partir de datos tanto directos (199) como indirectos, tales como la presencia en el LPB de neuronas enkefalinérgicas (212), para las que el Fos parece no ser un factor de transcripción crucial (213), y aunque no podemos descartar que la morfina active las neuronas enkefalinérgicas del LPB 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 LPB de los grupos tratados con morfina apoyaría la teoría propuesta por Katayama *y cols.* (211) en relación a la

participación del LPB dentro de un circuito antinociceptivo no mediado por opiáceos.

Esta teoría sería además compatible con el resultado que obtuvimos en los animales a los que se administró una dosis intraperitoneal de 30 mg/kg de pregabalina. En todos ellos pudimos observar una masiva expresión de Fos en el LPB.

Dadas las conexiones entre el NTS y el LPB, las explicaciones a este fenómeno podrían ser las mismas: la estimulación de territorios inervados por fibras del vago que, vía núcleo del tracto solitario, alcanzaría el LPB; los posibles efectos hemodinámicos y respiratorios que pudiera provocar la pregabalina sobre el animal de experimentación; y la presencia de anestésicos enmascarando los resultados.

Tras una revisión exhaustiva de la bibliografía ninguno de los trabajos sobre pregabalina menciona o señala al LPB como estructura que pudiera ser responsable de su actividad analgésica. Sin embargo, la administración de pregabalina en nuestro experimento provocó claramente un aumento de expresión de Fos en el LPB, lo que apoya la hipótesis de que el LPB mediaría, al menos en parte, el efecto analgésico de la pregabalina.

Nuestro estudio, es el primero, según la revisión bibliográfica, en estudiar la repercusión que la administración de pregabalina provoca en el LPB.

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

## 5.- Locus Coeruleus.

El locus coeruleus (LC) es uno de los principales núcleos noradrenérgicos del tronco de encéfalo. Conocido como A6, se localiza en la parte dorsal de la protuberancia rostral, a ambos lados del suelo del IV ventrículo.

Ha sido implicado en diversas actividades fisiológicas tales como el sueño, la atención, la memoria y la vigilancia, además de la analgesia (para revisión ver Aston-Jones *y cols.* (234)).

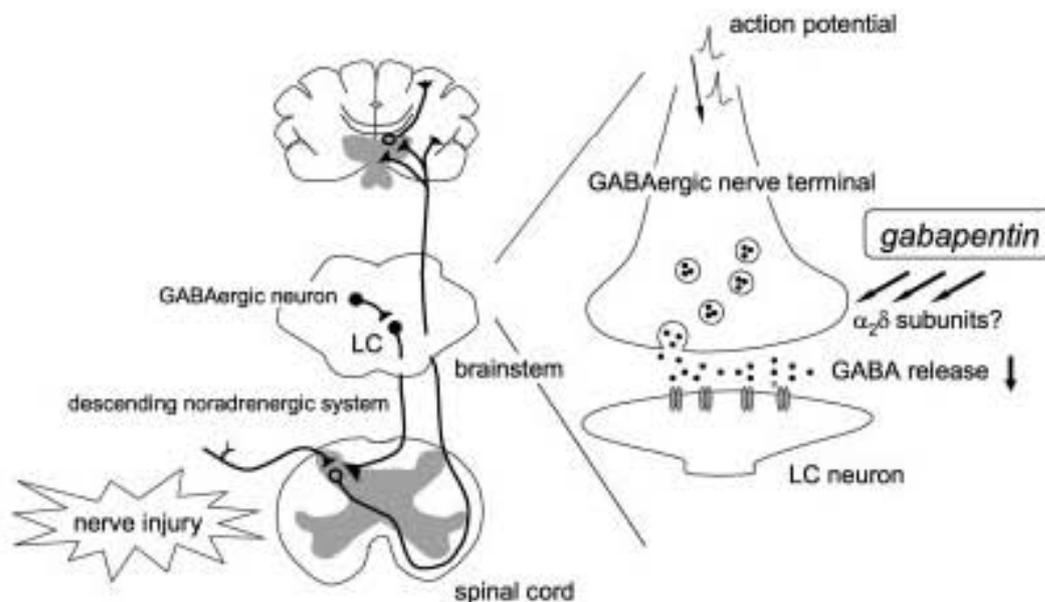
En relación a este último aspecto, son abundantes los trabajos que destacan que la estimulación eléctrica del LC produce un efecto antinociceptivo en ratas anestesiadas (para revisión ver Stamford (150) y Willis *y cols.* (39)). Es considerado como el más importante centro noradrenérgico en el control descendente del dolor (150) y también es uno de los centros troncoencefálicos de elevada expresión de la subunidad  $\alpha_2\delta$  (98).

Ciertamente, el LC es uno de los principales centros relacionados más recientemente en la bibliografía con el efecto antihiperálgico de la pregabalina, mediante la inhibición del tráfico de la subunidad  $\alpha_2\delta-1$  hacia los terminales (215, 216). El desplazamiento de esta subunidad proteica de los canales de calcio voltaje-dependientes desde el citoplasma hacia los terminales presinápticos es uno de los principales fenómenos que tienen lugar en el dolor neuropático y ha sido relacionado con la hiperálgia.

Por todo ello, el LC era, de todos los centros troncoencefálicos incluidos en este trabajo de investigación, el que a priori resultaba más interesante.

Previamente, el LC ya había sido señalado como lugar de acción del efecto en la inhibición del dolor neuropático de la gabapentina (217, 218).

La hipótesis de estos autores sería que la gabapentina (y por analogía la pregabalina) se uniría a la subunidad  $\alpha_2\delta$ -1 de los canales de calcio voltaje-dependientes situados en la presinapsis de las neuronas GABAérgicas que mantienen inhibidas a las neuronas noradrenérgicas del LC. El fármaco de esta forma bloquearía el efecto de las neuronas GABAérgicas sobre las noradrenérgicas provocando la “desinhibición” de estas últimas, que incrementarían la liberación de noradrenalina en la médula lo que daría como resultado una disminución del dolor neuropático (fig. 5.1).



**Fig. 5.1.** Esquema que ilustra la hipótesis propuesta por Bauer y cols. (217) sobre el efecto que la pregabalina tendría en el locus coeruleus.

En nuestro estudio analizamos el LC en dos niveles rostrocaudales diferentes y, efectivamente, la administración de pregabalina provocó una intensa inducción de la expresión de Fos, especialmente en el nivel caudal del LC. Esta elevada inmunoreactividad frente a Fos se observó en los ejemplares de todos los grupos que recibieron pregabalina,

independientemente de la aplicación o no posterior de un estímulo doloroso.

Nuestros resultados serían coherentes con la hipótesis del grupo japonés, ya que la “desinhibición” de las neuronas del LC por efecto de la pregabalina supone de hecho una activación de las mismas compatible con el incremento de Fos observado en nuestro estudio. Sería muy interesante confirmar la naturaleza noradrenérgica de las neuronas Fos-positivas detectadas en el LC de los animales que recibieron pregabalina mediante técnicas de doble marcaje inmunocitoquímico Fos-TH (tirosinhidroxilasa).

Del mismo modo, estos resultados son compatibles con el hecho de que en un trabajo previo de nuestro laboratorio, la administración de morfina no provocó inmunorreactividad frente a Fos en el LC. Este hecho podría ser explicado porque, ciertamente, el efecto analgésico del LC dependería, como hemos comentado, de la activación de receptores no-opiáceos.

Nuestros resultados ofrecieron, además, evidencias de la participación del LC en la transmisión nociceptiva somática superficial, no así de la neuropática.

Existen, en efecto, trabajos previos en la literatura en los que se ha podido comprobar que diversos estímulos nociceptivos son capaces de activar las neuronas del LC (90, 219). En consonancia con estos datos, en nuestro grupo control nociceptivo (CNC) pudimos comprobar que la aplicación del test de la formalina fue capaz de inducir la expresión de Fos en el LC, especialmente en su mitad más caudal, sugiriendo la participación del LC en el circuito de transmisión ascendente de la información dolorosa de, al menos, naturaleza nociceptiva somática superficial.

## 6.- Núcleo del Rafe Dorsal.

El DR ha sido relacionado con la regulación de diversas funciones tales como la temperatura corporal, el sueño, la actividad cardiovascular, la secreción hormonal, el comportamiento sexual y motor, así como la modulación del dolor (para revisión ver Wang y Nakai (101)).

Al igual que el resto de centros troncoencefálicos incluidos en este trabajo, mostró una elevada inmunorreactividad frente a la subunidad  $\alpha_2\delta-1$  (98).

La estimulación eléctrica del DR se ha observado que produce una potente analgesia (150). También la administración sistémica (220) o la microinyección en el DR de morfina provocaron la aparición de comportamientos antinociceptivos (101, 150, 221).

En nuestro estudio, los datos observados en los grupos a los que se aplicó un estímulo doloroso mostraron diferencias dependiendo de la naturaleza de dicho estímulo. De esta forma, en el grupo CNC se observó una intensa inmunorreacción frente a Fos, mientras que en el grupo CNP la inmunorreactividad fue mucho menor.

Esta disparidad en la actividad del DR según la naturaleza del estímulo algésico aplicado sería compatible con los escasos trabajos previos hallados en nuestra revisión de la bibliografía.

Porro *y cols.* (137) observaron tras aplicar el test de la formalina un aumento en el consumo de 2-desoxiglucosa en el DR a los 2-3 minutos del estímulo algésico, aunque no a los 60 minutos. Lantéri-Minet *y cols.* (139) no apreciaron expresión de Fos en el DR tras estímulo nociceptivo visceral.

En principio, nuestros resultados sugieren que el DR tendría un papel importante en el circuito nociceptivo somático superficial, cosa que no podemos asegurar en el caso del dolor neuropático.

Por otro lado, y a pesar de los antecedentes que implican al DR en el control del dolor, no hemos encontrado en la literatura estudios previos en los que se analice la expresión de Fos en el DR tras la administración de analgésicos.

Nuestros resultados apuntan en la dirección de los trabajos previamente comentados, ya que la administración de la pregabalina provocó un incremento claro de los niveles de inmunorreactividad frente a Fos en el DR.

Estos resultados serían compatibles con otros previos procedentes de un experimento similar en el que se comprobó que también el metamizol era capaz de inducir Fos en el DR.

Curiosamente, y a diferencia de lo apreciado en alguna de las otras estructuras incluidas en el presente trabajo, la administración previa de pregabalina bloqueó la expresión de Fos inducida por el test de la formalina, limitándola a niveles similares a los del grupo CPG.

De los datos obtenidos podemos, por tanto, concluir que el DR estaría involucrado, tanto en los circuitos ascendente de transmisión del dolor nociceptivo somático superficial, como descendentes de control del dolor.



## **06 CONCLUSIONES**



- 1.-** La pregabalina bloquea tanto la transmisión dolorosa nociceptiva somática superficial como la neuropática.
- 2.-** El estudio de la expresión de c-fos a nivel de la médula espinal es un buen método para evaluar tanto la capacidad algésica de una sustancia o proceder como la potencia analgésica de un fármaco como la pregabalina.
- 3.-** El núcleo del tracto solitario participa en el mecanismo de acción de la pregabalina, principalmente por medio de los subnúcleos medial (m), central (ce) y ventral-lateral (vl). Sin embargo, tiene poco protagonismo en la transmisión ascendente de los estímulos dolorosos de naturaleza nociceptiva somática y neuropática.
- 4.-** La porción lateral del núcleo parabraquial participa en el mecanismo de acción de la pregabalina, principalmente por medio de los subnúcleos externo (elPB) y central (clPB). Asimismo, también desempeña un papel en los circuitos nociceptivo somático superficial y

neuropático, principalmente por medio del subnúcleo dorsal (dlPB) y el área que queda por fuera del subnúcleo central (clPB).

**5.-** El locus coeruleus participa en el mecanismo de acción de la pregabalina, especialmente su porción caudal. También forma parte del circuito nociceptivo somático superficial, pero no del neuropático.

**6.-** El núcleo dorsal del rafe participa en el mecanismo de acción de la pregabalina y en el circuito nociceptivo somático superficial pero no en circuito doloroso neuropático.

## **07 BIBLIOGRAFÍA**



1. IASP: "Subcommittee on Taxonomy. Pain terms: a list with definitions and notes on usage". *Pain*, 1979, 6: 249-252.
2. The Pain in Europe: a report. En URL: <http://www.painineurope.com>. Accedido el 9 de enero de 2011.
3. Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain*, 2006 (10): 287-333.
4. Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T, Serra J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008 Apr 29; 70(18):1630-5.
5. Dworkin RH, Backonja M, Rowbotham MC, Allen RR, Argoff CR, Bennett GJ, Bushnell MC, Farrar JT, Galer BS, Haythornthwaite JA, Hewitt DJ, Loeser JD, Max MB, Saltarelli M, Schmader KE, Stein C, Thompson D, Turk DC, Wallace MS, Watkins LR, Weinstein SM. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*. 2003 Nov 60; (11):1524-34.
6. Harden RN. Chronic Neuropathic Pain. Mechanisms, diagnosis and treatment. *The Neurologist* 2005; 11: 111-122.
7. Gilron I, Watson CP, Cahill CM, Moulin DE. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. *CMAJ*. 2006 Aug 1; 175(3): 265-75.

8. Taylor RS. Epidemiology of Refractory Neuropathic Pain. *Pain Practice*. 2006; Vol 6, issue 1: 22-26.
9. Gilron I, Coderre TJ. Emerging drugs in neuropathic pain. *Expert Opin. Emerging Drugs* 2007; 12(1):113-126.
10. Carter GT, Galer BS. Advances in the management of neuropathic pain. *Phys Med Rehabil Clin N AM*. 2001 May; 12(2):447-459.
11. Toth C, Lander J, Wiebe S. The prevalence and impact of chronic pain with neuropathic pain symptoms in the general population. *Pain Med*. 2009 Jul-Aug; 10 (5): 918-29.
12. Gálvez R, Rejas J, Pérez M, Gómez M. Prevalence of neuropathic pain in Spain: clinical, working and health care implications. *Med Clin (Barc)*. 2005 Jul 9; 125(6):221-9.
13. Vázquez K. En Portada. El dolor: un asunto tan serio para el médico como para el paciente. *Revista española de Economía de la Salud*, 2003; 2 (5): 242-244.
14. Gálvez R, Ribera MV, Rejas J, Masramon X, Ruiz M. Neuropathic Pain (NeP) impact on patient mental functioning, symptom levels of anxiety and depression, and sleep disturbance: results from the DONEGA study. *Value in Health* 2004; 7 (6): 794.
15. Montrone, V, Petruzzella, O, Petrosino, R. El dolor: un síntoma multidisciplinar. *Harofarma*. Barcelona.1992, pp: 85-193.
16. Serra J. *Tratado de dolor neuropático*. Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana, 2006.
17. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000; 288: 1765-9.
18. McQuay H, Carrol D, Jadad AR, Wiffen PJ, Moore A. Anticonvulsant drugs for management of pain: a systematic review. *BMJ* 1995; 311: 1047-52.
19. Dirks J, Fredensborg BB, Christensen D, Fomsgaard JS, Flyger H, Dahl JB. A randomized study of the effects of single-dose gabapentin versus placebo on postoperative pain and morphine consumption after mastectomy. *Anesthesiology* 2002; 97: 560-4.
20. Turan A, Karamanlioglu B, Memis D, Hamamcioglu MK, Tukenmez B, Pamukcu Z et al. Analgesic effects of gabapentin after spinal surgery. *Anesthesiology* 2004; 100: 935-938.

21. Schwarz JB, Gibbons SE, Graham SR, Colbry NL, Guzzo PR, Le VD, Vartanian MG, Kinsora JJ, Lotarski SM, Li Z, Dickerson MR, Su TZ, Weber ML, El-Kattan A, Thorpe AJ, Donevan SD, Taylor CP, Wustrow DJ. Novel cyclopropyl beta-amino acid analogues of pregabalin and gabapentin that target the alfa2-delta protein. *J. Med. Chem.* 2005; 48: 3026-3035.
22. Lauria-Horner BA, Pohl RB. Pregabalin: a new anxiolytic. *Expert Opin Investig Drugs* 2003; 12:663-672.
23. Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L. Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 1999, 80: 391-8.
24. Chen SR, Xu Z, Pan HL. Stereospecific effect of pregabalin on ectopic afferent discharges and neuropathic pain induced by sciatic nerve ligation in rats. *Anesthesiology* 2001, 95: 1473-9.
25. Dworkin RH, Corbin AE, Young JP Jr, Sharma U, LaMoreaux L, Bockbrader H et al. Pregabalin for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomized, placebo-controlled trial. *Neurology* 2003; 60: 1274-83.
26. Sabatowski R, Galvez R, Cherry DA, Jacquot F, Vincent E, Maisonobe P et al. Pregabalin reduces pain and improves sleep and mood disturbances in patients with post-herpetic neuralgia: results of a randomised, placebo-controlled clinical trial. *Pain* 2004; 109:26-35.
27. Dahl JB, Kehlet H. The value of pre-emptive analgesia in the treatment of postoperative pain. *Br J Anaesth.* 1993 Apr; 70(4):434-9.
28. Hardy A. Lyon Playfair and the idea of progress: science and medicine in Victorian parliamentary politics. *Clio Med.* 1993; 23: 81-106.
29. Munglani, R; Hunt, S. Pre-emptive analgesia. Use of immediate early genes expression as markers of neuronal stimulation. *Br J Anaesth* 1993; 71: 458.
30. Munglani, R.; Fleming, B.G.; Hunt, S.P. Remembrance of times past: the significance of c-fos in pain. *Br J Anaesth*, 1996; 76: 1-4.
31. Taylor, J.; Mellström, B.; Fernaud, I.; Naranjo, J.R. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-fos immunoreactivity in spinal cord. *Eur J Pharmacol*, 1998; 351: 39-47.

32. Whiteside GT, Harrison J, Boulet J, Mark L, Pearson M, Gottshall S et al. Pharmacological characterisation of a rat model of incisional pain. *Br J Pharmacol* 2004; 141:85-91
33. Field MJ, Oles RJ, Lewis AS, McCleary S, Hughes J, Singh L. Gabapentin (neurontin) and S-( $\beta$ )-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1513-22.
34. Hill CM, Balkenohl M, Thomas DW, Walker R, Mathe H, Murray G. Pregabalin in patients with postoperative dental pain. *Eur J Pain* 2001; 2: 119-24.
35. Muriel Villoria, C; Madrid Arias, JL. Consideraciones en torno al tratamiento farmacológico del dolor. *Europharma*. Madrid 1993; pp 39-91.
36. Sherrington, C.S. The integrative action of the nervous system. Yale University Press. New Haven 1906. Citado en: Willis, W.D.; Westlund, K.N.; Carlton, SM (1994) Pain. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed). Academic Press. Sydney. pp 725-750.
37. Besson, JA; Chaouch, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev* 1987; 67: 67-186.
38. Adams, RD; Victor, M. Principios de neurología. 2ªed. Reverté. Barcelona. 1992; pp 101-115.
39. Willis, WD; Westlund, KN; Carlton, SM. Pain, 1995. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed). Academic Press. Sydney. pp 725-750.
40. Paxinos, G.; Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Fifth Ed. Elsevier Academic Press. London. 2005.
41. Gobel, S. Golgi studies of the neurons in layer II of the dorsal horn of the medulla (trigeminal nucleus caudalis). *J Comp Neurol* 1978; 180: 395-414.
42. Price, DD; Hayaski, H; Dubner, R; Ruda, MA. Functional relationships between neurons of the marginal and substantia gelatinosa layers of the primate dorsal horn. *J Neurophysiol* 1979; 42: 1590-1608.
43. Molander, C; Grant, G. Spinal cord cytoarchitecture. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. 1995; pp 39-45.

44. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science*. 1965 Nov 19; 150 (699): 971-9.
45. Hosobuchi, Y; Adams, JE; Linchitz, R. Pain relief by electrical stimulation of the central gray matter in humans and its reversal by naloxone. *Science* 1977; 197: 183-186.
46. Basbaum, AI; Fields, HL. Endogenous pain control mechanisms: Review and hypothesis. *Ann Neurol* 1978; 4: 451-462.
47. Basbaum, AI; Fields, HL. 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* 1979; 187: 513-532.
48. Basbaum, AI; Fields, HL. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7: 309-338.
49. Testut, L; Latarjet, A. Tratado de anatomía humana. Tomo II. Salvat. Barcelona. 1973; p 886.
50. Latarjet, M; Ruiz Liard, A. Anatomía humana. Tomo I. 2ª ed. Panamericana. México. 1990; p 178.
51. Beitz, AJ. Periaqueductal gray. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. 1995; pp 173-182.
52. Mantyh, PW. (1982) The midbrain periaqueductal gray in the rat, cat and monkey: a Nissl, Weil and Golgi analysis. *J Comp Neurol* 204: 349-363.
53. Beitz, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *J Comp Neurol* 1982; 237: 445-459.
54. Beitz, AJ; Shepard, RD. The midbrain periaqueductal gray in the rat. II. A Golgi analysis. *J Comp Neurol* 1985; 237: 460-475.
55. Nieuwenhuys, R, Voogd, J, Van Huijzen, C. *The human central nervous system. A synopsis and atlas*. 3rd ed. Springer-Verlag. Berlin. 1988; pp 321-323.
56. Van Bockstaele, EJ, Aston-Jones, G, Pieribone, VA, Ennis, M, Shipley, MT. Subregions of the periaqueductal gray topographically innervate the rostral ventral medulla in the rat. *J Comp Neurol* 1991; 309: 305-327.

57. Cameron, AA, Khan, IA, Westlund, KN, Cliffer, KD, Willis, WD. The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: A phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections. *J Comp Neurol* 1995; 351: 568-584.
58. Cameron, AA; Khan, IA; Westlund, KN; Willis, WD The efferent projection of the periaqueductal gray in the rat: A phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. II. Descending projections. *J comp Neurol* 1995; 351: 585-601.
59. Bandler, R; Carrive, P. Integrated defence reaction elicited by excitatory amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of the unrestrained cat. *Brain Res* 1988; 439: 95-106.
60. Bandler, R; Depaulis, A. 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. 1991; pp 175-198.
61. Carrive, P; Bandler, R. Viscerotopic organization of neurons subserving hypotensive reactions within the midbrain periaqueductal gray: a correlative functional and anatomical study. *Brain Res* 1991; 541: 206-215.
62. Harper, RM; Ni, H; Zhang, J. 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. 1991; pp 41-55.
63. Lovick, TA. Integrated activity of cardiovascular and pain regulatory systems: role in adaptive behavioural responses. *Prog Neurobiol* 1993; 40: 631-644.
64. Jürgens, U. 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. 1991; 11-21.
65. Larson, CR. 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. 1991; 23-40.
66. Ogawa, S; Kow, LM; McCarthy, MM; Pfaff, DW; Schwartz-Giblin, S. 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. 1991; 211-235.
67. Schwartz-Giblin S, McCarthy MM. A sexual column in the PAG?. *Trends Neurosci*, 1995 Mar; 18 (3): 129.
68. Fields, HL; Heinricher, MM; Mason, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 219-245.
69. Keay, KA; Bandler, R. Deep and superficial noxious stimulation increase Fos-like immunoreactivity in different regions of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Neurosci Lett* 1993; 154: 23-26.
70. Keay, KA; Clement, CJ; Oowler, B; Depaulis, A; Bandler, R. Convergence of deep somatic and visceral nociceptive information onto a discrete ventrolateral midbrain periaqueductal gray region. *Neuroscience* 1994; 61: 727-732.
71. Fanselow, MS. 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. 1991; 151-173.
72. Hamilton, BL. Cytoarchitectural subdivisions of the periaqueductal gray matter in the cat. *J Comp Neurol* 1973; 149: 1-28.
73. Conti, F; Barbaresi, P; Fabri, M. Cytochrome oxidase histochemistry reveals regional subdivisions in the rat periaqueductal gray matter. *Neuroscience* 1988; 24: 629-633.
74. Meller, ST; Dennis, BJ. Quantitative Nissl study of the neuronal types, and recognition of cytoarchitectural subdivisions, within the rabbit periaqueductal gray. *J Comp Neurol* 1990; 302: 87-99.
75. Valverde Navarro, AA; Olucha, FE; García Verdugo, JM; Hernández Gil De Tejada, T; Ruiz Torner, A Martínez Soriano, F. Distribution of basal-expressed c-fos-like immunoreactive cells of the periaqueductal grey matter of the rat. *Neuroreport* 1996; 7: 2749-2752.
76. Reynolds, DV. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science* 1969; 164: 444-445.

77. Sakuma, Y; Pfaff, DW. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. *Am J Physiol* 1979; 237: R278-R284.
78. Cannon, JT; Prieto, GJ; Lee, A; Liebeskind, JC. Evidence for opioid and nonopioid forms of stimulation-produced analgesia in the rat. *Brain Res* 1982; 243: 315-321.
79. Prieto, GJ; Cannon, JT; Liebeskind, JC. Nucleus raphe magnus lesions disrupt stimulation-produced analgesia from ventral but not dorsal midbrain areas in the rat. *Brain Res* 1983; 261: 53-57.
80. Carrive P, Bandler R. Control of extracranial and hindlimb blood flow by the midbrain periaqueductal grey of the cat. *Exp Brain Res*. 1991; 84(3):599-606.
81. Mccarthy, MM; Pfaff, DW; Schwartz-Giblin, S. Midbrain central gray GABA<sub>A</sub> receptor activation enhances and blockade reduces sexual behavior in the female rat. *Exp Brain Res* 1991; 86: 108-116.
82. Morgan, MM. 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. 1991; pp 139-150.
83. Bandler, R; Carrive, P; Depaulis, A. 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. 1991; pp 1-8.
84. Bandler, R; Shipley, MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: medules dor emotional expression? *Trends Neurosci* 1994; 17: 379-389.
85. Onstott, D; Mayer, B; Beitz, AJ. 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* 1993; 610: 317-324.
86. Sandkühler, J. 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. 1991; pp 267-286.

87. Sandkühler, J; Herdegen, T. Distinct patterns of activated neurons throughout the rat midbrain periaqueductal gray induced by chemical stimulation within its subdivisions. *J Comp Neurol* 1995; 357: 546-553.
88. Li, YW; Dampney, RAL. Expression of fos-like protein in brain following sustained hypertension and hypotension in conscious rabbits. *Neuroscience* 1994; 61: 613-634.
89. Murphy, AZ; Ennis, M; Rizvi, TA; Behbehani, MM; Shipley, MT. 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* 1995; 360: 286-300.
90. Clement, CI; Keay, KA; Owlser, BK; Bandler, R. Common patterns of increased and decreased fos expression in midbrain and pons evoked by noxious deep somatic and noxious visceral manipulations. *J Comp Neurol* 1996; 366: 495-515.
91. Gebhart, GF; Sandkuhler, J; Thalhammer, JG; Zimmermann, M. 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* 1983; 50: 1446-1458.
92. Chung, RY; Mason, P; Strassman, A; Maciewicz, R. Suppression of the jaw-opening reflex by periaqueductal gray stimulation is decreased by paramedian brainstem lesions. *Brain Res* 1986; 403: 172-176.
93. Beitz, AJ. The organization of afferent projections to the periaqueductal gray of the rat. *Neuroscience* 1982; 7: 133-159.
94. Meng, XW; Budra, B; Skinner, K; Ohora, PT; Fields, HL. Noradrenergic input nociceptive modulatory neurons in the rat rostral ventromedial medulla. *J Comp Neurol* 1997; 377: 381-391.
95. Martin GF, Vertes RP, Waltzer R. Spinal projections of the gigantocellular reticular formation in the rat. Evidence for projections from different areas to laminae I and II and lamina IX. *Exp Brain Res.* 1985; 58 (1):154-62
96. Mason P, Fields HL. Axonal trajectories and terminations of on- and off-cells in the cat lower brainstem. *J Comp Neurol.* 1989 Oct 8;288(2):185-207.
97. Skinner, K; Fields, HL; Basbaum, AI; Mason, P. GABA-Immunoreactive boutons contact identified OFF and ON cells in the nucleus raphe magnus. *J Comp Neurol* 1997; 378: 196-204.

98. Cole RL, Lechner SM, Williams ME, Prodanovich P, Bleicher L, Varney MA, Gu G. Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta(alpha2delta) subunit mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*. 2005 Oct 24; 491(3):246-69.
99. Törk, I. Raphe nuclei and serotonin containing systems. En: *The rat nervous system. Vol 2. Hindbrain and spinal cord*. Paxinos, G. (ed.) Academic Press. 1985; Sydney. 43-78.
100. Ivanov A, Aston-Jones G. Extranuclear dendrites of locus coeruleus neurons: activation by glutamate and modulation of activity by alpha adrenoceptors. *J. Neurophysiol*. 1995 Dec; 4 (6):2427-36.
101. Wang, Q.P.; Nakai, Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull*; 1994, 34: 575-585.
102. Wang, Q.P.; Nakai, Y. Immunoelectron microscopy of  $\beta$ -endorphinergic synaptic innervation of nitric oxide synthase immunoreactive neurons in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 1995; 684: 185-193.
103. Fallon JH, Loughlin SE. Locus coeruleus. En: *The rat nervous system. Vol. 2. Hindbrain and spinal cord*. Paxinos, G. (ed.) Academic Press. Sydney. 1985; pp. 79-93.
104. Hermanson, O.; Blomqvist, A. Subnuclear localization of Fos-like immunoreactivity in the rat parabrachial nucleus after nociceptive stimulation. *J Comp Neurol* 1996; 368: 45-56.
105. Bystrzycka, E.K.; Nail, B.S. Brain stem nuclei associated with respiratory, cardiovascular and other autonomic functions. En: *The rat nervous system. Vol. 2. Hindbrain and spinal cord*. Paxinos, G. (ed.) Academic Press. Sydney. 1985; pp 95-110.
106. Norgen, R. Gustatory system. En: *The rat nervous system. 2nd ed*. Paxinos, G. (ed.) 1995; Academic Press. Sydney. pp 751-771.
107. Herbert, H.; Saper, C.B. Organization of medullary adrenergic and noradrenergic projections to the periaqueductal gray in the rat. *J Comp Neurol* 1992; 315: 34-52.
108. Saper, C.B. Central autonomic system. En: *The rat nervous system. 2nd ed*. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. 1995; 107-135.

109. Ammons, WE; Blair, RW; Foreman, RD. Vagal afferent inhibition of primate thoracic spinothalamic neurons. *J Neurophysiol* 1983; 50: 926-939.
110. Palkovits, M; Mezey, E; Eskay, E; Eskay, RL. Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alfa-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat. *Brain Res* 1987; 436: 323-328.
111. Randich, A; Roose, MG; Gebhart, GF. Characterization of antinociception produced by glutamate microinjection in the nucleus tractus solitarius and the nucleus reticularis ventralis. *J Neurosci* 1988; 8: 4675-4684.
112. Morgan, MM; Sohn, JH; Lohof, AM; Ben-Eliyahu, S; Liebeskind, JC. Characterization of stimulation-produced analgesia from the nucleus tractus solitarius in the rat. *Brain Res* 1989; 486: 175-180.
113. Yew, DT; Luo, CB; Zheng, DR; Guan, YL; Lin, YQ; Chen, WZ. Development and localization of enkephalin and substance P in the nucleus of tractus solitarius in the medulla oblongata of human fetuses. *Neuroscience* 1990; 34: 491-498
114. Hammond, DL; Presley, R; Gogas, KR; Basbaum, AI. Morphine or U-50,488 supresses Fos protein-like immunoreactivity in the spinal cord and nucleus tractus solitarii evoked by a noxious visceral stimulus in the rat. *J Comp Neurol* 1992; 315: 244-253.
115. Wiertelak, EP; Roemer, B; Maier, SF; Watkins, LR. Comparison of the effects of nucleus tractus solitarius and ventral medial medulla lesions on illness-induced and subcutaneous formalin-induced hyperalgesias. *Brain Res* 1997; 748: 143-150.
116. Morgan, JI; Curran, T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 421-451.
117. Etienne-Decant, J. *Manual de bioquímica genética*. Masson. Barcelona. 1990: pp 149-165.
118. Sambucetti LC, Curran T. The Fos protein complex is associated with DNA in isolated nuclei and binds to DNA cellulose. *Science*. 1986 Dec 12; 234(4782):1417-9.
119. Curran T, Abate C, Cohen DR, Macgregor PF, Rauscher FJ 3rd, Sonnenberg JL, Connor JA, Morgan JI. Inducible proto-oncogene transcription factors: third messengers in the brain? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1990;55:225-34.

120. Distel RJ, Spiegelman BM. Protooncogene c-fos as a transcription factor. *Adv Cancer Res.* 1990; 55:37-55.
121. Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 1990 Apr; 4(4):477-85.
122. Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell.* 1988 Nov 4; 55(3):395-7.
123. Sagar, SM; Sharp, FR; Curran, T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988; 240: 1328-1331.
124. Menétrey, D; Gannon, A; Levine, JD; Basbaum, AI. 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* 1989; 285: 177-195.
125. Dragunow, M; Faull, R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 1989; 29: 261-265.
126. Bullit, E. Expression of c-fos-like protein as a marker for neurone activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 269: 517-530.
127. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci.* 1989 Nov; 12(11):459-62.
128. Kaneko M, Mestre C, Sánchez EH, Hammond DL .Intrathecally administered gabapentin inhibits formalin-evoked nociception and the expression of Fos-Like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 743-751.
129. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain.* 1977 Dec; 4(2):161-74
130. Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain.* 1988 Apr; 33(1):87-107.
131. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983 Jun; 16 (2):109-10.

132. Herdegen, T.; Kovary, K.; Leah, J.; Bravo, R. Specific temporal and spatial distribution of Jun, Fos and Krox-24 proteins in spinal neurons following noxious transsynaptic stimulation. *J Comp Neurol* 1991; 313: 178-191.
133. Takayama K, Suzuki T, Miura M. The comparison of effects of various anesthetics on expression of Fos protein in the rat brain. *Neurosci Lett*. 1994 Jul 18; 176 (1):59-62.
134. Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol*. 1981 Jun; 75 (6):816-21.
135. Fulwiler CE, Saper CB. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res*. 1984 Aug; 319 (3):229-59.
136. Sokal, R.R.; Rholf, J. *Biometry*. Third Edition. W.H. Freeman and Co. New York 1995.
137. Porro, C.A.; Cavazzuti, M.; Galetti, A.; Sassatelli, L. Functional activity mapping of the rat brainstem during formalin-induced noxious stimulation. *Neuroscience* 1991; 41: 667-680.
138. Porro, C.A.; Cavazzuti, M.; Galetti, A.; Sassatelli, L.; Barbieri, G.C. Functional activity mapping of the rat spinal cord during formalin-induced noxious stimulation. *Neuroscience* 1991; 41: 655-665.
139. Lantéri-Minet, M.; Isnardon, P.; De Pommery, J.; Menétrey, D. Spinal and midbrain structures involved in visceroreception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins. *Neuroscience* 1993; 55: 737-753.
140. Lantéri-Minet, M.; Weil-Fugazza, J.; De Pommery, J.; Menétrey, D. Hindbrain structures involved in pain processing as revealed by the expression of c-fos and other immediate early gene proteins. *Neuroscience* 1994; 58: 287-298
141. Rodella, L.; Rezzani, R.; Gioia, M.; Tredici, G.; Bianchi, R.) Expression of Fos immunoreactivity in the rat supraspinal regions following noxious visceral stimulation. *Brain Res Bull* 1998; 47: 357-366.
142. Bellavance, L.L.; Beitz, A.J. Altered c-fos expression in the parabrachial nucleus in a rodent model of CFA-induced peripheral inflammation. *J Comp Neurol* 1996; 366: 431-447.

143. Li, L.; Ding, J.; Ren,Z.; Han,Q.; Hu, G.; Xiao, M. Expression and colocalization of NADPH-diaphorase and Fos in the subnuclei of the parabrachial nucleus in rats following visceral noxious stimulation. *Brain Res* 2006; 1114: 41-52.
144. Jergova, S.; Kolesar, D.; Cizkova, D. Expression of c-Fos in the parabrachial nucleus following peripheral nerve injury in rats. *European Journal of Pain* 2008; 12: 172-179.
145. Sokoloff, L.; Reivich, M.; Kennedy, C.; Des Rosiers, M.H.; Patlak, C.S.; Pettigrew, K.D.; Sakurada, O.; Shinohara, M. The <sup>14</sup>C-deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 1977; 28: 897-931.
146. Porro, C.A.; Cavazzuti, M. Spatial and temporal aspects of spinal cord and brainstem activation in the formalin pain model. *Prog Neurobiol* 1993; 41: 565-607.
147. Hunt, S.P.; Pini, A.; Evan, G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987; 328: 632-634.
148. Sharp FR, Sagar SM, Swanson RA. Metabolic mapping with cellular resolution: c-fos vs. 2-deoxyglucose. *Crit Rev Neurobiol.* 1993; 7(3-4):205-28.
149. Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 1998; 45: 1-8.
150. Stamford, J.A. Descending control of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 217-227.
151. Preysler, R.W.; Menétrey, D.; Levine, J.D.; Basbaum, A.J. ystemic morphine supresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1990; 10: 323-335.
152. Bullit, E. Somatotopy of spinal nociceptive processing. *J Comp Neurol* 1991; 312: 279-290.
153. Buritova, J.; Honore, P.; Chapman, V.; Besson, J.M. Carrageenan oedema and spinal Fos-LI neurones are reduced by peroxicam in the rat. *Neuroreport* 1995; 6:1257-1260.
154. Chapman, V.; Honore, P.; Buritova, J.; Besson, J.M. Cholecystokinin B receptor antagonism enhaces the ability of a low dose of morphine to reduce c-fos expression in the spinal cord of the rat. *Neuroscience* 1995; 67:731-739.

155. Chapman V, Honoré P, Buritova J, Besson JM. The contribution of NMDA receptor activation to spinal c-Fos expression in a model of inflammatory pain. *Br J Pharmacol.* 1995 Sep; 116(1):1628-34.
156. Tavares, I.; Albino-Teixeira, A.; Lima, D. Hypertension inhibits noxious-evoked c-fos expression in the rat spinal cord. *Neuroreport* 1995; 6: 1664-1668.
157. Abbadie, C.; Besson, J.M. Effects of morphine and naloxone on basal and evoked Fos-like immunoreactivity in lumbar spinal cord neurons of arthritic rats. *Pain* 1993; 52: 29-39.
158. Hammond, D.L.; Presley, R.; Gogas, K.R.; Basbaum, A.I. Morphine or U-50,488 supresses Fos protein-like immunoreactivity in the spinal cord and nucleus tractus solitarii evoked by a noxious visceral stimulus in the rat. *J Comp Neurol* 1992; 315: 244-253.
159. Traub, R.J.; Stitt, S.; Gebhart, G.F. Attenuation of c-Fos expression in the rat lumbosacral spinal cord by morphine or tramadol following noxious colorectal distention. *Brain Res* 1995; 701: 175-182.
160. Kajander KC, Madsen AM, Iadarola MJ, Draisci G, Wakisaka S. Fos-like immunoreactivity increases in the lumbar spinal cord following a chronic constriction injury to the sciatic nerve of rat. *Neurosci Lett.* 1996 Mar 8;206(1):9-12.
161. Yamazaki Y, Maeda T, Someya G, Wakisaka S. Temporal and spatial distribution of Fos protein in the lumbar spinal dorsal horn neurons in the rat with chronic constriction injury to the sciatic nerve. *Brain Res.* 2001 Sep 28;914(1-2):106-14.
162. Ro LS, Li HY, Huang KF, Chen ST. Territorial and extra-territorial distribution of Fos protein in the lumbar spinal dorsal horn neurons in rats with chronic constriction nerve injuries. *Brain Res.* 2004 Apr 9;1004(1-2):177-87.
163. Tölle, T.R.; Schadrack, J.; Castro-Lopes, J.M.; Evan, G.; Roques, B.P.; Zieglgansberger, W. Effects of kelaforphan and morphine before and after noxious stimulation on immediate-early gene expression in rat spinal cord neurons. *Pain* 1994; 56: 103-112.
164. Tölle, T.R.; Herdegen, T.; Schadrack, J.; Bravo, R.; Zimmermann, M.; Zieglgänsberger, W. Application of morphine prior to noxious stimulation differentilly medulates expression of FOS, JUN, and KROX-24 proteins in rat spinal cord neurons. *Neuroscience* 1994; 58: 305-321.

165. Buritova J, Honoré P, Chapman V, Besson JM. Concurrent reduction of inflammation and spinal Fos-LI neurons by systemic diclofenac in the rat. *Neurosci Lett*. 1995 Mar 31;188(3):175-8.
166. Norgren, R. Gustatory system. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. 1995; pp 751-771.
167. Rutherford, S.D.; Widdop, R.E.; Sannajust, F.; Louis, W.J.; Gundlach, A.L. 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*1992; 13: 301-312.
168. Jones, S.L.; Blair, R.W. Noxious heat-evoked Fos-like immunoreactivity in the rat medulla, with emphasis on the catecholamine cell groups. *J Comp neurol* 1995; 354: 410-422.
169. Bester, H.; Matsumoto, N.; Besson, J.M.; Bernard, J.F. Further evidence for the involvement of the spinoparabrachial pathway in nociceptive processes: a c-fos study in the rat. *J Comp Neurol* 1997; 383: 439-458.
170. Kalia, M.; Sullivan, J.M. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol* 1982; 211: 248-264.
171. Lewis, J.W.; Baldrighi, G; Akil, H. A posible interface between autonomic function and pain control: opioid analgesia and the nucleus tractus solitarius. *Brain Res* 1987; 424: 65-70.
172. Aicher, S.A.; Randich, A. Antinociception and cardiovascular responses produced by electrical stimulation in the nucleus tractus solitarius, nucleus reticularis ventralis, and the caudal medulla. *Pain* 1990; 42: 103-119.
173. Du, H.J.; Zhou, S.Y. Involvement of solitary tract nucleus in control of nociceptive transmission in cat spinal cord neurons. *Pain* 1990; 40: 323-331.
174. Randich, A.; Aicher, S.A. Medullary substrates mediating antinociception produced by electrical stimulation of the vagus. *Brain Res* 1988; 445: 68-76.
175. Bernanrd, J.F.; Huang, G.F.; Besson, J.M. The parabrachial area: electrophysiological evidence for an involvement in visceral nociceptive processes. *J Neurophysiol*. 1994; 71:1646-1660.

176. Buritova, J.; Besson, JM.; Bernard, J. Involvement of the spinoparabrachial pathway in inflammatory nociceptive processes: a c-fos protein study in the awake rat. *J Comp Neurol* 1988; 397: 10–28.
177. Richard, S.; Engblom, D.; Paues, J.; Mackerlova L.; Blomqvist, A. 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* 2005; 481: 210–219.
178. Chamberlin NL, Saper CB. Topographic organization of cardiovascular responses to electrical and glutamate microstimulation of the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1992; 326(2):245-62.
179. Saleh TM, Connell BJ. Modulation of the cardiac baroreflex following reversible blockade of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.* 1997; 767(2):201-7.
180. Guo, Z.L.; Moazzam, A.R.; Longhurst, J.C. Stimulation of cardiac sympathetic afferents activates glutamatergic neurons in the parabrachial nucleus: relation to neurons containing nNos. *Brain Res.* 2005; 1053: 97-107.
181. Nishijo H, Norgren R. Responses from parabrachial gustatory neurons in behaving rats. *J Neurophysiol.* 1990 Apr;63(4):707-24.
182. Mizusawa A, Ogawa H, Kikuchi Y, Hida W, Shirato K. Role of the parabrachial nucleus in ventilatory responses of awake rats. *J Physiol.* 1995; 489 ( Pt 3):877-84.
183. Herdegen, T.; Kovary, K.; Buhl, A.; Bravo, R.; Zimmermann, M.; Gass, P. 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* 1995; 354: 39-56.
184. Ceccatelli, S; Villar, M.J; Goldstein, M; Hökfelt, T. Expression of c-fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc.Natl.Acad. Sci.* 1989; 86: 9569-9573.
185. Sharp FR, Sagar SM, Hicks K, Lowenstein D, Hisanaga K.) c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *J neurosci.* 1991; 11(8):2321-31.
186. Krukoff, TL; Khalili, P. Stress-induced activation of nitric oxide-producing neurons in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1977; 377: 509-519.

187. Herbert H.; Moga, M.M.; Saper, C.B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 293: 540-580.
188. Cechetto DF, Standaert DG, Saper CB. Spinal and trigeminal dorsal horn projections to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1985; 240(2):153-60.
189. Hylden JL, Anton F, Nahin RL. Spinal lamina I projection neurons in the rat: collateral innervation of parabrachial area and thalamus. *Neuroscience.* 1989; 28(1):27-37.
190. Slugg RM, Light AR. Spinal cord and trigeminal projections to the pontine parabrachial region in the rat as demonstrated with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol.* 1994 Jan 1; 339(1):49-61.
191. Bernard JF, Dallel R, Raboisson P, Villanueva L, Le Bars D. Organization of the efferent projections from the spinal cervical enlargement to the parabrachial area and periaqueductal gray: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol.* 1995 Mar 20; 353(4):480-505.
192. Feil K, Herbert H. Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei. *J Comp Neurol.* 1995 Mar 20; 353(4):506-28.
193. Spike RC, Puskár Z, Andrew D, Todd AJ. A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur J Neurosci.* 2003; 18(9):2433-48.
194. Bourgeais L.; Gauriau C.; Monconduit L.; Villanueva L.; Bernard J.F. Dendritic domains of nociceptive-responsive parabrachial neurons match terminal fields of lamina I neurons in the rat. *J Comp Neurol.* 2003 ; 464(2):238-56.
195. Bernard, J.F.; Besson, J.M. The spino-(trigemino)-pontoamygdaloid pathway: Electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.*1990; 63: 473-490.
196. Bernanrd, J.F.; Alden, M.; Besson, J.M. 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.* 1993; 329:201-29.
197. Bester H, Menendez L, Besson JM, Bernard JF. Spino-(trigemino)-parabrachiohypothalamic pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J Neurophysiol.* 1995 Feb; 73(2):568-85.

198. Menendez L, Bester H, Besson JM, Bernard JF. Parabrachial area: electrophysiological evidence for an involvement in cold nociception. *J Neurophysiol.* 1996; 75(5):2099-116.
199. Hiroshima K, Maeda T, Hanada K, Wakisaka S. Temporal and spatial distribution of Fos protein in the parabrachial nucleus neurons during experimental tooth movement of the rat molar. *Brain Res.* 2001; 27;908(2):161-73.
200. Krout, K.; Jansen, A.; Loewy, D. Periaqueductal Gray Matter Projection to the Parabrachial Nucleus in Rat Periaqueductal Gray Matter Projection to the Parabrachial Nucleus in Rat. *J Comp Neurol.* 1998; 401:437-454.
201. Behbehani, M.M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog Neurobiol* 1995; 46: 575-605.
202. Hayward L.; Castellanos M. Increased c-Fos expression in select lateral parabrachial subnuclei following chemical versus electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray in rats. *Brain Research* 2003; 974: 153–166.
203. Holstege G. Anatomical evidence for a strong ventral parabrachial projection to nucleus raphe magnus and adjacent tegmental field. *Brain Res.* 1988; 26; 447(1):154-8.
204. Katayama Y, Tsubokawa T, Maejima S, Yamamoto T. Responses of raphe-spinal neurons to stimulation of the pontine parabrachial region producing behavioral nociceptive suppression in the cat. *Appl Neurophysiol.* 1986; 49(3):112-20.
205. Petrov T, Krukoff TL, Jhamandas JH. The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: a combined double retrograde and immunocytochemical study. *J Comp Neurol.* 1992; 318(1):18-26.
206. Petrov T, Jhamandas JH, Krukoff TL. Characterization of peptidergic efferents from the lateral parabrachial nucleus to identified neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat.* 1992; 5(5):367-73.
207. Katayama Y, Subokawa T, Hirayama T, Yamamoto T. Pain relief following stimulation of the pontomesencephalic parabrachial region in humans: brain sites for nonopiate-mediated pain control. *Appl Neurophysiol.* 1985; 48(1-6):195-200.
208. Brennan TJ, Oh UT, Girardot MN, Ammons WS, Foreman RD. Inhibition of cardiopulmonary input to thoracic spinothalamic tract cells

- by stimulation of the subcoeruleus-parabrachial region in the primate. *J Auton Nerv Syst.* 1987 Jan;18(1):61-72.
209. Chiang CY, Sessle BJ, Hu JW. 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.* 1995 62(1):61-8.
210. Meng ID, Hu JW, Bereiter DA. Parabrachial area and nucleus raphe magnus inhibition of corneal units in rostral and caudal portions of trigeminal subnucleus caudalis in the rat. *Pain.* 2000 Sep; 87(3):241-51.
211. Katayama Y, Watkins LR, Becker DP, Hayes RL. Evidence for involvement of cholinergic cells of the parabrachial region in environmentally induced nociceptive suppression in the cat. *Brain Res.* 1984; 299(2):348-53.
212. Hermanson, O.; Ericson H.; Larhammar, D.; Blomqvist, A. Expression of FOS-like immunoreactivity and preproenkephalin mRNA in the rat parabrachial nucleus after nociceptive mechanical stimulation of the skin. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1992; 18: 832.
213. Johnston HM, Morris BJ. 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.* 1994; 25(1-2):147-50.
214. Aston-Jones, G.; Shipley M.T.; Grzanna, R. The locus coeruleus, A5 and A7 noradrenergic cell groups. En: *The rat nervous system.* 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. 1995; pp 183-213.
215. Bauer CS, Nieto-Rostro M, Rahman W, Tran-Van-Minh A, Ferron L, Douglas L, Kadurin I, Sri Ranjan Y, Fernandez-Alacid L, Millar NS, Dickenson AH, Lujan R, Dolphin AC. The increased trafficking of the calcium channel subunit  $\alpha 2\delta$ -1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the  $\alpha 2\delta$  ligand pregabalin. *J Neurosci.* 2009 Apr 1; 29(13):4076-88.
216. Bauer CS, Tran-Van-Minh A, Kadurin I, Dolphin AC. A new look at calcium channel  $\alpha 2\delta$  subunits. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Oct; 20(5):563-71.
217. Hayashida K, Obata H, Nakajima K, Eisenach JC. Gabapentin acts within the locus coeruleus to alleviate neuropathic pain. *Anesthesiology.* 2008 Dec; 109(6):1077-84.;

218. Tanabe M, Takasu K, Takeuchi Y, Ono H. Pain relief by gabapentin and pregabalin via supraspinal mechanisms after peripheral nerve injury. *J Neurosci Res.* 2008 Nov 15; 86(15):3258-64.
219. Hong M, Milne B, Loomis CW, Jhamandas K. In vivo catechol activity in the rat locus coeruleus following different nociceptive stimuli and naloxone. *Can J Physiol Pharmacol.* 1992 Aug; 70(8):1082-9.
220. Romandini S, Samanin R. Muscimol injections in the nucleus raphé dorsalis block the antinociceptive effect of morphine in rats: apparent lack of 5-hydroxytryptamine involvement in muscimol's effect. *Br J Pharmacol.* 1984 Jan; 81(1):25-9.
221. Dupouy V, Zajac JM. Effects of neuropeptide FF analogs on morphine analgesia in the nucleus raphe dorsalis. *Regul Pept.* 1995 Nov 10; 59(3):349-56.