

TESIS DOCTORAL

Departamento de Cirugía

“Efecto de la Duloxetina sobre la expresión de Fos en el tronco del encéfalo y en la médula espinal de la rata en modelos de dolor persistente”

Doctorando: Juan Carlos TORNERO TORNERO

Directores de tesis: Prof. Dr. D. Fco Javier Belda Nácher
Prof. Dr. D. Francisco Martínez Soriano
Prof. Dr. D. Alfonso A. Valverde Navarro

2015



Valencia, Octubre de 2015

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

Prof D. FRANCISCO JAVIER BELDA NACHER, Doctor en Medicina y Profesor Titular del Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia,

Prof D. FRANCISCO MARTÍNEZ SORIANO, Doctor en Medicina y Catedrático del Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de Valencia,

Prof D. ALFONSO AMADOR VALVERDE NAVARRO, Doctor en Medicina y Profesor Titular del Departamento de Anatomía y Embriología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN: Que **D. JUAN CARLOS TORNERO TORNERO** ha realizado, bajo su dirección, en el Departamento de Cirugía y en el Departamento de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia la tesis titulada: "Efecto de la Duloxetina sobre la expresión de Fos en el tronco del encéfalo de la médula espinal de la rata en modelos de dolor persistente."

Y para que conste, y a los efectos oportunos, firman el presente documento en Valencia, a 1 de Octubre de 2015.

Fdo.: Prof. Dr. D. F Javier Belda Nácher

Fdo.: Prof. Dr. D. Fco Martínez Soriano

Fdo.: Prof. Dr. D. Alfonso A. Valverde Navarro

Agradecimientos

Al profesor Martínez Soriano, por estar siempre dispuesto a ayudarme en aquellas inquietudes científicas y docentes que he tenido y por guiarme desde mi época de pregrado.

Al profesor Alfonso Valverde, por abrirme las puertas de la investigación en dolor desde el departamento de anatomía a través del grupo de estudio del sustrato anatómico del dolor y la analgesia (Gesada). Ha convertido en fácil lo que realmente era para mí complejo.

Al profesor Javier Belda, por ser ejemplo de dedicación a la investigación.

A todos los compañeros investigadores del departamento de Anatomía, especialmente a Arantxa Blasco Serra y Eva María González Soler, por sus horas de dedicación para que esta tesis doctoral pudiese ver la luz.

Un especial recuerdo al Dr Luis Aliaga Font que lo ha sido todo para mi a nivel profesional, él fue quien me introdujo el interés por los temas relacionados con el tratamiento del dolor. Con él crecí profesionalmente y nos fuimos convirtiendo en grandes amigos, siento enormemente su pérdida hace apenas unos días. Mi mas sincero homenaje y lamento profundamente que se haya ido demasiado pronto.

A mi mujer, Mónica Fernández, por todo lo que ha hecho a lo largo de estos años de convivencia para que me pudiera desarrollar profesional y personalmente. Sin el apoyo incondicional de ella habría sido imposible, y sobretodo por no exigirme nada a cambio y por apoyarme en las decisiones que he ido tomando.

A mis hijos, Adrián, Juan Carlos e Ismael, por ser el centro de mi vida y por esa alegría y vitalidad que emanan. Son mi motor, son por lo que vale la pena luchar y esforzarse.

A mis padres, Juan y Cari, por enseñarme que el esfuerzo y la dedicación son el eje que ha de guiar nuestras vidas.

INDICE

1- INTRODUCCIÓN

- 1.1. Definición y epidemiología del dolor
- 1.2. Impacto económico del dolor
- 1.3. Tipos de dolor
- 1.4. Tratamiento del dolor
 - 1.4.1. Tratamiento Farmacológico del Dolor Neuropático.
 - 1.4.2. Antidepresivos en dolor crónico
- 1.5. Duloxetina.
 - 1.5.1. Descripción.
 - 1.5.2. Mecanismo de acción.
 - 1.5.3. Farmacocinética.
 - 1.5.4. Indicaciones.
 - 1.5.5. Posología.
 - 1.5.6. Contraindicaciones.
 - 1.5.7. Efectos secundarios.
 - 1.5.8. Eficacia clínica y seguridad.
- 1.6. Sustrato Anatómico del Dolor y la Analgesia.
 - 1.6.1. Circuitos Ascendentes de Transmisión del Dolor.
 - 1.6.1.1. Receptores.
 - 1.6.1.2. Fibras Nerviosas.
 - 1.6.1.3. Asta Posterior o Dorsal de la Médula.
 - 1.6.1.4. Vías Ascendentes.
 - 1.6.2. Circuitos de control del dolor.
 - 1.6.2.1. La sustancia gris periacueductal.
 - 1.6.2.2. La región rostral y ventromedial del bulbo raquídeo.
 - 1.6.2.3. Otros núcleos implicados en la modulación de la transmisión nociceptiva.
 - 1.6.2.3.a. Núcleo Dorsal del Rafe.
 - 1.6.2.3.b. Locus Coeruleus.
- 1.7. El Proto-oncogen c-fos.
 - 1.7.1. Oncogenes y Proto-oncogenes.
 - 1.7.2. Proto-oncogen c-fos.
 - 1.7.3. Empleo del proto-oncogen c-fos como marcador celular de actividad neuronal.

2- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- 2.1. Planteamiento del problema.
- 2.2. Hipótesis de trabajo.
- 2.3. Objetivos.

3- MATERIAL Y MÉTODOS

- 3.1. Animal de experimentación
- 3.2. Habitación.
- 3.3. Modelo de dolor neuropático: chronic constriction injury (CCI).

- 3.4. Administración del fármaco.
 - 3.4.1. Preparación de la Duloxetina.
 - 3.4.1. Protocolo de administración.
- 3.5. Casuística.
 - 3.5.1. Casuística del estudio conductual.
 - 3.5.2. Casuística del estudio de inmunodetección.
- 3.6. Estudio conductual de algesia.
 - 3.6.1. Electronic Von Frey Test.
 - 3.6.2. Randall y Selitto Test.
- 3.7. Estudio Inmunohistoquímico.
 - 3.7.1. Perfusión.
 - 3.7.2. Inmunodetección de Fos.
- 3.8. Análisis estadístico.
- 3.9. Análisis de imagen.

4. RESULTADOS

- 4.1.- Resultados del estudio conductual.
 - 4.1.1. Estudio de estadística descriptiva.
 - 4.1.1.1. Resultados conductuales de Randall y Selitto.
 - 4.1.1.2. Resultados conductuales de Electronic Von Frey Test.
 - 4.1.2. Estudio de estadística inferencial.
 - 4.1.2.1. Resultados conductuales de Randall y Selitto.
 - 4.1.2.1.a. Comparación de la línea base con las medidas de dolor sin fármaco.
 - 4.1.2.1.b. Comparación de la línea base con el efecto agudo del fármaco.
 - 4.1.2.1.c. Comparación entre línea base y efecto crónico del fármaco.
 - 4.1.2.1.d. Comparación del Dolor sin fármaco y del efecto agudo del fármaco.
 - 4.1.2.1.e. Comparación del Dolor sin fármaco y del efecto crónico del fármaco.
 - 4.1.2.1.f. Comparación del efecto agudo del fármaco con el efecto crónico del fármaco.
 - 4.1.2.2. Resultados conductuales Electro von Frey.
 - 4.1.2.2.a. Comparación de la Línea Base con las Medidas de dolor sin fármaco.
 - 4.1.2.2.b. Comparación de la Línea Base con el Efecto agudo del fármaco.
 - 4.1.2.2.c. Comparación de la Línea Base con el Efecto crónico del fármaco.
 - 4.1.2.2.d. Comparación de las medidas de dolor sin fármaco con el efecto agudo del fármaco.
 - 4.1.2.2.e. Comparación de las medidas de dolor sin fármaco con las medidas del efecto crónico del fármaco.
 - 4.1.2.2.f. Comparación entre el efecto agudo del fármaco y el efecto crónico del fármaco.
- 4.2. Resultados del estudio Inmunohistoquímico.
 - 4.2.1. Estudio de estadística descriptiva.
 - 4.2.1.a. Asta posterior de la médula espinal.
 - 4.2.1.b. Núcleo dorsal del rafo. Estudio citoarquitectónico.

- 4.2.1.c. Núcleo locus coeruleus. Estudio citoarquitectónico.
- 4.2.2. Estudio de estadística inferencial.
 - 4.2.2.a. Asta posterior de la médula espinal.
 - 4.2.2.a.1. Análisis global.
 - 4.2.2.a.2. Análisis parcial por láminas.
 - 4.2.2.b. Núcleo dorsal del rafe. Estudio citoarquitectónico.
 - 4.2.2.c. Núcleo locus coeruleus. Estudio citoarquitectónico.

5. DISCUSIÓN

- 5.1. Respecto del Estudio Conductual.
- 5.2. Respecto del Estudio Inmunohistoquímico.
 - 5.2.1. En el Asta Posterior de la Médula.
 - 5.2.2. En el Núcleo Dorsal del Rafe.
 - 5.2.3. En el Locus Coeruleus.

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

Abreviaturas

CCI	Constricción crónica ciática
DR	Núcleo dorsal del rafe
DUL	Duloxetina
LC	Locus coeruleus
LIA	Líquido intersticial artificial
LPGi	Núcleo reticular paragangliocelular lateral
PAG	Sustancia gris periacueductal

1- INTRODUCCIÓN

1.1.-Definición y Epidemiología del Dolor

La palabra dolor viene del latín *dolor, doloris*, es un nombre de efecto o resultado (-or sufijo de resultado de la acción de un verbo), a partir del verbo latino *dolere* (sufrir y, en origen, ser golpeado).

Se han propuesto gran número de definiciones del dolor lo que refleja la enorme dificultad para encontrarle una definición exacta. Todos sabemos perfectamente a qué nos referimos cuando hablamos del dolor y, sin embargo, no significa lo mismo para cada uno de nosotros. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP), define el dolor como “*Una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño.*”. (Merskey H, 1994)

Esta definición del Subcomité de Taxonomía de la IASP incluye la siguiente nota actualizada en una revisión de 2012

www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576)

“La incapacidad de comunicarse verbalmente no niega la posibilidad de que el individuo esté experimentando dolor y esté en necesidad de un tratamiento apropiado para aliviar dicho dolor. El dolor es siempre *subjetivo*. Cada individuo aprende la aplicación de la palabra a través de experiencias relacionadas con la lesión en la vida temprana. Los biólogos reconocen que los estímulos que causan dolor son susceptibles de dañar el tejido. En consecuencia, el dolor es la experiencia que asociamos con daño tisular real o potencial.”

Es, sin duda, una *sensación* en una parte o partes del cuerpo, pero también es siempre desagradable y por lo tanto también una experiencia *emocional*. Experiencias que se asemejan al dolor, pero no son desagradables, por ejemplo, pinchazos, no deben ser llamados dolor. Experiencias anormales desagradables (disestesias) también pueden ser dolor, pero no son necesariamente así, ya que, subjetivamente, puede que no tengan las cualidades sensoriales habituales del dolor.

Muchas personas se quejan de dolor en ausencia de daño tisular o de cualquier otra causa fisiopatológica; por lo general esto sucede por razones psicológicas. Normalmente no hay manera de distinguir su experiencia de aquella debida a daños en los tejidos si se toma el

informe subjetivo. Si ellos consideran su experiencia como dolor y la describen de la misma manera que el dolor causado por el daño tisular, ésta debe ser aceptada como dolor. Esta definición evita asociar el dolor al estímulo. La actividad inducida en el nociceptor y vías nociceptivas por un estímulo nocivo no es el dolor, que siempre es un estado psicológico, aunque bien podemos considerar que el dolor tiene con más frecuencia una causa física próxima.

A partir de la definición clásica de dolor, se acepta que es un fenómeno que posee varios componentes (López Timoneda F, 1996):

- a) Componente sensorial-discriminativo: hace referencia a las cualidades sensoriales del dolor como la localización, calidad, intensidad y características temporo-espaciales.
- b) Componente cognitivo-evaluativo: analiza e interpreta el dolor en función de lo que se está sintiendo y lo que puede ocurrir.
- c) Componente afectivo-emocional: por el que la sensación dolorosa se acompaña de ansiedad, depresión, temor, angustia, etc... Respuestas en relación con experiencias dolorosas previas, a la personalidad del individuo y con factores socio-culturales.
- d) Componente comportamental: formado por los gestos y las actitudes que se manifiestan frente al dolor.

1.2.- Impacto Económico del Dolor.

El dolor es considerado un problema de salud pública afectando a gran parte de la población mundial. El 80% de los pacientes con dolor no obtienen un alivio significativo de su dolor cuando éste es de intensidad de moderado a severo.

En Europa se estima que hay 95 millones de personas que viven con dolor crónico, una cifra muy superior a los que padecen diabetes (60 millones), con importantes repercusiones a nivel personal, laboral y social.

El estudio Pain in Europe de 2011 (Reid KJ, 2011), cifra en una 17,2 % los españoles que sufren dolor crónico no oncológico, 6 puntos porcentuales por encima que en la encuesta realizada en 2003. Esta cifra se prevé que vaya incrementándose en los próximos años, dado el aumento en la esperanza de vida.

Este mismo estudio analizando los datos de nuestro país, afirma que el dolor persiste en los pacientes una media de 5 años y prácticamente la mitad de ellos lo sufre a diario (46,4%) y en el 81% de los casos es de carácter intenso.

Lo sufren más las mujeres que los hombres (61% vs 39%). El 60,5 % de los pacientes presentan dolor de espalda. Y el 80% de los pacientes que presenta dolor intenso refieren tener tratamiento prescrito sin embargo un 20% no sigue ninguna pauta analgésica regular.

El impacto económico del dolor es elevado. Los expertos dividen los costes en directos e indirectos. Los costes directos a los pacientes con dolor incluye tanto el derivado de la atención sanitaria por su médico de familia como por cualquier otro médico especialista o en urgencias además de los gastos derivados de la prescripción farmacéutica y las pruebas diagnósticas. El número de visitas (consultas, urgencias...) de los pacientes con dolor crónico oscila entre 2 y 9 cada 6 meses, siendo el profesional sanitario que más visitan el de atención primaria (Breivik H. 2006).

Los costes indirectos hacen referencia a las consecuencias macroeconómicas de disminución de la producción en relación con el absentismo laboral, la baja productividad laboral, las indemnizaciones, las jubilaciones anticipadas... Los costes indirectos suponen una carga mayor que los directos para la economía de un país (Linton SJ. 1999).

Se estima que uno de cada 5 pacientes con dolor crónico pierde su trabajo y un tercio presenta problemas en su puesto de trabajo, el 36% de los pacientes refiere haber perdido oportunidades debido a temas relacionados con su dolor. Se calcula que los pacientes con dolor crónico tienen un promedio de 12 días de baja laboral al año (Painful Truth Survey, 2012). Y los pacientes que refieren que su dolor es intenso presentan un absentismo laboral superior al de otros pacientes y se cifra en una media del 42% (Langley P, 2010).

A nivel individual se cifra en una disminución de un 30% el nivel de ingresos anual que pierde un paciente que padece dolor mantenido. Y en la encuesta que valora España (Langley, 2010), los pacientes con dolor intenso tienen un 20% de desempleo o solo obtienen contratos a tiempo parcial.

Los costes indirectos del dolor crónico en España, no se han recogido sin embargo si extrapolamos los datos de otros países, ajustándolo a la población española, el impacto sería de más de 16.000 millones de euros, lo que supone un 2,5 % del PIB. (EFIC, 2010).

1.3.-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:

1.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.

1.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.

1.c) El dolor **nociceptivo visceral**: se origina en las vísceras y órganos internos cuando éstos son irritados. Es el dolor de localización más vaga e indeterminada de los tres. Se describe, por tanto, como profundo, mal localizado, no bien definido, que suele irradiarse y acompañarse de reflejos autónomos (sudoración, variación de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, náuseas...). Es típicamente mordiente o cólico cuando se debe a la obstrucción de una víscera hueca y sordo, agudo o pulsátil cuando se debe a la afectación de las cápsulas de los órganos o del mesenterio. Aparece como producto de la compresión, falta de riego vascular o el estiramiento de estructuras viscerales.

2) dolor **neuropático**: Este tipo de dolor es debido a una lesión en el propio sistema nervioso. Serra (Serra J, 2007) 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,...

1.4.- Tratamiento del Dolor.

El tratamiento de los pacientes con dolor crónico se incluye en un plan multidimensional que incluye tratamientos no farmacológicos (cambios de estilo de vida, técnicas de apoyo psicológico, terapia física) y farmacológicos.

Las terapias no farmacológicas tienen que ir encaminadas a mejorar la calidad de vida del paciente y a corregir los factores potenciadores y mantenedores del dolor, de esta manera se ha demostrado que cambiando algunos hábitos de vida y haciéndolos más saludables se consigue una disminución del dolor. Las terapias físicas en patología musculoesquelética incluyen múltiples técnicas entre las que destacan las manipulaciones y movilizaciones, la termoterapia, los masajes, la acupuntura, la electroterapia... todas ellas con resultados variables a corto y largo plazo.

El tratamiento farmacológico está englobado en una visión multidimensional del dolor, sabiendo que el abordaje individualizado del paciente que adapte el tratamiento a sus circunstancias personales hará que se pueda conseguir una analgesia de mayor calidad.

Las premisas para un correcto tratamiento farmacológico del dolor son:

- Tratamiento individualizado, adaptado al tipo de dolor y a su intensidad.
- Valoración de comorbilidades del paciente disminuyendo interacciones y aumentando la seguridad.
- Valoración del consumo de analgésicos previos y su respuesta.
- La medición del dolor es fundamental y es el elemento que permitirá modificar la pauta analgésica.
- Valoración de las preferencias y expectativas del paciente.
- Información clara y concisa sobre los beneficios y efectos secundarios posibles.

La OMS (Organización Mundial de la Salud) publicó en 1986 (WHO, 1986) un esquema terapéutico para pacientes con dolor oncológico, que se ha extrapolado a cualquier tipo de dolor. Era un esquema basado en escalones, donde se iba aumentando progresivamente la

analgésia y añadiendo co-analgésicos en función de la intensidad del dolor. Dado que no era muy práctico para pacientes con dolor intenso de inicio, se planteó el término de ascensor terapéutico que implicaba que el paciente que tuviese un dolor severo podía empezar directamente con los fármacos más potentes sin necesidad de ir haciendo un escalonado terapéutico.

1.4.1.- Tratamiento Farmacológico del Dolor Neuropático.

El dolor neuropático es debido a una alteración de las vías aferentes y a una sensibilización de las neuronas nociceptivas.

Sus características principales incluyen parestesias, disestesias, dolores lancinantes, hiperalgesia y alodinia.

El tratamiento tradicional del dolor nociceptivo que incluye paracetamol y antiinflamatorios no ha demostrado ser eficaz en el dolor neuropático.

En el dolor neuropático es frecuente que los pacientes utilicen varios fármacos analgésicos simultáneamente junto con coanalgésicos con el objetivo de disminuir la intensidad dolorosa y los síntomas asociados al dolor. Más de la mitad de los pacientes necesitan un tratamiento combinado de fármacos (Moulin DE, 2007).

Se recomienda de inicio empezar con un solo fármaco y si con esto no es suficiente, asociar fármacos de primera y segunda línea.

Habitualmente se sigue la escalera analgésica de la OMS la cual preconiza el ascenso progresivo de analgésicos en función de la intensidad dolorosa. Además se aboga por el uso de coadyuvantes analgésicos (coanalgésicos) que serían aquellos fármacos cuya indicación principal no sería el tratamiento del dolor sin embargo sí que pueden tener efectos analgésicos y se pautan con el objetivo de disminuir las dosis de analgésicos potentes o para potenciar dicha acción analgésica.

Entre los coanalgésicos podemos citar a los antidepresivos, los anticonvulsivantes, los corticoides, los agonistas alfa 2 adrenérgicos, los relajantes musculares, etc...

Existen diferentes algoritmos para tratamiento de pacientes con dolor neuropático, el publicado por Martínez Salio (Martínez-Salio A, 2009) recomienda que en casos de dolor neuropático periférico hay que:

- Identificar el tipo de dolor neuropático periférico.
- Descartar la presencia de dolor nociceptivo asociado y tratarlo si fuera el caso.
- Iniciar con fármacos de primera línea en monoterapia.

Anticonvulsivantes: gabapentina o pregabalina

Antidepresivos:

1ª opción: antidepresivos tricíclicos

2ª opción: antidepresivos duales: Duloxetina o Venlafaxina

- Fármacos de segunda línea:

Opioides: tramadol, opioides mayores

- Fármacos tópicos:

Capsaicina 8% parche

Lidocaína 5% parche (neuralgia postherpética)

Existen también otros fármacos que se utilizan en dolor crónico:

- Benzodiacepinas
- Relajantes musculares
- Corticoides
- Vitaminas del grupo B

Si la efectividad tras monoterapia de fármaco de primera línea es nula o es mal tolerado se recomienda sustituir el anticonvulsivante por un antidepresivo y si el paciente ya tomaba un antidepresivo entonces se recomienda sustituirlo por un anticonvulsivante.

Si la efectividad es parcial en monoterapia (reducción intensidad dolor < 30%) de primera línea se recomienda asociar al anticonvulsivante un antidepresivo o al antidepresivo un anticonvulsivante.

Si persiste la mala tolerabilidad, ineffectividad o baja efectividad se recomienda asociar alguno de los fármacos de segunda línea.

Recientemente han sido publicadas en Lancet Neurology (Finnerup NB, 2015), las recomendaciones para la terapia farmacológica en dolor neuropático, siguiendo la metodología GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation).

De esta manera se considera como recomendaciones GRADE fuertes para su uso en dolor neuropático y por lo tanto como fármacos de primera línea: los anticonvulsivantes, los antidepresivos tricíclicos y los antidepresivos duales (duloxetina y venlafaxina).

Como fármacos de segunda línea con recomendación débil GRADE al tramadol, parches de lidocaína y capsaicina en parches, por lo general debido a su baja tolerabilidad o en relación a problemas con la seguridad.

Como fármacos de tercera línea de tratamiento en dolor neuropático, con recomendación débil GRADE, se recomiendan los opioides fuertes.

Los autores afirman que la combinación anticonvulsivante (pregabalina o gabapentina) y antidepresivo (duloxetina o tricíclicos) podría ser una alternativa a las dosis crecientes de monoterapia en pacientes que no responden a las dosis moderadas.

Resumiendo, el dolor neuropático es uno de los síndromes dolorosos más complejos, agrupa a numerosas etiologías, mecanismos fisiopatológicos, topografías y manifestaciones clínicas, y su tratamiento farmacológico es complicado. En general no se dispone en la práctica clínica actual de fármacos muy eficaces. Los fármacos empleados pertenecen a diferentes grupos farmacológicos, como los antidepresivos tricíclicos, los inhibidores selectivos de recaptación de serotonina (ISRS), los antiepilépticos, los anestésicos locales, los opiáceos, la clonidina e incluso los tratamientos tópicos. Como tratamientos no farmacológicos, existen múltiples opciones entre las que cabe citar la fisioterapia, la neuroestimulación eléctrica transcutánea (TENS), la estimulación medular, los bloqueos nerviosos, algunas intervenciones neuroquirúrgicas e incluso la acupuntura (Collins SD, 2005).

1. 4. 2.- Antidepresivos en dolor crónico.

La acción de los antidepresivos en el dolor se realiza por inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina. De forma clásica se ha pensado que el efecto sobre el dolor de los antidepresivos se debía a la mejoría de la ansiedad o de la depresión. Sin embargo existen múltiples evidencias (Ashbury FD, 2003) que confirman a los antidepresivos como fármacos a tener en cuenta en el tratamiento del dolor crónico y que son eficaces en pacientes que no presentan ni ansiedad ni depresión.

Un dato a tener en cuenta y que confirma que la acción de los antidepresivos en los pacientes con dolor, no es únicamente por una acción en la mejora del estado de ánimo es el hecho que el efecto sobre el dolor se alcanza más rápidamente y a dosis inferiores que el efecto antidepresivo (Jazmin L, 2003) (Saarto T, 2007).

El efecto analgésico de los antidepresivos tricíclicos y de los duales (duloxetina) es similar, sin embargo no ha podido demostrarse dicho efecto en los antidepresivos inhibidores de la recaptación de la serotonina (Saarto T, 2007).

Los antidepresivos más clásicos como los tricíclicos (amitriptilina, imipramina...) presentan una buena respuesta analgésica asociados a los opioides e inician su acción en las primeras 46 horas tras su administración y consiguen su máxima potencia a la semana de iniciado el tratamiento (Kloke M, 1991). El número de pacientes a tratar (NNT) para obtener una reducción del 30-50% del dolor es de 3.6 (IC 95%: 3,0-5,4) (Finnerup NB, 2015).

Sin embargo los antidepresivos tricíclicos presentan efectos secundarios que suelen ser mal tolerados incluso a dosis bajas.

Los efectos secundarios más habituales están en relación a sus acciones anticolinérgicas (sequedad de boca, retención urinaria, hipotensión ortostática...). En los pacientes ancianos debe iniciarse el tratamiento a bajas dosis con toma nocturna debido a los efectos sedantes que producen. Además presenta efectos arritmogénicos por lo que tendrá que pautarse con cuidado en pacientes con cardiopatía de base.

El desarrollo de un nuevo fármaco, la duloxetina, antidepresivo de características duales por su acción inhibitoria selectiva de la recaptación de serotonina y de noradrenalina, aportó una

nueva perspectiva prometedora en el tratamiento del dolor neuropático (Pérez-Cajaraville J. 2006).

1.5.- Duloxetina.

1.5.1.- Descripción.

El clorhidrato de duloxetina es un inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina y serotonina. Su denominación química es clorhidrato de (+)-(S)-N-metil-γ-(1-naftiloxi)-2-tiofenopropilamina (figura 1). Y es de administración oral.

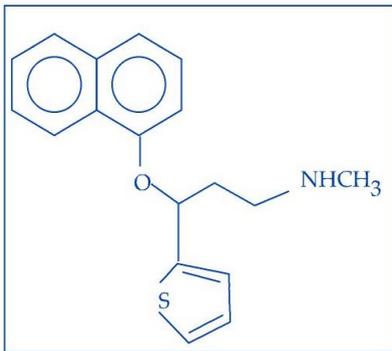


FIGURA 1: FORMULACIÓN DEL CLORHIDRATO DE DULOXETINA

La fórmula empírica es $C_{18}H_{19}NOS \cdot HCl$, con un peso molecular de 333,88.

Presenta una estructura sólida de un color que va de blanco a blanco ligeramente pardo, y es ligeramente soluble en agua.

Cada cápsula contiene gránulos con recubrimiento entérico conteniendo clorhidrato de duloxetina equivalentes a 30 o 60 mg de duloxetina base y están diseñados para prevenir la degradación del fármaco en el medio ácido del estómago.

Entre los ingredientes inactivos aparecen hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa, esferas de azúcar, talco, citrato de trietilo y mezcla de color blanco DDB8257W.

1.5.2.- Mecanismo de Acción.

La duloxetina es un inhibidor selectivo de la recaptación de noradrenalina y serotonina a nivel de la hendidura sináptica por lo que incrementa la activación de las vías neurales. Al bloquear la recaptación de neurotransmisores, la duloxetina incrementa la cantidad de estos en la sinapsis neuronal. Tanto la serotonina como la noradrenalina contribuyen al mantenimiento de un estado de ánimo positivo y a la reducción de la sensación de dolor. No parece modular directamente la función dopaminérgica y carece de actividad significativa por los receptores histaminérgicos, colinérgicos y adrenérgicos.

1.5.3.- Farmacocinética.

La duloxetina presenta una variabilidad interindividual de entre un 50 y un 60%, debida en parte al sexo, a la edad, el consumo de tabaco y al metabolismo mediado por el CYP2D6.

Tras la administración oral, se absorbe adecuadamente, alcanzando la concentración plasmática máxima (C_{max}) aproximadamente a las 6 horas. Su biodisponibilidad tras la administración oral oscila entre un 32 y un 80%. La administración concomitante con alimentos disminuye la absorción en aproximadamente un 11%, y retrasa la C_{max} de 6 a 10 horas.

La fijación a proteínas plasmáticas es elevada, aproximadamente un 96%, uniéndose tanto a la albúmina como a la alfa-1 glicoproteína ácida.

Es metabolizada ampliamente en el hígado por las isoenzimas CYP1A2 y el CYP2D6, dando lugar a metabolitos farmacológicamente inactivos. Posteriormente sufre conjugación.

La semivida de eliminación (t_{1/2}) tras la administración oral es de 12 horas, con variaciones que oscilan de las 8 a las 17 horas.

1.5.4.- Indicaciones.

Las indicaciones terapéuticas de la duloxetina son: (Micó 2005).

- trastornos depresivos mayores.
- trastorno de ansiedad generalizada.
- dolor neuropático periférico de origen diabético.

- incontinencia urinaria.

1.5.5.- Posología.

La posología recomendada depende de la situación clínica a tratar. El análisis llevado a cabo en Cochrane (Lunn M, 2014) concluye que las dosis diarias de 60 y 120 mg de duloxetina por vía oral son efectivas para tratar el dolor en la neuropatía diabética periférica pero no a dosis inferiores.

El inicio de la acción analgésica ocurre habitualmente al cabo de una semana de tratamiento (Wernicke JF, 2006).

1.5.6.- Contraindicaciones.

Está contraindicado el uso de duloxetina con los inhibidores irreversibles no selectivos de la monoaminoxidasa (IMAO), debido al riesgo de desarrollo de síndrome serotoninérgico. Tampoco debe emplearse en pacientes en tratamiento con fármacos inhibidores potentes de la isoenzima CYP1A2, como fluvoxamina o ciprofloxacino, dado que pueden dar lugar a concentraciones plasmáticas elevadas de duloxetina.

1.5.7.- Efectos Secundarios.

Los efectos secundarios más frecuentes (aquellos que se producen en más de uno de cada diez pacientes) de la duloxetina son sequedad de boca, náuseas, dolor de cabeza, somnolencia y fatiga. La mayoría de estos efectos secundarios frecuentes son leves o moderados y pasajeros, comienzan al inicio del tratamiento y van disminuyendo en las siguientes semanas.

1.5.8.- Eficacia clínica y seguridad.

La eficacia y seguridad de duloxetina en el tratamiento de diversas patologías ha sido estudiada en diversos ensayos clínicos.

La eficacia y seguridad de duloxetina en el tratamiento del dolor de la neuropatía diabética periférica se estudió en un ensayo multicéntrico doble-ciego (Goldstein DJ, 2005) que incluía 457 pacientes con dolor debido a la polineuropatía como consecuencia de la diabetes mellitus tipos 1 y 2 durante 12 semanas de tratamiento. Los pacientes fueron aleatorizados a recibir 20 mg/día de duloxetina, 60 mg/día, 120 mg/día, repartidos en dos dosis, o placebo. Tanto con las dosis de 60 como con 120 mg/día de duloxetina se obtuvo una mejoría significativa comparado con placebo en la escala "24-h Average Pain Store", comenzando esta mejoría una semana después de iniciar el tratamiento y continuando hasta la semana 12 del mismo. Menos de un 20% de los pacientes abandonaron el tratamiento debido a los efectos adversos. Los autores concluyeron que duloxetina a dosis de 60 y 120 mg/día resultaba segura y efectiva en el manejo del dolor neuropático periférico de naturaleza diabética.

La eficacia y seguridad de duloxetina en el tratamiento de la fibromialgia con o sin síndrome depresivo mayor asociado se estudió en un ensayo multicéntrico doble ciego (Arnold LM, 2004) comparado con placebo en 354 mujeres durante 12 semanas de tratamiento: 118 pacientes recibieron 60 mg de duloxetina una vez al día, 116 pacientes 60 mg dos veces al día y 120 pacientes recibieron placebo. Las dos dosis de duloxetina, 60 o 120 mg, resultaron seguras y bien toleradas, además de conseguir mejorías significativas ($p < 0,001$) en comparación con placebo en la escala de "Brief Pain Inventory average pain severity store". La disminución del dolor conseguida con duloxetina fue independiente del efecto del fármaco sobre el estado de ánimo y sobre la presencia o no de síndrome depresivo asociado. Sus autores, por tanto, concluyen en base a los resultados obtenidos, que ambas dosis de duloxetina fueron eficaces y seguras en el tratamiento de la fibromialgia en mujeres con o sin síndrome depresivo asociado.

1.6.-Sustrato Anatómico del Dolor y la Analgesia.

1.6.1.- Circuitos Ascendentes de Transmisión del Dolor.

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.

1.6.1.1.- Receptores.

Básicamente existen cinco tipos de receptores sensoriales (Navarro X, 2009): los *termorreceptores*, capaces de reconocer cambios de temperatura; los *mecanorreceptores*, capaces de responder ante deformaciones mecánicas del receptor; los *quimiorreceptores*, encargados de reconocer las sensaciones gustativas y olfatorias, así como los niveles de oxígeno o dióxido de carbono en la sangre; los *receptores electromagnéticos*, capaces de responder a la luz que llega a la retina; y los *nociceptores*, capaces de reconocer el daño tisular, ya sea por una lesión física o química. Cada tipo de receptor es sumamente sensible a un tipo de estímulo específico, a la vez que prácticamente insensible al resto de estímulos. Por ejemplo, los receptores nociceptivos de la piel casi nunca se estimulan con el tacto o la presión habituales, pero sí se activan cuando los estímulos táctiles se vuelven lo bastante intensos como para lesionar los tejidos. Otra característica especial de todos los receptores

sensoriales es que, después de cierto tiempo, se adaptan parcial o totalmente a los estímulos. Los receptores de adaptación parcial o receptores tónicos son aquellos que se adaptan poco o se adaptan muy lentamente al estímulo. Dentro de esta categoría estarían incluidos los nociceptores.

Los nociceptores o receptores encargados de recoger la información de naturaleza dolorosa. 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 (Woolf CJ, 2007).

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

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, 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 (Navarro X, 2009).

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

- los *mecanonociceptores de alto umbral*, activados preferentemente por pellizcos o pinchazos.
- los *nociceptores térmicos*, que responden ante temperaturas que podrían resultar lesivas.

- 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.

1.6.1.2.- Fibras Nerviosas.

Como ya hemos señalado anteriormente, el estímulo originado en los nociceptores, se transmite hasta la médula a través de dos tipos de fibras nerviosas:

- las *fibras A δ* , escasamente mielinizadas, de entre 2-5 μm de diámetro y una velocidad de conducción de 12-30 m/s.
- las *fibras C*, amielínicas, con un diámetro que varía entre las 0,2-1,4 μm y una velocidad de conducción de 0,5-2 m/s.

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.

1.6.1.3.- 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 (Verdú E, 2009).

Las fibras que conducen la información nociceptiva al entrar en la médula forman parte del fascículo o tracto de Lissauer. 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.

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 (Willis WD, 2007).

Las neuronas de la *lámina I* son, en su mayor parte, grandes y constituyen el principal punto de origen de los axones que forman el haz espinotalámico lateral.

La sustancia gelatinosa de Rolando o *lámina II* puede ser dividida en dos partes: la *lámina Ili*, que recibe información de tipo no dolorosa, y la *lámina Ile*, que recibe información de naturaleza nociceptiva.

En la *lámina Ilo* encontramos dos tipos de neuronas, descritas en 1909 por Cajal, las células en tallo (stalk cells) y las células isletas (islets cells) (Gobel S, 1987). Estas células reciben aferencias primarias nociceptivas y envían proyecciones, principalmente, a las neuronas de la lámina I (Verdú E, 2009). En relación al primer tipo se sugiere que son interneuronas excitadoras de las neuronas de proyección nociceptoras, mientras que el segundo tipo serían inhibitoras.

La *lámina V* contiene grandes neuronas denominadas de amplio margen dinámico o WDR debido a que responden a una gran variedad de estímulos mecánicos, térmicos y químicos. Algunas de ellas reciben estímulos nociceptivos de origen visceral, transmitidos por fibras A δ y C. Junto con las de la lámina I, las neuronas de la lámina V constituyen el grupo celular más importante en la transmisión ascendente de la información nociceptiva hacia el cerebro.

Las células de la *lámina X* de Rexed, correspondiente al centro desflechado viscerosensible, reciben la información nociceptiva de origen visceral (Molander C, 1995).

1.6.1.4.- 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.
- 5) el haz espinohipotalámico.

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 (Besson, 1987). Desde aquí, las fibras cruzan por la comisura gris anterior de la médula, en una decusación que tiene lugar a través de varios segmentos medulares, y alcanzan el cordón lateral de la hemimédula opuesta, en una posición ventral con relación al haz piramidal cruzado. En este momento las fibras se acodan en ángulo recto para hacerse ascendentes, recorriendo la médula, el bulbo, la protuberancia y el pedúnculo cerebral, formando parte del sistema anterolateral (SAL), hasta el tálamo donde hacen relevo en la neurona tálamo-cortical nociceptiva, situada en el *núcleo ventral posterolateral del tálamo* y los *núcleos talámicos intralaminares* (35, 37, 39).

Del mismo modo, las fibras algésicas del *haz espinoreticular* se dirigen hacia diversos núcleos reticulares bulbo-pontinos tales como, el *núcleo gigantocelular*, el *paragigantocelular* y los *núcleos reticulares oral y caudal del puente* (Willis WD, 2007).

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* (Prats A, 2007), así como al *núcleo parabraquial* y *área pretectal anterior* (Willis WD,

1995). 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 *cuerno 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 (Willis WD, 2007).

También se ha descrito, un *haz espinocervicotalámico* (Verdú E, 2009) (Prats A, 2007), 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 y V, 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.

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

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 la corteza prefrontal para que sea registrada la experiencia en nuestra memoria, la *amígdala*

para dotarla de un significado emocional y el hipotálamo para desencadenar las respuestas vegetativas correspondientes.

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.

1.6.2.- Circuitos de Control 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 (figura 2) (Melzack R, 1969).

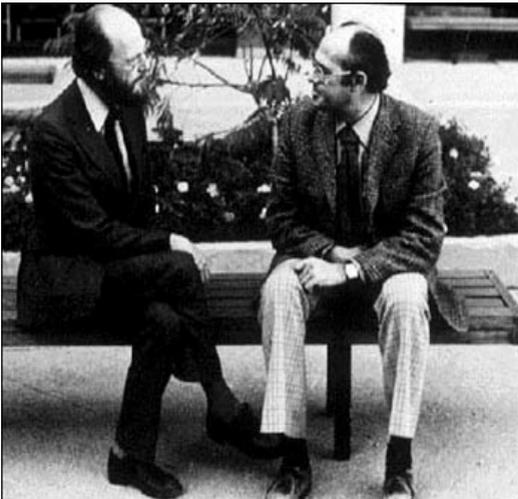


FIGURA 2: PATRICK WALL (IZDA) Y RONALD MELZACK (DCHA).

Estos autores propusieron la *teoría de la puerta de control* para el dolor (figura 3). La esencia de esta teoría es que un estímulo (aplicado, por ejemplo, a la piel) activa a las fibras tanto de

diámetro grande (A β , mielínicas, no nociceptivas) como a fibras finas nociceptivas (A δ y C, escasamente mielínicas o amielínicas). Las fibras de mayor diámetro excitarían a las interneuronas inhibitorias (células I) situadas en el asta posterior medular, las cuales provocarían una inhibición presináptica de las neuronas de transmisión secundarias (células T o neuronas espinotalámicas).

Por el contrario, las fibras de menor diámetro inhibirían a las células I, lo cual supondría una excitación de las células T, con la consiguiente facilitación de la transmisión nociceptiva. Así, si el estímulo es discreto predominaría la aferencia por las fibras de mayor diámetro bloqueándose la transmisión dolorosa, mientras que, si el estímulo es suficientemente intenso predominarían las aferencias por las fibras más finas facilitándose la transmisión nociceptiva. Según Melzack y Wall, este sistema debería estar también bajo el control de un sistema descendente de fibras, procedente del tronco cerebral, que sería sensible a factores ambientales.

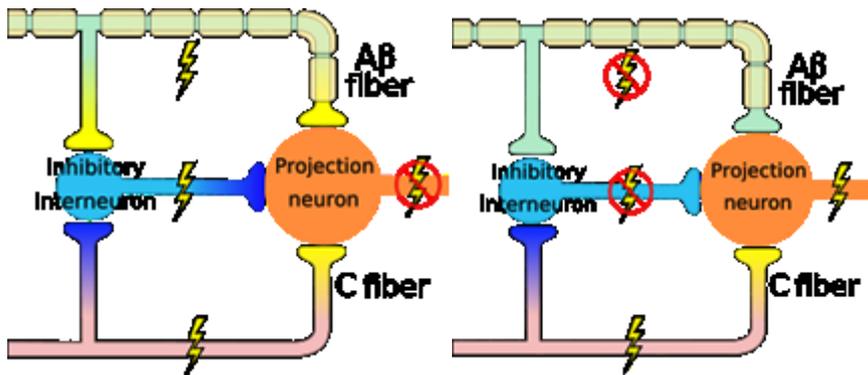


FIGURA 3. ESQUEMA DEL SISTEMA DE CONTROL DE LA TRANSMISIÓN NOCICEPTIVA SEGÚN LA TEORÍA DE LA PUERTA DE CONTROL PARA EL DOLOR DE MELZACK Y WALL.

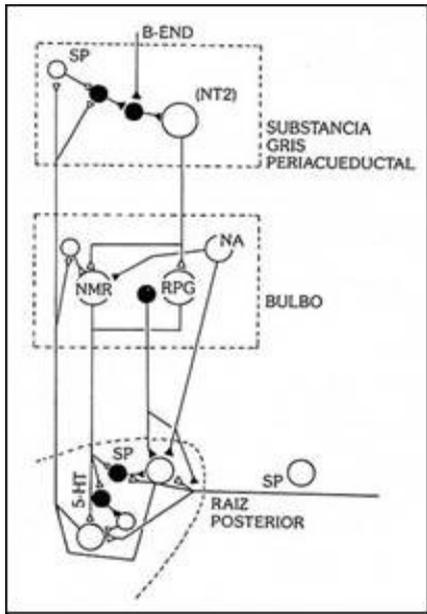


FIGURA 4: ESQUEMA DONDE SE ILUSTRAN EL MODELO DE CONTROL DESCENDENTE DEL DOLOR.

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. Basándose en estos datos, (Basbaum AI, 1984) se elaboró una hipótesis acerca de cuál sería la estructura de este circuito endógeno de modulación de la información nociceptiva (figura 4). Este circuito estaría formado por la PAG, varios núcleos de la porción rostral y ventromedial del bulbo, entre los que destacaría el *núcleo del rafe magno* (RMg), y el asta posterior de la médula espinal. En él jugarían un papel destacado los opiáceos endógenos (las β-endorfinas, encefalinas y dinorfinas). 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 β -endorfinérgicas. Los impulsos sobre la interneurona productora de opiáceos endógenos procederían de la vía ascendente nociceptiva directamente, o bien a través de otra interneurona (en este caso 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 inhibidoras (endorfinérgicas y gabaérgicas).

1.6.2.1.- La Sustancia Gris Periacueductal.

La sustancia gris periacueductal (PAG), tanto en el ser humano como en el resto de los mamíferos es la porción del sistema nervioso central que se halla situada alrededor del acueducto de Silvio, a nivel del mesencéfalo.

Diferentes estudios (Beitz, 1985) han revelado que la PAG de la rata está formada por dos poblaciones celulares: neuronas de tamaño pequeño y células gliales. Y estarían organizadas histológicamente en tres tipos diferentes de neuronas: fusiformes o bipolares, triangulares y estrelladas o multipolares.

Al igual que en el hombre, la PAG de la rata recibe y proyecta a todos los niveles del sistema nervioso central (Gaurian C, 2002).

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:

1) Las monoaminas (*adrenalina, noradrenalina, histamina y serotonina*) y la acetilcolina.

2) Los aminoácidos simples (*glutamato, aspartato y ácido γ -aminobutírico o GABA*).

3) Los neuropéptidos (*neurotensina, sustancia P, enkefalina, β -endorfina,...*).

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, repuestas autonómicas, vocalización, comportamientos sexuales o modulación del dolor. 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 (Keay KA, 1994).

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 (Bajic D, 2012).

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 (Valverde Navarro AA, 1996).

A los datos aportados por estos trabajos citoarquitectónicos, hay que sumar las evidencias encontradas por otros autores acerca de que no toda la PAG se comporta igual desde el punto de vista funcional (McCarthy MM, 1991).

Son muchos 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. (Bandler R, 1994) que confirma 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.

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 (Onstott, 1993), o fusión de dos columnas en una en otros (Beitz AJ, 1995), siendo clave en todos los estudios la herramienta utilizada para identificar las diferentes columnas (Valverde Navarro AA, 1996). Tales estudios han perseguido también definir conexiones intrínsecas en la PAG que servirían de nexo entre las diferentes columnas longitudinales propuestas (Sandkühler J, 1995).

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 (Murphy AZ, 1995). 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.

1.6.2.2.- 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 (Basbaum AI, 1984). 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 (Gebhart GF 1983) (Chung RY, 1987).

Las principales aferencias a los núcleos de esta región troncoencefálica proceden de la PAG y el núcleo cuneiforme (Beitz AJ 1985), así como de la formación reticular bulbar dorsal adyacente y el tegmento pontino dorsolateral. 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* (Meng XW, 1997).

En cuanto a las eferencias de la RVM, estas alcanzan mayoritariamente el asta posterior de la médula (Mason P, 1989), especialmente a las láminas I, II, V, VI y VII, aunque, también, proyectan a diferentes estructuras diencefálicas (Verdú E, 2009).

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. Las neuronas de la RVM son la principal fuente de serotonina que llega al asta posterior de la médula espinal. 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..

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. También desempeñan una función importante el GABA y la encefalina. La primera facilita la transmisión de la información nociceptiva, mientras que lo segundo bloquea dicha transmisión por activación del circuito antinociceptivo. Se han identificado otros

neurotransmisores, tanto en el interior de los somas neuronales (sustancia P, somatostatina, hormona liberadora de tirotrina o TRH y colecistoquinina), como en los terminales aferentes a estos centros (norepinefrina, neurotensina, glutamato, aspartato y acetilcolina). La principal función que se ha atribuido a los núcleos de la RVM ha sido la participación en el circuito endógeno de modulación de la transmisión nociceptiva (Basbaum AI, 1979) (Willis WD, 1995).

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 (Skinner K, 1997) (Keay, KA, 1994):

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. Por tanto, la activación de las células ON facilitaría la transmisión de la información nociceptiva a nivel del asta posterior de la médula espinal.

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

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).

1.6.2.3.- Otros Núcleos implicadas en la Modulación de la Transmisión Nociceptiva.

Desde que Basbaum y Fields (Basbaum AI, 1984) 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,...) (Cole RL, 2005).

Dado que nuestro trabajo va a profundizar en el sustrato anatómico del efecto analgésico de la duloxetina, inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina, seleccionaremos para nuestro estudio los principales núcleos troncoencefálicos de los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico, el núcleo dorsal del rafe (DR) y el locus coeruleus (LC).

1.6.2.3.a.- Núcleo Dorsal del Rafe.

El núcleo dorsal del rafe (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.

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.

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 μm de diámetro), hasta las grandes (35 μm) y multipolares, pasando por las de diámetro intermedio (24 μm) y aspecto fusiforme. 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. 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.

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.

En cuanto a la quimioarquitectura del DR, al igual que en otros núcleos del rafe, la serotonina es el principal neurotransmisor (Ivanov A, 2000). Pero, también han sido identificados la encefalina y el GABA (Willis WD, 1995), así como fibras β -endorfinérgicas (Wang QP, 2003).

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 (Wang QP, 2003). 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.

1.6.2.3.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 (Song Z, 2013).

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. 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.

El LC recibe aferencias principalmente de dos centros: 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, 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.

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.

El más importante de los neurotransmisores localizado en las neuronas del LC es la noradrenalina. 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 factor natriurético atrial y la serotonina.

El LC ha sido implicado en diversas actividades fisiológicas tales como el sueño, la atención, la memoria, la vigilancia o la analgesia. 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 (Willis WD, 1995).

1.7.- El Proto-oncogén c-fos.

1.7.1.- Oncogenes y Proto-oncogenes.

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

Estos oncogenes se denominan con la letra "v" seguida, tras un guión, de las tres letras que caracterizan a cada uno. En 1989, Bishop y Varmus recibieron el Premio Nobel por su

descubrimiento del origen celular de los oncogenes retrovíricos, es decir, que los genes transformantes de los retrovirus proceden del genoma celular (Morgan JI, 1991).

Actualmente se sabe que el origen de estos oncogenes es, efectivamente, celular, a partir de unos genes que todos poseemos en nuestro DNA, incluidos los demás mamíferos y otros eucariotas, y que llamaremos proto-oncogenes (Gao YJ, 2009) (Curran T, 1990).

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 (Curran T, 1990).

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

Los proto-oncogenes, por tanto, son genes celulares normales a partir de los cuales derivan los oncogenes retrovíricos.

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

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

Los proto-oncogenes conocidos hasta el momento se pueden agrupar en 5 familias:

- 1) Familia del proto-oncogén *ras*: codifica una proteína de membrana de la familia de las proteínas G.
- 2) Familia de los proto-oncogenes *src, abl, yes, fes, fps, fgr, ros*: codifican proteínas de membrana con actividad tirosincinasa.
- 3) Familia de los proto-oncogenes *erb-B, fms, raf, ml, mos*: codifican proteínas de membrana similares a las de la familia anterior pero sin actividad tirosincinasa.
- 4) Familia de los proto-oncogenes *myc, myb, fos, jun*: codifican proteínas nucleares.
- 5) Familia del proto-oncogén *sis*: codifica una proteína que se segrega.

1.7.2.- 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.

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) (Curran T, 1990).

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.

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 (Sheng M, 1990) (Curran T, 1988).

1.7.3.- 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 (Hossaini M, 2014).

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

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

Poder demostrar dicha relación entre los datos anatómicos y los fisiológicos ha sido difícil. Sin embargo, el empleo de *c-fos* como marcador de actividad neuronal se ha convertido en una de las herramientas más usadas para solucionar este tipo de problema.

2- Planteamiento del problema, hipótesis y objetivos

2.1.- Planteamiento del Problema.

A pesar de los ensayos clínicos en humanos que avalan el uso clínico de la duloxetina en dolor neuropático, todavía no se conoce en profundidad el sustrato anatómico en el que subyace el efecto analgésico de este antidepresivo.

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 duloxetina 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 su mecanismo de acción, la inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina, nuestro estudio se centrará en estudiar el papel que juega en el efecto analgésico de la duloxetina el principal núcleo serotoninérgico, el núcleo dorsal del rafe (DR), y el principal núcleo noradrenérgico, el locus coeruleus (LC).

2.2.- Hipótesis de Trabajo.

Nuestra hipótesis de trabajo defiende, por un lado, que las ratas con lesión nerviosa producida mediante constricción crónica del ciático (CCI) a las que se administra duloxetina presentarán analgesia respecto a las ratas a las que se aplique este modelo y se traten con vehículo.

Por otro lado, teniendo en cuenta el mecanismo de acción conocido de la duloxetina (inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina), esperamos que los principales núcleos noradrenérgico y serotoninérgico troncoencefálicos vean significativamente alterada su actividad tras la administración de la duloxetina en el modelo de dolor neuropático empleado, y que dicho efecto, se refleje a nivel medular.

2.3.- Objetivos

Los objetivos de este trabajo serán varios:

1º: Comprobar si el tratamiento con duloxetina reduce o no la alodinia y/o la hiperalgesia inducida en los animales de experimentación por la aplicación del modelo de dolor neuropático CCI.

2º: Comprobar si el tratamiento con duloxetina reduce o no la actividad neuronal inducida en el asta posterior de la médula espinal de los animales de experimentación por la aplicación del modelo de dolor neuropático CCI.

3º: Comprobar si el tratamiento con duloxetina modifica o no la actividad neuronal en los centros troncoencefálicos seleccionados para este estudio (el DR y el LC), tanto en animales a los que se aplique un estímulo nociceptivo (CCI) como a los que no.

Para alcanzar nuestros objetivos emplearemos test conductuales de medida de alodinia e hiperalgesia (Electro Von Frey y Randall y Sellito). Asimismo, analizaremos mediante inmunodetección de la proteína Fos, ampliamente utilizada como marcador de actividad neuronal en estudios de dolor, el efecto de la duloxetina en la actividad neuronal de los centros neurales objeto del estudio.

El interés de alcanzar los objetivos propuestos radica en que los estudios clínicos demuestran que la duloxetina 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 antihiperálgica. Los analgésicos tradicionales ejercen sus efectos por medio de la modulación de 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 condiciones de estimulación algésica nos permitirá, además, conocer hasta qué punto la sustancia objeto de estudio puede bloquear a nivel de asta posterior de la médula la expresión de c-fos debida a la llegada a ese nivel de las aferencias de naturaleza nociceptiva.

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

3- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.-Animal de experimentación.

Se utilizaron un total de 77 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Janvier Labs, Saint Berthevin, France), 350 ± 50 gramos. Utilizamos esta cepa porque los estudios previos de este modelo han sido realizados en ella (Grégoire S, 2012) (Alba-Delgado C, 2012) (Murai N, 2014) y utilizamos machos para evitar fluctuaciones conductuales producidas por los ciclos hormonales (Amandusson A, 2013) (Slattery DA, 2014).

Los roedores fueron recepcionados y estabulados en el animalario de la Unidad Central de Investigación de la Universidad de Valencia. Se mantuvieron con ciclo controlado de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, una temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$, una humedad relativa del $55\% \pm 10$, y con una impulsión de aire filtrado a través de filtros HEPPA con más de 15 renovaciones aire/hora. Las ratas estuvieron con acceso ad libitum a agua y comida (Dieta 2014 para mantenimiento de ratas, Harlan).

Los animales fueron estabulados, sometidos al procedimiento experimental y sacrificados según el RD 53/2013 sobre “protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos”, siguiendo las normas para la buena práctica con animales de experimentación del Consejo Europeo (86/609/EEC) y siguiendo las recomendaciones de FELASA (Federación Europea de animales de laboratorio), del Comité de Ética de la Universidad de Valencia y de la IASP (Zimmerman M, 1983) para el estudio de dolor en animales conscientes.

El número de animales de cada grupo experimental fue reducido al mínimo imprescindible. Siguiendo las indicaciones del Prof. Montes Suay, Catedrático de Universidad del Dpto. de Estadística y Investigación Operativa de la Facultad de CC. Matemáticas de la Universitat de València, la determinación del número mínimo de ejemplares por grupo experimental se hizo siguiendo el método propuesto por Cohen (Cohen J, 1988), de tal forma que se garantizara unos resultados estadísticamente válidos.

3.2.- Habitación.

En los tres primeros días del experimento se sometió al animal a un periodo de habitación al entorno, al investigador y a las maniobras que se le iban a realizar durante el procedimiento experimental, con el objetivo de disminuir el malestar de la rata durante el mismo, así como disminuir el error que pudiese introducir en nuestros resultados la respuesta de estrés (figura 5).

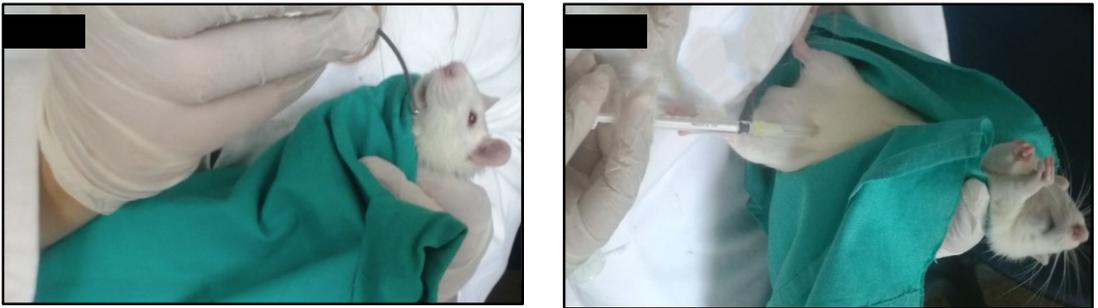


FIGURA 5. HABITUACIÓN A LAS MANIOBRAS DE INMOVILIZACIÓN PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS, POR VÍA ORAL (A) E INTRAPERITONEAL (B).

Finalmente, para los grupos destinados al estudio de medidas conductuales de dolor, se habitué al animal a los aparatos y manipulaciones específicas de su condición experimental.

A los animales del grupo que iban a ser medidos con el test Electrovonfrey se les alojó en un cilindro de metacrilato sobre una superficie rejada durante 10 minutos cada día (figura 6).

Los animales del grupo destinado al test de Randall y Selitto fueron habituados a permanecer inmóviles sobre un soporte de tela elevado, sujetas por la parte ventral del cuerpo y con las patas suspendidas a través de agujeros en la tela durante 10 minutos al día. El proceso total de habitación por día para cada rata fue de unos 30 minutos.



FIGURA 6. HABITUACIÓN A LOS TEST DE CONDUCTA. (A) HABITUACIÓN PARA EL ELECTROVONFREY TEST; LA RATA SE ENCUENTRA SOBRE UN SUELO DE REJILLA ELEVADO, DENTRO DE UN CILINDRO DE METACRILATO TRANSPARENTE DE 20 CM DE DIÁMETRO. (B) HABITUACIÓN PARA EL TEST RANDALL Y SELITTO; LA RATA SE ENCUENTRA INMÓVIL APOYADA POR LA PARTE VENTRAL DEL CUERPO SOBRE UN SOPORTE DE TELA ELEVADO, CON LAS PATAS SUSPENDIDAS EN EL AIRE A TRAVÉS DE AGUJEROS EN LA TELA.

El peso de los animales fue registrado todos los días desde el inicio hasta el final del experimento para detectar variaciones anormales de peso que pudieran ser indicativas de problemas en la salud del animal. Así mismo, con el mismo fin se controlaron mediante observación directa indicios cualitativos de estrés, tales como el exceso de secreción de porfirinas (cromodacriorrea) o la disminución de las conductas de autoaseo, y se registró cualquier otro tipo de dolor que pudiera sentir, como el producido por la rotura de alguna uña. Las ratas que presentaron un cuadro de sufrimiento innecesario para el objetivo de este trabajo fueron excluidas del experimento y sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (figura7).



FIGURA 7. SIGNOS DE SUFRIMIENTO EXCESIVO DEL ANIMAL QUE DETERMINAN CRITERIOS DE PUNTO FINAL: (A) SECRECIÓN EXCESIVA DE PORFIRINAS (CROMODACRIORREA), ACUMULADAS POR LA DISMINUCIÓN DE LA CONDUCTA DE AUTOASEO; (B) MUTILACIÓN PARCIAL DE LA PATA TRASERA DERECHA TRAS LA CONSTRICCIÓN DEL NERVIPO CIÁTICO.

3.3.- Modelo de dolor: *chronic constriction injury* (CCI).

Este modelo de dolor neuropático consistió en realizar tres ligaduras laxas alrededor del nervio ciático común, con 1mm aproximadamente de separación entre ellas (Bennett GJ, 1988) (figura 8). Se utilizó sutura de catgut crómico de 4/0 para la constricción del nervio, y de 3/0 para colocar puntos de aproximación de las fascias musculares y la piel, las cuales fueron abiertas para acceder al nervio. En ningún caso fue dañado el tejido muscular, y los paquetes musculares se desplazaron separando las fascias. Se tuvo especial cuidado en que las ligaduras no quedaran apretadas para evitar dañar las eferencias motoras del nervio. Durante toda la intervención, las ratas estuvieron anestesiadas con una mezcla gaseosa de Isoflurano y oxígeno.



FIGURA 8. INTERVENCIÓN PARA LA CONSTRICCIÓN DEL NERVI0 CIÁTICO COMÚN. (A) RATA ANESTESIADA CON ANESTESIA GASEOSA (ISOFLURANO-OXÍGENO), COLOCADA PARA LA INTERVENCIÓN; (B) EXPOSICIÓN DEL NERVI0 CIÁTICO COMÚN TRAS DISECCIONAR LOS DISTINTOS PLANOS SEPARANDO LAS FASCIAS; (C) SE OBSERVAN TRES LIGADURAS LAXAS ALREDEDOR DEL NERVI0 CIÁTICO COMÚN, CON SUTURA DE 4/0 DE CATGUT CRÓMICO Y APROXIMADAMENTE 1 MM DE SEPARACIÓN ENTRE ELLAS.

Las ratas bajo condición sham operated fueron sometidas al mismo procedimiento pero tras separar el nervio ciático del tejido conjuntivo, se volvieron a cerrar los tejidos sin realizar ninguna lesión sobre el nervio.

3.4.- Administración del fármaco.

La administración de la duloxetina o del vehículo (líquido intestinal artificial, LIA) se realizó por vía oral mediante una cánula gastroesofágica de acero curvada con la punta redondeada de calibre 16 de 75 mm de largo (Fine Science Tools).

Para la inoculación oral se inmovilizó al animal sujetándolo de forma que la cabeza quedara recta con respecto al cuerpo. Antes de introducir la cánula se calculó la distancia que se debía introducir situándola frente al animal y midiendo desde la boca hasta aproximadamente el apéndice xifoides. La cánula se introdujo suavemente en la boca apoyada en el paladar hasta alcanzar la distancia calculada previamente, inoculando la sustancia al llegar al final.

El volumen de inoculación no sobrepasó en ningún caso los 10 ml/kg.

3.4.1.- Preparación de la Duloxetina.

En este estudio empleamos cápsulas de 60 mg de clorhidrato duloxetina (Cymbalta®, Laboratorios Lilly).

Cada cápsula contiene gránulos con recubrimiento entérico para prevenir la degradación del fármaco en el medio ácido del estómago. Para poder disolver las cápsulas empleamos líquido intestinal artificial (LIA), cuya composición por cada 100 ml es la siguiente: 90 ml de agua destilada, 236 µl de hidróxido sódico (10N), 680,45 mg de dihidrogenofosfato de potasio y 10 ml de tween al 80%.

Cada cápsula de duloxetina se disolvió en 10 ml de LIA.

3.4.2.- Protocolo de Administración.

El cronograma del estudio conductual e inmunohistoquímico viene resumido en las figuras 9-12.

La administración en el caso del estudio conductual consistió en una dosis de 30 mg/kg cada 24 horas durante cuatro días, y comenzó a las 72 horas de la implantación del modelo CCI.

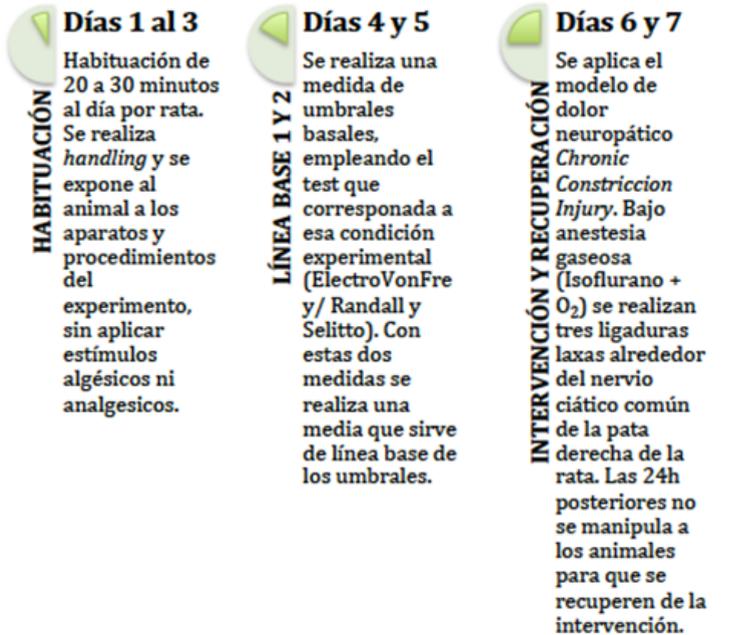


FIGURA 9. CRONOGRAMA ESTUDIO CONDUCTUAL DEL EFECTO DE LA DULOXETINA EN DOLOR NEUROPÁTICO.

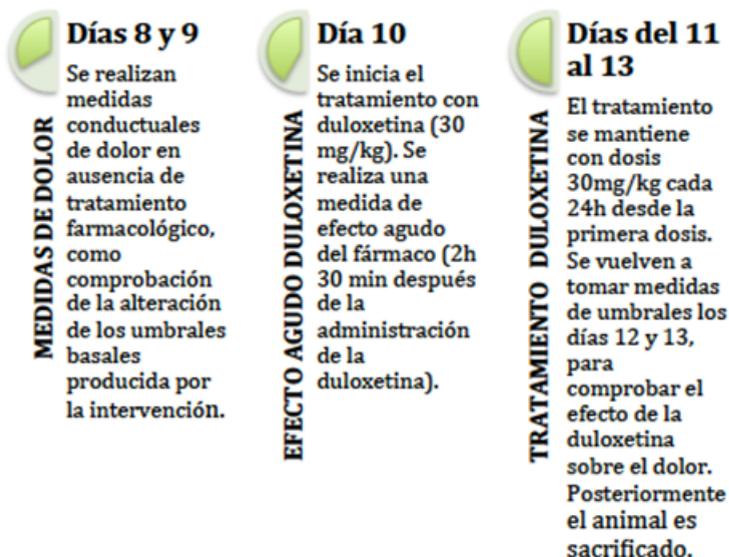


FIGURA 10. CRONOGRAMA ESTUDIO CONDUCTUAL DEL EFECTO DE LA DULOXETINA EN DOLOR NEUROPÁTICO.

Para el estudio de Inmunodetección de fos tratamiento se inició 2 horas antes de la intervención y continuó durante los tres días siguientes a la misma, con dosis de 30 mg/kg cada 24 horas. La perfusión de estos animales se inició a las 2h 30 min de la última administración.

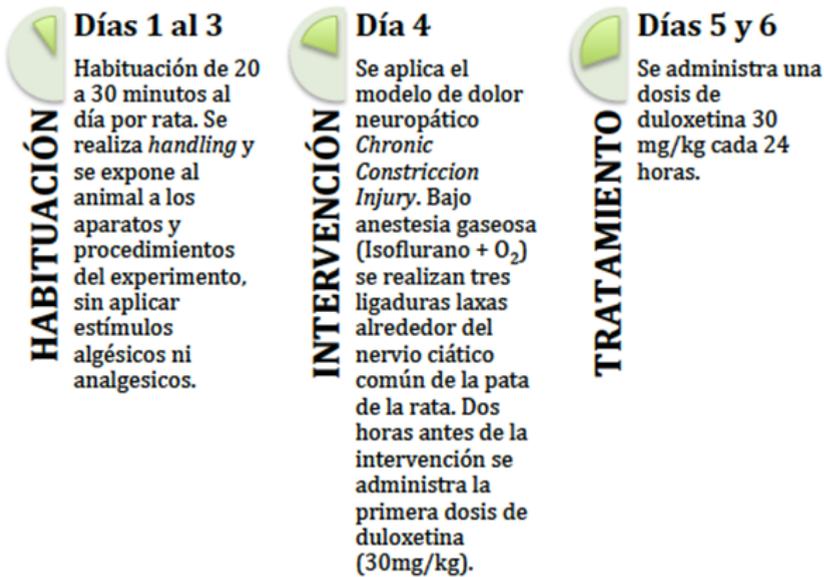


FIGURA 11. CRONOGRAMA ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL EFECTO DE LA DULOXETINA SOBRE EL DOLOR NEUROPÁTICO EN LOCUS COERULEUS, DORSAL RAPE Y LÁMINAS I, II Y V DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL.



Día 7

PERFUSIÓN

Se administra la última dosis de fármaco. Dos horas y media después se procede a la perfusión del animal, iniciándose con una sobredosis de pentobarbital sódico. Al finalizar la perfusión, se extrae el cerebro y la porción lumbar de la médula y se conserva en la solución fijadora durante 24h.



Días 8 al 13

TRATAMIENTO TEJIDO

El tejido pasa de la solución fijadora a una solución de sacarosa al 30% para su crioprotección. Los cerebros se cortan a 40 micras empleando un microtomo. A continuación se procede a realizar el protocolo inmunohistoquímico para la detección de c-fos.

FIGURA 12. CRONOGRAMA ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DEL EFECTO DE LA DULOXETINA SOBRE EL DOLOR NEUROPÁTICO EN LOCUS COERULEUS, DORSAL RAFF Y LÁMINAS I, II Y V DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL.

3.5- Casuística.

3.5.1.- Casuística del estudio conductual.

-**Grupo CCI-LIA** (n=8) (Chronic Constrictory Injury – Líquido Intersticial Artificial): Este grupo tuvo estimulación directa persistente sobre el nervio ciático común mediante ligaduras laxas y se le administró vehículo durante la fase de tratamiento.

-**Grup CCI_DULOXETINA** (n=9): Este grupo tuvo estimulación directa persistente sobre el nervio ciático común mediante ligaduras laxas y se le administró durante el tratamiento el fármaco objeto de estudio.

-**Grupo SHAM-LIA** (n=6): Este grupo no tuvo estimulación directa persistente sobre el nervio ciático común, la intervención fue simulada, y se le administró vehículo durante la fase de tratamiento.

-**Grupo SHAM-DULOXETINA** (n=6): Este grupo no tuvo estimulación directa persistente sobre el nervio ciático común, la intervención fue simulada y durante la fase de tratamiento se le administró el fármaco objeto de estudio.

3.5.2.- Casuística del estudio de inmunodetección.

-**Grupo CCI-LIA** (FOS) (n=6): Este grupo tuvo estimulación directa persistente sobre el nervio ciático común mediante ligaduras laxas y se le administró vehículo durante la fase de tratamiento.

-**Grupo CCI-DULOXETINA**(FOS) (n=6): Este grupo tuvo estimulación directa sobre el nervio ciático común mediante ligaduras laxas y se le administró durante el tratamiento el fármaco objeto de estudio.

-**Grupo SHAM-LIA (FOS) (n=6):** Este grupo no tuvo estimulación directa persistente sobre el nervio ciático común, la intervención fue simulada, y se le administró vehículo durante la fase de tratamiento.

-**Grupo SHAM-DULOXETINA (FOS)(n=6):** Este grupo no tuvo estimulación directa persistente sobre el nervio ciático común, la intervención fue simulada y durante la fase de tratamiento se le administró el fármaco objeto de estudio.

COND.EXP	DOLOR	FÁRMACO	Número de animales
CCI-LIA	Si	No	8
CCI-DULOXETINA	Si	Si	9
SHAM-LIA	No	No	6
SHAM-DULOXETINA	No	Si	6
CCI-LIA (FOS)	Si	No	6
CCI-DULOXETINA(FOS)	Si	Si	6
SHAM-LIA (FOS)	No	No	6
SHAM-DULOXETINA(FOS)	No	Si	6

TABLA 1. RESUMEN CASUÍSTICO DEL ESTUDIO COMPLETO.

3.6.- Estudio Conductual de Algesia.

Los test empleados para la medida conductual de los umbrales de dolor no produjeron lesiones en los animales, fueron de fácil aplicación y no invasivos, por lo que generaron poco estrés durante su aplicación, el cual quedó reducido aún más gracias al proceso de habituación.

3.6.1.- Electronic Von Frey Test.

Empleamos el Electronic Von Frey Test (EVF) para evaluar la alodinia táctil. El animal fue colocado sobre un suelo de rejilla elevado, dentro de un cilindro de metacrilato transparente de 20 cm de diámetro y 30 cm de altura. Utilizando el aparato electrónico de Von Frey (Electrovonfrey, model nº: 2290, IITC Inc. Woodland Hills, CA), que consiste en un transductor de fuerza que tiene acoplado una punta rígida (rígido tip) de 0.8 mm de diámetro, ejercimos una presión creciente sobre la planta de la pata trasera derecha de la rata hasta obtener una respuesta de retirada de la misma, teniendo en cuenta que tuviese las cuatro patas apoyadas sobre la rejilla en el momento de la medición. Se realizaron tres medidas en la pata con 30 segundos de intervalo entre estímulos en cada medición (figura 13).



FIGURA 13. (A) APARATO ELECTRONIC VON FREY: CONSTA DE UN TRANSDUCTOR DE FUERZA, UNA UNIDAD ALMEMO 2290-4 DE REGISTRO DE DATOS Y UN DISPOSITIVO DE REINICIO; (B) RATA SOBRE LA REJILLA ELEVADA. LA PUNTA RÍGIDA UNIDA AL TRANSDUCTOR DE FUERZA EJERCE PRESIÓN SOBRE LA PATA TRASERA DERECHA.

3.6.2.- Randall y Selitto Test.

Empleamos el test de Randall y Selitto adaptado para evaluar síntomas de hiperalgesia mecánica muscular. Para la realización de este test se inmovilizó ligeramente al animal empleando un soporte de tela elevado en el que el animal tenía la parte ventral de su cuerpo sobre la tela y las patas suspendidas en el aire, a través de unos agujeros de la tela destinados a tal fin. Una vez inmovilizado, se ejerció una presión creciente sobre el músculo gastrocnemio de la pata trasera derecha empleando el aparato adaptado de Randall y Selitto (IITC Inc. Woodland Hills, CA), hasta que el animal realizó la conducta de retirada de la pata. Se registraron tres medidas, con 30 segundos de intervalo interestímulo en cada medición (figura 14).



FIGURA 14. (A) APARATO RANDALL Y SELITTO ADAPTADO: CONSTA DE UN TRANSDUCTOR DE FUERZA, UNA UNIDAD ALMEMO 2290-4 DE REGISTRO DE DATOS Y UN DISPOSITIVO DE REINICIO; (B) RATA SOBRE EL SOPORTE DE TELA CON LAS PATAS SUSPENDIDAS. EL TRANSDUCTOR DE FUERZA UNIDO A UN APARATO EN FORMA DE PINZA EJERCE PRESIÓN SOBRE EL MÚSCULO GASTROCNEMIO LA PATA TRASERA DERECHA.

En todos los sujetos del estudio conductual se realizaron las siguientes medidas:

1. En la fase previa se establecieron los umbrales basales de dolor de cada rata (Línea Base). Este dato es el resultado de calcular la media de dos medidas realizadas en las mismas condiciones en dos días consecutivos. Hay que tener en cuenta que cada medida constó de la media de tres medidas, tomadas con un intervalo interestímulo de 30 segundos.
2. En la fase de establecimiento del modelo de dolor se realizaron dos medidas (a las 48 horas (dolor sin fármaco 1) y a las 72 horas (dolor sin fármaco 2) de la intervención de CCI antes de aplicar el tratamiento) para observar en qué grado la intervención y la implantación del modelo CCI afectaron los umbrales de dolor. Estas dos medidas fueron comparadas por separado, por un lado, con la línea de base de cada sujeto y, por otro lado, con las tres medidas de la fase de tratamiento.

3. En la fase de tratamiento, se tomaron en total tres medidas: la primera a las dos horas de haber administrado la primera dosis del fármaco/vehículo (a las 74 horas de la intervención). Esta medida fue considerada como medida de dosis aguda de duloxetina (efecto agudo); la segunda a las 48 horas (efecto crónico 1) de haber iniciado el tratamiento (120 horas desde la intervención); y la tercera 72 horas (efecto crónico 2) después del inicio del tratamiento (144 horas desde la intervención). Estas dos últimas medidas se consideran medidas de tratamiento crónico. Para la comparación de los valores en el análisis estadístico, cada medida fue considerada independiente, y comparada por separado con la línea de base y con cada una de las dos medidas de la fase de establecimiento del modelo de dolor.

Al finalizar la última medida las ratas fueron sacrificadas mediante una sobredosis de pentobarbital sódico. En estos sujetos no extrajimos ni cerebro ni médula porque la manipulación realizada durante los test alteraría la expresión de c-fos.

3.7.- Estudio Inmunohistoquímico.

3.7.1.- Perfusión.

A los 150 minutos de la administración de la última dosis de duloxetina (tercer día de tratamiento), los animales recibieron una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico. Se comenzaron las maniobras propias del proceso de perfusión cuando el animal estuvo profundamente anestesiado (ausencia de reflejo corneal), y con el corazón todavía en activo. Las perfusiones se realizaron mediante acceso transcárdico, con un primer lavado del árbol vascular con suero salino isotónico heparinizado (15000UI/l) seguido de una solución fijadora de paraformaldehído al 4%. Todo el proceso de anestesia y perfusión en ningún caso sobrepasó los 15 minutos de duración, para evitar la inducción iatrogénica de c-fos por efecto de la manipulación previa o de la propia anestesia (Herdegen T, 1991; Takayama K, 1994).

Al finalizar la perfusión, el encéfalo y la porción lumbar de la médula espinal fueron extraídos y conservados a 4°C en la misma solución fijadora hasta el día siguiente. Transcurrido ese tiempo, las muestras se pasaron a una solución crioprotectora a base de sacarosa al 30% en PBS (Phosphate Buffered Saline), en la cual permanecieron hasta que se hundieron (48-72 horas). Una vez crioprotegidas, las piezas se congelaron y seccionaron con un criostato en cortes coronales de 40µm de grosor distribuidos en 6 series equivalentes que se conservaron a -40°C hasta su utilización.

3.7.2.-Inmunodetección de Fos.

Tras tres lavados con tampón para eliminar la sacarosa, se procedió a la detección inmunocitoquímica de la proteína codificada por el proto-oncogén objeto de nuestro estudio, c-fos, por el método del ABC (Hsu SM, 1981). Los cortes pasaron por sucesivas soluciones (Valverde-Navarro AA, 1996): reducción/inhibición de peroxidasas endógenas; incubación en anticuerpo primario policlonal rabbit anti-Fos a 1:10000 (Santa Cruz, biotechnology®); incubación en anticuerpo secundario horse anti-Rabbit a 1:200 (Jackson Immunoresearch Laboratories®); incubación en solución ABC (Vector Laboratories®); revelado con diaminobencidina (DAB) (Sigma-Aldrich®) intensificada con alumbre de cromo y níquel al 5%.

3.8.- Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó SPSS v.21 (IBM). Se analizaron por separado los grupos experimentales destinados al estudio conductual (CCI-LIA, CCI-DULOX, SHAM-LIA y SHAM-DULOX) y los destinados al estudio inmunohistoquímico (CCI-LIA (FOS), CCI-DULOX (FOS), SHAM-LIA (FOS) y SHAM-DULOX (FOS)).

Todas las medidas registradas mediante el Electrovonfrey test y el Randall y Selitto test fueron ponderadas para cada sujeto respecto a su línea base, para obtener las variaciones en el umbral perceptivo de cada rata en función de su nivel basal.

Las comparaciones dentro del estudio conductual se realizaron entre los siguientes datos: por un lado, el valor de la línea base, obtenido de la media de dos medidas realizadas antes de la ligadura del nervio ciático en dos días consecutivos bajo las mismas condiciones, fue comparado con cada una de las dos medidas realizadas tras la implantación del modelo de dolor, así como con cada una de las tres medidas obtenidas durante la fase de tratamiento (dosis aguda, dosis crónica 48 horas, dosis crónica 72 horas). Por otro lado, las dos medidas obtenidas en la fase de establecimiento del modelo de dolor se compararon por separado con la línea base y con cada una de las tres medidas registradas durante la fase de tratamiento. También se compararon las medidas obtenidas en la fase de tratamiento (dosis aguda, dosis crónica 48 horas, dosis crónica 72 horas) por separado con la línea base, por un lado, y con cada una de las dos medidas obtenidas en la fase de establecimiento del modelo de dolor; y por último, se compararon las tres medidas referentes al tratamiento entre sí.

En el caso del estudio inmunohistoquímico, se compararon las cuatro condiciones experimentales entre ellas para cada núcleo (Rafe Dorsal, Locus Coeruleus y asta posterior de la médula (láminas I+II y V).

La estadística de los resultados se inició con una descriptiva que incluyó la media, la desviación típica y el error típico de la media para las variables originales.

Posteriormente se realizaron pruebas de normalidad de la muestra, esfericidad y homogeneidad de varianzas, para determinar el estadístico más apropiado para el estudio de comparaciones entre los grupos. Para poder emplear el estadístico ANOVA de análisis de varianzas, los datos debían cumplir los supuestos de esfericidad (sólo necesario para la ANOVA de medidas repetidas), normalidad y homogeneidad de varianzas; aunque numerosos autores sostienen que ANOVA es robusta para homogeneidad de varianzas (y de ser así, se empleamos el test de Games-Howell como prueba post-hoc). En caso de no

sostener la robustez de ANOVA para la homogeneidad, acudimos a una prueba paralela no paramétrica (Friedman), y en el caso de no cumplirse el supuesto de esfericidad, recurrimos a las estimaciones de ϵ en la estimación de Huynh y Feldt, la cual, si se mantenía entre 0,7 y 1, seguimos usando el ANOVA y no acudimos a las pruebas no paramétricas.

En el caso del estudio conductual, si se cumplieron los criterios para el uso de la ANOVA, para comparar las medidas de dolor empleamos un análisis de varianzas con medidas repetidas ANOVA (intra-sujetos), ya que medimos las mismas variables pero repetidas veces, en este caso por tener varios momentos temporales de la misma variable, y estamos interesados en contrastar las medias de esos momentos. Los factores presentaron la misma escala de medida y se buscó encontrar diferencias en promedio en las medias de dolor de los sujetos. Posteriormente a la prueba ANOVA de medidas repetidas, realizamos análisis post-hoc de Bonferroni y Tukey para saber entre qué grupos existen diferencias y cuantificarlas. Cuando no se cumplieron las condiciones de normalidad, esfericidad y homogeneidad de varianzas, empleamos la prueba paralela no paramétrica.

Para el análisis estadístico del estudio inmunohistoquímico usamos un análisis de varianzas ANOVA de un factor ya que teníamos una variable independiente que agrupaba a los sujetos en grupos independientes, y queríamos saber si existían diferencias entre las medias de esos grupos en una variable cuantitativa. Para ello, los grupos debieron cumplir los supuestos de independencia, normalidad y homogeneidad (algunos autores sostienen que ANOVA de un factor es robusto ante el fallo de uno de estos dos últimos supuestos; en caso de que fallaran los dos, usamos la prueba no paramétrica Brown-Forsythe-Welch). Posteriormente a la prueba ANOVA de un factor, realizamos un análisis post-hoc de Bonferroni y Tukey para saber entre qué grupos existen diferencias y cuantificarlas.

3.9.- Análisis de Imagen.

Con la ayuda de un atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos G, 1986) se seleccionaron las fotografías de los centros troncoencefálicos Dorsal Rafe (DR), Locus Coeruleus (LC) y de las láminas I, II y V del asta posterior de la médula espinal, las cuales fueron tomadas con ayuda de un microscopio Axioscope A1 de Carl Zeiss® para epifluorescencia con combinación de luz transmitida. Las imágenes para el estudio fotográfico fueron capturadas mediante una cámara AxioCam MRC refrigerada de alta resolución acoplada al microscopio. El conteo de c-fos se realizó mediante el programa ImageJ. Para ello, se fusionaron empleando el programa Photoshop CS5 las plantillas de los núcleos a estudiar extraídas del atlas de estereotaxia usado anteriormente y las fotografías de los cortes seleccionados.

Es importante señalar que no todos los elementos inmunorreactivos mostraron la misma intensidad de marcaje, pudiendo encontrar en una misma sección desde células fuertemente inmunopositivas (puntos de coloración negra opaca y homogénea) hasta células débilmente marcadas (puntos de coloración grisácea translúcida e irregular). Para nuestro estudio sólo se consideraron aquellas células claramente marcadas. Esto se consiguió ajustando previamente los parámetros del programa de análisis Image J. En caso de corrección manual del ImageJ, se mantuvo siempre el mismo criterio de exclusión o inclusión con todos los ejemplares del experimento.

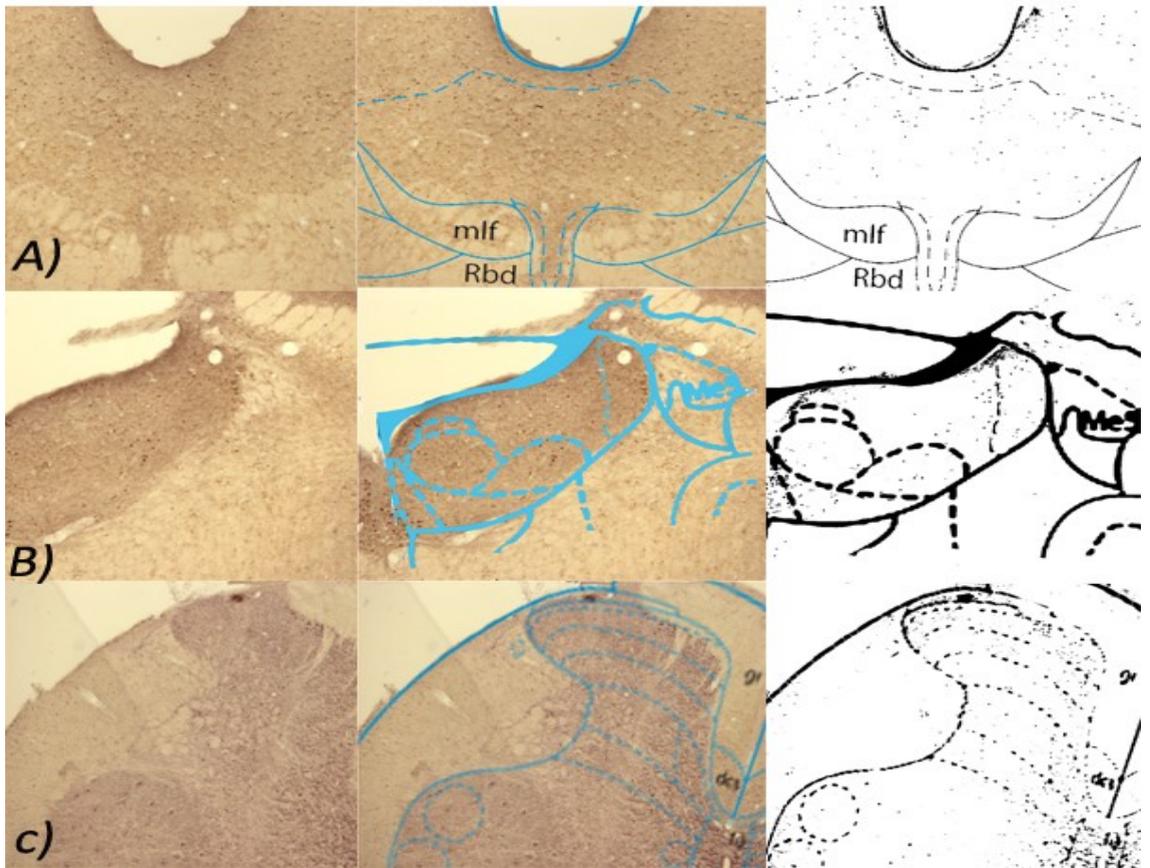


FIGURA 15. PROCESO DE ANÁLISIS Y CONTAJE DE FOS EN LOS NÚCLEOS (A) DORSAL RAFF; (B) LOCUS COERULEUS; (C) MÉDULA

4. RESULTADOS

4.1.- Resultados del estudio conductual.

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

Para comparar las medidas de dolor, usaremos dos análisis: en primer lugar, emplearemos un análisis de varianzas con medidas repetidas ANOVA (intra-sujetos), ya que medimos las mismas variables pero repetidas veces, en este caso por tener varios momentos temporales de la misma variable, y estamos interesados en contrastar las medias de esos momentos. Los factores presentan la misma escala de medida y se busca encontrar diferencias en promedio en las medias de dolor de los sujetos. Para poder hacer esta prueba, los datos han de cumplir los supuestos de esfericidad y de homogeneidad; aunque numerosos autores sostienen que ANOVA es robusta para homogeneidad de varianzas (y de ser así, se emplearía el test de Games-Howell como prueba post-hoc). En caso de no sostener la robustez de ANOVA para la homogeneidad, se acudiría a una prueba no paramétrica, y en el caso de no cumplirse el supuesto de esfericidad, se debe recurrir a las estimaciones de ϵ en la estimación de Huynh y Feldt, la cual, si se mantiene entre 0,7 y 1, seguiremos usando el ANOVA y no habrá que acudir a las pruebas no paramétricas. Posteriormente a la prueba ANOVA de medidas repetidas, realizaremos análisis post-hoc de Bonferroni, Scheffe y Tukey para saber entre qué grupos existen diferencias y cuantificarlas.

En segundo lugar, usaremos un análisis de varianzas ANOVA de un factor ya que tenemos una variable independiente que agrupa a los sujetos en grupos independientes, y queremos saber si existen diferencias entre las medias de esos grupos en una variable cuantitativa. Para ello, los grupos deben cumplir los supuestos de independencia, normalidad y homogeneidad (algunos autores sostienen que ANOVA de un factor es robusto ante el fallo de uno de estos dos últimos supuestos; en caso de que fallen los dos, usaremos la prueba no paramétrica Brown-Forsythe-Welch).

4.1.1.- Estudio de estadística descriptiva.

4.1.1.1. Resultados conductuales Randall y Sellito.

En este apartado describiremos las variables a estudiar, las cuales podemos dividir en:

- Línea Base, establecida como control absoluto de cada rata.
- Fase de establecimiento del modelo de dolor o Dolor sin fármaco: dos medidas tomadas a las 48 horas (Dolor sin fármaco 1) y 72 horas (Dolor sin fármaco 2) tras la operación y sin recibir ningún tipo de farmacología.
- Fase de tratamiento:
 - o Efecto agudo del fármaco: Medida tomada a las 74 horas de la operación y tras 2 horas de una única dosis aguda de fármaco.
 - o Efecto crónico del fármaco: Dos medidas tomadas a las 120 horas de la operación y tras 48 horas de dosis diarias repetidas de fármaco (Efecto crónico del fármaco 1) y a las 144 horas de la operación y tras 72 horas de dosis diarias repetidas de fármaco (Efecto crónico del fármaco 2).

Las condiciones experimentales son:

- Grupo constricción crónica del ciático tratado con vehículo (*CCI-LIA*)
Los animales de este grupo mostraron una evidente hiperalgesia mecánica en la fase de dolor sin fármaco sin mejora en las fases de tratamiento farmacológico con el vehículo, en este caso líquido intestinal artificial.
- Grupo constricción crónica del ciático tratado con Duloxetina (*CCI-DUL*)
Los animales de este grupo mostraron una evidente hiperalgesia mecánica en la fase de dolor sin fármaco con una mejora significativa en las fases de tratamiento farmacológico con Duloxetina.
- Grupo control tratado con vehículo (*SHAM-LIA*)
Los animales de este grupo no mostraron hiperalgesia mecánica significativa en la fase de dolor sin fármaco, y por lo tanto no mostraron mejora de los síntomas respecto a su línea base.

- Grupo control tratado con Duloxetina (*SHAM-DUL*).

Los animales de esta condición experimental mostraron resultados semejantes a los del grupo SHAM-LIA: No mostraron hiperalgesia y por lo tanto, tampoco mejoría de ésta.

En las siguientes tablas puede verse que todas las variables cumplen el supuesto de normalidad (nos fijaremos en la tabla de Shapiro-Wilk puesto que el tamaño muestral no supera los 50 sujetos (Tabla 2)); así como el supuesto de homogeneidad de varianzas (Tabla 3). Por último, se exponen los datos descriptivos estadísticos de las variables según las condiciones experimentales (Tabla 4).

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Línea Base	,203	21	,024	,913	21	,062
Dolor sin fármaco 1	,119	21	,200 [*]	,943	21	,251
Dolor sin fármaco 2	,111	21	,200 [*]	,971	21	,754
Efecto agudo del fármaco	,212	21	,015	,939	21	,212
Efecto crónico del fármaco 1	,137	21	,200 [*]	,952	21	,371
Efecto crónico del fármaco 2	,141	21	,200 [*]	,933	21	,155

TABLA 2: PRUEBAS DE NORMALIDAD PARA LAS VARIABLES CUANTITATIVAS DEL ESTUDIO CONDUCTUAL DE RANDALL Y SELLITO. SE OBSERVA EL ESTADÍSTICO DE SHAPIRO-WILK YA QUE LA N TOTAL (TAMAÑO MUESTRAL TOTAL) NO SUPERA LOS 50 SUJETOS. TODAS LAS VARIABLES SON NORMALES.

Prueba de Levene para la igualdad de varianzas

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	
		F	Sig.
Línea Base	Se han asumido varianzas iguales	,012	,914
Dolor sin fármaco 1	Se han asumido varianzas iguales	,674	,435
Dolor sin fármaco 2	Se han asumido varianzas iguales	,264	,621
Efecto agudo del fármaco	Se han asumido varianzas iguales	,069	,799
Efecto crónico del fármaco 1	Se han asumido varianzas iguales	1,380	,274
Efecto crónico del fármaco 2	Se han asumido varianzas iguales	,044	,838

TABLA 3: PRUEBAS DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE LEVENE PARA LAS VARIABLES CUANTITATIVAS DEL ESTUDIO CONDUCTUAL DE RANDALL Y SELLITO. SE ASUMEN VARIANZAS IGUALES (HOMOGÉNEAS) EN TODOS LOS CASOS.

Informe

Condición experimental		Línea Base	Dolor sin fármaco 1	Dolor sin fármaco 2	Efecto agudo del fármaco	Efecto crónico del fármaco 1	Efecto crónico del fármaco 2
CCH-LIA	Media	,47500	,39850	,30050	,36583	,32267	,37467
	Desv. típ.	,150621	,174478	,080766	,159653	,061497	,099045
	Error típ. de la media	,061491	,071230	,032972	,065178	,025106	,040435
CCH-DULOXETINA	Media	,53720	,41980	,38800	,46800	,57740	,56980
	Desv. típ.	,077332	,148480	,081062	,102228	,058149	,114371
	Error típ. de la media	,034584	,066402	,036252	,045718	,026005	,051148
SHAM-LIA	Media	,59920	,55600	,56640	,58380	,61280	,67640
	Desv. típ.	,073323	,099169	,096749	,105488	,120823	,094249
	Error típ. de la media	,032791	,044350	,043267	,047176	,054034	,042149
SHAM-DULOXETINA	Media	,61620	,55120	,54820	,58620	,62880	,68460
	Desv. típ.	,046709	,099402	,119819	,041650	,057491	,090861
	Error típ. de la media	,020889	,044454	,053585	,018626	,025711	,040634
Total	Media	,55300	,47743	,44362	,49452	,52529	,56676
	Desv. típ.	,108624	,146854	,145292	,142382	,150968	,161386
	Error típ. de la media	,023704	,032046	,031705	,031070	,032944	,035217

TABLA 4: ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES Y GRUPOS. SE EXPONEN LAS DESCRIPTIVOS MEDIA, DESVIACIÓN TÍPICA Y ERROR TÍPICO DE LA MEDIA.

4.1.1.2.- Resultados conductuales Electro von Frey.

Las variables a estudiar son las siguientes:

- Línea de base: establecida como control absoluto de cada rata.
- Fase de establecimiento del modelo de dolor o Dolor sin fármaco: dos medidas tomadas a las 48 horas (Dolor sin fármaco 1) y 72 horas (Dolor sin fármaco 2) tras la operación y sin recibir ningún tipo de farmacología.
- Fase de tratamiento:
 - o Efecto agudo del fármaco: Medida tomada a las 72 horas de la operación y tras 2 horas de una única dosis aguda de fármaco.
 - o Efecto crónico del fármaco: Dos medidas tomadas a las 120 horas de la operación y tras 48 horas de dosis diarias repetidas de fármaco (Efecto crónico del fármaco 1) y a las 144 horas de la operación y tras 72 horas de dosis diarias repetidas de fármaco (Efecto crónico del fármaco 2).

Las condiciones experimentales son:

- Grupo constricción crónica del ciático tratado con vehículo (CCI-LIA)
Los animales de este grupo mostraron alodinia mecánica en la fase de dolor sin fármaco sin mejora en las fases de tratamiento farmacológico con el vehículo, en este caso líquido intestinal artificial en la pata ipsilateral a la lesión.
- Grupo constricción crónica del ciático tratado con Duloxetina (CCI-DUL)
Los animales de este grupo mostraron alodinia mecánica en la fase de dolor sin fármaco con una mejora significativa en las fases de tratamiento farmacológico con Duloxetina en la pata ipsilateral a la lesión.
- Grupo control tratado con vehículo (SHAM-LIA)
Los animales de este grupo no mostraron alodinia mecánica significativa en la fase de dolor sin fármaco, y por lo tanto no mostraron mejora de los síntomas respecto a su línea base en la pata ipsilateral a la lesión.

- Grupo control tratado con Duloxetina (SHAM-DUL)

Los animales de esta condición experimental mostraron resultados semejantes a los del grupo SHAM-LIA: No mostraron hiperalgesia y por lo tanto, tampoco mejoría de ésta en la pata ipsilateral a la lesión.

En las siguientes tablas puede verse que todas las variables, salvo las variables sin fármaco, cumplen tanto el supuesto de normalidad (nos fijaremos en la tabla de Shapiro-Wilk puesto que el tamaño muestral no supera los 50 sujetos (Tabla 5) como el supuesto de homogeneidad de varianzas (Tabla 6). Por último, se exponen los datos descriptivos estadísticos de las variables según las condiciones experimentales (Tabla 7). Al obtener estos descriptivos, tendremos que usar la prueba no paramétrica paralela a ANOVA de medidas repetidas, llamada prueba de Friedman o Prueba K para medidas relacionadas cuando hayan de compararse las medidas de dolor sin fármaco.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Línea Base	,114	24	,200*	,964	24	,526
Dolor sin fármaco 1	,202	24	,013	,874	24	,006
Dolor sin fármaco 2	,224	24	,003	,859	24	,003
Efecto agudo del fármaco	,198	24	,016	,920	24	,057
Efecto crónico del fármaco 1	,172	24	,065	,930	24	,099
Efecto crónico del fármaco 2	,164	24	,093	,923	24	,069

TABLA 5: PRUEBAS DE NORMALIDAD PARA LAS VARIABLES CUANTITATIVAS DEL ESTUDIO CONDUCTUAL DE ELECTROVONFREY. SE OBSERVA EL ESTADÍSTICO DE SHAPIRO-WILK YA QUE LA N TOTAL (TAMAÑO MUESTRAL TOTAL) NO SUPERA LOS 50 SUJETOS. TODAS LAS VARIABLES SON NORMALES EXCEPTO LAS VARIABLES DOLOR SIN FÁRMACO 1 (ESTADÍSTICO= 0,874; $P<0,05$) Y DOLOR SIN FÁRMACO 2 (ESTADÍSTICO= 0,859; $P<0,05$).

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas	
	F	Sig.
Línea base	,202	,662
Dolor sin fármaco 1	6,889	,024
Dolor sin fármaco 2	9,136	,012
Efecto agudo del fármaco	2,187	,167
Efecto crónico del fármaco 1	,958	,349
Efecto crónico del fármaco 2	4,554	,056

TABLA 6: PRUEBAS DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS DE LEVENE PARA LAS VARIABLES CUANTITATIVAS DEL ESTUDIO CONDUCTUAL DE ELECTROVONFREY. SE ASUMEN VARIANZAS IGUALES (HOMOGÉNEAS) EN TODOS LOS CASOS EXCEPTO EN LAS VARIABLES DOLOR SIN FÁRMACO 1 ($F=6,889$; $p<0,05$) Y DOLOR SIN FÁRMACO 2 ($F= 9,136$; $p<0,05$).

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico
Línea Base	CCI-LIA	5	1276,7000	134,66734	60,22506
	CCI-DULOXETINA	7	1564,8829	152,50051	57,63978
	SHAM-LIA	6	1595,5850	188,56333	76,98066
	SHAM-DULOXETINA	6	1892,0550	273,79783	111,77749
	Total	24	1594,3133	280,29883	57,21576
Dolor sin fármaco 1	CCI-LIA	5	399,0660	135,00623	60,37662
	CCI-DULOXETINA	7	483,3671	138,28306	52,26609
	SHAM-LIA	6	1534,7217	269,54966	110,04319
	SHAM-DULOXETINA	6	1443,0567	140,94958	57,54242
	Total	24	968,5654	559,26495	114,15948
Dolor sin fármaco 2	CCI-LIA	5	457,0680	216,06577	96,62755
	CCI-DULOXETINA	7	431,1443	91,47626	34,57478
	SHAM-LIA	6	1461,6633	250,62056	102,31542
	SHAM-DULOXETINA	6	1678,6100	137,58157	56,16744
	Total	24	1006,0413	605,25549	123,54726
Efecto agudo del fármaco	CCI-LIA	5	430,6000	160,90655	71,95960
	CCI-DULOXETINA	7	711,9057	179,50672	67,84716
	SHAM-LIA	6	1377,7767	78,88782	32,20582
	SHAM-DULOXETINA	6	1553,2217	182,23283	74,39624
	Total	24	1030,0971	483,06119	98,60445
Efecto crónico del fármaco 1	CCI-LIA	5	397,8660	173,08012	77,40378
	CCI-DULOXETINA	7	900,5714	286,32782	108,22174
	SHAM-LIA	6	1555,6117	223,70952	91,32903
	SHAM-DULOXETINA	6	1417,0000	186,45288	76,11907
	Total	24	1088,7083	494,51385	100,94222
Efecto crónico del fármaco 2	CCI-LIA	5	431,5340	158,58050	70,91936
	CCI-DULOXETINA	7	820,9986	371,20216	140,30123
	SHAM-LIA	6	1398,5550	75,96509	31,01262
	SHAM-DULOXETINA	6	1630,8350	256,09217	104,54919
	Total	24	1086,7083	522,72358	106,70050

TABLA 7: ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES Y GRUPOS. SE EXPONEN LAS DESCRIPTIVOS MEDIA, DESVIACIÓN TÍPICA Y ERROR TÍPICO DE LA MEDIA.

4.1.2.- Estudio de estadística inferencial.

4.1.2.1- Resultados conductuales Randall y Sellito.

4.1.2.1.a. Comparación de la línea base con las medidas de dolor sin fármaco.

Realizamos un ANOVA de medidas repetidas para las variables Línea base, Dolor sin fármaco 1 y Dolor sin fármaco 2, siendo el factor del grupo experimental que presenta 4 condiciones experimentales diferentes.

Los resultados se recogen en las tablas 8 y 9, que a su vez reproduce las tablas ANOVA de medidas repetidas de las variables.

En la tabla 8, se observa cómo las variables cumplen el supuesto de esfericidad de Mauchly. Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 16.

Como podemos observar, existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F=7,589$; $p<0,05$).

En la tabla 9, se muestran los resultados de los análisis post-hoc en la cual se observa que las diferencias están entre los grupos CCI-LIA y CCI-DULOX y las condiciones experimentales control, mostrando más dolor. Estos resultados eran esperables puesto que la operación SHAM no constituye una lesión en el nervio ciático.

Prueba de esfericidad de Mauchly

: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
factor1	,996	,059	2	,971	,996	1,000	,500

TABLA 8. TABLA DE SUPUESTO DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY. SE OBSERVA QUE LAS VARIABLES A ESTUDIAR CUMPLEN EL SUPUESTO ($W=0,996$; $p<0,05$).

Comparaciones múltiples

: MEASURE_1

	Condición experimental	Condición experimental (comparación)	Diferencia de medias (I-J)	Error tip.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,06608	,041610	,418	-,18821	,05605
		SHAM-LIA	-,21820 [†]	,039231	,000	-,33335	-,10305
		SHAM-DULOXETINA	-,26433 [†]	,045300	,000	-,39729	-,13137
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,06608	,041610	,418	-,05605	,18821
		SHAM-LIA	-,15212 [†]	,041610	,014	-,27425	-,02999
		SHAM-DULOXETINA	-,19825 [†]	,047376	,005	-,33730	-,05920
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,21820 [†]	,039231	,000	,10305	,33335
		CCI-DULOXETINA	,15212 [†]	,041610	,014	,02999	,27425
		SHAM-DULOXETINA	-,04613	,045300	,742	-,17909	,08683
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,26433 [†]	,045300	,000	,13137	,39729
		CCI-DULOXETINA	,19825 [†]	,047376	,005	,05920	,33730
		SHAM-LIA	,04613	,045300	,742	-,08683	,17909
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,06608	,041610	,818	-,19537	,06320
		SHAM-LIA	-,21820 [†]	,039231	,001	-,34009	-,09631
		SHAM-DULOXETINA	-,26433 [†]	,045300	,000	-,40508	-,12359
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,06608	,041610	,818	-,06320	,19537
		SHAM-LIA	-,15212 [†]	,041610	,017	-,28140	-,02283
		SHAM-DULOXETINA	-,19825 [†]	,047376	,006	-,34545	-,05105
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,21820 [†]	,039231	,001	,09631	,34009
		CCI-DULOXETINA	,15212 [†]	,041610	,017	,02283	,28140
		SHAM-DULOXETINA	-,04613	,045300	1,000	-,18688	,09461
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,26433 [†]	,045300	,000	,12359	,40508
		CCI-DULOXETINA	,19825 [†]	,047376	,006	,05105	,34545
		SHAM-LIA	,04613	,045300	1,000	-,09461	,18688

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

TABLA 9: TABLA POST-HOC DE COMPARACIONES MÚLTIPLES SEGÚN LAS CORRECCIONES DE BONFERRONI Y TUKEY. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA Y CCI-DUL ENTRE LOS GRUPOS CONTROL SHAM (P<0,05).

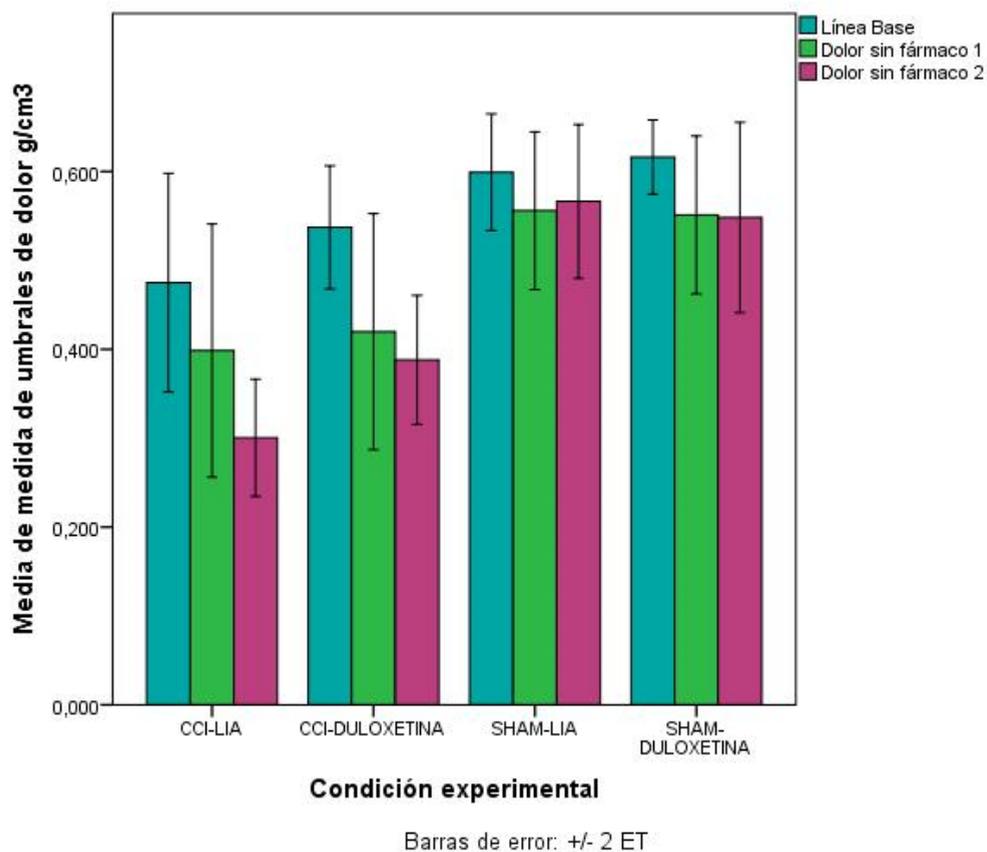


FIGURA 16: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES LÍNEA BASE, DOLOR SIN FÁRMACO 1 Y DOLOR SIN FÁRMACO 2. SE OBSERVA UN DESCENSO SIGNIFICATIVO EN LAS MEDIAS DE LOS UMBRALES DE DOLOR EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES RESPECTO A SUS LÍNEAS BASE Y A LOS GRUPOS SHAM; ASIMISMO, LOS GRUPOS SHAM NO MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS RESPECTO A SUS LÍNEAS BASE.

4.1.2.1.b. Comparación de la línea base con el efecto agudo del fármaco.

Realizamos un ANOVA de medidas repetidas para las variables Línea base y Efecto agudo del fármaco, siendo el factor del grupo experimental que presenta 4 condiciones experimentales diferentes. En la tabla 10 se observa cómo las variables cumplen el supuesto de esfericidad de Mauchly. A priori, en la tabla ANOVA intra-sujetos (Tabla 11) no hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F=1,190$; $p>0,05$); pero si dejamos atrás las líneas generales y nos centramos de forma específica en las pruebas post-hoc (Tabla 12) vemos que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CCI-LIA y los grupos control ($p<0,05$).

El grupo CCI-DUL no muestra diferencias estadísticamente significativas con los grupos control ($p<0,05$) pero tampoco con el grupo CCI-LIA ($p<0,05$), lo que indica que está justo a medio camino de ambos, con lo cual podemos vislumbrar que el medicamento, a efectos a agudos, tiene un cierto efecto analgésico. Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 17.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
f1	1,000	,000	0	.	1,000	1,000	1,000

TABLA 10: TABLA DE SUPUESTO DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY; LAS VARIABLES CUMPLEN DE FORMA MUY ALTA EL SUPUESTO (W=1; P>0,05).

ANOVA de medidas repetidas. Prueba F de comparación de medias. ANOVA intra-sujetos.

Medida: MEASURE_1

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Comparación2	Esfericidad asumida	,015	1	,015	1,190	,295
	Greenhouse-Geisser	,015	1,000	,015	1,190	,295
	Huynh-Feldt	,015	1,000	,015	1,190	,295
	Límite-inferior	,015	1,000	,015	1,190	,295
Comparación2 * CONDEXP	Esfericidad asumida	,006	3	,002	,159	,922
	Greenhouse-Geisser	,006	3,000	,002	,159	,922
	Huynh-Feldt	,006	3,000	,002	,159	,922
	Límite-inferior	,006	3,000	,002	,159	,922
Error(Comparación2)	Esfericidad asumida	,159	13	,012		
	Greenhouse-Geisser	,159	13,000	,012		
	Huynh-Feldt	,159	13,000	,012		
	Límite-inferior	,159	13,000	,012		

TABLA 11: TABLA ANOVA DE MEDIDAS INTRA-SUJETOS O MEDIDAS REPETIDAS. NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS, HABLANDO EN LÍNEAS GENERALES.

Comparaciones múltiples

: MEASURE_1

	Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,07283	,052777	,533	-,22773	,08208
		SHAM-LIA	-,17170*	,049759	,020	-,31775	-,02565
		SHAM-DULOXETINA	-,18937*	,057457	,026	-,35801	-,02073
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,07283	,052777	,533	-,08208	,22773
		SHAM-LIA	-,09888	,052777	,286	-,25378	,05603
		SHAM-DULOXETINA	-,11654	,060090	,260	-,29291	,05983
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,17170*	,049759	,020	,02565	,31775
		CCI-DULOXETINA	,09888	,052777	,286	-,05603	,25378
		SHAM-DULOXETINA	-,01767	,057457	,989	-,18631	,15097
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,18937*	,057457	,026	,02073	,35801
		CCI-DULOXETINA	,11654	,060090	,260	-,05983	,29291
		SHAM-LIA	,01767	,057457	,989	-,15097	,18631
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,07283	,052777	1,000	-,23681	,09116
		SHAM-LIA	-,17170*	,049759	,026	-,32630	-,01710
		SHAM-DULOXETINA	-,18937*	,057457	,035	-,36789	-,01085
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,07283	,052777	1,000	-,09116	,23681
		SHAM-LIA	-,09888	,052777	,502	-,26286	,06511
		SHAM-DULOXETINA	-,11654	,060090	,447	-,30324	,07016
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,17170*	,049759	,026	,01710	,32630
		CCI-DULOXETINA	,09888	,052777	,502	-,06511	,26286
		SHAM-DULOXETINA	-,01767	,057457	1,000	-,19619	,16085
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,18937*	,057457	,035	,01085	,36789
		CCI-DULOXETINA	,11654	,060090	,447	-,07016	,30324
		SHAM-LIA	,01767	,057457	1,000	-,16085	,19619

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

TABLA 12 : TABLA POST-HOC DE COMPARACIONES MÚLTIPLES. A CONTRARIO QUE CON EL ANOVA GENERAL, EN LAS PRUEBAS POST HOC OBSERVAMOS DE FORMA ESPECÍFICA QUE SÍ HAY DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE EL GRUPO CCI-LIA Y LOS GRUPOS CONTROL (P<0,05)

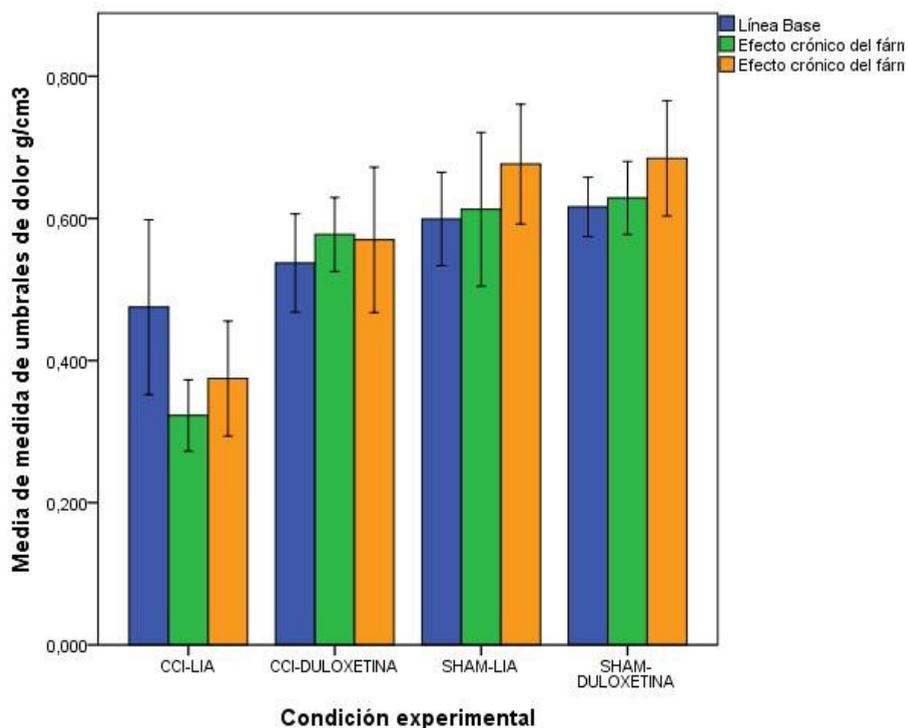


FIGURA 17: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES LÍNEA BASE Y EFECTO AGUDO DEL FÁRMACO. SE PUEDE OBSERVAR UNA APROXIMACIÓN HACIA VALORES DE LÍNEA BASE DE CCI-DULOJETINA MIENTRAS QUE NO SE APRECIA NINGUNA MEJORA EN LOS VALORES DE CCI-LIA.

4.1.2.1.c. Comparación entre línea base y efecto crónico del fármaco.

Realizamos un ANOVA de medidas repetidas para las variables: línea base, efecto crónico del fármaco1 y efecto crónico del fármaco2.

En la tabla 13 se observa cómo las variables cumplen el supuesto de esfericidad de Mauchly.

A priori, volvemos a observar en la tabla ANOVA intra-sujetos (Tabla 14) que no hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F=1,063$; $p>0,05$); esto puede ocurrir por la fortísima similitud entre los grupos control SHAM-LIA y SHAM-DULOX durante todo el proceso, algo que indicaría que los controles son muy efectivos.

En las pruebas post-hoc (Tabla 15) se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CCI-LIA y los grupos control ($p<0,05$) y CCI-LIA y el grupo CCI-DULOX ($p<0,05$); así como el grupo CCI-DUL no muestra diferencias estadísticamente significativas con los grupos control ($p<0,05$). Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 18.

Prueba de Esfericidad de Mauchly^a

Medida: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
Comparación2	,778	4,022	2	,134	,818	1,000	,500

TABLA 13: PRUEBA W DE ESFERICIDAD DE MUACHLY. TODAS LAS VARIABLES CUMPLEN EL SUPUESTO DE ESFERICIDAD.

ANOVA de medidas repetidas. Prueba F de comparación de medias. Prueba de ANOVA intra-sujetos

Medida: MEASURE_1

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Comparación2	Esfericidad asumida	,018	2	,009	1,063	,357
	Greenhouse-Geisser	,018	1,636	,011	1,063	,347
	Huynh-Feldt	,018	2,000	,009	1,063	,357
	Límite-inferior	,018	1,000	,018	1,063	,317
Comparación2 * CONDEXP	Esfericidad asumida	,088	6	,015	1,781	,133
	Greenhouse-Geisser	,088	4,909	,018	1,781	,151
	Huynh-Feldt	,088	6,000	,015	1,781	,133
	Límite-inferior	,088	3,000	,029	1,781	,189
Error(Comparación2)	Esfericidad asumida	,280	34	,008		
	Greenhouse-Geisser	,280	27,818	,010		
	Huynh-Feldt	,280	34,000	,008		
	Límite-inferior	,280	17,000	,016		

TABLA 14: TABLA ANOVA DE MEDIDAS INTRA-SUJETOS O MEDIDAS REPETIDAS. NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS, HABLANDO EN LÍNEAS GENERALES.

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

DHS de Tukey	Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,17069 [*]	,034075	,001	-,26755	-,07383
		SHAM-LIA	-,23869 [*]	,034075	,000	-,33555	-,14183
		SHAM-DULOXETINA	-,25242 [*]	,034075	,000	-,34928	-,15556
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,17069 [*]	,034075	,001	,07383	,26755
		SHAM-LIA	-,06800	,035590	,260	-,16917	,03317
		SHAM-DULOXETINA	-,08173	,035590	,138	-,18290	,01943
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,23869 [*]	,034075	,000	,14183	,33555
		CCI-DULOXETINA	,06800	,035590	,260	-,03317	,16917
		SHAM-DULOXETINA	-,01373	,035590	,980	-,11490	,08743
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,25242 [*]	,034075	,000	,15556	,34928
		CCI-DULOXETINA	,08173	,035590	,138	-,01943	,18290
		SHAM-LIA	,01373	,035590	,980	-,08743	,11490
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,17069 [*]	,034075	,001	-,27237	-,06901
		SHAM-LIA	-,23869 [*]	,034075	,000	-,34037	-,13701
		SHAM-DULOXETINA	-,25242 [*]	,034075	,000	-,35410	-,15074
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,17069 [*]	,034075	,001	,06901	,27237
		SHAM-LIA	-,06800	,035590	,438	-,17420	,03820
		SHAM-DULOXETINA	-,08173	,035590	,208	-,18794	,02447
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,23869 [*]	,034075	,000	,13701	,34037
		CCI-DULOXETINA	,06800	,035590	,438	-,03820	,17420
		SHAM-DULOXETINA	-,01373	,035590	1,000	-,11994	,09247
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,25242 [*]	,034075	,000	,15074	,35410
		CCI-DULOXETINA	,08173	,035590	,208	-,02447	,18794
		SHAM-LIA	,01373	,035590	1,000	-,09247	,11994

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,003.

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

TABLA 15: TABLA POST-HOC DE COMPARACIONES MÚLTIPLES. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE EL GRUPO CCI-LIA Y LOS DEMÁS GRUPOS (p<0,05)

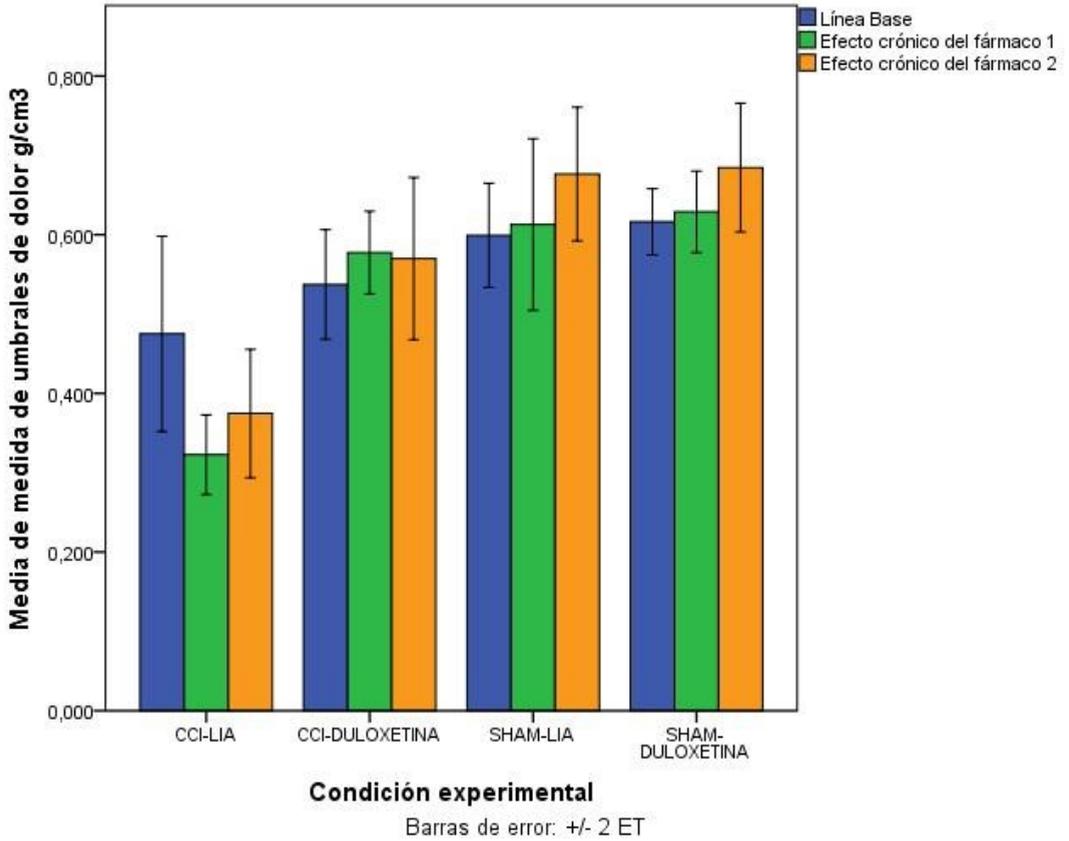


FIGURA 18: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES LÍNEA BASE, EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 1 Y EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 2. SE PUEDE OBSERVAR UNA APROXIMACIÓN HACIA VALORES DE LÍNEA BASE DE CCI-DULOJETINA MIENTRAS QUE NO SE APRECIA NINGUNA MEJORA EN LOS VALORES DE CCI-LIA.

4.1.2.1.d. Comparación del Dolor sin fármaco y del efecto agudo del fármaco.

Se realiza ANOVA de medidas repetidas para las variables: dolor sin fármaco 1, dolor sin fármaco 2 y efecto agudo del fármaco.

En la tabla 16 se observa cómo las variables no cumplen el supuesto de esfericidad de Mauchly, por ello nos fijaremos en el valor épsilon de Huynh-Feldt, el cual, al ser mayor de 0,7, indica que ANOVA intra-sujetos sigue siendo robusta con estos valores, si en la posterior tabla ANOVA asumimos la F que nos da Huynh-Feldt.

La tabla de ANOVA intra-sujetos (Tabla 17) indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F=1,288$; $p>0,05$).

En las pruebas post-hoc (Tabla 18) se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-LIA y CCI-DULOX y los grupos control ($p<0,05$); así como El grupo CCI-DUL no muestra diferencias estadísticamente significativas con los grupos control ($p>0,05$); sin embargo, se puede observar una tendencia de CCI-DULOX a la aproximación a los valores SHAM (Control) ($p=0,05$).

Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 19.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
c	,567	9,088	2	,011	,698	,875	,500

TABLA 16: TABLA DE PRUEBA W DE MAUCHLY. LAS VARIABLES NO CUMPLEN EL SUPUESTO DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY, POR ELLO NOS FIJAREMOS EN EL VALOR ÉPSILON DE HUYNH-FELDT, EL CUAL, AL SER MAYOR DE 0,7, INDICA QUE ANOVA INTRA-SUJETOS SIGUE SIENDO ROBUSTA CON ESTOS VALORES, SI EN LA POSTERIOR TABLA ANOVA ASUMIMOS LA F QUE NOS DA HUYNH-FELDT.

ANOVA de medidas repetidas. Prueba F de comparación de medias. Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida: MEASURE_1

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
c	Esfericidad asumida	,027	2	,013	1,288	,289
	Greenhouse-Geisser	,027	1,395	,019	1,288	,283
	Huynh-Feldt	,027	1,750	,015	1,288	,287
	Límite-inferior	,027	1,000	,027	1,288	,272
c * CONDEXP	Esfericidad asumida	,024	6	,004	,392	,879
	Greenhouse-Geisser	,024	4,186	,006	,392	,820
	Huynh-Feldt	,024	5,249	,005	,392	,858
	Límite-inferior	,024	3,000	,008	,392	,761
Error(c)	Esfericidad asumida	,352	34	,010		
	Greenhouse-Geisser	,352	23,721	,015		
	Huynh-Feldt	,352	29,743	,012		
	Límite-inferior	,352	17,000	,021		

TABLA 17: TABLA DE ANOVA INTRA-SUJETOS. EL VALOR HUYNH-FELDT (F=1,288; p>0,05) INDICA QUE NO HAY DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS A LÍNEAS GENERALES.

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

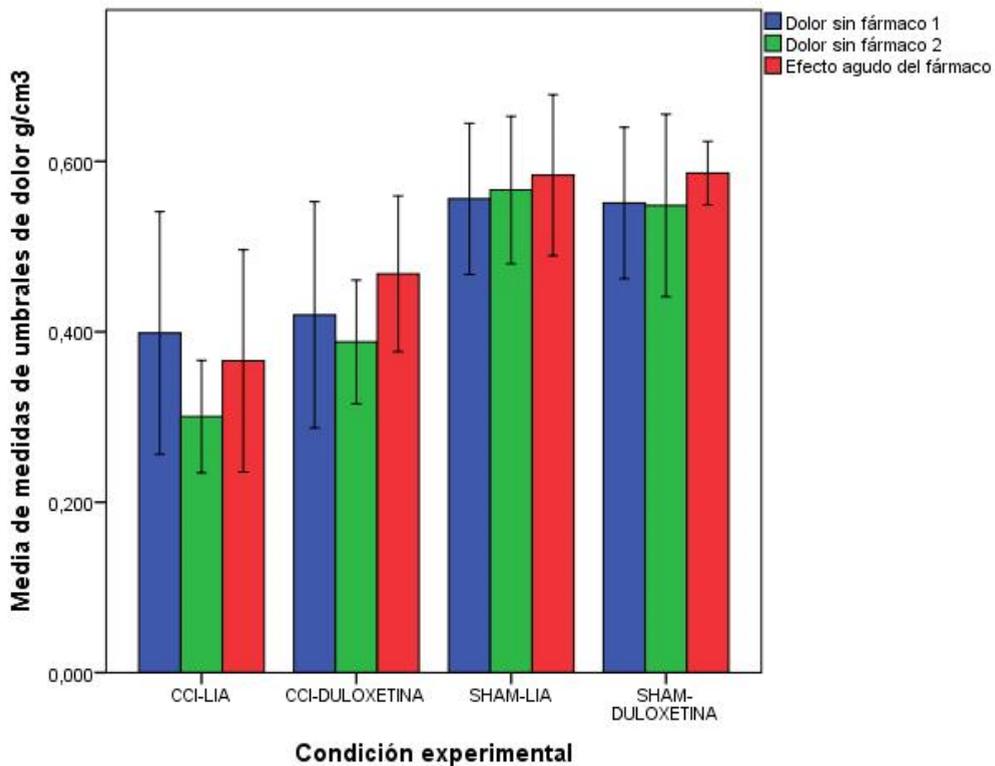
	Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error tip.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,07032	,049533	,505	-,21112	,07048
		SHAM-LIA	-,21379*	,049533	,002	-,35459	-,07299
		SHAM-DULOXETINA	-,20692*	,049533	,003	-,34772	-,06612
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,07032	,049533	,505	-,07048	,21112
		SHAM-LIA	-,14347	,051736	,057	-,29053	,00360
		SHAM-DULOXETINA	-,13660	,051736	,074	-,28366	,01046
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,21379*	,049533	,002	,07299	,35459
		CCI-DULOXETINA	,14347	,051736	,057	-,00360	,29053
		SHAM-DULOXETINA	,00687	,051736	,999	-,14020	,15393
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,20692*	,049533	,003	,06612	,34772
		CCI-DULOXETINA	,13660	,051736	,074	-,01046	,28366
		SHAM-LIA	-,00687	,051736	,999	-,15393	,14020
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,07032	,049533	1,000	-,21813	,07749
		SHAM-LIA	-,21379*	,049533	,003	-,36160	-,06598
		SHAM-DULOXETINA	-,20692*	,049533	,004	-,35473	-,05911
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,07032	,049533	1,000	-,07749	,21813
		SHAM-LIA	-,14347	,051736	,078	-,29785	,01092
		SHAM-DULOXETINA	-,13660	,051736	,103	-,29098	,01778
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,21379*	,049533	,003	,06598	,36160
		CCI-DULOXETINA	,14347	,051736	,078	-,01092	,29785
		SHAM-DULOXETINA	,00687	,051736	1,000	-,14752	,16125
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,20692*	,049533	,004	,05911	,35473
		CCI-DULOXETINA	,13660	,051736	,103	-,01778	,29098
		SHAM-LIA	-,00687	,051736	1,000	-,16125	,14752

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,007.

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

TABLA 18: TABLAS POST-HOC CON LOS RESULTADOS DE TUKEY Y BONFERRONI. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES Y LOS GRUPOS CONTROL, CON UNA TENDENCIA DEL GRUPO CCI-DULOX HACIA LOS GRUPOS SHAM.



Barras de error: +/- 2 ET

FIGURA 19: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES DOLOR SIN FÁRMACO 1, DOLOR SIN FÁRMACO 2 Y EFECTO AGUDO DEL FÁRMACO.

4.1.2.1.f. Comparación del Dolor sin fármaco y del efecto crónico del fármaco.

Se realiza ANOVA de medidas repetidas para las variables: dolor sin fármaco 1, dolor sin fármaco 2 y efecto crónico 1, efecto crónico 2.

En la tabla 19 se observa cómo las variables cumplen el supuesto de esfericidad de Mauchly.

La tabla ANOVA intra-sujetos (Tabla 20) indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F=6,985$; $p<0,05$).

En las pruebas post-hoc (Tabla 21) se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-LIA con los grupos CCI-DULOX y los grupos control ($p<0,05$); así como el grupo CCI-DUL muestra diferencias estadísticamente significativas con el grupo CCI-LIA y con los grupos control ($p<0,05$); sin embargo, se puede observar una tendencia de CCI-DULOX a la aproximación a los valores SHAM (Control).

Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 20.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
c	,499	10,918	5	,053	,676	,903	,333

TABLA 19: PRUEBA W DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY. TODAS LAS VARIABLES CUMPLEN EL SUPUESTO DE ESFERICIDAD.

ANOVA de medidas repetidas. Prueba F de comparación de medias. Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida: MEASURE_1

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
c	Esfericidad asumida	,196	3	,065	6,985	,001
	Greenhouse-Geisser	,196	2,027	,097	6,985	,003
	Huynh-Feldt	,196	2,709	,072	6,985	,001
	Límite-inferior	,196	1,000	,196	6,985	,017
c * CONDEXP	Esfericidad asumida	,110	9	,012	1,312	,254
	Greenhouse-Geisser	,110	6,080	,018	1,312	,278
	Huynh-Feldt	,110	8,126	,014	1,312	,261
	Límite-inferior	,110	3,000	,037	1,312	,303
Error(c)	Esfericidad asumida	,476	51	,009		
	Greenhouse-Geisser	,476	34,453	,014		
	Huynh-Feldt	,476	46,050	,010		
	Límite-inferior	,476	17,000	,028		

TABLA 20: TABLA DE ANOVA INTRA-SUJETOS. EL VALOR CON ESFERICIDAD ASUMIDA (F=6,985; P<0,05) INDICA QUE HAY DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

	Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,13967 [*]	,038218	,010	-,24830	-,03103
		SHAM-LIA	-,25382 [*]	,038218	,000	-,36245	-,14518
		SHAM-DULOXETINA	-,25412 [*]	,038218	,000	-,36275	-,14548
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,13967 [*]	,038218	,010	,03103	,24830
		SHAM-LIA	-,11415 [*]	,039918	,048	-,22762	-,00068
		SHAM-DULOXETINA	-,11445 [*]	,039918	,048	-,22792	-,00098
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,25382 [*]	,038218	,000	,14518	,36245
		CCI-DULOXETINA	,11415 [*]	,039918	,048	,00068	,22762
		SHAM-DULOXETINA	-,00030	,039918	1,000	-,11377	,11317
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,25412 [*]	,038218	,000	,14548	,36275
		CCI-DULOXETINA	,11445 [*]	,039918	,048	,00098	,22792
		SHAM-LIA	,00030	,039918	1,000	-,11317	,11377
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,13967 [*]	,038218	,012	-,25371	-,02562
		SHAM-LIA	-,25382 [*]	,038218	,000	-,36786	-,13977
		SHAM-DULOXETINA	-,25412 [*]	,038218	,000	-,36816	-,14007
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,13967 [*]	,038218	,012	,02562	,25371
		SHAM-LIA	-,11415	,039918	,065	-,23327	,00497
		SHAM-DULOXETINA	-,11445	,039918	,064	-,23357	,00467
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,25382 [*]	,038218	,000	,13977	,36786
		CCI-DULOXETINA	,11415	,039918	,065	-,00497	,23327
		SHAM-DULOXETINA	-,00030	,039918	1,000	-,11942	,11882
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,25412 [*]	,038218	,000	,14007	,36816
		CCI-DULOXETINA	,11445	,039918	,064	-,00467	,23357
		SHAM-LIA	,00030	,039918	1,000	-,11882	,11942

TABLA 21: TABLA POST-HOC DE COMPARACIONES MÚLTIPLES. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA Y LOS DEMÁS GRUPOS; ASÍ COMO EN EL GRUPOS CCI-DULOX Y LOS DEMÁS GRUPOS, MOSTRANDO UNA TENDENCIA DE APROXIMACIÓN A LOS VALORES SHAM.

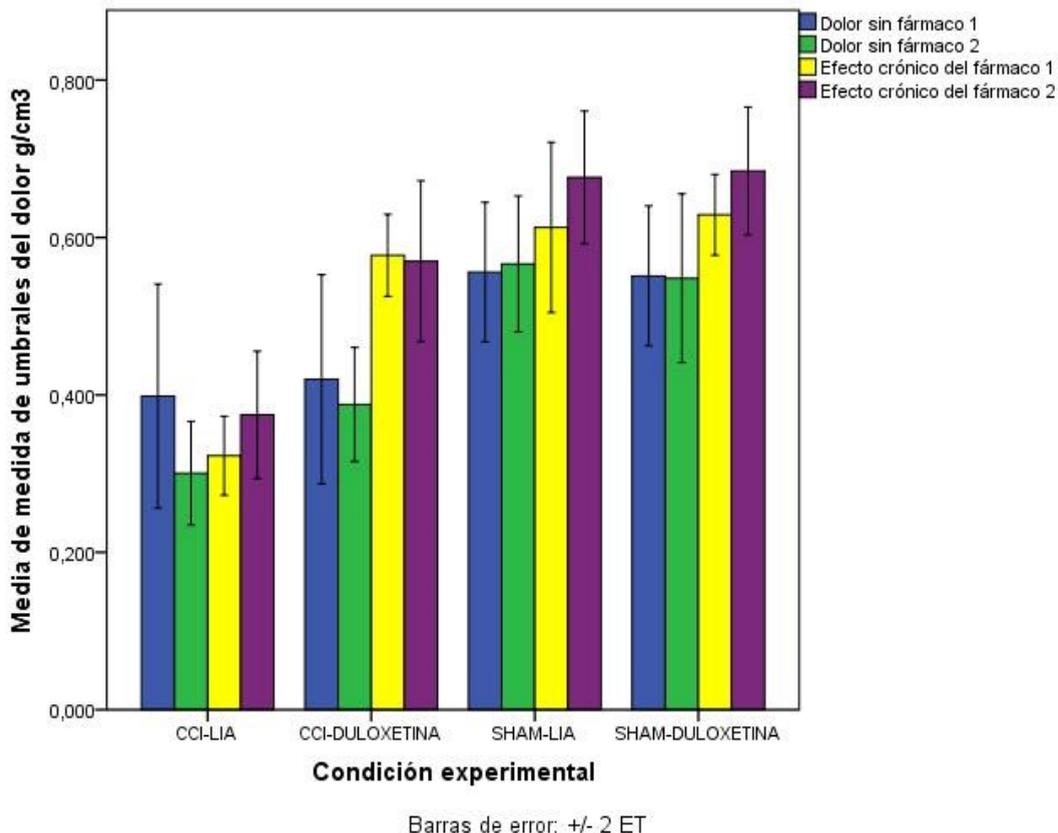


FIGURE 20: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES DOLOR SIN FÁRMACO 1, DOLOR SIN FÁRMACO 2, EFECTO CRÓNICO DLE FÁRMACO 1 Y EFECTO CRÓNICO DL FÁRMACO 2.

4.1.2.1.f. Comparación del efecto agudo del fármaco con el efecto crónico del fármaco.

En último lugar, se comparan los efectos agudo y crónico del fármaco (efecto crónico del fármaco 1 y 2 por separado).

Se realiza ANOVA de medidas repetidas para las variables Efecto agudo del fármaco, efecto crónico del fármaco 1 y efecto crónico del fármaco 2.

En la tabla 22 se observa cómo las variables cumplen el supuesto de esfericidad de Mauchly (W=0,985; $p>0,05$).

La tabla ANOVA intra-sujetos (Tabla 23) indica que hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos (F =3,888; $p<0,05$).

En las pruebas post-hoc (Tabla 24) se pueden apreciar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-LIA con los grupos CCI-DULOX y los grupos control SHAM-LIA y SHAM-DULOXETINA ($p<0,05$). Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 21.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
Comparación2	,958	,679	2	,712	,960	1,000	,500

TABLA 22: PRUEBA W DE ESFERICIDAD DE MUACHLY. TODAS LAS VARIABLES CUMPLEN EL SUPUESTO DE ESFERICIDAD (W=0,985; $p>0,05$).

ANOVA de medidas repetidas. Prueba F de comparación de medias. Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida: MEASURE_1

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Comparación2	Esfericidad asumida	,059	2	,030	3,888	,030
	Greenhouse-Geisser	,059	1,920	,031	3,888	,032
	Huynh-Feldt	,059	2,000	,030	3,888	,030
	Límite-inferior	,059	1,000	,059	3,888	,065
Comparación2 * CONDEXP	Esfericidad asumida	,038	6	,006	,832	,553
	Greenhouse-Geisser	,038	5,760	,007	,832	,550
	Huynh-Feldt	,038	6,000	,006	,832	,553
	Límite-inferior	,038	3,000	,013	,832	,494
Error(Comparación2)	Esfericidad asumida	,260	34	,008		
	Greenhouse-Geisser	,260	32,643	,008		
	Huynh-Feldt	,260	34,000	,008		
	Límite-inferior	,260	17,000	,015		

TABLA 23: TABLA ANOVA DE FACTOR INTRA-SUJETOS. SE APRECIAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS. (F =3,888; p<0,05).

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

	Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,18401*	,041070	,002	-,30075	-,06727
		SHAM-LIA	-,26994*	,041070	,000	-,38669	-,15320
		SHAM-DULOXETINA	-,27881*	,041070	,000	-,39555	-,16207
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,18401*	,041070	,002	,06727	,30075
		SHAM-LIA	-,08593	,042896	,225	-,20787	,03600
		SHAM-DULOXETINA	-,09480	,042896	,160	-,21673	,02713
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,26994*	,041070	,000	,15320	,38669
		CCI-DULOXETINA	,08593	,042896	,225	-,03600	,20787
		SHAM-DULOXETINA	-,00887	,042896	,997	-,13080	,11307
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,27881*	,041070	,000	,16207	,39555
		CCI-DULOXETINA	,09480	,042896	,160	-,02713	,21673
		SHAM-LIA	,00887	,042896	,997	-,11307	,13080
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-,18401*	,041070	,002	-,30656	-,06146
		SHAM-LIA	-,26994*	,041070	,000	-,39250	-,14739
		SHAM-DULOXETINA	-,27881*	,041070	,000	-,40136	-,15626
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	,18401*	,041070	,002	,06146	,30656
		SHAM-LIA	-,08593	,042896	,368	-,21394	,04207
		SHAM-DULOXETINA	-,09480	,042896	,247	-,22280	,03320
	SHAM-LIA	CCI-LIA	,26994*	,041070	,000	,14739	,39250
		CCI-DULOXETINA	,08593	,042896	,368	-,04207	,21394
		SHAM-DULOXETINA	-,00887	,042896	1,000	-,13687	,11914
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	,27881*	,041070	,000	,15626	,40136
		CCI-DULOXETINA	,09480	,042896	,247	-,03320	,22280
		SHAM-LIA	,00887	,042896	1,000	-,11914	,13687

TABLA 24: TABLA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES POST-HOC SEGÚN LAS CORRECCIONES DE TUKEY Y BONFERRONI. SE PUEDEN APRECIAR DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA CON LOS GRUPOS CCI-DULOX Y LOS GRUPOS CONTROL SHAM-LIA Y SHAM-DULOXETINA (p<0,05).

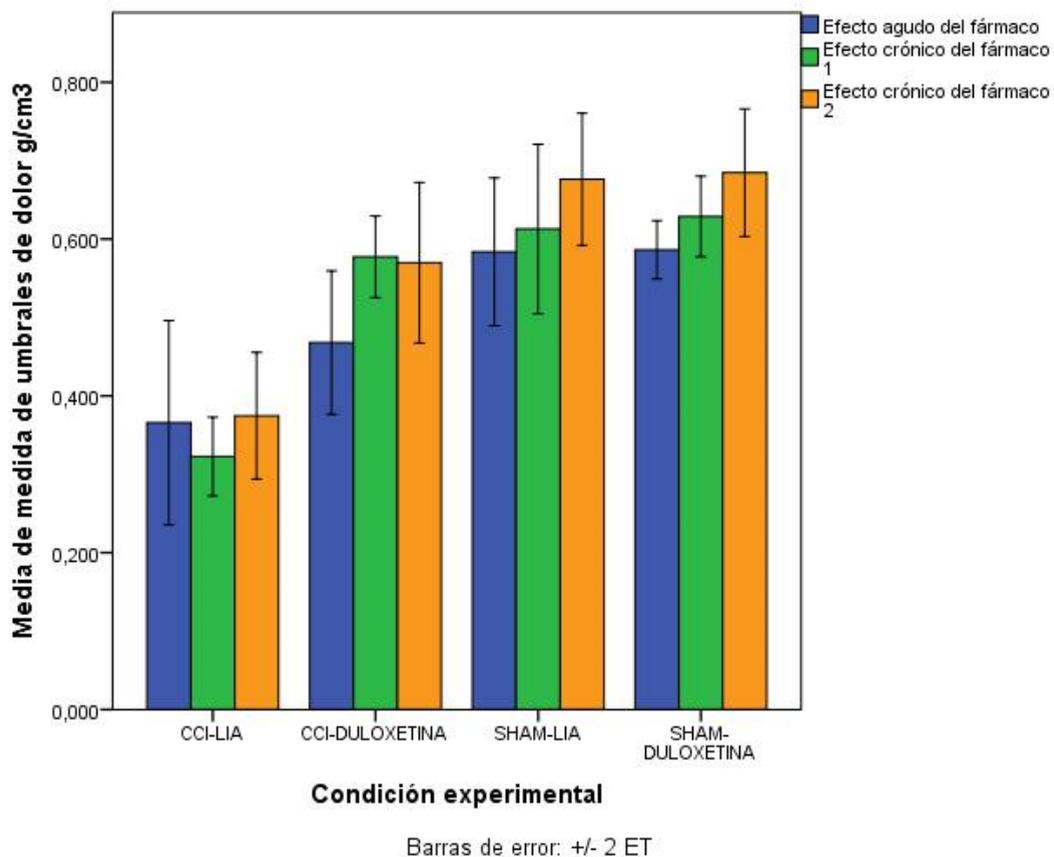


FIGURA 21: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES EFECTO AGUDO DEL FÁRMACO, EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 1 Y EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 2.

4.1.2.2. Resultados conductuales ElectroVon Frey.

4.1.2.2.a. Comparación de la Línea Base con las Medidas de dolor sin fármaco.

Se emplea la prueba no paramétrica de Friedman (también llamada prueba K de muestras relacionadas) ya que para las medidas de dolor sin fármaco no se asumen varianzas ni iguales ni normales.

Se puede observar en la Tabla 25 que se rechaza la hipótesis nula, es decir, hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

En la prueba post-hoc de Games Howell (empleada cuando las varianzas no son iguales) (tabla 26) vemos que esas diferencias se encuentran entre los grupos experimentales CCI-LIA y CCI-DULOX y los grupos control SHAM-LIA y SHAM-DULOX ($p < 0,05$).

Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 22.

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las distribuciones de Línea Base, Dolor sin fármaco 1 and Dolor sin fármaco 2 son las mismas.	Análisis de dos vías de Friedman de varianza por rangos de muestras relacionadas	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

TABLA 25: PRUEBA NO PARAMÉTRICA DE FRIEDMAN PARA MUESTRAS RELACIONADAS. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($p < 0,05$)

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

Games-Howell

Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-115,5201	58,40257	,313	-336,5900	105,5498
	SHAM-LIA	-819,7120*	91,42742	,000	-1106,2365	-533,1875
	SHAM-DULOXETINA	-960,2959*	79,50890	,000	-1209,0700	-711,5218
CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	115,5201	58,40257	,313	-105,5498	336,5900
	SHAM-LIA	-704,1919*	74,07126	,001	-967,8266	-440,5572
	SHAM-DULOXETINA	-844,7758*	58,73026	,000	-1049,7667	-639,7849
SHAM-LIA	CCI-LIA	819,7120*	91,42742	,000	533,1875	1106,2365
	CCI-DULOXETINA	704,1919*	74,07126	,001	440,5572	967,8266
	SHAM-DULOXETINA	-140,5839	91,63709	,456	-423,9457	142,7779
SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	960,2959*	79,50890	,000	711,5218	1209,0700
	CCI-DULOXETINA	844,7758*	58,73026	,000	639,7849	1049,7667
	SHAM-LIA	140,5839	91,63709	,456	-142,7779	423,9457

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

TABLA 26: PRUEBA POST-HOC DE GAMES-HOWELL; SE EMPLEA ESTA PRUEBA PUESTO QUE NO SE HAN HALLADO VARIANZAS IGUALES EN LOS GRUPOS DE DOLOR SIN FÁRMACO. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA Y CCI-DULOX Y LOS GRUPOS CONTROL SHAM-LIA Y SHAM-DULOX (P<0,05)

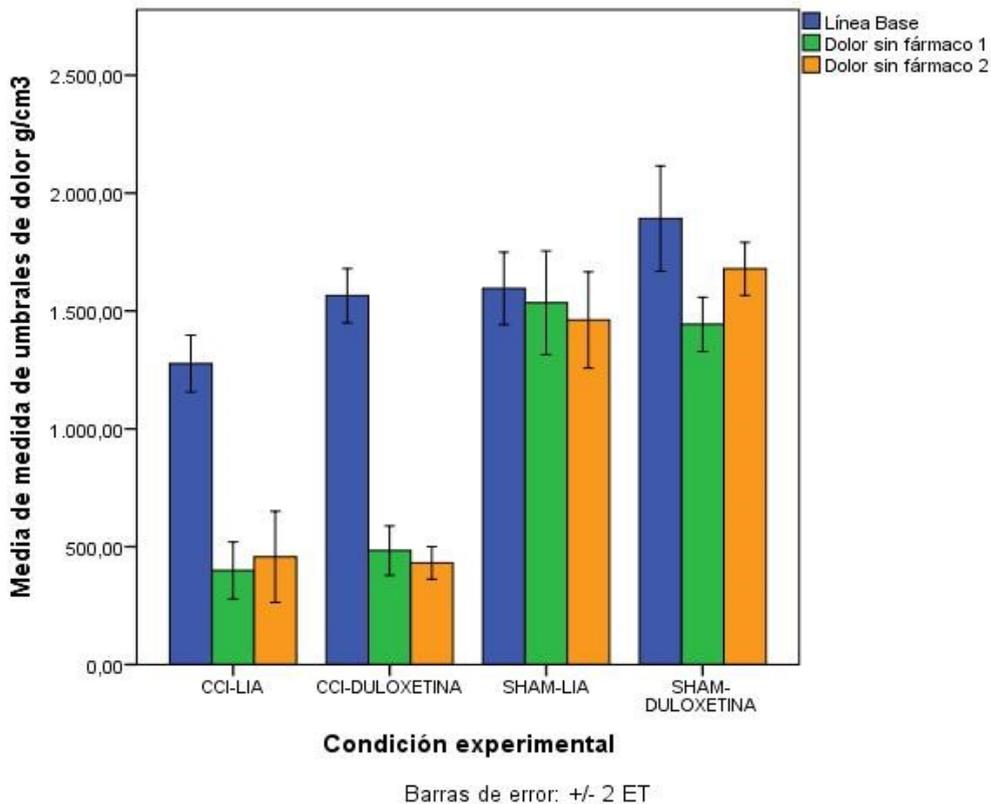


FIGURA 22: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES LÍNEA BASE, DOLOR SIN FÁRMACO 1 Y DOLOR SIN FÁRMACO 2. SE OBSERVA UN DESCENSO SIGNIFICATIVO EN LAS MEDIAS DE LOS UMBRALES DE DOLOR EN LOS GRUPOS EXPERIMENTALES RESPECTO A SUS LÍNEAS BASE Y A LOS GRUPOS SHAM; ASIMISMO, LOS GRUPOS SHAM NO MUESTRAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS RESPECTO A SUS LÍNEAS BASE.

4.1.2.2.b. Comparación de la Línea Base con el Efecto agudo del fármaco.

A continuación, se realiza un ANOVA de medidas repetidas para comparar la línea base con el efecto agudo del fármaco. Las variables cumplen fuertemente la prueba de esfericidad de Mauchly ($W=1$; $p>0,05$) (tabla 27). En la Tabla ANOVA de efecto intra-sujetos (tabla 28) se observan diferencias estadísticamente significativas ($F=111,582$; $p<0,05$). En las comparaciones múltiples según las correcciones de Bonferroni y Tukey (tabla 29) se observan diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p<0,05$). Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 23.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
factor1	1,000	,000	0	.	1,000	1,000	1,000

TABLA 27: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY. LAS VARIABLES CUMPLEN EL SUPUESTO DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY ($W=1$; $p>0,05$)

Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida: MEASURE_1

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
factor1	Esfericidad asumida	3762451,208	1	3762451,208	111,582	,000
	Greenhouse-Geisser	3762451,208	1,000	3762451,208	111,582	,000
	Huynh-Feldt	3762451,208	1,000	3762451,208	111,582	,000
	Límite-inferior	3762451,208	1,000	3762451,208	111,582	,000
factor1 * CONDEXP	Esfericidad asumida	1002873,819	3	334291,273	9,914	,000
	Greenhouse-Geisser	1002873,819	3,000	334291,273	9,914	,000
	Huynh-Feldt	1002873,819	3,000	334291,273	9,914	,000
	Límite-inferior	1002873,819	3,000	334291,273	9,914	,000
Error(factor1)	Esfericidad asumida	674380,653	20	33719,033		
	Greenhouse-Geisser	674380,653	20,000	33719,033		
	Huynh-Feldt	674380,653	20,000	33719,033		
	Límite-inferior	674380,653	20,000	33719,033		

TABLA 28: TABLA ANOVA DE EFECTO INTRA-SUJETOS. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($F=111,582$; $p<0,05$).

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

	Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-284,7443	70,77324	,003	-482,8341	-86,6545
		SHAM-LIA	-633,0308	73,18940	,000	-837,8833	-428,1784
		SHAM-DULOXETINA	-868,9883	73,18940	,000	-1073,8408	-664,1359
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	284,7443	70,77324	,003	86,6545	482,8341
		SHAM-LIA	-348,2865	67,24492	,000	-536,5008	-160,0723
		SHAM-DULOXETINA	-584,2440	67,24492	,000	-772,4583	-396,0298
	SHAM-LIA	CCI-LIA	633,0308	73,18940	,000	428,1784	837,8833
		CCI-DULOXETINA	348,2865	67,24492	,000	160,0723	536,5008
		SHAM-DULOXETINA	-235,9575	69,78335	,014	-431,2767	-40,6383
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	868,9883	73,18940	,000	664,1359	1073,8408
		CCI-DULOXETINA	584,2440	67,24492	,000	396,0298	772,4583
		SHAM-LIA	235,9575	69,78335	,014	40,6383	431,2767
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-284,7443	70,77324	,004	-491,9060	-77,5826
		SHAM-LIA	-633,0308	73,18940	,000	-847,2649	-418,7967
		SHAM-DULOXETINA	-868,9883	73,18940	,000	-1083,2224	-654,7542
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	284,7443	70,77324	,004	77,5826	491,9060
		SHAM-LIA	-348,2865	67,24492	,000	-545,1204	-151,4527
		SHAM-DULOXETINA	-584,2440	67,24492	,000	-781,0779	-387,4102
	SHAM-LIA	CCI-LIA	633,0308	73,18940	,000	418,7967	847,2649
		CCI-DULOXETINA	348,2865	67,24492	,000	151,4527	545,1204
		SHAM-DULOXETINA	-235,9575	69,78335	,018	-440,2217	-31,6933
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	868,9883	73,18940	,000	654,7542	1083,2224
		CCI-DULOXETINA	584,2440	67,24492	,000	387,4102	781,0779
		SHAM-LIA	235,9575	69,78335	,018	31,6933	440,2217

TABLA 29: TABLA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES SEGÚN BONFERRONI Y TUKEY. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE TODOS LOS GRUPOS (P<0,05).

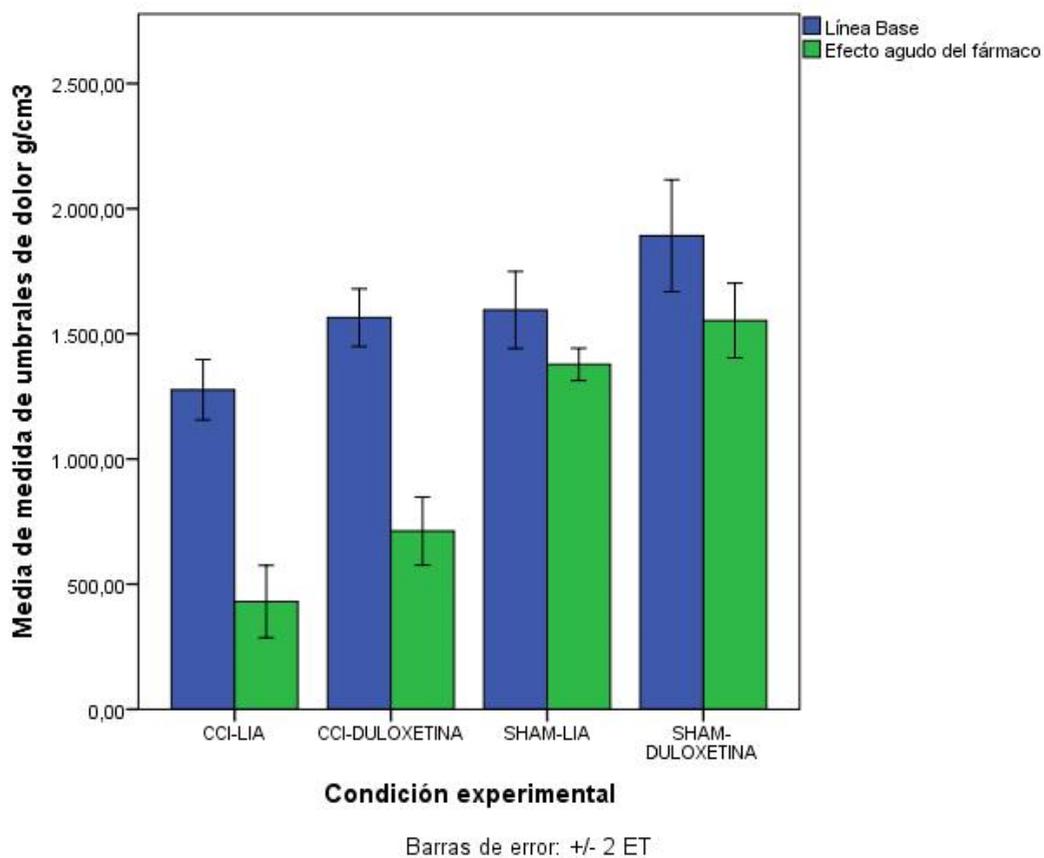


FIGURA 23: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES LÍNEA BASE Y EL EFECTO AGUDO DEL FÁRMACO. SE PUEDE OBSERVAR UNA APROXIMACIÓN HACIA VALORES DE LÍNEA BASE DE CCI-DULOX MIENTRAS QUE NO SE APRECIA NINGUNA MEJORA EN LOS VALORES DE CCI-LIA.

4.1.2.2.c. Comparación de la Línea Base con el Efecto crónico del fármaco.

A continuación, se realiza un ANOVA de medidas repetidas para comparar la línea base con el efecto crónico del fármaco (efecto crónico del fármaco 1 y 2, por separado).

Las variables cumplen fuertemente la prueba de esfericidad de Mauchly ($W=1$; $p>0,05$) (tabla 30).

En la Tabla 31 de ANOVA de efecto intra-sujetos se observan diferencias estadísticamente significativas ($F=61,669$; $p<0,05$).

En las comparaciones múltiples según las correcciones de Bonferroni y Tukey (Tabla 32) se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-LIA con respecto a los grupos CCI-DULOX y los grupos control, así como diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CCI-DULOX y los grupos control ($p<0,05$). Los grupos control no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,05$).

Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 24.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
factor1	,901	1,979	2	,372	,910	1,000	,500

TABLA 30: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY. LAS VARIABLES CUMPLEN EL SUPUESTO DE ESFERICIDAD ($W=0,901$; $p>0,05$).

ANOVA de medidas repetidas. Pruebas de efectos intra-sujetos. Prueba F de medidas repetidas.

Medida: MEASURE_1

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
factor1	Esfericidad asumida	4154468,415	2	2077234,207	61,669	,000
	Greenhouse-Geisser	4154468,415	1,820	2282708,407	61,669	,000
	Huynh-Feldt	4154468,415	2,000	2077234,207	61,669	,000
	Límite-inferior	4154468,415	1,000	4154468,415	61,669	,000
factor1 * CONDEXP	Esfericidad asumida	1518348,356	6	253058,059	7,513	,000
	Greenhouse-Geisser	1518348,356	5,460	278089,855	7,513	,000
	Huynh-Feldt	1518348,356	6,000	253058,059	7,513	,000
	Límite-inferior	1518348,356	3,000	506116,119	7,513	,001
Error(factor1)	Esfericidad asumida	1347340,301	40	33683,508		
	Greenhouse-Geisser	1347340,301	36,399	37015,386		
	Huynh-Feldt	1347340,301	40,000	33683,508		
	Límite-inferior	1347340,301	20,000	67367,015		

TABLA 31: TABLA ANOVA DE EFECTO INTRA-SUJETOS. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS (F=61,669; p<005).

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

DHS de Tukey	Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error tip.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-393,4510 [*]	99,63461	,004	-672,3219	-114,5800
		SHAM-LIA	-814,5506 [*]	103,03609	,000	-1102,9420	-526,1591
		SHAM-DULOXETINA	-944,5967 [*]	103,03609	,000	-1232,9881	-656,2052
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	393,4510 [*]	99,63461	,004	114,5800	672,3219
		SHAM-LIA	-421,0996 [*]	94,66745	,001	-686,0677	-156,1315
		SHAM-DULOXETINA	-551,1457 [*]	94,66745	,000	-816,1139	-286,1776
	SHAM-LIA	CCI-LIA	814,5506 [*]	103,03609	,000	526,1591	1102,9420
		CCI-DULOXETINA	421,0996 [*]	94,66745	,001	156,1315	686,0677
		SHAM-DULOXETINA	-130,0461	98,24105	,559	-405,0166	144,9243
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	944,5967 [*]	103,03609	,000	656,2052	1232,9881
		CCI-DULOXETINA	551,1457 [*]	94,66745	,000	286,1776	816,1139
		SHAM-LIA	130,0461	98,24105	,559	-144,9243	405,0166
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-393,4510 [*]	99,63461	,005	-685,0933	-101,8086
		SHAM-LIA	-814,5506 [*]	103,03609	,000	-1116,1495	-512,9517
		SHAM-DULOXETINA	-944,5967 [*]	103,03609	,000	-1246,1956	-642,9978
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	393,4510 [*]	99,63461	,005	101,8086	685,0933
		SHAM-LIA	-421,0996 [*]	94,66745	,001	-698,2025	-143,9967
		SHAM-DULOXETINA	-551,1457 [*]	94,66745	,000	-828,2486	-274,0428
	SHAM-LIA	CCI-LIA	814,5506 [*]	103,03609	,000	512,9517	1116,1495
		CCI-DULOXETINA	421,0996 [*]	94,66745	,001	143,9967	698,2025
		SHAM-DULOXETINA	-130,0461	98,24105	1,000	-417,6094	157,5172
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	944,5967 [*]	103,03609	,000	642,9978	1246,1956
		CCI-DULOXETINA	551,1457 [*]	94,66745	,000	274,0428	828,2486
		SHAM-LIA	130,0461	98,24105	1,000	-157,5172	417,6094

TABLA 32: TABLA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES SEGÚN TUKEY Y BONFERRONI. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA Y CCI-DULOX, Y DE ÉSTOS FRENTE A LOS GRUPOS CONTROL (p<0,05).

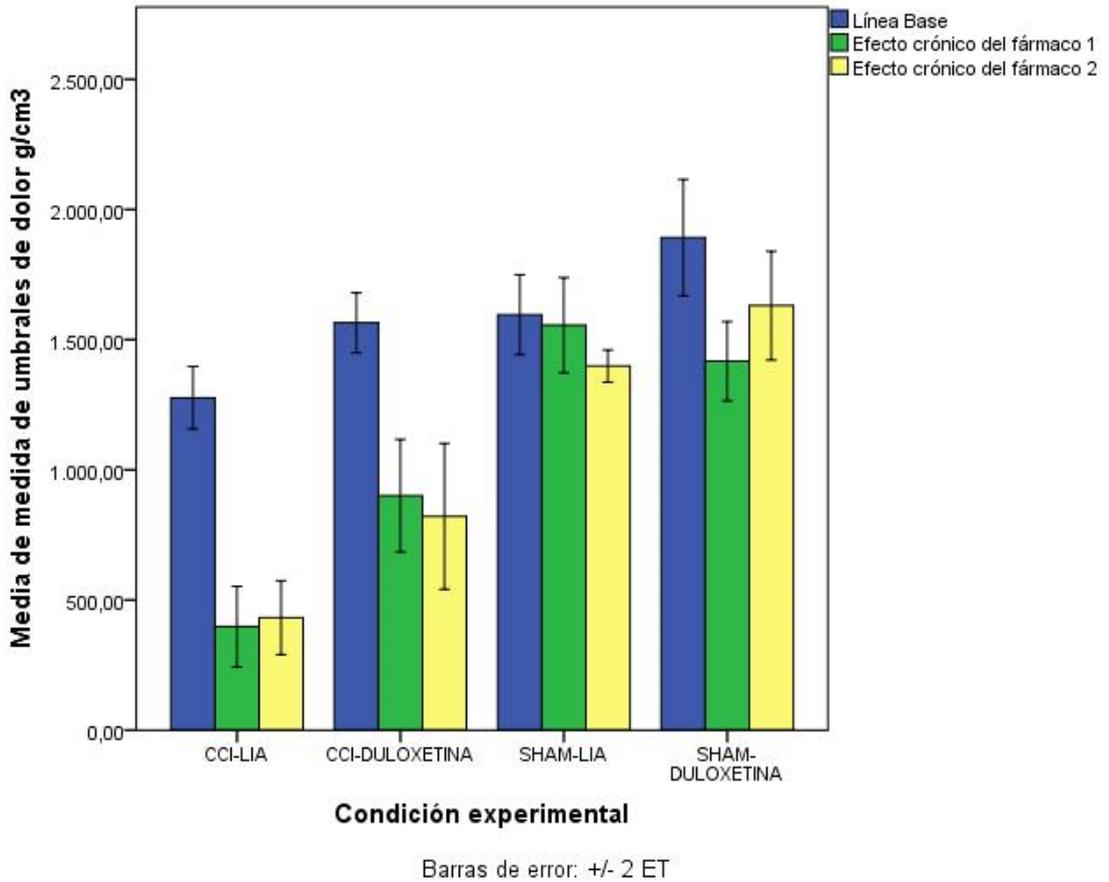


FIGURA 24: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES LÍNEA BASE, EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 1 Y EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 2. SE PUEDE OBSERVAR UNA APROXIMACIÓN HACIA VALORES DE LÍNEA BASE DE CCI-DULOX MIENTRAS QUE NO SE APRECIA NINGUNA MEJORA EN LOS VALORES DE CCI-LIA.

4.1.2.2.d. Comparación de las medidas de dolor sin fármaco con el efecto agudo del fármaco.

A continuación, se realiza la prueba no paramétrica de Friedman (prueba K para muestras relacionadas) para comparar las medidas de dolor sin fármaco (dolor sin fármaco 1 y 2, por separado) con el efecto agudo del fármaco. A priori, en la Tabla de Friedman de efecto intra-sujetos (Tabla 33) no se observan diferencias estadísticamente significativas a efectos generales ($p > 0,05$); sin embargo, en las comparaciones múltiples según las correcciones de Games-Howell para variables con varianzas no homogéneas (Tabla 34) se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-LIA y CCI-DULOX respecto a los grupos control ($p < 0,05$).

Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 9.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las distribuciones de Dolor sin fármaco 1, Dolor sin fármaco 2 and Efecto agudo del fármaco son las mismas.	Análisis de dos vías de Friedman de varianza por rangos de muestras relacionadas	,687	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

TABLA 33: TABLA DE FRIEDMAN DE EFECTO INTRA-SUJETOS, NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($p > 0,05$).

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1
Games-Howell

Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error tip.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-113,2277	67,86285	,425	-364,7925	138,3371
	SHAM-LIA	-1029,1426 [*]	90,21720	,000	-1311,6843	-746,6008
	SHAM-DULOXETINA	-1129,3848 [*]	83,37862	,000	-1394,4775	-864,2920
CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	113,2277	67,86285	,425	-138,3371	364,7925
	SHAM-LIA	-915,9148 [*]	67,04120	,000	-1145,7074	-686,1222
	SHAM-DULOXETINA	-1016,1571 [*]	57,50976	,000	-1208,9524	-823,3617
SHAM-LIA	CCI-LIA	1029,1426 [*]	90,21720	,000	746,6008	1311,6843
	CCI-DULOXETINA	915,9148 [*]	67,04120	,000	686,1222	1145,7074
	SHAM-DULOXETINA	-100,2422	82,71124	,634	-354,6708	154,1864
SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	1129,3848 [*]	83,37862	,000	864,2920	1394,4775
	CCI-DULOXETINA	1016,1571 [*]	57,50976	,000	823,3617	1208,9524
	SHAM-LIA	100,2422	82,71124	,634	-154,1864	354,6708

TABLA 34: TABLA POST-HOC DE COMPARACIONES MÚLTIPLES SEGÚN LAS CORRECCIONES DE GAMES-HOWELL PARA VARIABLES CON VARIANZAS NO HOMOGÉNEAS. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA Y CCI-DULOX RESPECTO A LOS GRUPOS CONTROL.

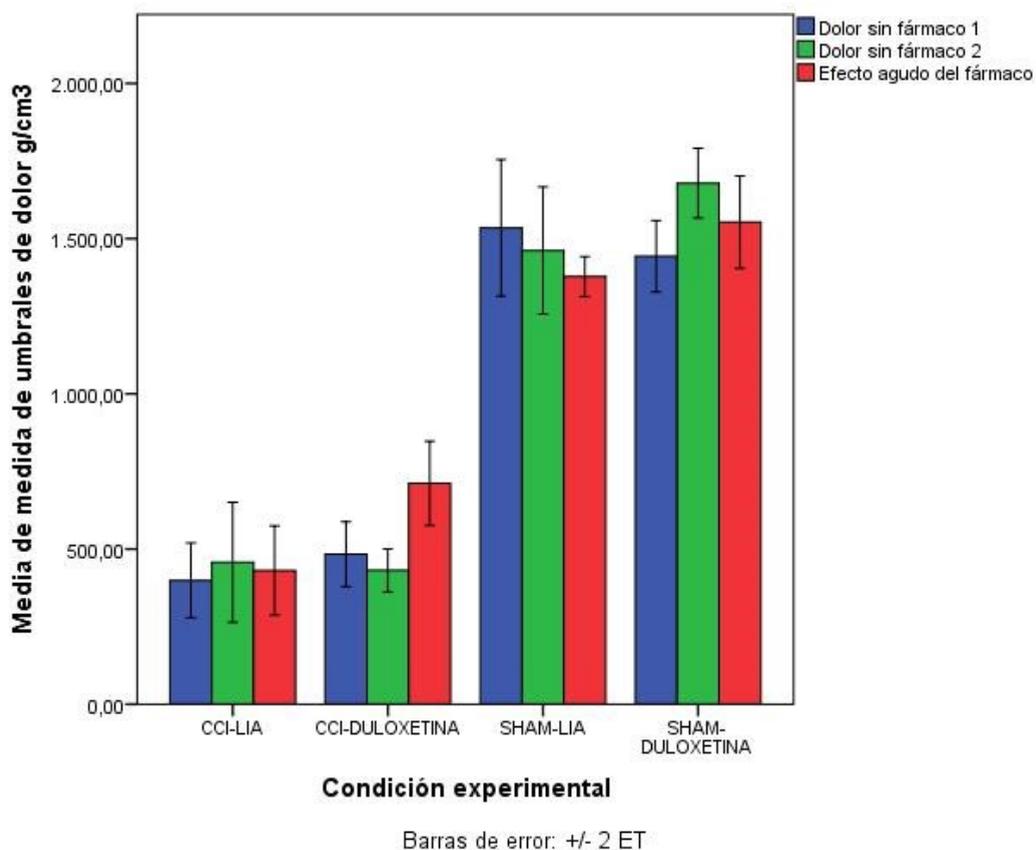


FIGURA 25: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES DOLOR SIN FÁRMACO 1, DOLOR SIN FÁRMACO2 Y EL EFECTO AGUDO DEL FÁRMACO. SE PUEDE APRECIAR UNA MEJORA EN EL GRUPO EXPERIMENTAL CCI-DULOX.

4.1.2.2.e. Comparación de las medidas de dolor sin fármaco con las medidas del efecto crónico del fármaco.

Se realiza la prueba no paramétrica de Friedman (prueba K para muestras relacionadas) para comparar la las medidas de dolor sin fármaco (1 y2 por separado) con el efecto crónico del fármaco (1 y 2 por separado).

En la Tabla de Friedman de efecto intra-sujetos (Tabla 35) no se observan diferencias estadísticamente significativas a efectos generales ($p>0,05$); sin embargo, y de forma específica, en las pruebas post-hoc y en las comparaciones múltiples según las correcciones de Games-Howell para variables con varianzas no homogéneas (Tabla 36) se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-LIA y CCI-DULOX respecto a los grupos control ($p<0,05$).

Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 26.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las distribuciones de Dolor sin fármaco 1, Dolor sin fármaco 2, Efecto crónico del fármaco 1 and Efecto crónico del fármaco 2 son las mismas.	Análisis de dos vías de Friedman de varianza por rangos de muestras relacionadas	,105	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

TABLA 35: TABLA DE FRIEDMAN DE EFECTO INTRA-SUJETOS, NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ($P>0,05$).

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

Games-Howell

(I)CONDICIÓN EXPERIMENTAL	(J)CONDICIÓN EXPERIMENTAL	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-237,6369	78,34481	,053	-478,6402	3,3665
	SHAM-LIA	-1066,2544 [*]	84,80100	,000	-1331,1858	-801,3230
	SHAM-DULOXETINA	-1120,9919 [*]	77,01677	,000	-1362,0805	-879,9034
CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	237,6369	78,34481	,053	-3,3665	478,6402
	SHAM-LIA	-828,6176 [*]	85,86424	,000	-1089,3747	-567,8604
	SHAM-DULOXETINA	-883,3551 [*]	78,18593	,000	-1118,7862	-647,9239
SHAM-LIA	CCI-LIA	1066,2544 [*]	84,80100	,000	801,3230	1331,1858
	CCI-DULOXETINA	828,6176 [*]	85,86424	,000	567,8604	1089,3747
	SHAM-DULOXETINA	-54,7375	84,65424	,914	-315,1799	205,7049
SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	1120,9919 [*]	77,01677	,000	879,9034	1362,0805
	CCI-DULOXETINA	883,3551 [*]	78,18593	,000	647,9239	1118,7862
	SHAM-LIA	54,7375	84,65424	,914	-205,7049	315,1799

TABLA 36: TABLA POST-HOC DE COMPARACIONES MÚLTIPLES SEGÚN GAMES-HOWELL. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA Y CCI-DULOX Y LOS GRUPOS CONTROL (SHAM) ($P < 0,05$).

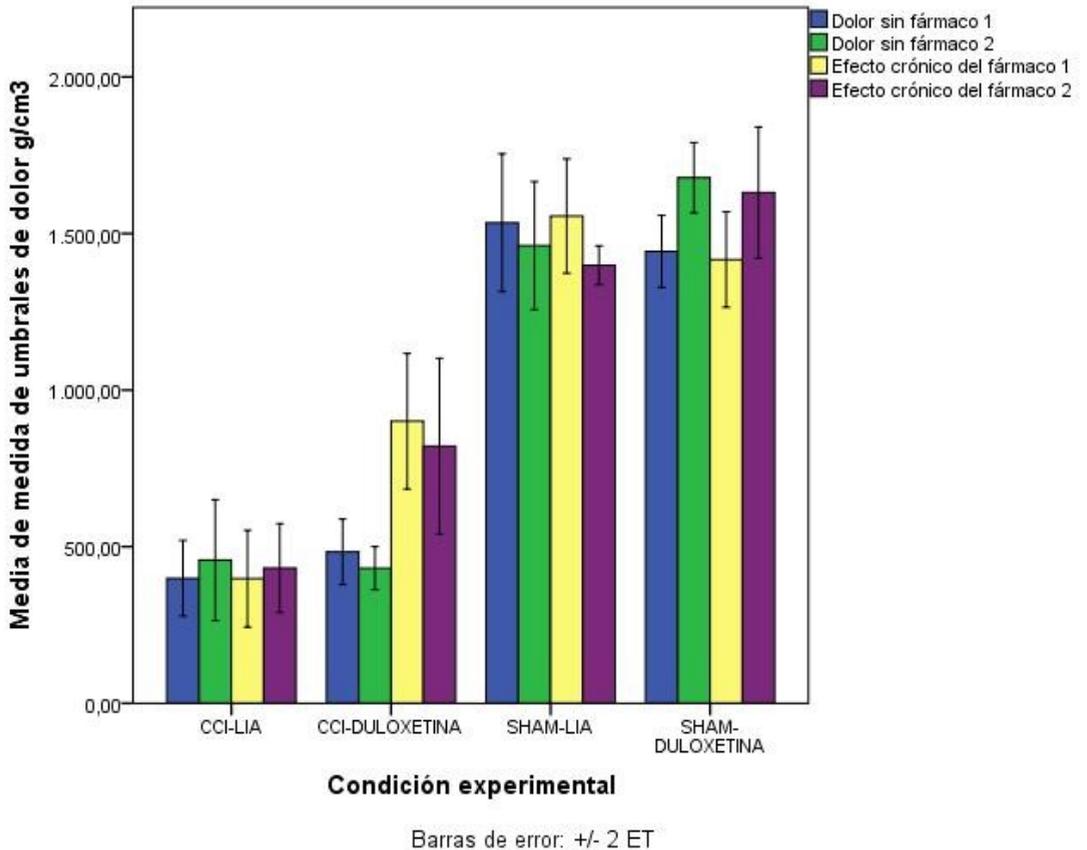


FIGURA 26: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES DOLOR SIN FÁRMACO 1, DOLOR SIN FÁRMACO 2, EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 1 Y EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 2. SE PUEDE APRECIAR UNA MEJORA SIGNIFICATIVA EN EL GRUPO EXPERIMENTAL CCI-DULOX, ASIMISMO NO SE APRECIA NINGUNA MEJORA EN EL GRUPO CCI-LIA. LOS GRUPOS SHAM ACTÚAN COMO CONTROLES.

4.1.2.2.f. Comparación entre el efecto agudo del fármaco y el efecto crónico del fármaco.

Para esta comparación conductual, se realiza un ANOVA de medidas repetidas para comparar la el efecto agudo del fármaco con el efecto crónico del fármaco (1 y2 por separado).

Las variables cumplen el supuesto de esfericidad de Mauchly ($W= 0,980$; $p>0,05$) (tabla 37).

En la Tabla ANOVA de efecto intra-sujetos (tabla 38) no se observan diferencias estadísticamente significativos ($F=0,752$; $p>0,05$).

Sin embargo, en las pruebas post hoc de comparaciones múltiples según las correcciones de Bonferroni y Tukey (tabla 39) se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-LIA con respecto a los grupos CCI-DULOX y los grupos control, así como diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CCI-DULOX y los grupos control($p<0,05$). Los grupos control no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,05$). Los resultados pueden observarse gráficamente en la Figura 27.

Prueba de esfericidad de Mauchly^a

Medida: MEASURE_1

Efecto intra-sujetos	W de Mauchly	Chi-cuadrado aprox.	gl	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite-inferior
factor1	,980	,391	2	,822	,980	1,000	,500

TABLA 37: PRUEBA DE ESFERICIDAD DE MAUCHLY. LAS VARIABLES CUMPLEN EL SUPUESTO DE ESFERICIDAD ($W=0,980$; $p>0,05$).

Prueba ANOVA de medidas relacionadas. Pruebas de efectos intra-sujetos.

Medida: MEASURE_1

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
factor1	Esfericidad asumida	40708,726	2	20354,363	,752	,478
	Greenhouse-Geisser	40708,726	1,960	20768,910	,752	,476
	Huynh-Feldt	40708,726	2,000	20354,363	,752	,478
	Límite-inferior	40708,726	1,000	40708,726	,752	,396
factor1 * CONDEXP	Esfericidad asumida	330180,742	6	55030,124	2,033	,084
	Greenhouse-Geisser	330180,742	5,880	56150,892	2,033	,085
	Huynh-Feldt	330180,742	6,000	55030,124	2,033	,084
	Límite-inferior	330180,742	3,000	110060,247	2,033	,142
Error(factor1)	Esfericidad asumida	1082696,705	40	27067,418		
	Greenhouse-Geisser	1082696,705	39,202	27618,685		
	Huynh-Feldt	1082696,705	40,000	27067,418		
	Límite-inferior	1082696,705	20,000	54134,835		

TABLA 38: TABLA ANOVA PARA MUESTRAS RELACIONADAS. NO SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (F=0,752; P>0,05)

Comparaciones múltiples

Medida: MEASURE_1

	Condición experimental	Condición experimental comparación	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DHS de Tukey	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-391,1586*	99,46290	,004	-669,5489	-112,7683
		SHAM-LIA	-1023,9811*	102,85851	,000	-1311,8755	-736,0867
		SHAM-DULOXETINA	-1113,6856*	102,85851	,000	-1401,5800	-825,7911
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	391,1586*	99,46290	,004	112,7683	669,5489
		SHAM-LIA	-632,8225*	94,50430	,000	-897,3340	-368,3110
		SHAM-DULOXETINA	-722,5270*	94,50430	,000	-987,0385	-458,0155
	SHAM-LIA	CCI-LIA	1023,9811*	102,85851	,000	736,0867	1311,8755
		CCI-DULOXETINA	632,8225*	94,50430	,000	368,3110	897,3340
		SHAM-DULOXETINA	-89,7044	98,07174	,797	-364,2010	184,7921
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	1113,6856*	102,85851	,000	825,7911	1401,5800
		CCI-DULOXETINA	722,5270*	94,50430	,000	458,0155	987,0385
		SHAM-LIA	89,7044	98,07174	,797	-184,7921	364,2010
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DULOXETINA	-391,1586*	99,46290	,005	-682,2983	-100,0188
		SHAM-LIA	-1023,9811*	102,85851	,000	-1325,0602	-722,9020
		SHAM-DULOXETINA	-1113,6856*	102,85851	,000	-1414,7647	-812,6064
	CCI-DULOXETINA	CCI-LIA	391,1586*	99,46290	,005	100,0188	682,2983
		SHAM-LIA	-632,8225*	94,50430	,000	-909,4479	-356,1972
		SHAM-DULOXETINA	-722,5270*	94,50430	,000	-999,1523	-445,9017
	SHAM-LIA	CCI-LIA	1023,9811*	102,85851	,000	722,9020	1325,0602
		CCI-DULOXETINA	632,8225*	94,50430	,000	356,1972	909,4479
		SHAM-DULOXETINA	-89,7044	98,07174	1,000	-376,7721	197,3632
	SHAM-DULOXETINA	CCI-LIA	1113,6856*	102,85851	,000	812,6064	1414,7647
		CCI-DULOXETINA	722,5270*	94,50430	,000	445,9017	999,1523
		SHAM-LIA	89,7044	98,07174	1,000	-197,3632	376,7721

TABLA 39: TABLA POST-HOC DE COMPARACIONES MÚLTIPLES SEGÚN LAS CORRECCIONES DE TUKEY Y BONFERRONI. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA Y CCI-DULOX RESPECTO A LOS GRUPOS CONTROL.

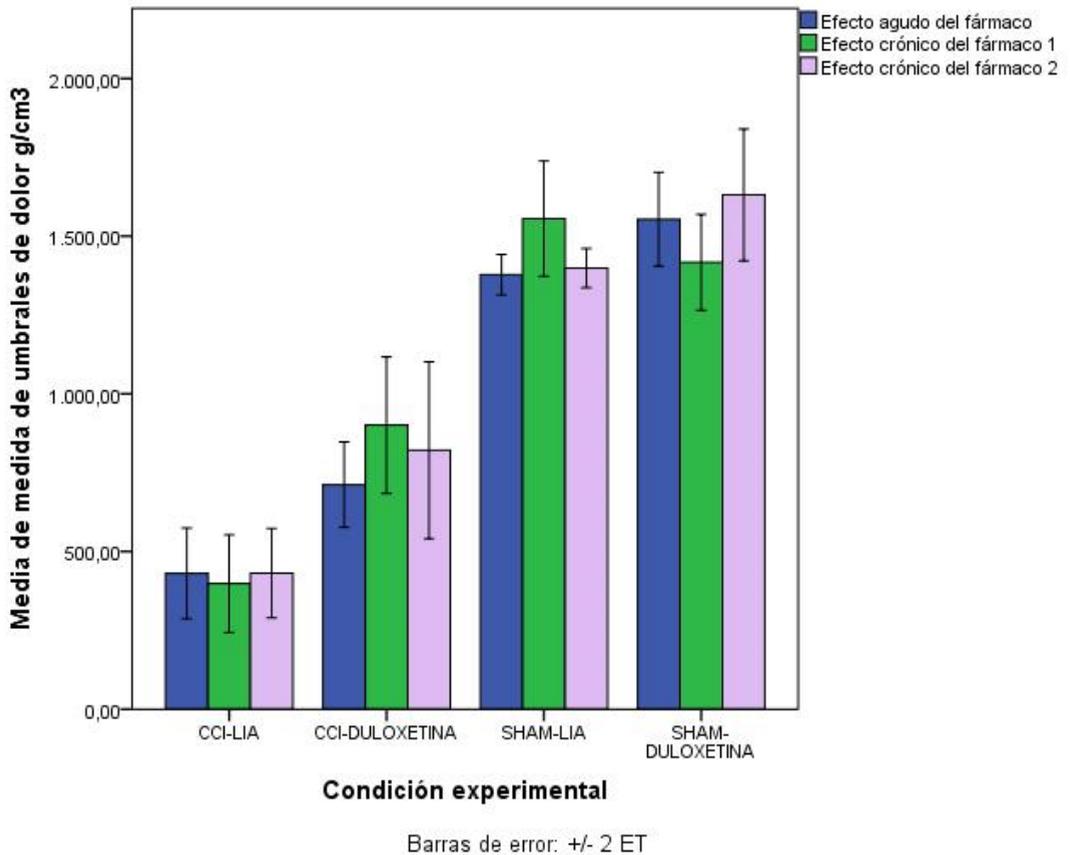


FIGURA 27: GRÁFICA COMPARACIÓN DE LAS MEDIAS DE MEDIDA DE UMBRALES DE DOLOR DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES SEGÚN LAS VARIABLES EFECTO AGUDO DEL FÁRMACO, EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 1 Y EFECTO CRÓNICO DEL FÁRMACO 2. SE PUEDE APRECIAR UN EFECTO SIMILAR EN AMBOS CASOS, CON UNA TENDENCIA A LA MEJORA EN EL CASO DE CCI-DUL. EN EL CASO DE CCI-LIA NO HAY CAMBIOS.

4.2.- Resultados del estudio Inmunohistoquímico.

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

En primer lugar es importante señalar que no todos los elementos inmunorreactivos mostraron la misma intensidad de marcaje, pudiendo encontrar en una misma sección desde células fuertemente inmunopositivas (puntos de coloración negra opaca y homogénea) hasta células débilmente marcadas (puntos de coloración grisácea translúcida e irregular). Para nuestro estudio sólo se consideraron aquellas células claramente marcadas. Esto se consiguió ajustando previamente los parámetros del programa de análisis de imagen ImageJ. Las mediciones fueron llevadas a cabo por un investigador que desconocía a qué grupo pertenecían las preparaciones y que, en caso de corrección manual del ImageJ, mantuvo el mismo criterio de exclusión o inclusión con todos los ejemplares del experimento.

4.2.1. Estudio estadístico descriptivo.

4.2.1.a. Asta Posterior de la médula espinal. Estudio citoarquitectónico.

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

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 contó con un atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos G, 1986), con el cual se demarcó la zona mediante comparación de áreas fusionando las fotografías obtenidas con el microscopio *Axioscope A1* de *Carl Zeiss* para epifluorescencia con combinación de luz transmitida mediante photoshop CS5 de plantillas de los núcleos a estudiar extraídas del atlas y, posteriormente, analizando la expresión de fos mediante el programa ImageJ (Fig 28).

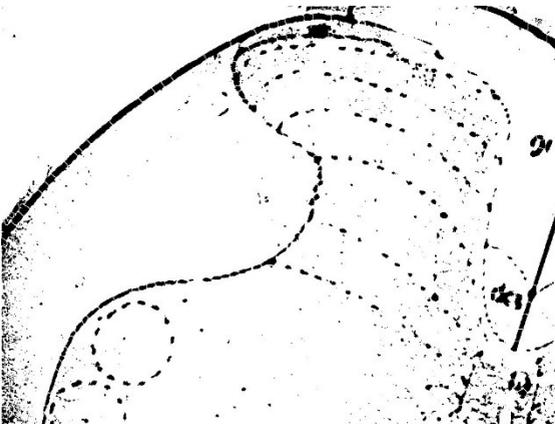
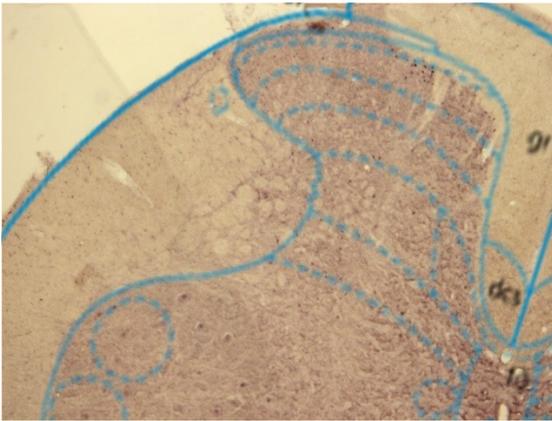
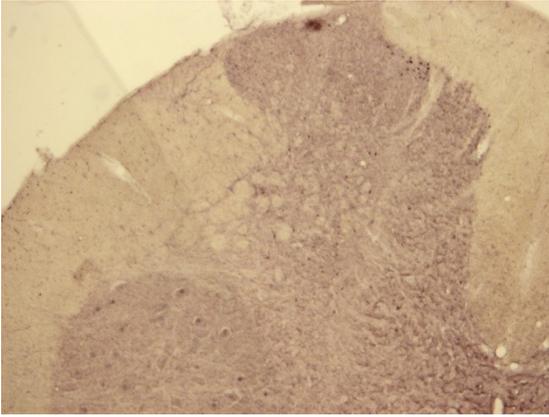


FIGURA 28: MICROFOTOGRAFÍA (5x) DE LA MÉDULA ESPINAL DE LA RATA EN UN CORTE CORRESPONDIENTE AL NIVEL L4 TEÑIDO CON INMUNOCITOQUÍMICA DE C-FOS, CON LA PLANTILLA DEL ATLAS WATSON Y PATXINOS Y, POR ÚLTIMO, PROCESADA CON IMAGEJ.

Las condiciones experimentales son:

- Grupo constricción crónica del ciático tratado con vehículo (CCI-LIA).

Los animales de este grupo mostraron una intensa inmunorreacción frente a Fos en las láminas de Rexed I, II y V del asta posterior de la médula, con predominio ipsilateral a la lesión. La constricción crónica del ciático y su tratamiento con vehículo (líquido intestinal artificial) provocó un incremento de células inmunorreactivas en todas las láminas del asta posterior de la médula espinal de las ratas (figura 29 y 30).

- Grupo constricción crónica del ciático tratado con Duloxetina (CCI-DUL).

La administración de duloxetina, por vía oral, previa a la aplicación del modelo de dolor neuropático, provocó una disminución en el número de células inmunopositivas en el asta posterior de la médula espinal (figura 31 y 32).

- Grupo control tratado con vehículo (SHAM-LIA).

Las ratas del grupo control operación SHAM tratadas con vehículo LIA mostraron un menor marcaje de células inmunopositivas, con predominio ipsilateral (figura 33 y 34).

- Grupo control tratado con Duloxetina (SHAM-DUL).

Las ratas del grupo control operación SHAM tratadas con duloxetina mostraron un marcaje de células inmunopositivas con independencia de la hemisección estudiada (figura 35 y 36).

Los datos estadísticos descriptivos se resumen en la siguientes tablas (tabla 40, tabla 41 y tabla 42).

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Láminas I+II Ipsilateral	11,091	3	23	,000
Lámina V ipsilateral	1,766	3	23	,182
Láminas I+II contralateral	1,783	3	23	,178
Lámina V contralateral	,267	3	23	,849

TABLA 40: PRUEBA DE LEVENE PARA LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS. SE PUEDE OBSERVAR QUE LA VARIABLE "LÁMINAS I+II IPSILATERAL" NO CUMPLE EL SUPUESTO ($P < 0,05$).

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico
Láminas I+II Ipsilateral	CCI-LIA	9	68,89	29,362	9,787
	CCI-DUL	8	35,38	9,999	3,535
	SHAM-DUL	5	7,00	4,301	1,924
	SHAM-LIA	5	6,60	3,715	1,661
	Total	27	35,96	31,617	6,085
Lámina V ipsilateral	CCI-LIA	9	30,11	5,533	1,844
	CCI-DUL	8	29,25	7,086	2,505
	SHAM-DUL	5	9,00	8,216	3,674
	SHAM-LIA	5	17,40	1,949	,872
	Total	27	23,59	10,334	1,989
Láminas I+II contralateral	CCI-LIA	9	20,67	8,888	2,963
	CCI-DUL	8	19,75	7,459	2,637
	SHAM-DUL	5	7,20	4,324	1,934
	SHAM-LIA	5	5,20	2,280	1,020
	Total	27	15,04	9,549	1,838
Lámina V contralateral	CCI-LIA	9	15,78	7,412	2,471
	CCI-DUL	8	17,50	5,632	1,991
	SHAM-DUL	5	6,80	4,658	2,083
	SHAM-LIA	5	12,60	4,615	2,064
	Total	27	14,04	6,875	1,323

TABLA 41: ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS DE LAS VARIABLES SEGÚN CONDICIÓN EXPERIMENTAL.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Láminas I+II ipsilateral	,155	27	,095	,875	27	,004
Lámina V ipsilateral	,125	27	,200*	,951	27	,228
Láminas I+II contralateral	,103	27	,200*	,934	27	,085
Lámina V contralateral	,098	27	,200*	,985	27	,952

TABLA 42: PRUEBAS DE NORMALIDAD. SE OBSERVA EL ESTADÍSTICO DE SHAPIRO-WILK AL TENER UNA N (TAMAÑO MUESTRAL TOTAL) MENOR DE 50. LA VARIABLE "LÁMINAS I+II IPSILATERAL" NO CUMPLE CON EL SUPUESTO ($p < 0,05$).



FIGURA 29: MICROFOTOGRAFÍA (5x) QUE ILUSTRA LA INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN NEURONAS DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL A NIVEL L4/L5 EN RATAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO CON VEHÍCULO CCI-LIA EN LA HEMISECCIÓN CONTRALATERAL A LA LESIÓN.

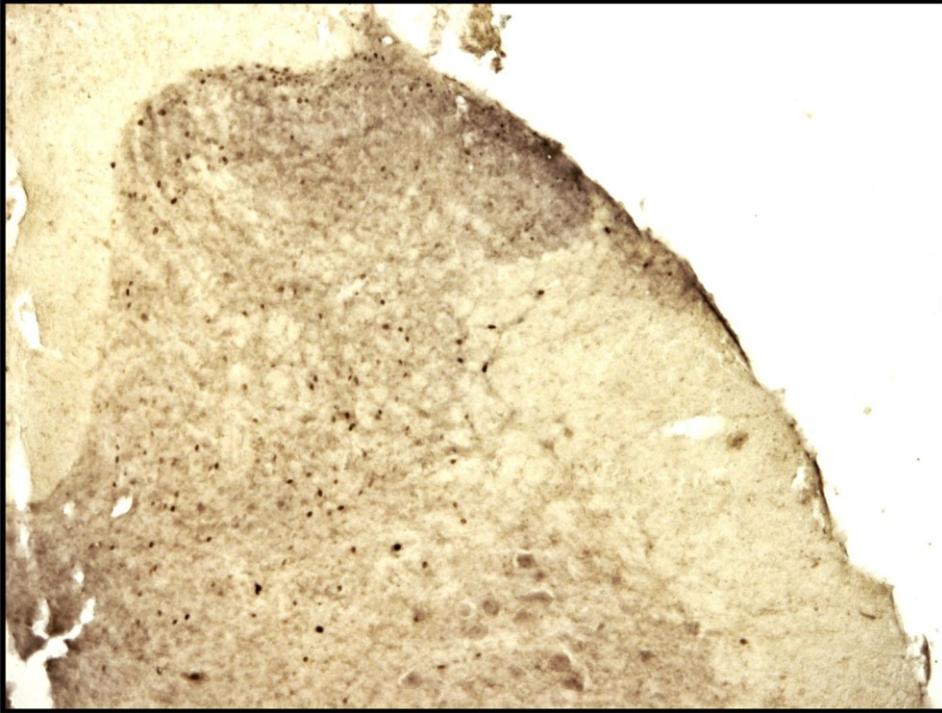


FIGURA 30: MICROFOTOGRAFÍA (5x) QUE ILUSTR A LA INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN NEURONAS DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL A NIVEL L4/L5 EN RATAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO CON VEHÍCULO CCI-LIA EN LA HEMISECCIÓN IPSILATERAL A LA LESIÓN.

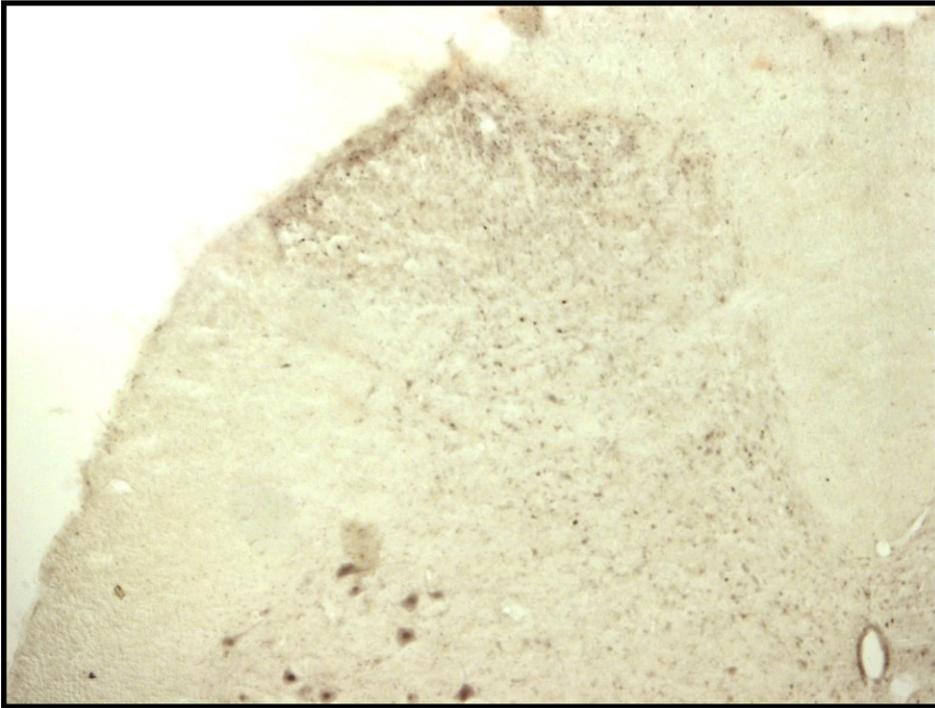


FIGURA 31: MICROFOTOGRAFÍA (5x) QUE ILUSTR LA INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN NEURONAS DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL A NIVEL L4/L5 EN RATAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO CON VEHÍCULO CCI-DUL EN LA HEMISECCIÓN CONTRALATERAL A LA LESIÓN.

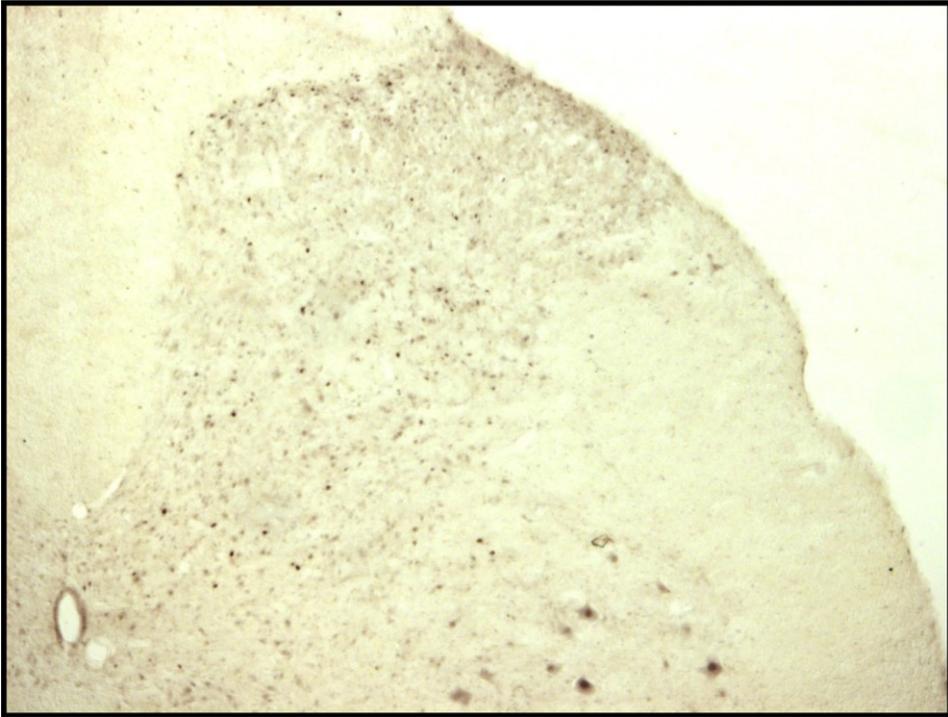


FIGURA 32: MICROFOTOGRAFÍA (5X) QUE ILUSTRA LA INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN NEURONAS DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL A NIVEL L4/L5 EN RATAS DEL GRUPO EXPERIMENTAL TRATADO CON DULOJETINA CCI-DUL. EN LA HEMISECCIÓN IPSILATERAL A LA LESIÓN.

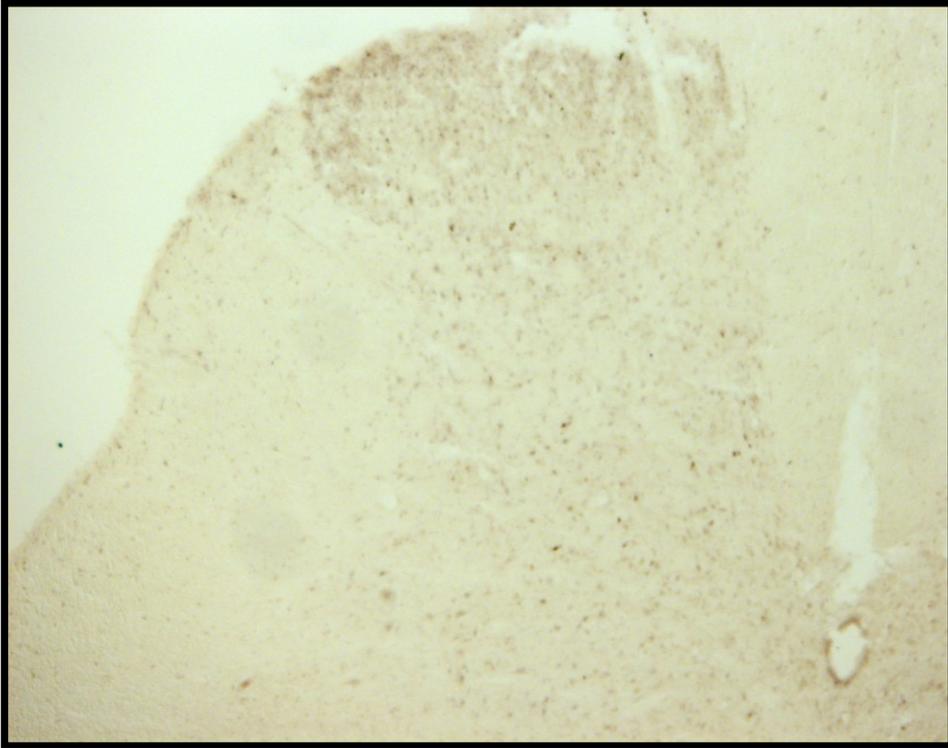


FIGURA 33: MICROFOTOGRAFÍA (5x) QUE ILUSTR LA INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN NEURONAS DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL A NIVEL L4/L5 EN RATAS DEL GRUPO CONTROL TRATADO CON VEHÍCULO SHAM-LIA EN LA HEMISECCIÓN IPSILATERAL A LA LESIÓN.

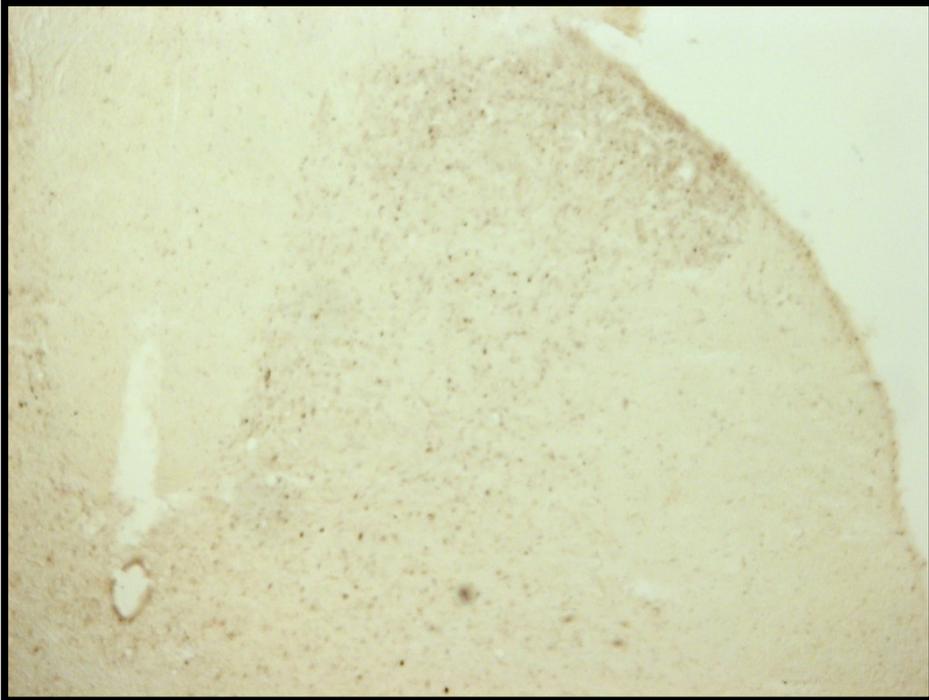


FIGURA 34: MICROFOTOGRAFÍA (5x) QUE ILUSTRA LA INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN NEURONAS DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL A NIVEL L4/L5 EN RATAS DEL GRUPO CONTROL TRATADO CON VEHÍCULO SHAM-LIA EN LA HEMISECCIÓN CONTRALATERAL A LA LESIÓN.

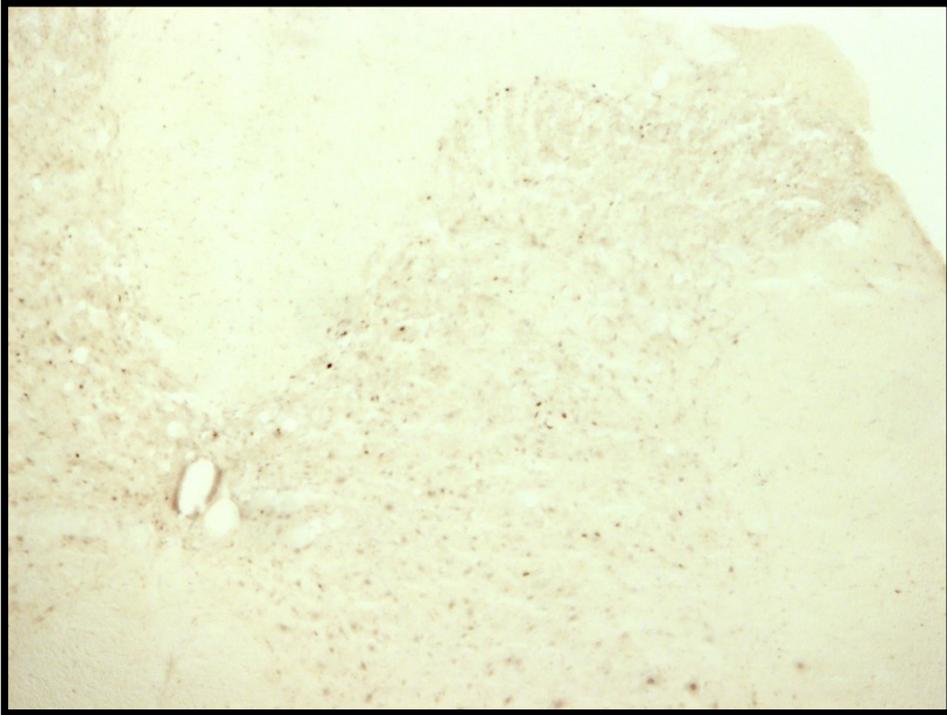


FIGURA 35: MICROFOTOGRAFÍA (5X) QUE ILUSTR A INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN NEURONAS DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL A NIVEL L4/L5 EN RATAS DEL GRUPO CONTROL TRATADO CON DULOXETINA SHAM-DUL EN LA HEMISECCIÓN IPSILATERAL A LA LESIÓN.

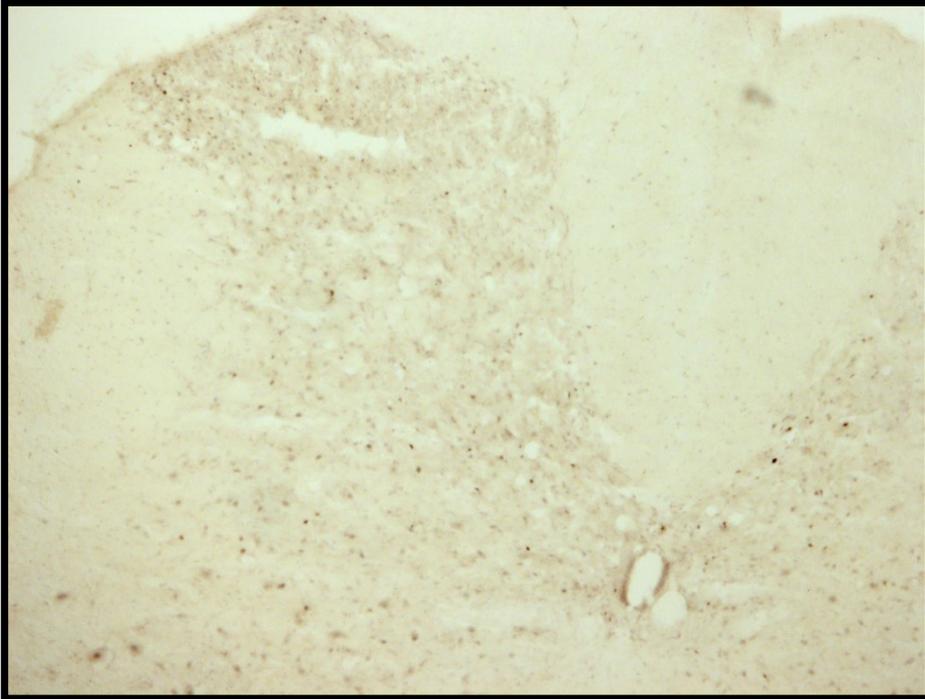


FIGURA 36: MICROFOTOGRAFÍA (5x) QUE ILUSTRA LA INMUNORREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN NEURONAS DEL ASTA POSTERIOR DE LA MÉDULA ESPINAL A NIVEL L4/L5 EN RATAS DEL GRUPO CONTROL TRATADO CON DULOXETINA SHAM-DUL EN LA HEMISECCIÓN CONTRALATERAL A LA LESIÓN.

4.2.1.b. Núcleo Dorsal del Rafe (DR). Estudio citoarquitectónico.

El núcleo del Rafe Dorsal fue estudiado al nivel rostrocaudal -8,04 mm de Bregma.

El estudio del Rafe Dorsal se llevó a cabo en secciones coronales representativas del nivel -8,04 mm respecto a Bregma del cerebro de la rata. Para su delimitación, se contó con un atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos G, 1986), con el cual se demarcó la zona mediante comparación de áreas fusionando las fotografías obtenidas con el microscopio Axioscope A1 de Carl Zeiss para epifluorescencia con combinación de luz transmitida mediante photoshop CS5 de plantillas de los núcleos a estudiar extraídas del atlas y, posteriormente, analizando la expresión de fos mediante el programa ImageJ (Fig 37).

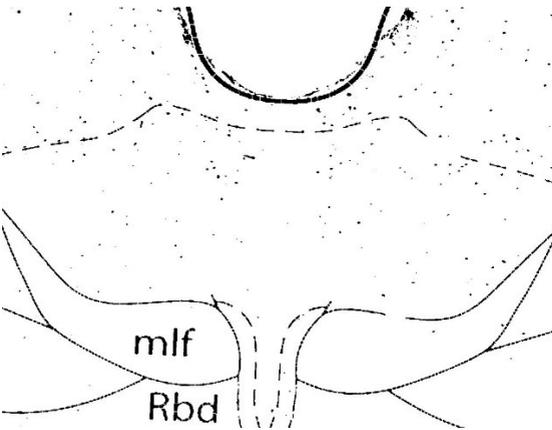
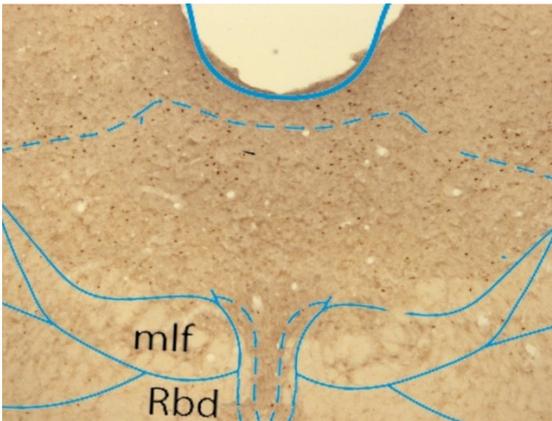


FIGURA 37: MICROFOTOGRAFÍA (5x) DEL NÚCLEO SEROTONINÉRGICO DORSAL DEL RAPE DEL CEREBRO DE LA RATA TEÑIDO CON INMUNOCITOQUÍMICA DE C-FOS; PROCESADO CON LA PLANTILLA DEL ATLAS WATSON Y PATXINOS Y, POR ÚLTIMO, PROCESADA CON IMAGEJ.

Las condiciones experimentales son:

- Grupo constricción crónica del ciático tratado con vehículo (CCI-LIA).

Los animales de este grupo mostraron una menor inmunorreacción de Fos con respecto a la condición experimental CCI-DUL. La constricción crónica del ciático y su tratamiento con vehículo (líquido intestinal artificial) provoca un incremento de células inmunorreactivas frente a los grupos control (SHAM) (Fig 38).

- Grupo constricción crónica del ciático tratado con Duloxetina (CCI-DUL).

La administración de duloxetina, por vía oral, previa a la aplicación del modelo de dolor neuropático, provocó un aumento en el número de células inmunopositivas en el Rafe Dorsal del cerebro de la rata frente a los grupos control SHAM, pero una disminución frente al grupo CCI-LIA (Fig 39).

- Grupo control tratado con vehículo (SHAM-LIA).

Las ratas del grupo control operación SHAM tratadas con vehículo LIA mostraron un menor marcaje de células inmunopositivas que los grupos de condiciones experimentales. (Fig 40).

- Grupo control tratado con Duloxetina (SHAM-DUL).

Las ratas del grupo control operación SHAM tratadas con duloxetina mostraron un menor marcaje de células inmunopositivas con que los grupos de condiciones experimentales (Fig 41).

Los datos estadísticos descriptivos se resumen en la siguientes tablas (tabla 43, tabla 44 y tabla 45).

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Rafe Dorsal	,257	33	,000	,816	33	,000

TABLA 43: TABLA DE PRUEBA DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK. NO SE ASUME NORMALIDAD.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Rafe Dorsal

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
6,848	3	29	,001

TABLA 44: PRUEBA DE LEVENE PARA LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS. NO SE HAN ASUMIDO VARIANZAS IGUALES.

Descriptivos

Rafe Dorsal

	N	Media	Desviación típica	Error típico
CCI-LIA	7	118,86	43,129	16,301
CCI-DUL	6	89,83	24,693	10,081
SHAM-DUL	10	47,60	9,143	2,891
SHAM-LIA	10	42,30	6,634	2,098
Total	33	68,79	38,353	6,676

TABLA 45: ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS SEGÚN CONDICIÓN EXPERIMENTAL.



FIGURA 38: MICROFOTOGRAFÍA (5x) DE CORTE CORONAL A NIVEL DEL DR DE RATA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL CCI-LIA.



FIGURA 39: MICROFOTOGRAFÍA (5x) DE CORTE CORONAL A NIVEL DEL DR DE RATA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL CCI-DUL.



FIGURA 40: MICROFOTOGRAFÍA (5x) DE CORTE CORONAL A NIVEL DEL DR DE RATA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL CONTROL SHAM-LIA.

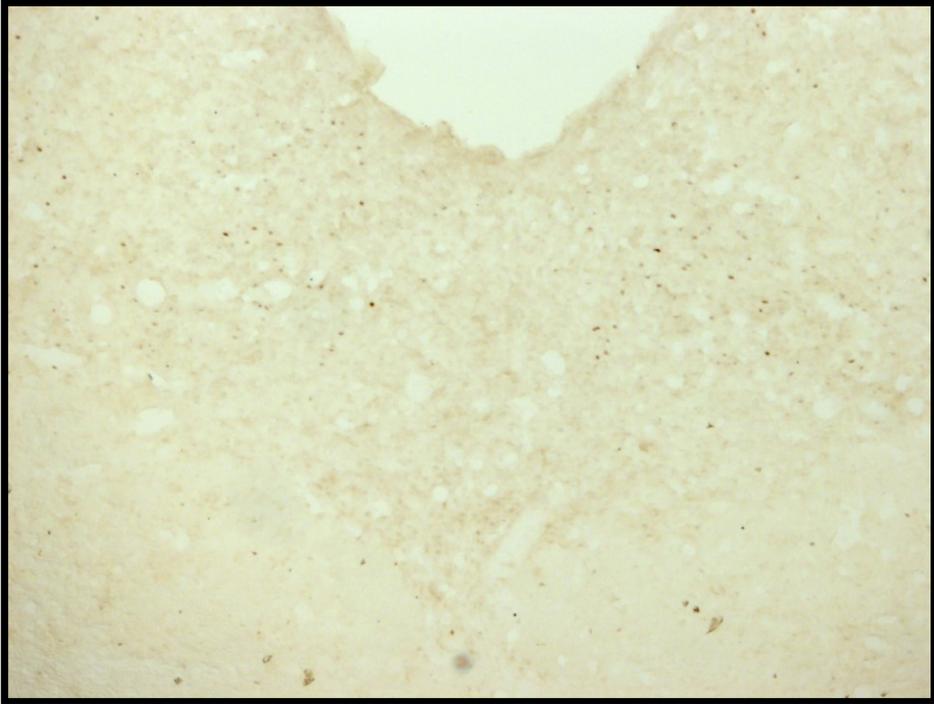


FIGURA 41: MICROFOTOGRAFÍA (5x) DE CORTE CORONAL A NIVEL DEL DR DE RATA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL CONTROL SHAM-DUL.

4.2.1.c. Núcleo Locus Coeruleus (LC). Estudio citoarquitectónico.

El núcleo Locus Coeruleus fue estudiado en dos niveles rostrocaudales diferentes, situados a -9,60mm y a -9,96 mm de Bregma.

El estudio de los niveles de Locus Coeruleus se llevó a cabo en secciones coronales representativas de los niveles -9,60 mm y -9,96 mm respecto a Bregma del cerebro de la rata. Para su delimitación, se contó con un atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos G, 1986), con el cual se demarcó la zona mediante comparación de áreas fusionando las fotografías obtenidas con el microscopio Axioscope A1 de Carl Zeiss para epifluorescencia con combinación de luz transmitida mediante photoshop CS5 de plantillas de los núcleos a estudiar extraídas del atlas y, posteriormente, analizando la expresión de fos mediante el programa ImageJ (figura 42 y 43).

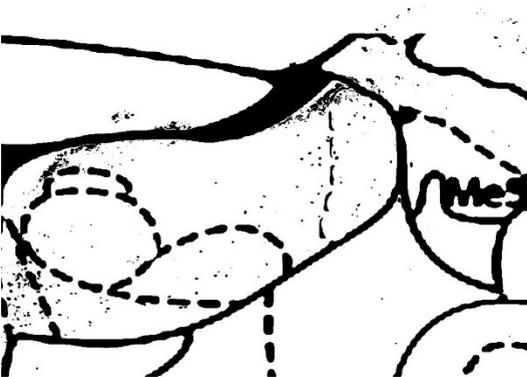
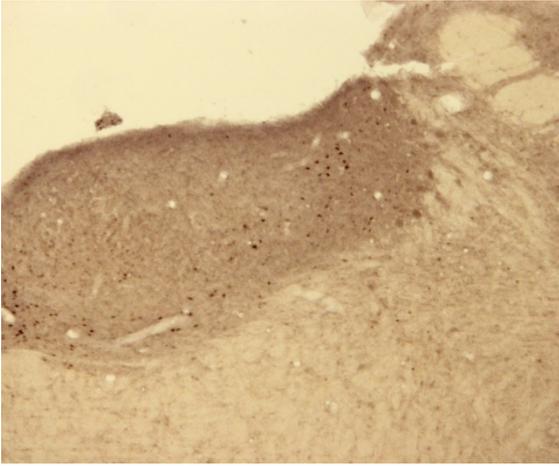


FIGURA 42: MICROFOTOGRAFÍA (5X) DEL LOCUS COERULEUS DEL CEREBRO DE LA RATA TEÑIDO CON INMUNOCITOQUÍMICA DE C-FOS (NIVEL ROSTRAL DE LC); PROCESADO CON LA PLANTILLA DEL ATLAS WATSON Y PATXINOS Y, POR ÚLTIMO, PROCESADA CON IMAGEJ.

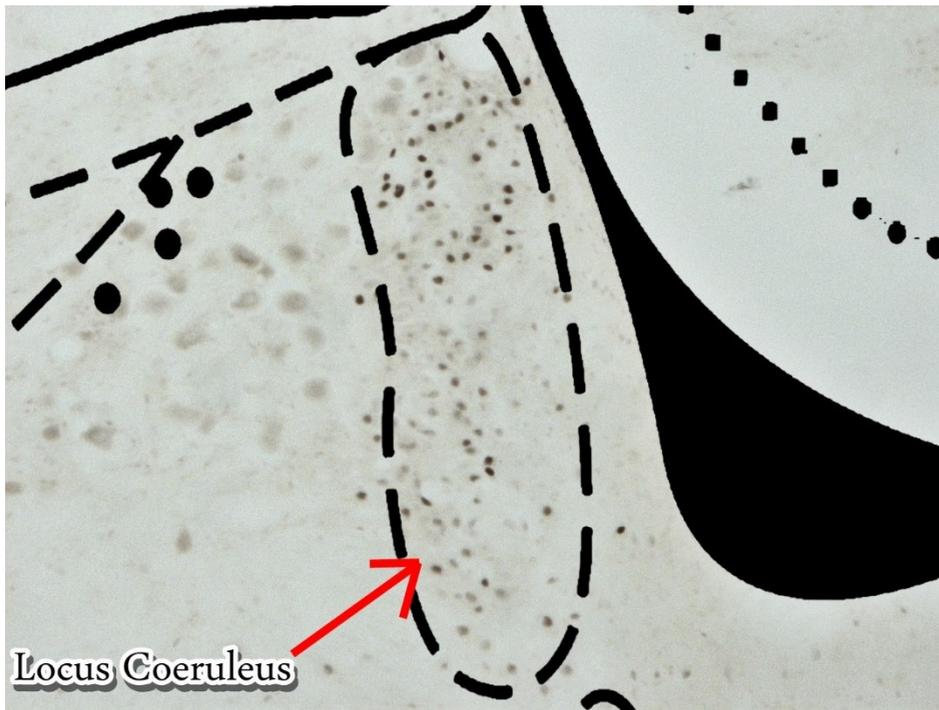


FIGURA 43: MICROFOTOGRAFÍA (10X) DEL NÚCLEO LOCUS COERULEUS DEL CEREBRO DE LA RATA TEÑIDO CON LA TÉCNICA INMUNOCITOQUÍMICA C-FOS (NIVEL CAUDAL DE LC); PROCESADO CON LA PLANTILLA DEL ATLAS WATSON Y PATXINOS .

Las condiciones experimentales son:

- Grupo constricción crónica del ciático tratado con vehículo (CCI-LIA).

Los animales de este grupo mostraron una mayor inmunorreacción de Fos en el nivel caudal del núcleo con respecto a la condición experimental CCI-DUL, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en las zonas rostrales. La constricción crónica del ciático y su tratamiento con vehículo (líquido intestinal artificial) provoca un incremento de células inmunorreactivas con independencia del nivel frente a los grupos control (SHAM) (figura 44 y 45).

- Grupo constricción crónica del ciático tratado con Duloxetina (CCI-DUL)

La administración de duloxetina, por vía oral, previa a la aplicación del modelo de dolor neuropático, provocó un descenso con respecto a CCI-LIA en el número de células inmunopositivas en el Locus Coeruleus del cerebro de la rata,; sin embargo, presenta similitud frente a los grupos control SHAM (figura 46 y 47).

- Grupo control tratado con vehículo (SHAM-LIA)

Las ratas del grupo control operación SHAM tratadas con vehículo LIA mostraron un menor marcaje de células inmunopositivas que los grupos de condiciones experimentales. (figura 48 y 49).

- Grupo control tratado con Duloxetina (SHAM-DUL)

Las ratas del grupo control operación SHAM tratadas con duloxetina mostraron un menor marcaje de células inmunopositivas con que los grupos de condiciones experimentales pero una similitud frente al grupo CCI-DULOX (figura 50 y 51).

Los datos estadísticos descriptivos se resumen en la siguientes tablas (tabla 46, tabla 47 y tabla 48).

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
LC rostral	,135	29	,185	,959	29	,312
LC caudal	,230	29	,000	,852	29	,001

TABLA 46: TABLA DE PRUEBA DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK. LA VARIABLE LC CAUDAL NO ASUME NORMALIDAD ($P < 0,05$)

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
LC rostral	,123	3	25	,946
LC caudal	1,713	3	25	,190

TABLA 47: PRUEBA DE LEVENE PARA LA HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS. AMBAS VARIABLES CUMPLEN LA HOMOGENEIDAD ($P > 0,05$)

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico
LC rostral	CCI-LIA	7	15,14	4,981	1,883
	CCI-DUL	8	18,25	4,892	1,729
	SHAM-DUL	6	15,83	5,231	2,136
	SHAM-LIA	8	9,88	4,734	1,674
	Total	29	14,69	5,689	1,056
LC caudal	CCI-LIA	7	25,14	3,388	1,280
	CCI-DUL	8	10,00	5,071	1,793
	SHAM-DUL	6	6,67	1,966	,803
	SHAM-LIA	8	6,88	3,682	1,302
	Total	29	12,10	8,419	1,563

TABLA 48: ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS SEGÚN CONDICIÓN EXPERIMENTAL.

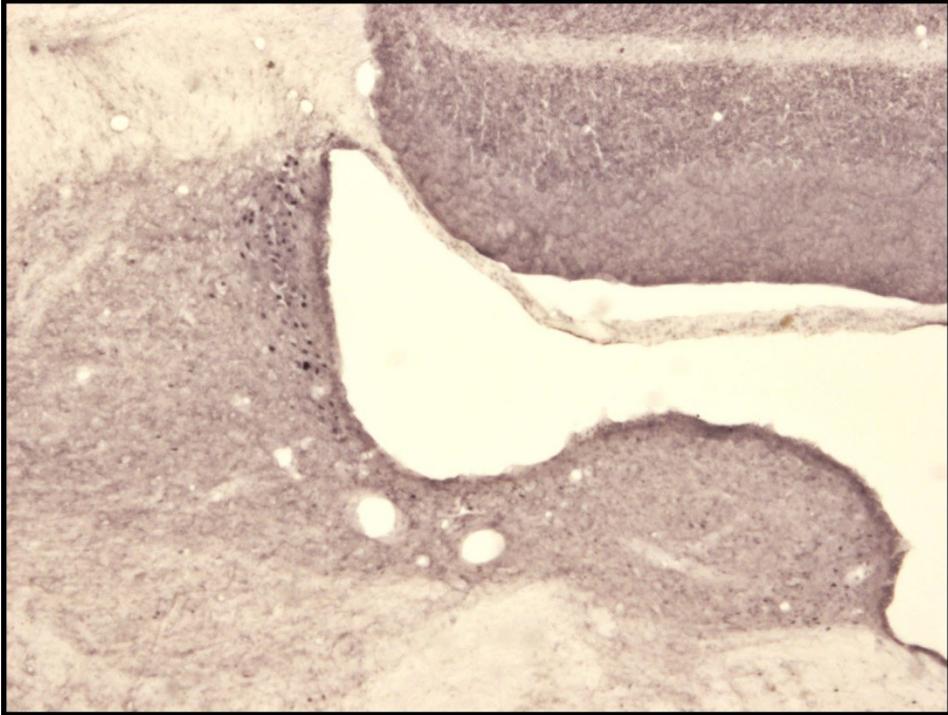


FIGURA 44: MICROFOTOGRAFÍA (5X) DE CORTE CORONAL DEL LOCUS COERULEUS (LC) DE RATA A NIVEL -9,96 MM DE BREGMA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL CCI-LIA.

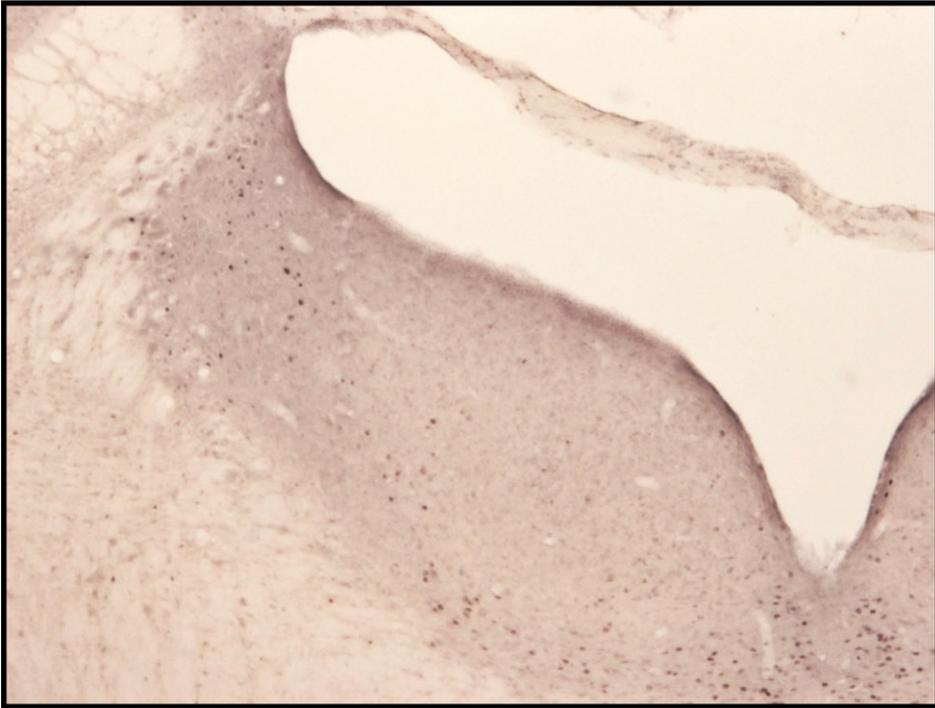


FIGURA 45: MICROFOTOGRAFÍA (5X) DE CORTE CORONAL DEL LOCUS COREULEUS (LC) DE RATA A NIVEL -9,60 MM DE BREGMA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL CCI-LIA.

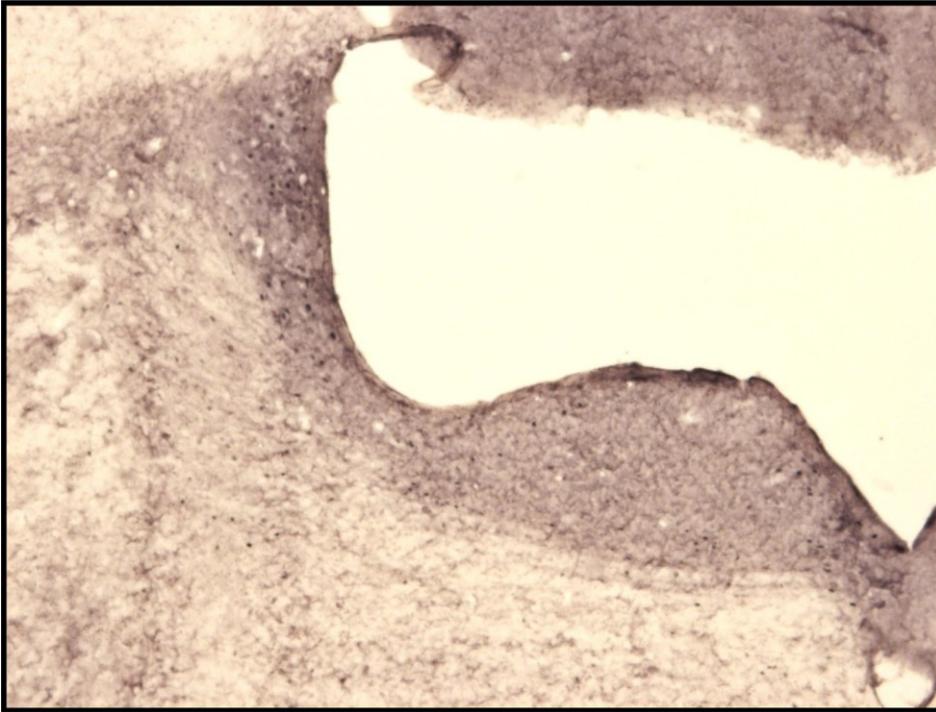


FIGURA 46: MICROFOTOGRAFÍA (5X) DE CORTE CORONAL DEL LOCUS COREULEUS (LC) DE RATA A NIVEL -9,96 MM DE BREGMA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL CCI-DUL.

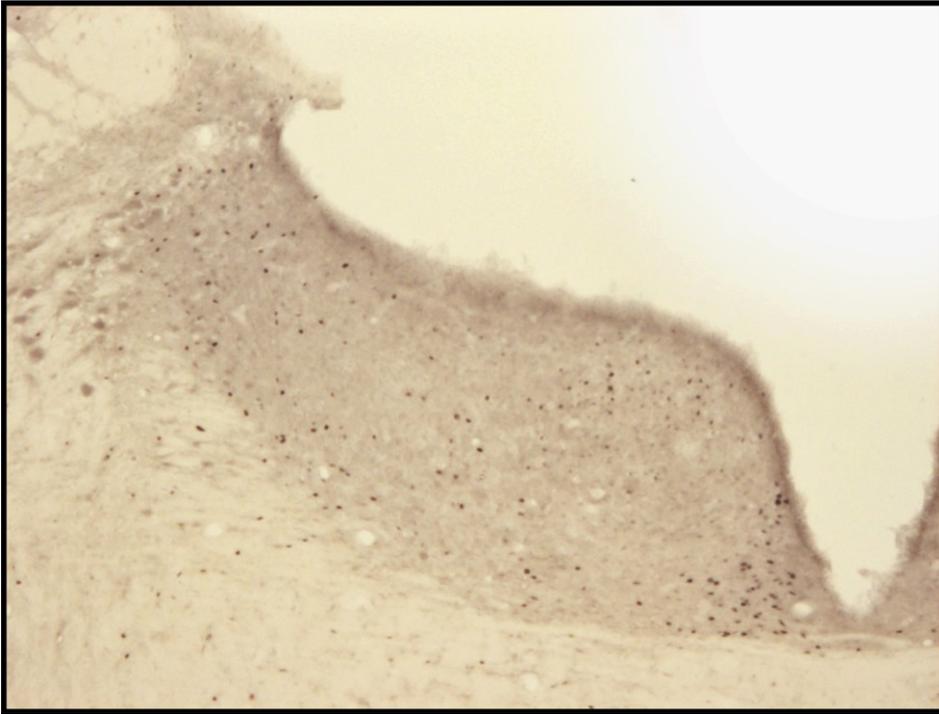


FIGURA 47: MICROFOTOGRAFÍA (5X) DE CORTE CORONAL DEL LOCUS COREULEUS (LC) DE RATA A NIVEL -9,60 MM DE BREGMA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL CCI-DUL.

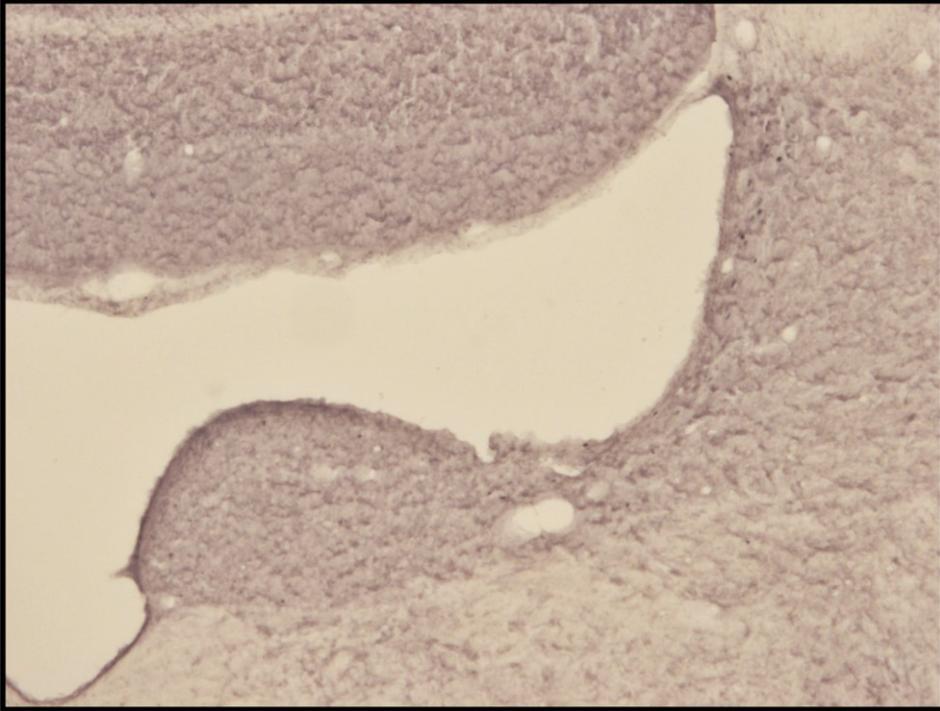


FIGURA 48: MICROFOTOGRAFÍA (5X) DE CORTE CORONAL DEL LOCUS COERULEUS (LC) DE RATA A NIVEL -9,96 MM DE BREGMA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL SHAM-LIA.

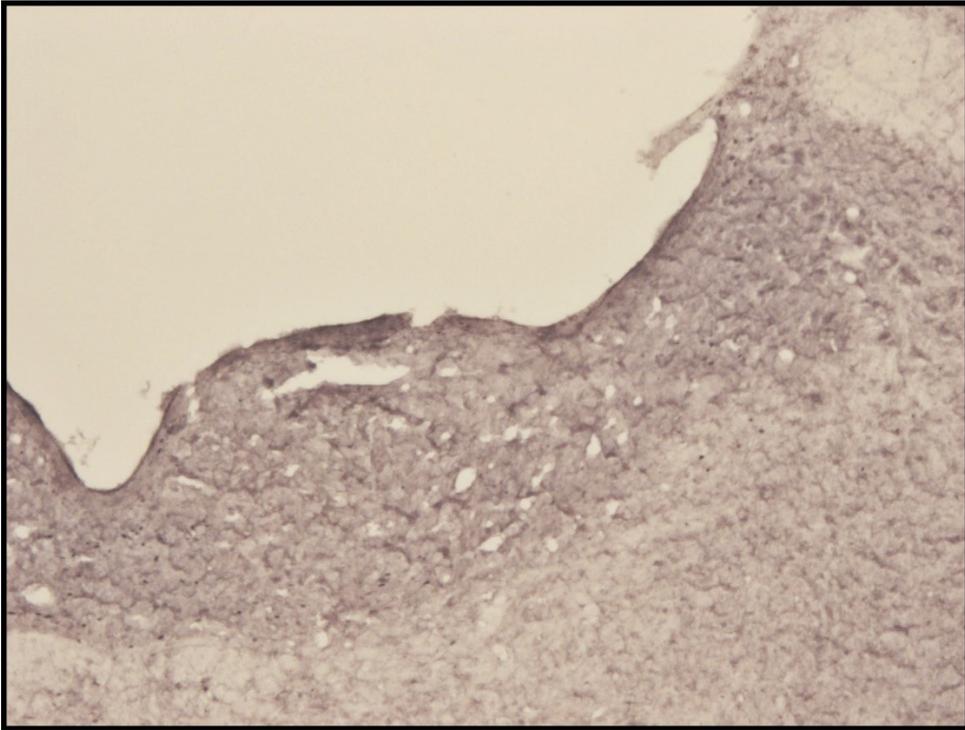


FIGURA 49: MICROFOTOGRAFÍA (5x) DE CORTE CORONAL DEL LOCUS COREULEUS (LC) DE RATA A NIVEL -9,60 MM DE BREGMA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL SHAM-LIA.

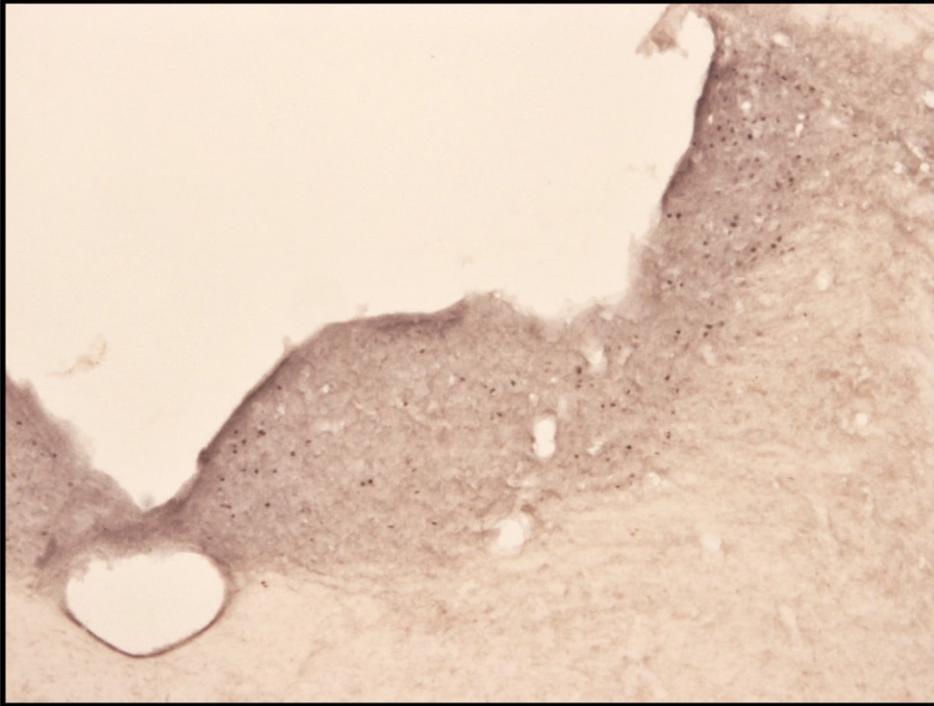


FIGURA 50: MICROFOTOGRAFÍA (5X) DE CORTE CORONAL DEL LOCUS COREULEUS (LC) DE RATA A NIVEL -9,96 MM DE BREGMA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL SHAM-DUL.

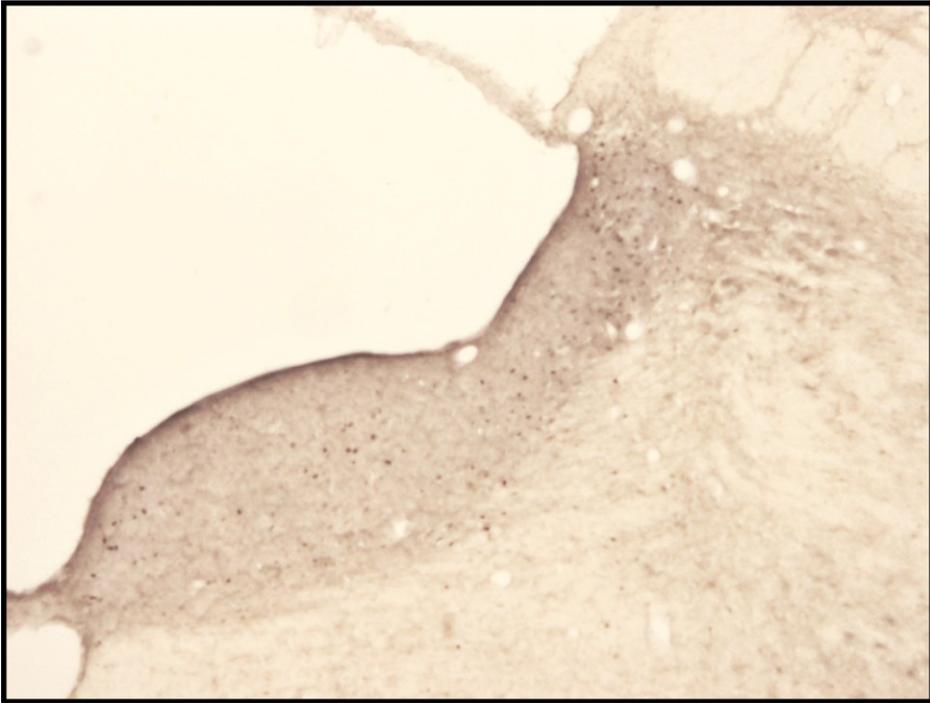


FIGURA 51: MICROFOTOGRAFÍA (5X) DE CORTE CORONAL DEL LOCUS COERULEUS (LC) DE RATA A NIVEL -9,60 MM DE BREGMA, PROCESADO PARA LA DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE C-FOS; CONDICIÓN EXPERIMENTAL SHAM-DUL.

4.2.2. Estudio Estadístico inferencial.

4.2.2.a Estudio estadístico del asta posterior de la médula.

4.2.2.a.1 Análisis global asta posterior de la médula.

En primer lugar, se realiza un análisis inferencial del total del recuento de células inmunoreactivas frente a Fos en la médula (es decir, sin segregar el contaje según láminas) según hemisección ipsi o contralateral. Se adjunta un análisis descriptivo de estos datos llevado a cabo para cada grupo experimental (tabla 49, tabla 50 y tabla 51) y se acompaña con un gráfico de las medias para las variables dentro de cada uno de los grupos (figura 52). Se puede observar que se debe realizar una prueba no paramétrica paralela a ANOVA de un factor para la variable médula ipsilateral puesto que no cumple los supuestos de homogeneidad ni de normalidad.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
MÉDULA IPSI	,156	29	,069	,912	29	,019
MÉDULA CONTRA	,091	29	,200*	,981	29	,859

TABLA 49: PRUEBAS DE NORMALIDAD DE SHAPIRO-WILK. LA VARIABLE MÉDULA IPSILATERAL NO CUMPLE EL SUPUESTO ($P<0,05$).

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
MÉDULA IPSI	8,494	3	25	,000
MÉDULA CONTRA	1,228	3	25	,320

TABLA 50: PRUEBA DE LEVENE DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS. LA VARIABLE MÉDULA IPSILATERAL NO CUMPLE EL SUPUESTO ($P<0,05$).

Descriptivos

		N	Media	Desviación típica	Error típico
Médula Ipsilateral	CCI-LIA	9	98,11	31,239	10,413
	CCI-DUL	8	64,63	15,602	5,516
	SHAM-DUL	6	20,67	10,912	4,455
	SHAM-LIA	6	22,17	4,355	1,778
	Total	29	57,14	38,302	7,113
Médula Contralateral	CCI-LIA	9	36,44	13,106	4,369
	CCI-DUL	8	37,25	7,869	2,782
	SHAM-DUL	6	13,67	10,614	4,333
	SHAM-LIA	6	21,00	6,841	2,793
	Total	29	28,76	13,940	2,589

TABLA 51: TABLA DE DESCRIPTIVOS DE LAS VARIABLES SEGÚN CONDICIÓN EXPERIMENTAL.

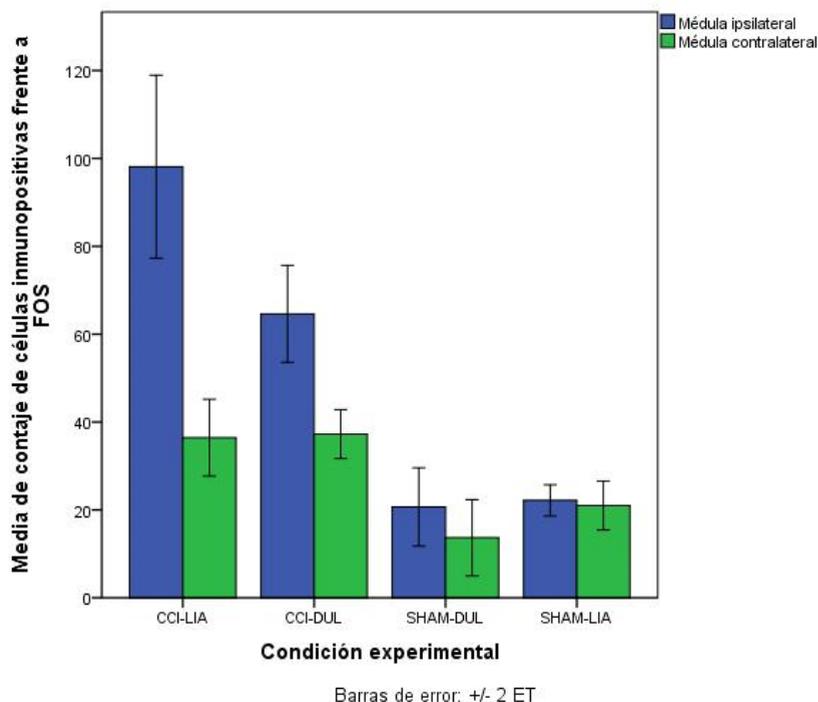


FIGURA 52: GRÁFICO DE LAS MEDIAS. SE PUEDE OBSERVAR UN AUMENTO EN LA INMUNOREACTIVIDAD FRENTE A FOS EN LA HEMISECCIÓN IPSILATERAL A LA LESIÓN DE LA CONDICIÓN EXPERIMENTAL CCI-LIA FRENTE A LOS DEMÁS GRUPOS; ASIMISMO, SE MANTIENE UNA RELATIVA ESTABILIDAD EN LA HEMISECCIÓN CONTRALATERAL.

Efectuamos un análisis no paramétrico paralelo al análisis de varianza de un factor ANOVA, llamado Kruskal-Wallis o Prueba K para muestras independientes (tabla 52) para la variable médula ipsilateral ya que no cumple los supuestos de normalidad ni homogeneidad de varianza.

La prueba post-hoc es realizada según la corrección de Games-Howell (tabla 53) puesto que es robusta ante el fallo del supuesto de homogeneidad.

Asimismo, realizaremos un análisis ANOVA de un factor (o prueba F de muestras independientes) (Tabla 54) para la variable Médula contralateral, y se empleará un post-hoc según Tukey y Bonferroni (Tabla 55).

Se deduce de ellas que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales tanto en la hemisección Ipsilateral ($p < 0,05$) como en la contralateral ($F=9,073$, $p < 0,05$) (Tabla 55). De forma más específica, en las pruebas post-hoc para la variable de médula Ipsilateral observamos que estas diferencias ocurren entre las condiciones experimentales CCI-LIA frente a CCI-DUL y frente a los grupos control SHAM-LIA y SHAM-DUL. Se observan diferencias estadísticamente significativas del grupo CCI-DUL frente a los demás grupos, observando sin embargo una tendencia de la variable CCI-DUL a la semejanza hacia niveles de los grupos control SHAM. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control. En lo referente a la variable de médula contralateral (tabla 54), observamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales CCI-DUL y CCI-LIA y los grupos control SHAM-LIA y SHAM-DUL.

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de MÉDULA IPSI es la misma entre las categorías de Grupo.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

TABLA 52: TABLA DE PRUEBA NO PARAMÉTRICA KRUSKAL-WALLIS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES PARA LA VARIABLE MÉDULA IPSILATERAL. HAY DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS ($p < 0,05$).

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
MÉDULA CONTRA	2836,255	3	945,418	9,073	,000
	2605,056	25	104,202		
	5441,310	28			

TABLA 53: TABLA ANOVA DE UN FACTOR PARA LA VARIABLE MÉDULA CONTRALATERAL. HAY DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE GRUPOS ($p < 0,05$).

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: MÉDULA CONTRA

	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	CCI-LIA	CCI-DUL	-,806	4,960	,998	-14,45	12,84
		SHAM-DUL	22,778*	5,380	,001	7,98	37,58
		SHAM-LIA	15,444*	5,380	,038	,65	30,24
	CCI-DUL	CCI-LIA	,806	4,960	,998	-12,84	14,45
		SHAM-DUL	23,583*	5,513	,001	8,42	38,75
		SHAM-LIA	16,250*	5,513	,032	1,09	31,41
	SHAM-DUL	CCI-LIA	-22,778*	5,380	,001	-37,58	-7,98
		CCI-DUL	-23,583*	5,513	,001	-38,75	-8,42
		SHAM-LIA	-7,333	5,894	,605	-23,54	8,88
	SHAM-LIA	CCI-LIA	-15,444*	5,380	,038	-30,24	-,65
		CCI-DUL	-16,250*	5,513	,032	-31,41	-1,09
		SHAM-DUL	7,333	5,894	,605	-8,88	23,54
Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DUL	-,806	4,960	1,000	-15,02	13,40
		SHAM-DUL	22,778*	5,380	,002	7,36	38,19
		SHAM-LIA	15,444*	5,380	,049	,03	30,86
	CCI-DUL	CCI-LIA	,806	4,960	1,000	-13,40	15,02
		SHAM-DUL	23,583*	5,513	,001	7,79	39,38
		SHAM-LIA	16,250*	5,513	,041	,46	32,04
	SHAM-DUL	CCI-LIA	-22,778*	5,380	,002	-38,19	-7,36
		CCI-DUL	-23,583*	5,513	,001	-39,38	-7,79
		SHAM-LIA	-7,333	5,894	1,000	-24,22	9,55
	SHAM-LIA	CCI-LIA	-15,444*	5,380	,049	-30,86	-,03
		CCI-DUL	-16,250*	5,513	,041	-32,04	-,46
		SHAM-DUL	7,333	5,894	1,000	-9,55	24,22

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

TABLA 54: TABLA POST-HOC SEGÚN LAS CORRECCIONES DE TUKEY Y BONFERRONI. OBSERVAMOS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES CCI-LIA Y CCI-DUL Y LOS GRUPOS CONTROL SHAM-LIA Y SHAM-DUL.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: MÉDULA IPSI

Games-Howell

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CCI-LIA	CCI-DUL	50,762 [*]	10,441	,003	19,07	82,46
	SHAM-DUL	89,762 [*]	9,578	,000	59,83	119,70
	SHAM-LIA	88,262 [*]	8,664	,000	59,02	117,50
CCI-DUL	CCI-LIA	-50,762 [*]	10,441	,003	-82,46	-19,07
	SHAM-DUL	39,000 [*]	7,547	,003	15,52	62,48
	SHAM-LIA	37,500 [*]	6,346	,005	15,35	59,65
SHAM-DUL	CCI-LIA	-89,762 [*]	9,578	,000	-119,70	-59,83
	CCI-DUL	-39,000 [*]	7,547	,003	-62,48	-15,52
	SHAM-LIA	-1,500	4,796	,988	-17,67	14,67
SHAM-LIA	CCI-LIA	-88,262 [*]	8,664	,000	-117,50	-59,02
	CCI-DUL	-37,500 [*]	6,346	,005	-59,65	-15,35
	SHAM-DUL	1,500	4,796	,988	-14,67	17,67

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

TABLA 55: ANÁLISIS POST-HOC SEGÚN LAS CORRECCIONES DE GAMES-HOWELL PARA VARIABLES CON VARIANZAS NO HOMOGÉNEAS. SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS CCI-LIA FRENTE A LOS GRUPOS CCI-DUL Y FRENTE A LOS GRUPOS SHAM. DEL MISMO MODO, SE ENCUENTRAN DIFERENCIAS ENTRE EL GRUPO CCI-DUL Y LOS DEMÁS.

4.2.2.a.2. Análisis parcial por láminas.

A continuación, analizaremos los resultados según láminas I+II y V en las hemisecciones ipsi y contralaterales. Como se pudo apreciar anteriormente en el apartado de estadística descriptiva, la variable médula Ipsilateral láminas I+II no es homogénea ni normal, así que al contrastar esta variable utilizaremos el análisis no paramétrico Kruskal-Wallis (tabla 56) y la prueba post-Hoc de Games-Howell. Para las demás variables elegimos una prueba de análisis de varianza ANOVA de un factor con pruebas post-hoc según Tukey y Bonferroni.

Se encuentran diferencias estadísticamente significativas en todos los casos, tanto en láminas I+II Ipsilateral ($p < 0,05$), en Lámina V Ipsilateral, ($F=16,479$; $p < 0,05$), en Láminas I+II contralaterales, ($F=8,605$; $p < 0,05$) y en Lámina V contralateral (Tabla 57), ($F=3,637$; $p < 0,05$).

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Láminas I+II ipsilateral es la misma entre las categorías de Condición experimental.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

TABLA 56: TABLA DE PRUEBA NO PARAMÉTRICA KRUSKAL-WALLIS DE MUESTRAS INDEPENDIENTES PARA LA VARIABLE LÁMINAS I+II IPSILATERAL. HAY DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS ($p < 0,05$).

ANOVA de un factor

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Lámina V ipsilateral	Inter-grupos	1894,930	3	631,643	16,479	,000
	Intra-grupos	881,589	23	38,330		
	Total	2776,519	26			
Láminas I+II contralateral	Inter-grupos	1253,863	3	417,954	8,605	,001
	Intra-grupos	1117,100	23	48,570		
	Total	2370,963	26			
Lámina V contralateral	Inter-grupos	395,407	3	131,802	3,637	,028
	Intra-grupos	833,556	23	36,242		
	Total	1228,963	26			

TABLA 57: TABLA ANOVA DE UN FACTOR PARA LAS VARIABLES LÁMINA V IPSILATERAL, LÁMINAS I+II CONTRALATERALES Y LÁMINA V CONTRALATERAL. OBSERVAMOS DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS PARA TODAS LAS VARIABLES ($p < 0,05$)

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples (Tabla 58) para la variable Láminas I+II Ipsilateral confirma que esas diferencias se encuentran entre los grupos CCI-LIA frente a CCI-DUL y frente a los grupos control, evidenciando un mayor marcaje de Fos en este grupo experimental tratado con vehículo en las láminas I+II en la sección Ipsilateral a la lesión.

Del mismo modo, vemos diferencias estadísticamente significativas en el grupo CCI-DUL frente a las otras condiciones experimentales, mostrando una tendencia de aproximación hacia los niveles de los grupos control CHAM. Asimismo, las condiciones establecidas como grupos controles SHAM-LIA y SHAM-DULOX no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Láminas I+II ipsilateral
Games-Howell

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CCI-LIA	CCI-DUL	33,514*	10,406	,039	1,69	65,33
	SHAM-DUL	61,889*	9,974	,001	30,46	93,32
	SHAM-LIA	62,289*	9,927	,001	30,89	93,69
CCI-DUL	CCI-LIA	-33,514*	10,406	,039	-65,33	-1,69
	SHAM-DUL	28,375*	4,025	,000	16,10	40,65
	SHAM-LIA	28,775*	3,906	,000	16,74	40,81
SHAM-DUL	CCI-LIA	-61,889*	9,974	,001	-93,32	-30,46
	CCI-DUL	-28,375*	4,025	,000	-40,65	-16,10
	SHAM-LIA	,400	2,542	,998	-7,78	8,58
SHAM-LIA	CCI-LIA	-62,289*	9,927	,001	-93,69	-30,89
	CCI-DUL	-28,775*	3,906	,000	-40,81	-16,74
	SHAM-DUL	-,400	2,542	,998	-8,58	7,78

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

TABLA 58: TABLA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES POST-HOC SEGÚN GAMES-HOWELL PARA LA VARIABLE LÁMINAS I+II IPSILATERAL. SE OBSERVAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE TODOS LOS GRUPOS (P<0,05).

En referencia a las demás variables; en primer lugar encontramos diferencias estadísticamente significativas en las pruebas post-hoc según Bonferroni y Tukey (tabla 59) en la variable Lámina V Ipsilateral entre los grupos CCI-LIA y CCI-DULOX frente a los grupos control SHAM ($p < 0,05$). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control ($p > 0,05$) como en los grupos experimentales entre sí ($p > 0,05$).

En segundo lugar, las pruebas post-hoc para la variable Láminas I+II contralateral (tabla 59) muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-LIA y CCI-DULOX frente a los grupos control SHAM ($p < 0,05$). No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control ($p > 0,05$) como en los grupos experimentales entre sí ($p > 0,05$).

Por último, las pruebas posthoc de Tukey y Bonferroni para la variable Lámina V contralateral muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-DULOX y SHAM-DULOX ($p < 0,05$) (tabla 59).

Estos resultados se representan gráficamente mediante un histograma de barras de error, en el que, de nuevo, destacan las diferencias ya mencionadas (figura 53, 54, 55 y 56).

Comparaciones múltiples

Variable dependiente	(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
						Límite inferior	Límite superior	
Lámina V ipsilateral	HSD de Tukey	CCI-LIA	CCI-DUL	.861	3,008	.992	-7,46	9,19
			SHAM-DUL	21,111 [*]	3,453	.000	11,55	30,67
			SHAM-LIA	12,711 [*]	3,453	.006	3,15	22,27
		CCI-DUL	CCI-LIA	-.861	3,008	.992	-9,19	7,46
			SHAM-DUL	20,250 [*]	3,529	.000	10,48	30,02
			SHAM-LIA	11,850 [*]	3,529	.013	2,08	21,62
		SHAM-DUL	CCI-LIA	-21,111 [*]	3,453	.000	-30,67	-11,55
			CCI-DUL	-20,250 [*]	3,529	.000	-30,02	-10,48
			SHAM-LIA	-8,400	3,916	.169	-19,24	2,44
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-12,711 [*]	3,453	.006	-22,27	-3,15
			CCI-DUL	-11,850 [*]	3,529	.013	-21,62	-2,08
			SHAM-DUL	8,400	3,916	.169	-2,44	19,24
	Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DUL	.861	3,008	1,000	-7,82	9,54
			SHAM-DUL	21,111 [*]	3,453	.000	11,14	31,08
			SHAM-LIA	12,711 [*]	3,453	.007	2,74	22,68
		CCI-DUL	CCI-LIA	-.861	3,008	1,000	-9,54	7,82
			SHAM-DUL	20,250 [*]	3,529	.000	10,06	30,44
			SHAM-LIA	11,850 [*]	3,529	.016	1,66	22,04
		SHAM-DUL	CCI-LIA	-21,111 [*]	3,453	.000	-31,08	-11,14
			CCI-DUL	-20,250 [*]	3,529	.000	-30,44	-10,06
			SHAM-LIA	-8,400	3,916	.256	-19,70	2,90
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-12,711 [*]	3,453	.007	-22,68	-2,74
			CCI-DUL	-11,850 [*]	3,529	.016	-22,04	-1,66
			SHAM-DUL	8,400	3,916	.256	-2,90	19,70
Láminas I+II contralateral	HSD de Tukey	CCI-LIA	CCI-DUL	.917	3,386	.993	-8,45	10,29
			SHAM-DUL	13,467 [*]	3,887	.011	2,71	24,22
			SHAM-LIA	15,467 [*]	3,887	.003	4,71	26,22
		CCI-DUL	CCI-LIA	-.917	3,386	.993	-10,29	8,45
			SHAM-DUL	12,550 [*]	3,973	.021	1,56	23,54
			SHAM-LIA	14,550 [*]	3,973	.007	3,56	25,54
		SHAM-DUL	CCI-LIA	-13,467 [*]	3,887	.011	-24,22	-2,71
			CCI-DUL	-12,550 [*]	3,973	.021	-23,54	-1,56
			SHAM-LIA	2,000	4,408	.968	-10,20	14,20
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-15,467 [*]	3,887	.003	-26,22	-4,71
			CCI-DUL	-14,550 [*]	3,973	.007	-25,54	-3,56
			SHAM-DUL	-2,000	4,408	.968	-14,20	10,20
	Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DUL	.917	3,386	1,000	-8,86	10,69
			SHAM-DUL	13,467 [*]	3,887	.013	2,25	24,69
			SHAM-LIA	15,467 [*]	3,887	.004	4,25	26,69
		CCI-DUL	CCI-LIA	-.917	3,386	1,000	-10,69	8,86
			SHAM-DUL	12,550 [*]	3,973	.026	1,08	24,02
			SHAM-LIA	14,550 [*]	3,973	.008	3,08	26,02
		SHAM-DUL	CCI-LIA	-13,467 [*]	3,887	.013	-24,69	-2,25
			CCI-DUL	-12,550 [*]	3,973	.026	-24,02	-1,08
			SHAM-LIA	2,000	4,408	1,000	-10,72	14,72
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-15,467 [*]	3,887	.004	-26,69	-4,25
			CCI-DUL	-14,550 [*]	3,973	.008	-26,02	-3,08
			SHAM-DUL	-2,000	4,408	1,000	-14,72	10,72
Lámina V contralateral	HSD de Tukey	CCI-LIA	CCI-DUL	-1,722	2,925	.934	-9,82	6,37
			SHAM-DUL	8,978	3,358	.061	-1,31	18,27
			SHAM-LIA	3,178	3,358	.780	-6,11	12,47
		CCI-DUL	CCI-LIA	1,722	2,925	.934	-6,37	9,82
			SHAM-DUL	10,700 [*]	3,432	.023	1,20	20,20
			SHAM-LIA	4,900	3,432	.496	-4,60	14,40
		SHAM-DUL	CCI-LIA	-8,978	3,358	.061	-18,27	3,17
			CCI-DUL	-10,700 [*]	3,432	.023	-20,20	-1,20
			SHAM-LIA	-5,800	3,807	.440	-16,34	4,74
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-3,178	3,358	.780	-12,47	6,11
			CCI-DUL	-4,900	3,432	.496	-14,40	4,60
			SHAM-DUL	5,800	3,807	.440	-4,74	16,34
	Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DUL	-1,722	2,925	1,000	-10,17	6,72
			SHAM-DUL	8,978	3,358	.081	-1,71	18,67
			SHAM-LIA	3,178	3,358	1,000	-6,51	12,87
		CCI-DUL	CCI-LIA	1,722	2,925	1,000	-6,72	10,17
			SHAM-DUL	10,700 [*]	3,432	.029	1,79	20,61
			SHAM-LIA	4,900	3,432	1,000	-5,01	14,81
		SHAM-DUL	CCI-LIA	-8,978	3,358	.081	-18,67	3,17
			CCI-DUL	-10,700 [*]	3,432	.029	-20,61	-1,79
			SHAM-LIA	-5,800	3,807	.848	-16,79	5,19
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-3,178	3,358	1,000	-12,87	6,51
			CCI-DUL	-4,900	3,432	1,000	-14,81	5,01
			SHAM-DUL	5,800	3,807	.848	-5,19	16,79

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

TABLA 59: TABLA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES POST-HOC SEGÚN BONFERRONI Y TUKEY PARA LAS VARIABLES LÁMINA V IPSILATERAL, LÁMINAS I+II CONTRALATERAL Y LÁMINA V CONTRALATERAL. SE OBSERVAN MÚLTIPLES DIFERENCIAS EXPUESTAS EN EL TEXTO.

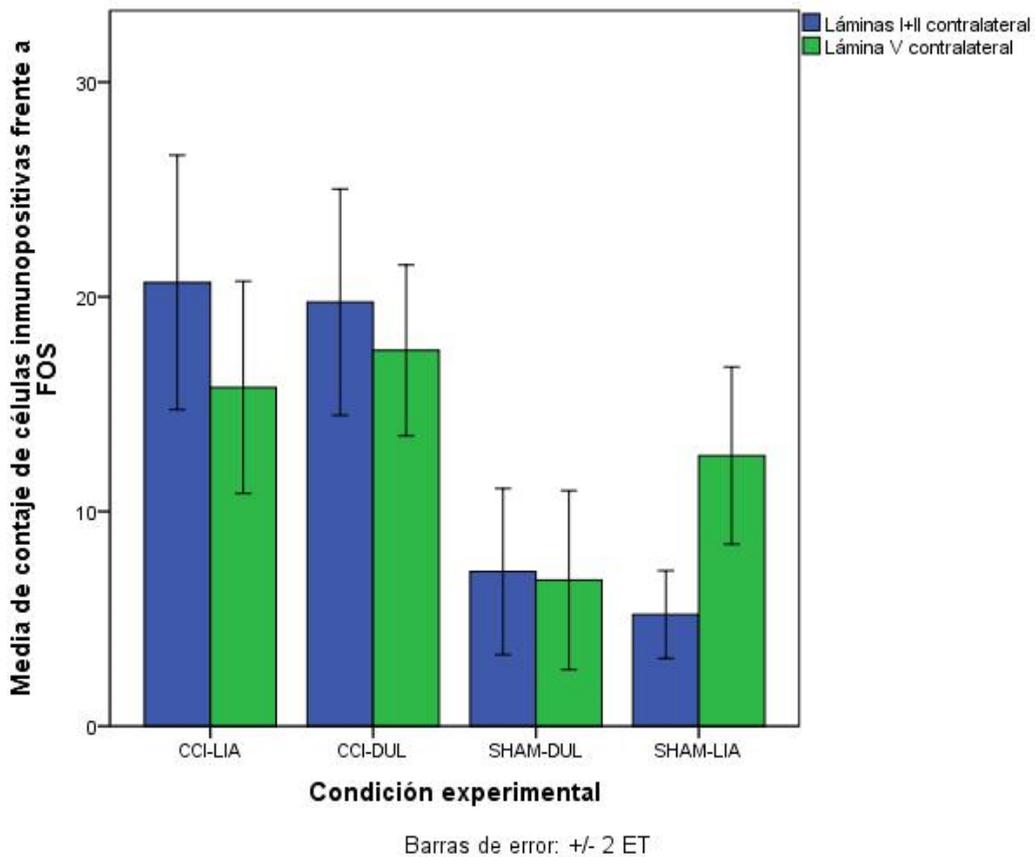


FIGURA 53: GRÁFICO DE MEDIAS PARA LAS VARIABLES LÁMINAS I+II CONTRALATERAL Y LÁMINA V CONTRALATERAL.

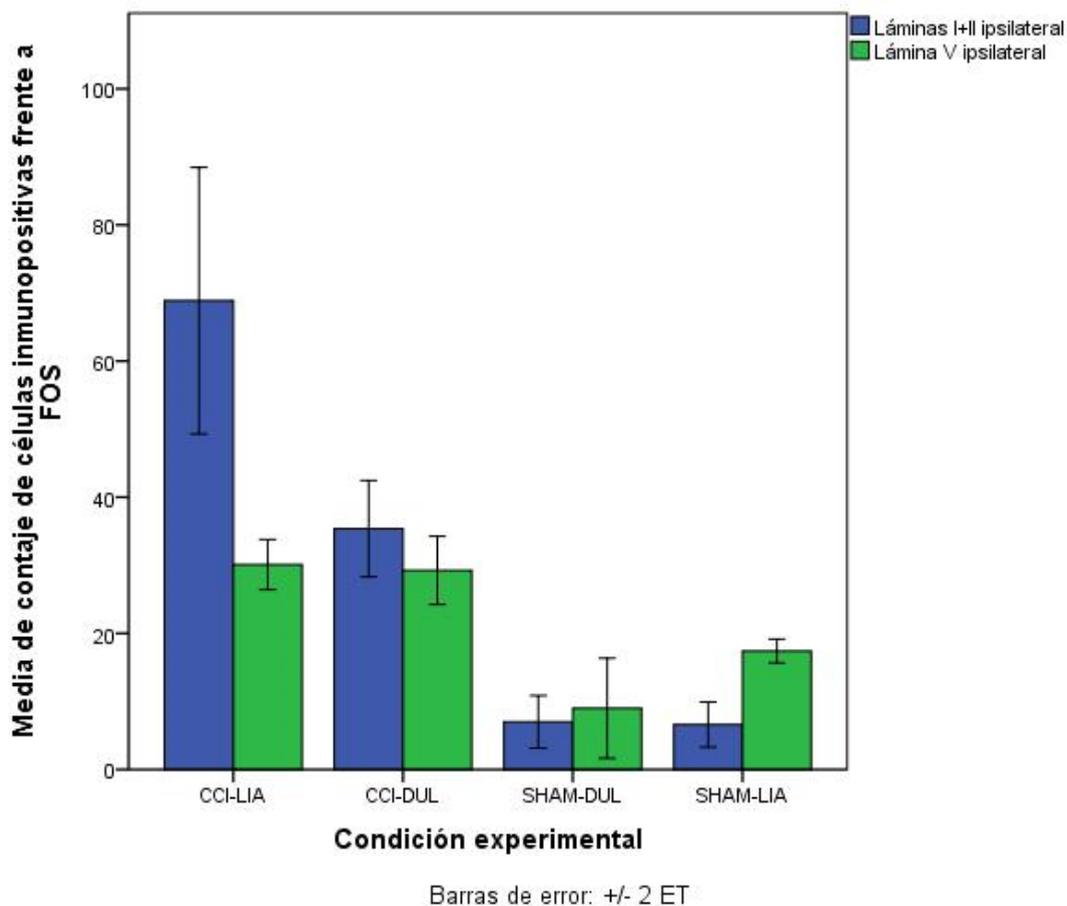


FIGURA 54: GRÁFICO DE MEDIAS PARA LAS VARIABLES LÁMINAS I+II IPSILATERAL Y LÁMINA V IPSILATERAL.

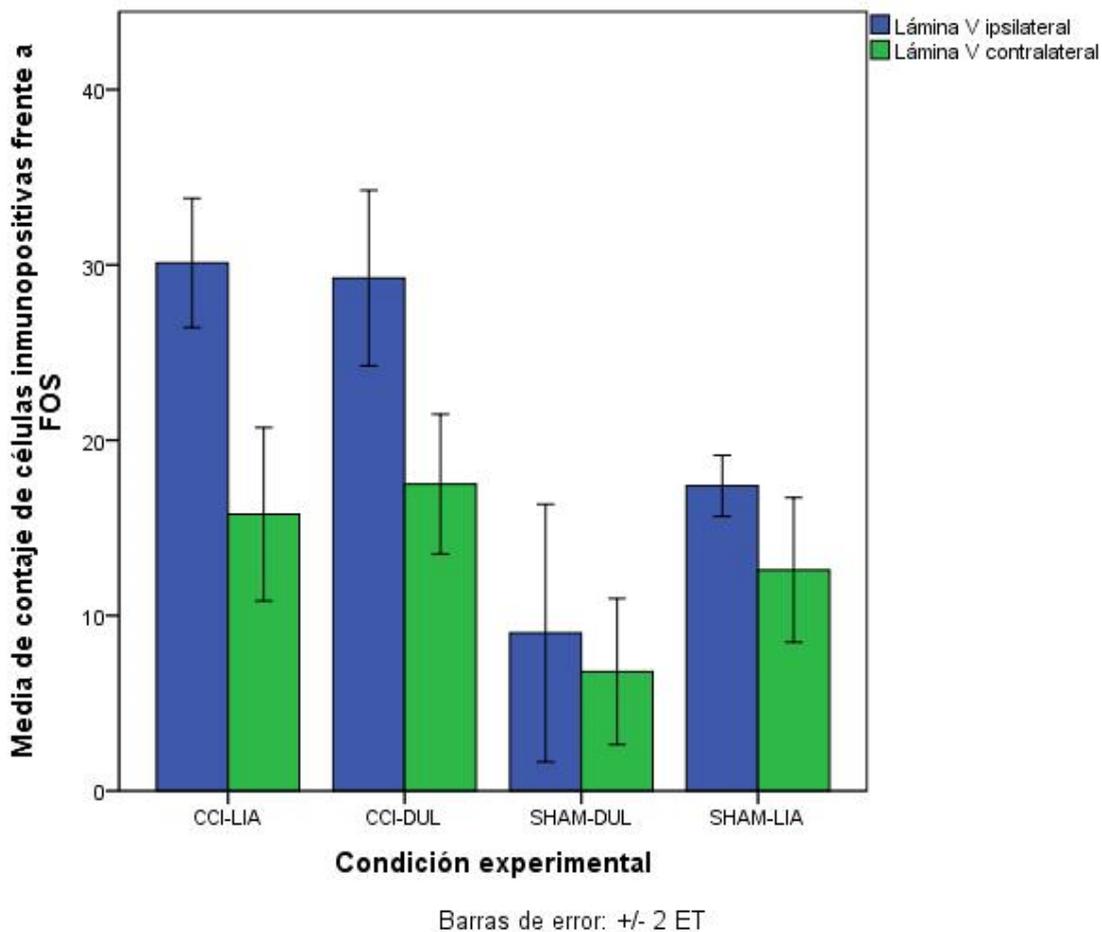


FIGURA 55: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS MEDIAS DE LAS VARIABLES LÁMINA V DE SENDAS HEMISECCIONES IPSI Y CONTRALATERAL.

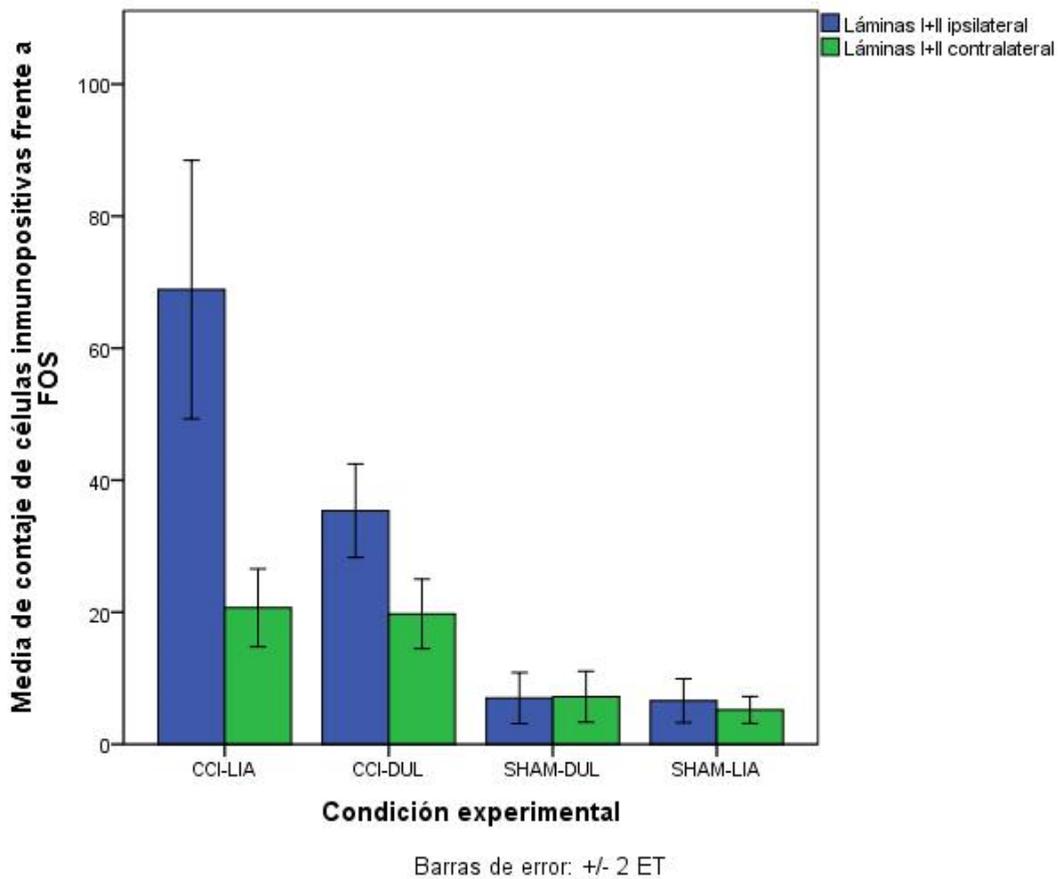


FIGURA 56: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS MEDIAS DE LAS VARIABLES LÁMINAS I+II DE SENDAS HEMISECCIONES IPSI Y CONTRALATERAL.

4.2.2.b. Estudio estadístico del núcleo Dorsal del Rafe (DR).

Como hemos visto en la sección de estadística descriptiva, las variables no cumplen el supuesto de normalidad ni de homogeneidad de varianzas, por lo que analizaremos la muestra con la prueba no paramétrica paralela a ANOVA de un factor conocida como prueba K para muestras independientes o prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. Las comparaciones múltiples las analizaremos mediante el test Games-Howell para variables con varianzas no homogéneas.

El test de Kruskal-Wallis para muestras independientes muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$) (Tabla 60). La prueba post-hoc de Games-Howell (Tabla 61) muestra que las diferencias, de forma específica, se producen entre los grupos CCI-LIA y CCI-DUL y los grupos SHAM-LIA y SHAM-DUL ($p < 0,05$). Asimismo, los grupos CCI-LIA y CCI-DUL no muestran diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), como tampoco lo hacen los grupos SHAM-LIA y SHAM-DUL entre sí ($p > 0,05$).

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Rafe Dorsal es la misma entre las categorías de Condición experimental.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	,000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

TABLA 60: PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES. SE RECHAZA LA HIPÓTESIS NULA, ES DECIR, HAY DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE GRUPOS ($p < 0,05$).

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Rafe Dorsal

Games-Howell

(I) Condición experimental	(J) Condición experimental	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
CCI-LIA	CCI-DUL	29,024	19,167	,466	-29,88	87,93
	SHAM-DUL	71,257 [*]	16,556	,017	15,01	127,51
	SHAM-LIA	76,557 [*]	16,436	,013	20,23	132,88
CCI-DUL	CCI-LIA	-29,024	19,167	,466	-87,93	29,88
	SHAM-DUL	42,233 [*]	10,488	,028	5,60	78,87
	SHAM-LIA	47,533 [*]	10,297	,018	10,70	84,37
SHAM-DUL	CCI-LIA	-71,257 [*]	16,556	,017	-127,51	-15,01
	CCI-DUL	-42,233 [*]	10,488	,028	-78,87	-5,60
	SHAM-LIA	5,300	3,572	,469	-4,89	15,49
SHAM-LIA	CCI-LIA	-76,557 [*]	16,436	,013	-132,88	-20,23
	CCI-DUL	-47,533 [*]	10,297	,018	-84,37	-10,70
	SHAM-DUL	-5,300	3,572	,469	-15,49	4,89

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

TABLA 61: TABLA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES POSTHOC SEGÚN GAMES-HOWELL. APARECEN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES CCI-LIA Y CCI-DULO Y ENTRE LOS GRUPOS CONTROL SHAM-LIA Y SHAM-DUL (P<0,05).

A continuación se expone la representación gráfica de los resultados (figura 57):

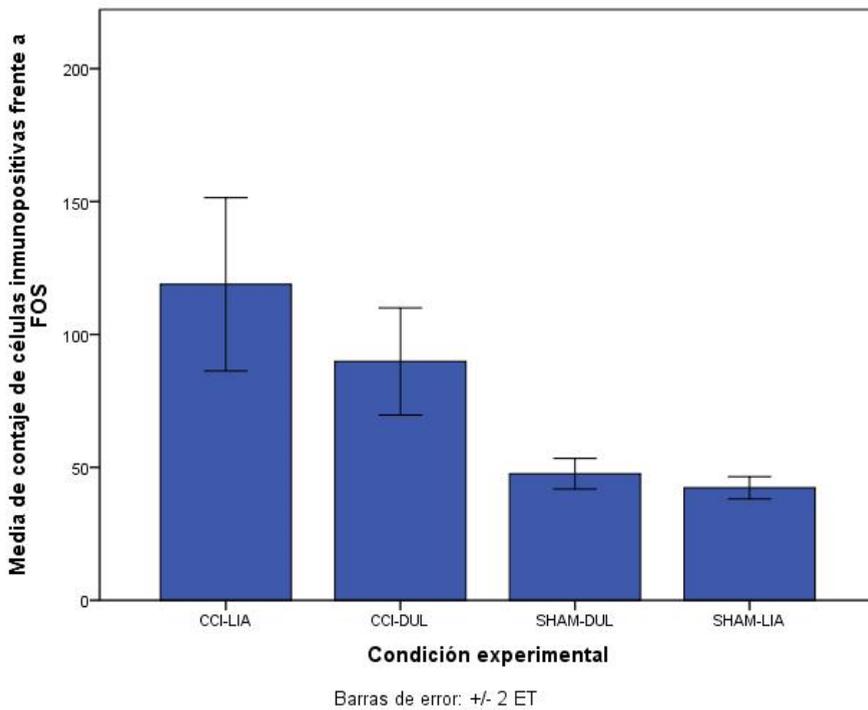


FIGURA 57: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS RESULTADOS DEL CONTAJE DE CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS FRENTE A FOS EN EL NÚCLEO DEL RAPE DORSAL DEL CEREBRO DE LA RATA.

4.2.2.c. Estudio estadístico del núcleo Locus Coeruleus (LC).

El análisis estadístico inferencial de las variables Locus coeruleus rostral y Locus coeruleus caudal se ha realizado mediante un análisis ANOVA de un factor, siendo el factor el grupo experimental.

De los resultados del ANOVA se deduce que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales, tanto para la variable LC rostral ($F=4,045$; $p<0,05$) y para la LC caudal ($F=37,221$; $p<0,05$) (Tabla 62).

ANOVA de un factor

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
LC rostral	Inter-grupos	296,141	3	98,714	4,045	,018
	Intra-grupos	610,065	25	24,403		
	Total	906,207	28			
LC caudal	Inter-grupos	1621,624	3	540,541	37,221	,000
	Intra-grupos	363,065	25	14,523		
	Total	1984,690	28			

TABLA 62: TABLA ANOVA DE UN FACTOR PARA LAS VARIABLES LC ROSTRAL Y LC CAUDAL; AMBAS MUESTRAN DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS GRUPOS.

El estudio pormenorizado de las comparaciones múltiples Bonferroni y Tukey (Tabla 63) confirmó las diferencias al comparar los grupos. Específicamente, existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CCI-DUL y SHAM-LIA a nivel de Locus Coeruleus rostral ($p<0,05$).

Por otra parte, a nivel de Locus coruleus caudal encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los grupo CCI-LIA frente a CCI-DUL y frente a los grupos control SHAM-LIA y SHAM-DUL ($p<0,05$). CCI-DUL también mostro diferencias estadísticamente significativas frente a CCI-LIA y frente a los grupos control ($p<0,05$). Los grupos control no muestran diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p>0,05$).

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	
LC rostral	HSD de Tukey	CCI-LIA	CCI-DUL	-4,857*	2,402	,207	-11,46	1,75
			SHAM-DUL	-,690	2,582	,993	-7,79	6,41
			SHAM-LIA	5,268	2,402	,153	-1,34	11,88
		CCI-DUL	CCI-LIA	4,857	2,402	,207	-1,75	11,46
			SHAM-DUL	4,167	2,507	,364	-2,73	11,06
			SHAM-LIA	10,125*	2,321	,001	3,74	16,51
		SHAM-DUL	CCI-LIA	,690	2,582	,993	-6,41	7,79
			CCI-DUL	-4,167	2,507	,364	-11,06	2,73
			SHAM-LIA	5,958	2,507	,108	-,94	12,85
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-5,268	2,402	,153	-11,88	1,34
			CCI-DUL	-10,125*	2,321	,001	-16,51	-3,74
			SHAM-DUL	-5,958	2,507	,108	-12,85	,94
	Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DUL	-4,857	2,402	,324	-11,74	2,02
			SHAM-DUL	-,690	2,582	1,000	-8,09	6,71
			SHAM-LIA	5,268	2,402	,227	-1,61	12,15
		CCI-DUL	CCI-LIA	4,857	2,402	,324	-2,02	11,74
			SHAM-DUL	4,167	2,507	,654	-3,01	11,35
			SHAM-LIA	10,125*	2,321	,001	3,48	16,77
		SHAM-DUL	CCI-LIA	,690	2,582	1,000	-6,71	8,09
			CCI-DUL	-4,167	2,507	,654	-11,35	3,01
			SHAM-LIA	5,958	2,507	,153	-1,22	13,14
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-5,268	2,402	,227	-12,15	1,61
			CCI-DUL	-10,125*	2,321	,001	-16,77	-3,48
			SHAM-DUL	-5,958	2,507	,153	-13,14	1,22
LC caudal	HSD de Tukey	CCI-LIA	CCI-DUL	15,143*	1,972	,000	9,72	20,57
			SHAM-DUL	18,476*	2,120	,000	12,64	24,31
			SHAM-LIA	18,268*	1,972	,000	12,84	23,69
		CCI-DUL	CCI-LIA	-15,143*	1,972	,000	-20,57	-9,72
			SHAM-DUL	3,333	2,058	,386	-2,33	8,99
			SHAM-LIA	3,125	1,905	,375	-2,12	8,37
		SHAM-DUL	CCI-LIA	-18,476*	2,120	,000	-24,31	-12,64
			CCI-DUL	-3,333	2,058	,386	-8,99	2,33
			SHAM-LIA	-,208	2,058	1,000	-5,87	5,45
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-18,268*	1,972	,000	-23,69	-12,84
			CCI-DUL	-3,125	1,905	,375	-8,37	2,12
			SHAM-DUL	,208	2,058	1,000	-5,45	5,87
	Bonferroni	CCI-LIA	CCI-DUL	15,143*	1,972	,000	9,49	20,79
			SHAM-DUL	18,476*	2,120	,000	12,40	24,55
			SHAM-LIA	18,268*	1,972	,000	12,62	23,92
		CCI-DUL	CCI-LIA	-15,143*	1,972	,000	-20,79	-9,49
			SHAM-DUL	3,333	2,058	,707	-2,56	9,23
			SHAM-LIA	3,125	1,905	,681	-2,33	8,58
		SHAM-DUL	CCI-LIA	-18,476*	2,120	,000	-24,55	-12,40
			CCI-DUL	-3,333	2,058	,707	-9,23	2,56
			SHAM-LIA	-,208	2,058	1,000	-6,10	5,69
		SHAM-LIA	CCI-LIA	-18,268*	1,972	,000	-23,92	-12,62
			CCI-DUL	-3,125	1,905	,681	-8,58	2,33
			SHAM-DUL	,208	2,058	1,000	-5,69	6,10

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

TABLA 63: ESTUDIO PORMENORIZADO DE COMPARACIONES MÚLTIPLES SEGÚN TUKEY Y BONFERRONI PARA LAS VARIABLES LC ROSTRAL Y LC CAUDAL.

La representación gráfica de los resultados puede observarse en la siguiente gráfica (figura 58):

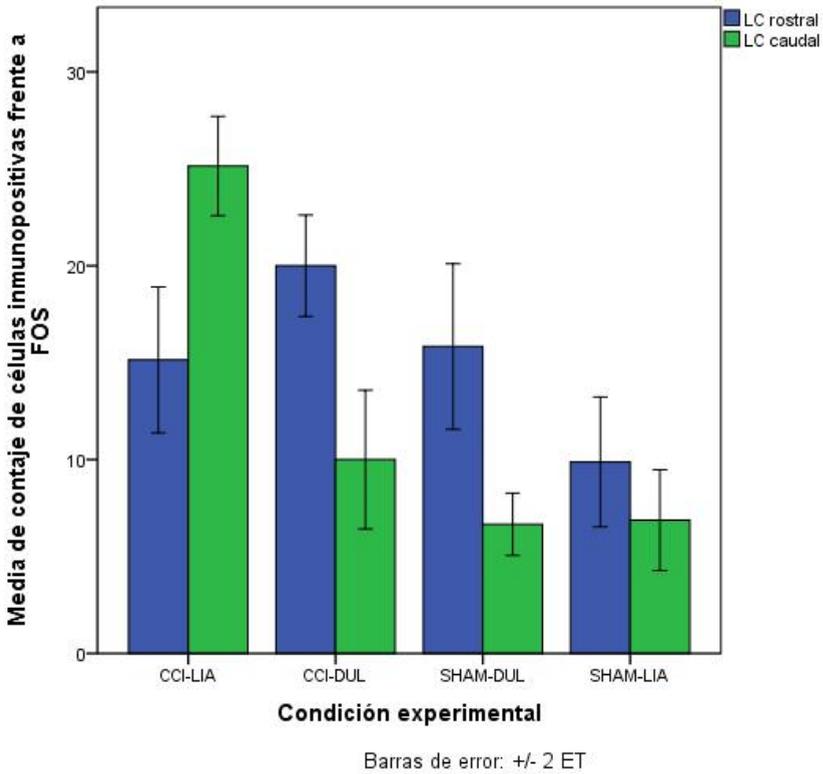


FIGURA 58: REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LAS MEDIAS DE CONTAJE DE CÉLULAS INMUNOPOSITIVAS A FOS.

5. DISCUSIÓN

En nuestro estudio se ha recreado una situación neurálgica siguiendo el modelo de dolor neuropático en rata Chronic Constriction Injury (CCI) propuesto por Bennet y Xie en 1988, usando como grupos control los grupos Sham Operated (SHAM-LIA, SHAM-DULOX). En ambos supuestos se ha tratado a los sujetos o bien con duloxetina o bien con el vehículo empleado para disolver la duloxetina, el líquido intestinal artificial (LIA).

De esta forma se han obtenido los grupos CCI-LIA, CCI-DULOX, SHAM-LIA y SHAM-DULOX. En todos ellos hemos medido la alodinia táctil y la hiperalgesia mecánica mediante la aplicación de los tests conductuales Electrovonfrey (EVF) y Randall y Selitto (RyS), respectivamente, para evaluar el efecto analgésico de la duloxetina. Asimismo, se ha realizado un estudio inmunohistoquímico (con animales organizados en los mismos 4 grupos empleados en el estudio conductual) para analizar el papel de los principales centros troncoencefálicos serotoninérgico (el núcleo dorsal del rafe, DR) y noradrenérgico (el locus coeruleus, LC) en el efecto analgésico de la duloxetina, y su repercusión a nivel del asta posterior medular.

Nuestra hipótesis de trabajo mantiene que las ratas con lesión nerviosa producida por el modelo CCI a las que se introduzca un tratamiento con duloxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina, presentarán analgesia respecto a las ratas tratadas con vehículo; del mismo modo, los controles SHAM se mantendrán en niveles basales. Por otro lado, esperamos que los principales núcleos noradrenérgico y serotoninérgico troncoencefálicos (DR y LC) tengan un papel relevante en el efecto de la duloxetina sobre el dolor neuropático, que se refleje en cambios en la actividad neuronal en dichos núcleos y en las láminas nociceptivas (láminas I, II y V) de la médula espinal.

5.1.- Respecto del Estudio Conductual.

Los resultados obtenidos en el test conductual de Randall y Selitto (RyS) son los esperados:

- Por un lado, el modelo de dolor neuropático utilizado en nuestro estudio (la constricción crónica del ciático o CCI) produce tanto hiperalgesia mecánica como alodinia. En efecto, nuestros resultados revelan diferencias estadísticamente significativas entre la media de las 2 medidas de línea base y las 2 medidas tomadas en la fase de establecimiento del modelo de dolor (a las 48 y 72 horas de la intervención de CCI y previas al inicio del tratamiento farmacológico/administración del vehículo), es decir, entre los grupos experimentales CCI (CCI-LIA y CCI-DULOX) y los grupos control SHAM (SHAM-LIA y SHAM-DULOX). Nuestros resultados muestran que tras la implantación del modelo de constricción crónica del ciático existe hiperalgesia mecánica en las condiciones experimentales, mientras que los sujetos sometidos sólo a la operación pero sin constricción del ciático (SHAM) no muestran este síntoma.

- Por otra parte, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el grupo CCI-LIA y el grupo CCI-DULOX en las medidas del efecto agudo del fármaco respecto a las medidas de la fase de establecimiento del modelo de dolor (Dolor sin fármaco 1 y 2). A pesar de ello, se observa una tendencia del grupo CCI-DULOX a aproximarse a los valores obtenidos en los grupos SHAM en las medidas de efecto agudo.

- En cuanto al tratamiento crónico, existen diferencias estadísticamente significativas entre CCI-LIA y CCI-DULOX, tanto a las 48 como a las 72 horas posteriores al inicio del tratamiento con duloxetina/vehículo, respecto a las 2 medidas obtenidas en esos mismos grupos en la fase de establecimiento del modelo de dolor (a las 48 y 72 horas de la intervención de CCI y previas al inicio del tratamiento farmacológico/administración del vehículo). Se observa un aumento de los umbrales de dolor en el grupo CCI-DULOX tras el tratamiento crónico (tanto a las 48 como a las 72 horas posteriores al inicio del tratamiento con duloxetina), pero sin

llegar a alcanzar los valores de la línea base ni los de los grupos control (SHAM-LIA, SHAM-DULOX).

- Los grupos SHAM no muestran diferencias significativas ni tras la administración aguda (Efecto agudo) ni tras la administración crónica (Efecto crónico 1 y 2) de duloxetina / vehículo respecto a las medidas obtenidas en la fase de establecimiento del modelo de dolor.

En cuanto a los resultados obtenidos en el test conductual Electrovonfrey (EVF), al igual que con RyS, también han sido los esperados:

- Se han obtenido diferencias estadísticamente significativas entre la línea base y las 2 medidas tomadas en la fase de establecimiento del modelo de dolor entre los grupos experimentales CCI-LIA y CCI-DULOX y los grupos control SHAM-LIA y SHAM-DULOX; es decir, tras la implantación del modelo de constricción crónica del nervio ciático existe alodinia táctil en las condiciones experimentales CCI-LIA y CCI-DULOX, mientras que los sujetos sometidos a la operación sin lesión nerviosa (SHAM-LIA y SHAM-DULOX) no muestran alodinia táctil. En la fase de establecimiento del modelo de dolor, no existen diferencias estadísticamente significativas ni entre los dos grupos CCI entre ellos ni entre los dos grupos SHAM entre ellos, lo que muestra una correcta implantación del modelo y la consecución de una cialgia experimental. Asimismo, se comprueba que la intervención sin lesión del nervio ciático no provoca variaciones relevantes en los umbrales de dolor.

- A diferencia de lo observado en el test Randall y Selitto, hay diferencias estadísticamente significativas en términos generales cuando comparamos el dolor sin fármaco (1 y 2) y el tratamiento agudo del fármaco entre los grupos CCI-LIA y CCI-DULOX, y no existen diferencias estadísticamente significativas entre la condición CCI-DULOX y los controles SHAM.

- En cuanto al dolor crónico forma específica encontramos diferencias muy evidentes entre el grupo CCI-DULOX y el resto de grupos; es decir, la duloxetina mantiene un efecto crónico eficaz, que no se observa en el grupo experimental tratado con vehículo.

En resumen, nuestros resultados conductuales confirman:

- En primer lugar: el éxito del Chronic Constriction Injury como modelo de dolor neuropático, así como el excelente grupo control que representa los SHAM operated, en el que se expone el nervio ciático común pero sin lesionarlo.

- En segundo lugar, la mejora de la hiperalgesia mecánica tras el tratamiento agudo con duloxetina, pero sin llegar a mostrar resultados estadísticamente significativos, y la mejora estadísticamente significativa de la alodinia mecánica en esta dosis aguda del tratamiento farmacológico; así como la mejora significativa tanto de la alodinia como de la hiperalgesia mecánica tras el tratamiento crónico con 30 mg/kg de duloxetina a dosis repetida durante tres días.

Estos resultados son congruentes con los recientes de M'Dahoma et al. (M'Dahoma, 2015). Este grupo de estudio realizó la implantación del modelo de dolor neuropático de acuerdo con el procedimiento de Bennett y Xie (1988), es decir, practicando 4 ligaduras suaves en el ciático derecho de la rata. A los animales se les permitió recuperarse durante una semana en su jaula. Los tratamientos farmacológicos comenzaron inmediatamente después, y se determinaron los umbrales a intervalos de tiempo regulares (30 o 60 min) después de la administración del fármaco.

El estudio del grupo de M'Dahoma realizó el test conductual de Randall y Selitto (1957), midiendo los umbrales nociceptivos utilizando un algésímetro Ugo Basile (Bioseb, 92370 Chaville, Francia). Los umbrales de presión fueron medidos según una retirada de la pata inicial y una vocalización secundaria (Kayser, 2010) el día antes de la lesión del nervio y más tarde en el día 15 después de la cirugía para las ratas a las que se les impuso el modelo CCI. Sólo los animales que presentaron una hipersensibilidad mecánica evidente (con una reducción de los umbrales nociceptivos de al menos un 30% en comparación con el grupo control), aproximadamente el 60% de las ratas CCI, se utilizaron para los estudios farmacológicos. M'Dahoma et al. (2015) no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales de este grupo que fueron tratados con duloxetina (con una

única dosis aguda de 10mg/kg) y los que no, concluyendo que, de forma general, los antidepresivos tienen que ser administrados de forma crónica para que alcancen efectos antihiperalgésicos significativos.

En nuestro estudio, a pesar de utilizar 30mg/kg de duloxetina (una dosis más alta que la empleada en el reciente estudio de M'Dahoma et al. (M'Dahoma, 2015) el tratamiento agudo con este fármaco tampoco muestra diferencias estadísticamente significativas frente al grupo no tratado con duloxetina en el test conductual de RyS. Sin embargo, cuando en nuestro estudio el tratamiento con duloxetina se prolongó durante 3 días consecutivos (tratamiento crónico), sí pudimos constatar una notable mejoría, con valores en el RyS tendentes a los obtenidos en condiciones control (SHAM).

En cuanto al test EVF, M'Dahoma et al. (M'Dahoma, 2015) determinaron la sensibilidad mecánica con una serie graduada de ocho filamentos de von Frey (4, 6, 8, 10, 12, 15, 26 y 60 g) aplicados a la superficie plantar de la pata trasera ipsilateral a la cirugía CCI. La medición la realizaron mediante el procedimiento de up-down de Chaplan et al. (1994). La fuerza del filamento más grueso (60 g) fue asignada arbitrariamente como el valor "cut-off" (Latrémoière et al., 2008). De esta forma, M'Dahoma et al. (2015) obtuvieron en el test EVF los mismos resultados que en el test RyS, es decir, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los animales control y los tratados con una única dosis aguda de duloxetina.

Los resultados de M'Dahoma et al. (M'Dahoma, 2015), en este caso en el test EVF, no coinciden con los de nuestro estudio, algo que puede deberse a un efecto dosis-dependiente del fármaco, puesto que nosotros utilizamos una dosis mayor.

Estos mismos resultados tras una única dosis aguda duloxetina fueron obtenidos en otro reciente estudio mediante pruebas conductuales (LeCudennec, 2014). En este caso, sin embargo, los autores llevaron a cabo un estudio dosis dependiente (10 mg/kg, 30 mg/kg y 50 mg/kg), que mostró, una tendencia dosis-dependiente a mejorar tanto la alodinia táctil

como la hiperalgesia térmica inducidas tras aplicar a los animales el modelo de dolor neuropático CCI.

Tras la cirugía, a las ratas se les permitió recuperarse durante una semana antes de empezar con los tests conductuales. Tras la recuperación, las ratas fueron sometidas a un pre-test utilizando una estimulación táctil de ambas patas traseras para verificar la presencia de dolor neuropático y solamente las ratas que respondieron con una retirada de la pata lesionada a una fuerza entre 0 y 25% se incluyeron en los experimentos.

En este estudio de 2014 las respuestas nociceptivas de la pata trasera lesionada se midieron antes de cualquier tratamiento (línea de base para permitir comparaciones intra-sujetos), y luego a los 90 y 180 minutos después de la administración de las sustancias farmacológicas a estudiar.

Este grupo de estudio evaluó la alodinia táctil mediante la prueba Electrovonfrey (Bioseb, EVF2) (Moller KA, 1998). Cada animal fue colocado bajo una caja invertida de acrílico plástico (18 × 11,5 × 14 cm) en un suelo de rejilla. A continuación, se aplicó un incremento de fuerza utilizando la punta de una sonda electrónica de von Frey, accediendo por debajo de la rejilla a la pata trasera no lesionada y luego a la lesionada. Se registró como resultado la fuerza necesaria para causar una retirada de la pata. Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces y se calculó la fuerza media por pata.

En el estudio del grupo de LeCudennec (LeCudennec, 2014) evaluaron la hiperalgesia mecánica mediante la prueba pinchmeter (Luis-Delgado OE, 2006). El dispositivo utilizado (Bioseb, BIO-SWB) consiste en un par de fórceps romos grandes (15 cm de largo; zona de contacto plana: 7 mm × 1,5 mm con bordes lisos) equipado con 2 medidores de tensión conectados a un dinamómetro electrónico modificado. Las puntas de las pinzas se colocan alrededor de la pata trasera de los animales y la fuerza aplicada se incrementa hasta que aparece una respuesta de retirada de la pata. La fuerza máxima aplicada en la pata lesionada se registró automáticamente. Con el fin de prevenir el daño tisular, la fuerza aplicada se

limitó a un máximo de 1 kg. Este procedimiento se llevó a cabo 3 veces y se calculó la fuerza media por pata.

Los fármacos se administraron oralmente en un volumen de 10 ml/kg de peso corporal, pero también se seleccionaron rangos de dosis tomados de la literatura experimental: 10, 30 y 50 mg/kg para la duloxetina (Joshi SK, 2006 y Munro G, 2009). La duloxetina no disminuyó la actividad motora de los animales a la dosis más alta evaluada.

En cuanto a los resultados de EVF de este estudio de 2014, el análisis de delta 90 min y delta 180 min utilizando ANOVA reveló la ausencia de un efecto significativo sobre la alodinia táctil para una dosis aguda de duloxetina entre 10 y 30 mg/kg. A los 50 mg/kg, la duloxetina aumentó delta a 90 y 180 minutos, aunque este efecto no alcanzó significación estadística debido a la gran variabilidad interindividual, pero evidenció un posible efecto dosis dependiente. Las diferencias frente a nuestros resultados pueden deberse a las diferencias en los días de recuperación entre los estudios, pero es congruente pensar en un efecto dosis dependiente si comparamos los resultados de M'Dahoma et al (M'Dahoma, 2015) con los nuestros.

Por otra parte, los resultados del test Pinchmeter (test semejante al test Randall y Selitto) evidencian que la duloxetina aumentó delta de forma dosis-dependiente, siendo este efecto significativo a los 30 y 50 mg/kg po en 90 min ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente) y en la dosis más alta a 180 min ($P < 0,01$).

En un estudio anterior a éste, utilizando el modelo de CCI, la duloxetina (dosis variables de 3 a 30 mg /kg) inyectada de forma intraperitoneal no afectó a la alodinia mecánica y no tuvo efectos significativos sobre la hiperalgesia mecánica ni sobre la hiperalgesia térmica (Bomholt SF, 2005); Estos resultados son congruentes con nuestros resultados en el test RyS de hiperalgesia mecánica pero con los de EVF de alodinia mecánica, en este caso puede ser debido a la vía de administración y de nuevo a un efecto dosis dependiente.

Por otra parte, nuestros resultados coinciden con la investigación de Miyazaki (Miyazaki R, 2012) en la que se expone que el tratamiento del dolor neuropático con morfina, pregabalina, gabapentina o duloxetina atenúa el nivel de alodinia mecánica de una forma dosis-dependiente, y que el tratamiento con un par de estos fármacos combinados (como duloxetina y morfina) producen un efecto sinérgico para la alodinia mecánica.

Sin embargo, otros estudios previos han obtenido resultados completamente opuestos, como que la dosis única de 3 a 30 mg/kg de duloxetina en un modelo CCI no afecta a la alodinia mecánica pero sí tiene efectos estadísticamente significativos en hiperalgesia mecánica y térmica (Bomholt SF, 2005); y otros estudios corroboran esos resultados con esa misma dosis continuada (5 días) (Wattiez AS, 2011; Grégoire S, 2012).

La existencia de la necesidad de unir la investigación básica y la clínica ha dado lugar a la medicina traslacional, que ha abierto camino a que los nuevos conocimientos biológicos se traduzcan en el incremento de nuevos tratamientos gracias su fundamentación en la investigación traslacional; por ello, se mencionarán un par de estudios muy interesantes en dolor neuropático y duloxetina en humanos.

Estudios realizados con duloxetina en dolor neuropático de origen diabético en humanos, en los cuales utilizan dosis de 60 y 120 mg/día de duloxetina, obtuvieron una mejoría significativa comparado el tratamiento con placebo en la escala "24-h Average Pain Store", comenzando esta mejoría una semana después de iniciar el tratamiento y continuando hasta la semana 12 del mismo (Pérez-Cajaraville J, 2006).

De la misma forma, una reciente revisión de la utilidad clínica de la duloxetina en el tratamiento de dolor neuropático periférico diabético en humanos (King JB, 2015) expone que en los ensayos clínicos, la duloxetina fue, por lo general, bien tolerada a la vez que eficaz para reducir las puntuaciones de dolor cuando la dosis diaria fue igual o mayor a 60 mg. Otro de los estudios más recientes (Ogawa K, 2015) correlaciona la respuesta al dolor y las mejoras en la calidad de vida en los pacientes con dolor neuropático periférico diabético tratados con duloxetina. En él, los pacientes tratados con duloxetina mostraron una mejoría

del dolor en general, y esta mejora en las puntuaciones de dolor se correlacionó positivamente con una mejoría en la calidad de vida; todo ello informado por los pacientes tratados con duloxetina.

5.2.- Respecto del Estudio Inmunohistoquímico.

5.2.1.- En el Asta Posterior de la Médula.

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 et al. (Hunt SP, 1987) comprobaron que podía ser inducida su expresión a este nivel tras la aplicación de un estímulo doloroso. Resultados similares fueron obtenidos independientemente de que el estímulo doloroso aplicado fuera nociceptivo somático superficial (Presley RW, 1990), nociceptivo somático profundo (Menétrey D, 1989), nociceptivo visceral (Hammond DL, 1992) o neuropático. En efecto, ha sido descrito que la constricción crónica del nervio ciático provoca un incremento ipsilateral de la expresión de la proteína Fos (Yamazaki et al., 2001).

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

Diversos trabajos sostienen que el estudio inmunocitoquímico de la proteína Fos es un método eficaz para detectar actividad neuronal inducida por un estímulo doloroso en el asta posterior de la médula espinal (Harris JA, 1998). 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 en el asta posterior de la médula inducida por el estímulo nociceptivo. Aunque el analgésico más estudiado ha sido la morfina, también se ha investigado el efecto que sobre la expresión

de Fos inducida por dolor tenían otros analgésicos como el peroxicam, el diclofenaco, el metamizol o el tramadol (Presley RW, 1990; Taylor J, 1998).

También en este caso, nuestros resultados coincidieron con los de estos estudios previos, de manera que la administración de duloxetina consiguió atenuar la expresión de Fos inducida por el estímulo doloroso. Este efecto de la duloxetina inhibiendo la expresión de Fos en el asta posterior de la médula inducida por el dolor neuropático era esperable, ya que la duloxetina está indicada en el tratamiento de patologías que cursan con esta modalidad de dolor, y además es congruente con los resultados obtenidos en los test conductuales.

Estudios inmunohistoquímicos recientes, que utilizan técnicas diferentes o combinadas a las nuestras, apoyan estos resultados.

En primer lugar, en el trabajo de Peirs et al. (Peirs C, 2015), se han identificado neuronas VGLUT3+ve y su conectividad polisináptica a neuronas CR+ve como determinantes clave de la alodinia mecánica, siendo originarias de la lámina II y lámina III, respectivamente, y que se unen para producir la alodinia; por lo que sería interesante estudiar la lámina III en futuros estudios; de la misma forma, también reportan que la activación de calretinina en las neuronas de la lámina II de ratones adultos induce específicamente la alodinia mecánica. En este estudio realizan un análisis posterior de c-Fos, que revela el circuito se extiende dorsalmente a las neuronas de proyección nociceptivas de la lámina I, incluyendo a las neuronas de calretinina de la lámina II, que nos muestran también la transmisión entre láminas de la alodinia mecánica.

Por último, el uso de modelos de dolor inflamatorio y neuropático, muestra que varios microcircuitos en el asta dorsal codifican estas formas de dolor. Esto es congruente con nuestros resultados ya que las láminas que más activación inmunopositivas de C-Fos han mostrado son las láminas I y II.

En otro interesante estudio reciente (Terayama R., 2015), se usó una doble inmunohistoquímica con fluorescencia para c-Fos y señal extracelular quinasa regulada fosforilada (p-ERK) para detectar la entrada sináptica convergente de diferentes ramas del

nervio ciático tras una lesión en el nervio tibial. La expresión de c-Fos y la fosforilación de ERK fueron inducidas por termoestimulación nociva de la pata trasera, y también por la estimulación eléctrica del nervio tibial lesionado. Los resultados de este estudio indican que los inputs primarios convergentes a través de los nervios intactos vecinos pueden contribuir a la hiperinducibilidad de c-Fos en el asta dorsal de la médula.

5.2.2.- En el Núcleo Dorsal del Rafe.

El Núcleo Dorsal del Rafe (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 (Wang QP, 1994). Se ha observado que la estimulación eléctrica del DR produce una potente analgesia (Stamford JA, 1995). También la administración sistémica o la microinyección en el DR de morfina provocaron la aparición de comportamientos antinociceptivos (Wang QP, 1994; Stamford JA, 1995).

Tras revisar la bibliografía no hemos encontrado estudios previos en los que se analice la expresión de Fos en el DR tras la aplicación de dolor neuropático. En nuestro estudio, los datos obtenidos en el grupo al que se aplicó un estímulo doloroso neuropático mostraron una moderada inmunorreactividad frente a Fos. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron una mayor inmunorreacción frente a Fos en el DR cuando el estímulo doloroso aplicado era nociceptivo somático superficial. 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 et al. (Porro CA, 1991) 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 et al. (Lantéri-Minet, 1993) no apreciaron expresión de Fos en el DR tras estímulo nociceptivo visceral.

Por otro lado, y a pesar de los antecedentes que implican al DR en el control del dolor, tampoco hemos encontrado en la literatura estudios previos en los que se analice la expresión de Fos en el DR tras la administración de analgésicos. Nuestro estudio mostró una tendencia al bloqueo por parte de la duloxetina del Fos inducido por el estímulo doloroso neuropático, aunque sin llegar a ofrecer diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados contrastarían con otros previos procedentes de un experimento similar de nuestro laboratorio en el que se comprobó que el metamizol era capaz de inducir Fos en el DR.

Estudios electrofisiológicos recientes, como el estudio de Sagheddu et al. (Sagheddu, 2015), confirma que la neuropatía periférica induce cambios a largo plazo en las neuronas serotoninérgicas (Rafe Dorsal) y en los sistemas dopaminérgicos que podrían representar el efecto de la mala adaptación al dolor crónico de larga duración. En este estudio, impusieron el modelo de dolor desarrollado por Decosterd et al. (Decosterd I, 2000), en la cual la pata trasera del nervio ciático izquierdo es expuesta a nivel de trifurcación en los nervios sural, tibial y peroneo común. Los nervios tibial y peroneo común se ligan, dejando el nervio sural intacto. Los resultados obtenidos en este estudio, evidencian un cambio en el sistema serotoninérgico, medido en el rafe dorsal, tras la aplicación de un modelo de dolor neuropático cronificado. Esto es congruente con nuestros resultados ya que existe una exacerbación en la activación de Fos en la condición CCI-LIA, que es atenuada en la condición experimental CCI-DULOX, mientras que existen niveles semejantes en las condiciones control SHAM-LIA y SHAM-DULOX.

Otro estudio, referente a analgesia en el núcleo Dorsal del Rafe (Freitas RL, 2009) con Metiotepina (un antagonista serotoninérgico) concluyen que este fármaco, administrado de forma periférica, actúa en autorreceptores serotoninérgicos pre-sinápticos 5-HT_{1A}, facilitando la antinocicepción post-ictal y actuando en los receptores serotoninérgicos post-sinápticos 5-HT_{1A} / 1B; es decir, las neuronas de DR ejercen un papel importante en la organización de la antinocicepción post-ictal.

De esta manera, los resultados de nuestro estudio sugieren que el DR participaría tanto en el circuito del dolor neuropático como en el de control de dicho estímulo algésico, pero sería necesario aumentar el tamaño muestral para conseguir unos resultados estadísticamente significativos, así como incluir estudios electrofisiológicos o pruebas de microdiálisis para aportar diferentes puntos de vista que potencien los resultados.

5.2.3.- En el 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 (Van Bockstaele EJ, 1995).

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 (Stamford JA, 1995). Es considerado como el más importante centro noradrenérgico en el control descendente del dolor. De hecho, el LC ya había sido señalado como lugar de acción del efecto en la inhibición del dolor neuropático de la gabapentina (Hayashida K, 2008; Tanabe M, 2008). Asimismo, revisando la bibliografía hemos encontrado trabajos previos en los que se ha podido comprobar que diversos estímulos nociceptivos son capaces de activar las neuronas del LC (Clement CL., 1996).

Nuestros resultados, sin embargo, no han ofrecido evidencias estadísticamente significativas de la participación del LC ni en la transmisión dolorosa neuropática ni en su control. En nuestro estudio, la porción rostral del LC muestra una tendencia al aumento de inmunorreactividad frente a la proteína Fos de las condiciones tratadas con duloxetine. Por otra parte, la porción caudal del LC muestra un aumento significativo de la inmunorreactividad frente a la proteína Fos en la condición experimental tratada con

vehículo CCI-LIA, así como la no existencia de diferencias estadísticamente significativas de la condición experimental CCI-DULOX con las condiciones control SHAM. Esto podría deberse a una modificación del patrón de activación de los núcleos paralocus rostrales, a una activación segmentaria del LC frente a dolor neuropático y analgesia, o a una disfunción del LC frente al dolor neuropático.

En estudios recientes, como en el de Condés-Lara et al. (Condés-Lara M, 2015), relacionan la actividad del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) con alteraciones en el patrón de activación de LC, entre otros. En este estudio, exponen que el papel del núcleo (PVN) en la analgesia endógena ha sido sugerido en la última década (DeLaTorre S, 2009) (Yang J, 2009). Además, se ha sugerido que una interacción entre el PVN y LC (Rojas-Piloni G, 2012) podría tener un efecto antinociceptivo aditivo, ya que la estimulación eléctrica PVN aumenta la existencia de células inmunopositivas frente a c-Fos inmunoreactividad en LC (entre otros, como PAG o MRN). A falta de conocer el nivel del análisis, esto sería congruente con nuestros resultados en LC rostral, el cual mostraba una mayor reactividad frente a Fos de las condiciones tratadas con duloxetina.

El estudio de Kimura et al., (Kimura M, 2015) obtuvo resultados congruentes con los nuestros, empleando el modelo de dolor neuropático SNL (ligadura segmentaria del nervio espinal): Este modelo de dolor neuropático aumentó la concentración basal de glutamato extracelular en el LC y la liberación de noradrenalina en la médula espinal, lo que fue asociado a un aumento de la actividad neuronal tónica de LC y una baja regulación de GLT-1 en el mismo. Estos resultados sugieren que el aumento de glutamato extracelular en LC y la baja regulación de GLT-1 contribuyen a la disfunción de LC y al deterioro de la analgesia endógena del dolor evocado después de una lesión nerviosa. Es decir, estos resultados apoyarían la falta de significatividad en los resultados de la inmunohistoquímica de c-Fos en el LC por la disfunción y deterioro de la analgesia endógena por parte del núcleo a estudiar.

Sin embargo, Pertovaara et al. (Pertovaara A, 2006) menciona dos artículos que exponen resultados contradictorios entre sí, pero que sugieren que los mecanismos noradrenérgicos no tienen un papel importante en el desarrollo de los síntomas neuropáticos; por ello, en su

revisión concluye que la noradrenalina, actuando en receptores noradrenérgicos supraespinales, puede o bien facilitar o inhibir el dolor dependiendo de la zona supraespinal de su liberación, del tipo de receptor adrenérgico activado y de la intensidad y duración del estímulo doloroso (heterorreceptores); o bien no tienen ningún efecto sobre la inhibición del dolor o el dolor en sí (antinocicepción). Por tanto, el sistema de regulación del dolor noradrenérgico interactúa con otros sistemas de neurotransmisores reguladores del dolor en los distintos niveles del neuroeje. Aun así, es un hecho que los mecanismos noradrenérgicos están involucrados en acciones analgésicas de algunos anestésicos. Este planteamiento es muy interesante, ya que de él surgen ideas experimentales tales como analizar con inmunohistoquímicas mediante fos y trazadores diferentes estímulos dolorosos en el Locus Coeruleus y su interacción con diferentes núcleos.

Por todo ello, sería interesante y necesario aumentar el tamaño muestral de nuestro estudio, así como realizar pruebas paralelas a la expresión de Fos, como estudio inmunohistoquímico con trazadores, electrofisiología y microdiálisis.

Resumiendo, nuestros resultados confirman una mejora de los especímenes lesionados y tratados de forma crónica con duloxetina frente a los lesionados y tratados con vehículo; aproximándose, tanto en las pruebas conductuales como en el estudio de expresión de la proteína Fos, a las condiciones control; apoyando la hipótesis propuesta en este estudio.

Por otra parte, queda una parcela abierta en relación al mecanismo subyacente en los centros supramedulares del control del dolor, ya que, aunque hemos observado un cambio en la activación del patrón de activación de estos centros, faltarían refuerzos experimentales para saber de qué forma están alterados, qué tipo neuronas y conexiones están presentes en esta modulación, qué núcleos no monoaminérgicos están actuando, etc.

Una limitación de este estudio puede ser la inmunohistoquímica. El c-fos presenta un patrón de activación de los centros, pero no aclara qué tipo de neuronas están interviniendo en la

acción, o qué núcleos supramedulares están siendo afectados tanto por el dolor como por el efecto analgésico del fármaco. Por ello, para futuras investigaciones se plantea tanto un estudio con trazadores anterógrados como retrógrados, para crear una red robusta de conexiones ante el mecanismo de procesamiento del dolor neuropático; inmunohistoquímicas dobles para neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas, GABA, etc... para identificar qué neuronas están actuando en cada momento. Interesante también es el uso de microdiálisis para saber en qué medida se está liberando neurotransmisores, y en qué puntos además de electrofisiología in vivo como una forma de registrar cambios en los centros supramedulares tanto in situ como in vivo en una neurona o población de neuronas ante una estimulación eléctrica directa en el nervio o en la médula espinal.

Todas estas técnicas forman parte de la vanguardia de la investigación, y está planteado utilizarlas en futuros estudios. El dolor forma parte de una parcela de la investigación aún algo desconocida, pero los pacientes con dolor van en aumento y son cada vez mayores las herramientas utilizadas para su control. Las nuevas terapias dirigidas a la combinación de conocimientos experimentales (biológicos, médicos, farmacológicos, psicológicos y fisioterápicos) deben ser desarrolladas, como parte del avance de la medicina traslacional y de la medicina en general.

6- CONCLUSIONES

1.- La duloxetina ha mostrado ser eficaz en el tratamiento de los principales síntomas del dolor neuropático, la alodinia y la hiperalgesia mecánica, tanto tras una única dosis de 30 mg/kg, v.o. (tratamiento agudo), como, especialmente, tras repetir dicho tratamiento durante 3 días consecutivos (tratamiento crónico).

2.- La administración de duloxetina disminuye la expresión de c-fos inducida en el asta posterior de la médula espinal tras la aplicación del modelo de dolor neuropático Chronic Constriction Injury (CCI), lo que teniendo en cuenta que Fos es un marcador aceptado de actividad neuronal, implica que la duloxetina consigue disminuir la actividad de las neuronas nociceptivas medulares inducidas por el CCI.

3.- La administración de duloxetina provoca un incremento de actividad en neuronas del locus coeruleus (LC), aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo, lo que no permite extraer conclusiones sólidas sobre la naturaleza de la participación del LC en el mecanismo de acción de la duloxetina.

4.- La administración de duloxetina provoca una tendencia al bloqueo del Fos inducido por el estímulo doloroso neuropático, aunque sin llegar a ofrecer diferencias estadísticamente significativas, lo que no permite extraer conclusiones sólidas sobre la naturaleza de la participación del DR en el mecanismo de acción de la duloxetina.

7- BIBLIOGRAFÍA

Alba-Delgado C, Mico JA, Sánchez-Blázquez P, Berrocoso E. Analgesic antidepressants promote the responsiveness of locus coeruleus neurons to noxious stimulation: implications for neuropathic pain. *Pain* 2012; 153: 1438-49.

Amandusson Å, Blomqvist A. Estrogenic influences in pain processing. *Front Neuroendocrinol.* 2013; 34: 329-49.

Arnold LM, Lu Y, Crofford LJ, Wohlreich M, Detke MJ, Iyengar S, Goldstein DJ. A double-blind, multicenter trial comparing duloxetine with placebo in the treatment of fibromyalgia patients with or without major depressive disorder. *Arthritis Rheum.* 2004; 50: 2974-84.

Ashbury FD, Madlensky L, Raich P, Thompson M, Whitney G, Hotz K, Kralj B, Edell WS. Antidepressant prescribing in community cancer care. *Support Care Cancer* 2003; 11: 278-85.

Bajic D, Von Bockstaele EJ, Proudfit HK. Ultrastructural analysis of rat ventrolateral periaqueductal gray projections to the A5 cell group. *Neuroscience* 2012; 224: 145-59.

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 175-98.

Bandler, R; Shipley, MT. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci.* 1994; 17: 379-89.

Basbaum, AI; Fields, HL. Endogenous pain control systems: Brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 1984; 7: 309-38.

Beitz, A.J. The midbrain periaqueductal gray in the rat. I. Nuclear volume, cell number, density, orientation, and regional subdivisions. *J. Comp. Neurol.* 1985; 237: 445-59.

Beitz, AJ. Periaqueductal gray. En: The rat nervous system. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Australia. 1995; pp 173-82.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988; 33:87–107.

Besson, JA; Chaouch, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.* 1987; 67: 67-186.

Bomholt SF, Mikkelsen JD, Blackburn-Munro G. Antinociceptive effects of the antidepressants amitriptyline, duloxetine, mirtazapine and citalopram in animal models of acute, persistent and neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2005; 48: 252-63.

Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain.* 2006; 10: 287- 333.

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: 568-84.

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.* 1987; 403: 172-76.

Clement CI, Keay KA, Oowler BK, Bandler R. Common patterns of increased and decreased fos expression in midbrain and pons evoked by noxious deep somatic and noxious visceral manipulations in the rat. *J Comp Neurol.* 1996; 366: 495-515.

Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates Publishers. Hillsdale, New Jersey. 1988. NJ. 567.

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; 491: 246-69.

Collins SD, Chessell IP. Emerging therapies for neuropathic pain. *Exp Opin Emerg Drugs*, 2005; 10: 95-108.

Condés-Lara M, Martínez-Lorenzana G, Rubio-Beltrán E, Rodríguez-Jiménez J, Rojas-Piloni G, González-Hernández A. Hypothalamic paraventricular nucleus stimulation enhances c-Fos expression in spinal and supraspinal structures related to pain modulation. *Neurosci Res.* 2015; 98: 59-63.

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.

Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell.* 1988; 55: 395-7.

Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 2000; 87: 149-58.

DeLaTorre S, Rojas-Piloni G, Martínez-Lorenzana G, Rodríguez-Jiménez J, Villanueva L, Condés-Lara M. Paraventricular oxytocinergic hypothalamic prevention or interruption of long-term potentiation in dorsal horn nociceptive neurons: electrophysiological and behavioral evidence. *Pain* 2009; 144: 320-8.

EFIC. Pain proposal improving the current and future management of chronic pain. A European Consensus Report. 2010. http://www.efic.org/userfiles/file/pain_proposal.pdf.

Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpää M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice AS, Rowbotham M, Sena

E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and metaanalysis. *The Lancet Neurology* 2015; 14: 162–73.

Freitas RL, Ferreira CM, Urbina MA, Mariño AU, Carvalho AD, Butera G, de Oliveira AM, Coimbra NC. 5-HT1A/1B, 5-HT6, and 5-HT7 serotonergic receptors recruitment in tonic-clonic seizure-induced antinociception: role of dorsal raphe nucleus. *Exp Neurol*. 2009; 217: 16-24.

Gao YJ, Ji RR. C-fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation ad tissue injury? *Open Pain J* 2009; 2: 11-7.

Gaurian C, Bernard JF. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp Physiol* 2002; 87: 251-8.

Gebhart GF, Sandkühler 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: 1446-59.

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: 375-93.

Goldstein DJ, Lu Y, Detke MJ, Lee TC, Iyengar S. Duloxetine vs placebo in patients with painful diabetic neuropathy. *Pain* 2005; 116: 109-18.

Grégoire S, Michaud V, Chapuy E, Eschalier A, Ardid D. Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats: effect of duloxetine and gabapentin. *Pain* 2012; 153: 1657-63.

Hammond DL, Presley R, Gogas KR, Basbaum AI. Morphine or U-50,488 suppresses Fos protein-like immunoreactivity in the spinal cord and nucleus tractus solitarii evoked by a noxious visceral stimulus in the rat. *J Comp Neurol*. 1992; 315: 244-53.

Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull*. 1998; 45: 1-8.

[Tesis Doctoral J Carlos Tornero](#)

Hayashida K, Eisenach JC. Multiplicative interactions to enhance gabapentin to treat neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 2008; 598: 21-6.

Herdegen T, Tölle TR, Bravo R, Zieglgänsberger W, Zimmermann M. Sequential expression of JUN B, JUN D and FOS B proteins in rat spinal neurons: cascade of transcriptional operations during nociception. *Neurosci Lett* 1991; 129: 221-4.

Hossaini M, Duraku LS, Kohli SK, Jongen JL, Holstege JC. Spinal distribution of c-Fos activated neurons expressing enkephalin in acute and chronic pain models. *Brain Res* 2014; 1543: 83-92.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981; 29: 577-80.

<http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576>

Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987; 328: 632-4.

Ivanov A, Aston-Jones G. Hypocretin/orexin depolarizes and decreases potassium conductance in locus coeruleus neurons. *Neuroreport* 2000; 11: 1755-8.

Jazmin L, Tien D, Janni G, Ohara PT. Is noradrenaline a significant factor in the analgesic effect of antidepressants? *Pain* 2003; 106:3–8.

Joshi SK, Hernandez G, Mikusa JP, Zhu CZ, Zhong C, Salyers A, Wismer CT, Chandran P, Decker MW, Honore P. Comparison of antinociceptive actions of standard analgesics in attenuating capsaicin and nerve-injury-induced mechanical hypersensitivity. *Neuroscience* 2006; 143: 587-96.

Kayser V, Viguiier F, Ioannidi M, Bernard JF, Latrémolière A, Michot B, Vela JM, Buschmann H, Hamon M, Bourgoin S. Differential anti-neuropathic pain effects of tetrodotoxin in sciatic

nerve- versus infraorbital nerve- ligated rats – Behavioral, pharmacological and immunohistochemical investigations. *Neuropharmacology* 2010; 58: 474–87.

Keay KA, Clement CI, Owler B, Depaulis A, Bandler R. Convergence of deep somatic and visceral nociceptive information onto a discrete ventrolateral midbrain periaqueductal gray region. *Neuroscience* 1994; 61: 727-32.

Kimura M, Suto T, Morado-Urbina CE, Peters CM, Eisenach JC, Hayashida K. Impaired pain-evoked analgesia after nerve injury in rats reflects altered glutamate regulation in the Locus Coeruleus. *Anesthesiology* 2015; 123: 899-908.

King JB, Schauerhamer MB, Bellows BK. A review of the clinical utility of duloxetine in the treatment of diabetic peripheral neuropathic pain. *Ther Clin Risk Manag.* 2015; 11: 1163-75.

Kloke M, Hoffken K, Olbrich H, Schmidt CG. Anti-depressants and anti-convulsants for the treatment of neuropathic pain syndromes in cancer patients. *Onkologie* 1991; 14: 40-3.

Langley P, Muller-Schwerfe G, Nicolaou A, Liedgens H, Pergolizzi J, Varrassi G. The societal impact of pain in the European Union: health-related quality of life and healthcare resource utilization. *Pain. J Med Econ* 2010; 13: 571-81.

Lantéri-Minet M, Isnardon P, de Pommery J, Menétréy D. Spinal and hindbrain structures involved in visceroreception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins. *Neuroscience.* 1993; 55: 737-53.

Latrémolière A, Mauborgne A, Masson J, Bourgoin S, Kayser V, Hamon M, Pohl M. Differential implication of proinflammatory cytokine interleukin-6 in the development of cephalic versus extracephalic neuropathic pain in rats. *J Neurosci.* 2008; 28: 8489-501.

Le Cudennec C, Castagné V. Face-to-face comparison of the predictive validity of two models of neuropathic pain in the rat: analgesic activity of pregabalin, tramadol and duloxetine. *Eur J Pharmacol.* 2014; 735: 17-25.

Linton SJ. Impacto socioeconómico del dolor de espalda crónico: ¿se está beneficiando alguien? *Rev Soc Esp Dolor* 1999; 6: 333-42.

López Timoneda F, Definición y Clasificación del dolor. *Clin Urol Complut*, 1996; 4: 49-55.

Luis-Delgado OE, Barrot M, Rodeau JL, Ulery PG, Freund-Mercier MJ, Lasbennes F. The transcription factor DeltaFosB is recruited by inflammatory pain. *J Neurochem.* 2006; 98: 1423-31.

Lunn M, Hughes R, Wiffen P. Duloxetina para el tratamiento de la neuropatía dolorosa, el dolor crónico o la fibromialgia. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014 Issue 2. Art. No.: CD007115. DOI: 10.1002/14651858.CD007115.

Martínez-Salio A, Gómez De la Cámara A, Ribera Canudas MV, Montero Homs J, Blanco Tarrío E, Collado Cruz A, Ferrero Méndez A, Molet Teixidó J, Oteo-Alvaro A, Gálvez Mateos R, Zamorano Bayarri E, Peña Arrebola A, Pardo Fernández J. Diagnosis and treatment of the neuropathic pain. *Med Clin (Barc).* 2009; 133: 629-36.

Mason P, Fields HL. Axonal trajectories and terminations of on- and off-cells in the cat lower brainstem. *J Comp Neurol.* 1989; 288: 185-207.

M'Dahoma S, Barthélemy S, Tromilin C, Jeanson T, Viguier F, Michot B, Pezet S, Hamon M, Bourgoin S. Respective pharmacological features of neuropathic-like pain evoked by intrathecal BDNF versus sciatic nerve ligation in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015 Aug 13. pii: S0924-977X(15)00244-8. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.07.026.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science.* 1965; 150: 971-9.

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: 177-95.

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: 381-91.

Merskey H, Bogduk N. Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage". Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy. Edited by IASP Press. Seattle,1994; pp 209-214.

Micó J. A. La FDA., da fe: los antidepresivos son analgésicos. *Rev Soc Esp Dolor* 2005; 12: 1-2.

Miyazaki R, Yamamoto T. The efficacy of morphine, pregabalin, gabapentin, and duloxetine on mechanical allodynia is different from that on neuroma pain in the rat neuropathic pain model. *Anesth Analg*. 2012; 115: 182-8.

Molander C, Grant G. Spinal cord cytoarchitecture. In: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed.). Academic Press. Sydney. 1995; pp 39-45.

Möller KA, Johansson B, Berge OG. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. *J Neurosci Methods*. 1998; 84: 41-7.

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.

Moulin DE, Clark AJ, Gilron I, Ware MA, Watson CP, Sessle BJ. Pharmacological management of chronic neuropathic pain – consensus statement and guidelines from the Canadian Pain Society. *Pain Res Manag* 2007; 12: 13–21.

Munro G. Pharmacological assessment of the rat formalin test utilizing the clinically used analgesic drugs gabapentin, lamotrigine, morphine, duloxetine, tramadol and ibuprofen: influence of low and high formalin concentrations. *Eur J Pharmacol.* 2009; 605: 95-102.

Murai N, Aoki T, Tamura S, Sekizawa T, Kakimoto S, Tsukamoto M, Oe T, Enomoto R, Hamakawa N, Matsuoka N. AS1069562, the (+)-isomer of indeloxazine, exerts analgesic effects in a rat model of neuropathic pain with unique characteristics in spinal monoamine turnover. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 348: 372-82.

Muriel Villoria, C; Madrid Arias, JL. Consideraciones en torno al tratamiento farmacológico del dolor. *Europharma.* Madrid 1993; pp 39-91.

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.

Navarro X, Verdú E. Fisiología de las aferencias primarias del dolor. En: *Tratamiento del dolor. Teoría y Práctica.* Tercera edición. Coordinadores: Aliaga L, Baños JE, De Barutell C, Molet J, Rodríguez de la Serna A. Publicaciones Permanyer. Barcelona. 2009; pp: 19-26.

Ogawa K, Fujikoshi S, Montgomery W, Alev L. Correlation between pain response and improvements in patient-reported outcomes and health-related quality of life in duloxetine-treated patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015; 11: 2101-7.

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: 317-24.

Painful Truth Survey, IML Research – sponsored by Boston Scientific, 2012 The Painful Truth. State of Pain Management in Europe. En: <http://www.epresspack.net/mnr/dynamic/2013/01/937949.pdf>
[Tesis Doctoral J Carlos Tornero](#)

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in stereotaxic coordinates. 2nd edition. Academic Press. San Diego, 1986.

Peirs C, Williams SP, Zhao X, Walsh CE, Gedeon JY, Cagle NE, Goldring AC, Hioki H, Liu Z, Marell PS, Seal RP. Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron*. 2015; 87: 797-812.

Pérez-Cajaraville J., Gil-Aldea I. Nuevas perspectivas en el tratamiento del dolor neuropático: duloxetina. *Rev. Soc. Esp. Dolor* 2006; 6: 421-7.

Pertovaara A. Noradrenergic pain modulation. *Prog Neurobiol*. 2006; 80: 53-83.

Porro CA, Cavazzuti M, Galetti A, Sassatelli L. Functional activity mapping of the rat brainstem during formalin-induced noxious stimulation. *Neuroscience*. 1991; 41: 667-80.

Prats A, San Molina J. Vías centrales ascendentes y descendentes relevantes en el dolor. En: Serra-Catafau J. editores. Tratado de dolor neuropático. Madrid. Editorial Médica Panamericana 2007; pp 99-114.

Presley RW, Menétrey D, Levine JD, Basbaum AI. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci*. 1990; 10: 323-35.

Price DD, Hayashi 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: 1590-608.

Reid KJ, Harker J, Bala MM, Truysers C, Kellen E, Bekkering GE, Kleijnen J. Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact. *Curr Med Res Opin*. 2011; 27: 449-62.

Rojas-Piloni G, Rodríguez-Jiménez J, Martínez-Lorenzana G, Condés-Lara M. Dorsal horn antinociception mediated by the paraventricular hypothalamic nucleus and locus coeruleus: a comparative study. *Brain Res.* 2012; 1461: 41-50.

Saarto T, Wiffen PJ. Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD005454.

Sagheddu C, Aroni S, De Felice M, Lecca S, Luchicchi A, Melis M, Muntoni AL, Romano R, Palazzo E, Guida F, Maione S, Pistis M. Enhanced serotonin and mesolimbic dopamine transmissions in a rat model of neuropathic pain. *Neuropharmacology.* 2015; 97: 383-93.

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: 546-53.

Schweimer JV, Ungless MA. Phasic responses in dorsal raphe serotonin neurons to noxious stimuli. *Neuroscience.* 2010; 171: 1209-15.

Serra J, Quiles C. Guía para la creación de una unidad de dolor neuropático. In: *Tratado de dolor neuropático.* Ed. J Serra. Ed. Panamericana, Madrid, 2007, pp. 269-280.

Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron.* 1990; 4: 477-85.

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.

Slattery DA, Cryan JF. The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. *ILAR J* 2014; 55: 297-309.

Song Z, Ansah OB, Meyerson BA, Pertovaara A, Linderöth B. Exploration of supraspinal mechanisms in effects of spinal cord stimulation: role of the locus coeruleus. *Neuroscience* 2013; 253: 426-34.

[Tesis Doctoral J Carlos Tornero](#)

Stamford JA. Descending control of pain. *Br J Anaesth*. 1995; 75: 217-27.

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; 176: 59-62.

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; 86: 3258-64.

Taylor J, Mellström B, Fernaud I, Naranjo JR. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord. *Eur J Pharmacol*. 1998; 351: 39-47.

Terayama R, Kishimoto N, Yamamoto Y, Maruhama K, Tsuchiya H, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T. Convergent nociceptive input to spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury. *Neurochem Res*. 2015; 40: 438-45.

Törk, I. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In: *The rat nervous system*. Vol 2. Hindbrain and spinal cord. Paxinos, G. (ed.) Academic Press. 1985; Sydney. 43-78.

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: 2749-52.

Van Bockstaele EJ, Aston-Jones G. Integration in the ventral medulla and coordination of sympathetic, pain and arousal functions. *Clin Exp Hypertens*. 1995; 17: 153-65.

Verdú E, Navarro X. Fisiología de la transmisión nociceptiva en el sistema nervioso central. En: *Tratamiento del dolor. Teoría y Práctica*. Tercera edición. Coordinadores: Aliaga L, Baños JE, De Barutell C, Molet J, Rodríguez de la Serna A. Publicaciones Permanyer. Barcelona. 2009; pp: 27-32.

Wang QP, Nakai Y. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull.* 1994; 34: 575-85.

Wang QP, Zadina JE, Guan JL, Shioda S. Morphological evidence of endomorphin as an agonist for the mu-opioid receptor in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 2003; 341: 107-10.

Wattiez AS, Libert F, Privat AM, Liodice S, Fialip J, Eschalier A, Courteix C. Evidence for a differential opioidergic involvement in the analgesic effect of antidepressants: prediction for efficacy in animal models of neuropathic pain? *Br J Pharmacol* 2011; 163: 792-803.

Wernicke JF, Pritchett YL, D'Souza DN, Waninger A, Tran P, Iyengar S, Raskin J. A randomized controlled trial of duloxetine in diabetic peripheral neuropathic pain. *Neurology* 2006; 67: 1411-20.

WHO. Cancer pain relief. Geneva. 1986.

Willis WD Jr. The somatosensory system, with emphasis on structures for pain. *Brain Res Rev* 2007; 55: 297-313.

Willis WD, Westlund KN, Carlton SM. Pain, 1995. En: *The rat nervous system*. 2nd ed. Paxinos, G. (ed). Academic Press. Sydney. 1995. pp 725-50.

Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors: noxious stimulus detectors. *Neuron* 2007; 55: 353-64.

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; 914: 106-14.

Yang J, Yuan H, Liu W, Song C, Xu H, Wang G, Song C, Ni N, Yang D, Lin B. Arginine vasopressin in hypothalamic paraventricular nucleus is transferred to the nucleus raphe magnus to participate in pain modulation. *Peptides.* 2009; 30: 1679-82.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983; 16: 109-10.