



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

---

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA RESPUESTA SENSORIAL AL  
ETANOL DESPUÉS DE ALTERACIONES DEL SISTEMA TRIGEMINAL.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

ALEJANDRA GARCÍA URBINA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ISAAC OBED PÉREZ MARTÍNEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

Marco teórico.....	3
Dolor.....	4
El procesamiento del dolor y su integración en el circuito córtico- límbico.....	7
Interconectividad del circuito córtico límbico.....	11
Relación del procesamiento nociceptivo orofacial del nervio trigeminal con el circuito córtico-límbico.....	14
Evaluación experimental de las dimensiones del dolor.....	16
Evaluación de la dimensión sensorial del procesamiento nociceptivo orofacial.....	16
Evaluación de la dimensión cognitivo/evaluativa del procesamiento nociceptivo orofacial.....	21
Evaluación de la dimensión motivacional/afectiva del procesamiento nociceptivo orofacial.....	24
Planteamiento del problema.....	26
Justificación.....	27
Hipótesis.....	29
Objetivo General.....	29
Objetivos Particulares.....	29
Material y métodos.....	30
Animales.....	30

Cirugía de constricción del nervio trigeminal.....	30
Constricción del nervio mentoniano.....	30
Prueba de hiperalgesia con acetona.....	32
Neofobia.....	33
Preferencia de dos botellas.....	35
Programa de reforzamiento fijo y progresivo.....	35
Reforzamiento fijo (FR).....	36
Reforzamiento progresivo (PR).....	37
Software y hardware.....	39
MED-PC.....	39
MATLAB.....	40
Resultados.....	41
Discusión.....	57
Referencias.....	61

## Marco teórico

En México la prevalencia del dolor orofacial afecta al 85% de la población en algún momento de su vida [1]. El dolor orofacial, independientemente de su etiología, es uno de los síntomas de consulta más frecuente en el consultorio dental que aún no se ha llegado de manera eficaz, esto se debe a que la comprensión fisiopatológica nociceptiva aún es limitada. Los trastornos del dolor orofacial abarcan una gran gama, que incluyen trastornos de la articulación temporomandibular, dolor periodontal, la neuralgia del trigémino, dolor facial atípico, síndrome de ardor bucal, dolor postquirúrgico dental, dolor de cabeza y cuello de origen infeccioso. [2]

Las lesiones nerviosas constituyen una complicación que puede ser ocasionada por el dentista tras la realización de varios procedimientos odontológicos como son: las cistectomías, la extracción de dientes, las apicectomías, los tratamientos endodónticos, la colocación de anestesia local, o la cirugía implantológica o preprotésica [3].

El dolor en la región orofacial es un problema común e incapacitante que puede tener efectos colaterales en la calidad de vida en los pacientes. A pesar de las terapias actuales, los pacientes aún están lejos de encontrar un alivio efectivo debido a que aún hay una limitada comprensión de la fisiopatología nociceptiva [4], y por lo tanto, pese a una gran gama de alternativas terapéuticas, no se aborda el control del dolor desde todos los ángulos que deben ser afectados por la terapia analgésica.

## Dolor

La concepción del dolor desde principios del siglo pasado como sensación no se trata sino de un mecanicismo mal entendido en las ciencias biomédicas que hizo que se extendiera el entendimiento del dolor como un tipo de sensación producida por determinada estimulación nerviosa, en la que los aspectos emocionales no constituirían sino una reacción a dicha sensación. Los aspectos sensorio-perceptivos del dolor eran los que había que tener en cuenta en el estudio y tratamiento de este padecimiento y esta conceptualización es la que ha determinado que durante décadas la investigación de este problema se centrara específicamente en las variables anatomofisiológicas. Dolor no sería sino nocicepción.

No obstante, en la actualidad la dimensión sensorial del dolor se considera como uno de los diversos componentes de la experiencia de dolor, de forma que para la comprensión de este fenómeno es preciso atender a otros aspectos que cursan conjuntamente con los aspectos perceptivos.

Si bien el estudio de los procesos sensorio-perceptivos del dolor ha favorecido no sólo la comprensión en profundidad de este fenómeno, sino que además ha servido para desarrollar procedimientos de analgesia extraordinariamente eficaces, éste no puede considerarse únicamente como un sentido somático, sino que debemos entenderlo como una experiencia global, en la que los procesos sensoriales sólo conforman una parte de todo este fenómeno. El dolor consiste en un acontecimiento vital complejo, multidimensional y susceptible de estudio e intervención por diversas disciplinas científicas.

Uno de los modelos psicológicos del dolor más influyentes es el modelo de Melzack y Casey (1968) [5], en el que este fenómeno se concibe como una experiencia multidimensional. Las dimensiones del dolor que hay que tener en cuenta a la hora de su conceptualización, evaluación o intervención son tres: *dimensión sensorial/discriminativa*, *dimensión motivacional/afectiva* y *dimensión cognitivo/evaluativa*. Cada una de éstas confieren al dolor una serie de características especiales, pero interrelacionadas del tal forma que la experiencia de dolor no puede entenderse de forma completa si no se tienen en cuenta todas ellas.

- a) **Dimensión Sensorial/discriminativa:** está directamente relacionada con los mecanismos anatomofisiológicos. Es la encargada de la transmisión de la estimulación nociceptiva desde la región donde se haya producido un daño tisular, infección o cualquier otra alteración orgánica o funcional hasta los centros nerviosos superiores [6]. Tal dimensión se dice que es discriminativa ya que es la responsable de la detección de las características espaciales y temporales del dolor, así como de la intensidad y ciertos aspectos de la cualidad del dolor (distinción entre dolor urente, opresivo, etc.), parámetros éstos de especial relevancia para el diagnóstico de la patología que produce el dolor (neurológica, traumatismo, infecciosa, psicógena, etc.) [7]. Sin embargo, la experiencia del dolor resultante se ve afectada por factores contextuales y cognitivos [8] de tal forma que la activación nociceptiva no siempre produce dolor, y por el contrario, el dolor puede ocurrir sin una activación nociceptiva identificable [9].

Los procedimientos de intervención que se basan en la dimensión sensorial/discriminativa son las técnicas biomédicas tradicionales. Los analgésicos (quizá el más utilizado de todos los tipos de intervención) pueden incidir en tres niveles: a nivel receptorial, disminuyendo la capacidad de estimulación de los nociceptores (analgésicos como el ácido acetil-salicílico, o el paracetamol); a nivel de conducción (anestésicos locales como la lipnocaína); o a nivel central (opiáceos). Otros procedimientos comunes son bloqueos nerviosos, transecciones nerviosas, etc.

- b) **Dimensión Cognitivo/evaluativa:** trata de la creación del aprendizaje que conlleva la experiencia subjetiva del dolor haciendo referencia a las creencias, valores culturales y variables cognitivas como influencia del pasado o creación de una nueva experiencia como mecanismo de supervivencia [10]. De tal forma que el individuo evalúa al estímulo como recompensante o aversivo.

Es por eso que el dolor puede ser considerado como una emoción homeostática primordial, análoga al hambre, sed, sueño, termorregulación y mantenimiento de las funciones viscerales [11].

- c) **Dimensión Motivacional/afectiva:** está directamente relacionada con la dimensión cognitivo/evaluativa. Tiene que ver con la decisión de ejercer una acción de huir o mantener la sensación. Cuando la sensación es recompensante se genera una persistencia o hábito que puede llegar a una adicción, en cambio cuando es aversiva, el sujeto escapa o huye de ella y es difícil que se revierta [12].



Entonces...

Este mecanismo homeostático involucra receptores que detectan una sensación (a) la cual es interpretada en una emoción aversiva/recompensante (b), y que exige una respuesta conductual de persistencia/escape (c).

Por ejemplo, cuando un niño reacciona quitándose del fuego al quemarse, la sensación dolorosa produce un fuerte impulso motivacional para promover un escape; ese movimiento que ocurre en milisegundos, es simultáneo a la integración de información a circuitos corticales y subcorticales en el sistema nervioso central, lo cual promueve el aprendizaje.

En ocasiones, estímulos aversivos pueden volverse apetitivos, por ejemplo la sustancia activa contenida en el chile (capsaicina), a cierta dosis puede ser tolerable e incluso placentera, sin embargo a una dosis más alta se vuelve muy aversiva. Cabe destacar que el sistema nervioso periférico y central, sufre adaptaciones relacionadas al consumo de capsaicina, que le permiten al individuo incrementar la dosis y la ingesta en busca de placer. Otros estímulos como el etanol, a pesar de activar la vía nociceptiva, puede convertirse en un estímulo altamente recompensante, y a su vez incluso inducir una adicción. La clave a todo lo anterior se encuentra en la relación entre el procesamiento nociceptivo y los sistemas de recompensa del cerebro.

### **El procesamiento del dolor y su integración en el circuito córtico-límbico.**

Neuroimágenes en pacientes con dolor crónico demuestran que se observan áreas estimuladas correspondientes al circuito córtico-

límbico, el cual se encarga de procesar la evaluación de recompensa o aversión a un estímulo y sus respuestas conductuales consecuentes [13,14]. Estos circuitos comprenden principalmente al tálamo, la amígdala, el núcleo Accumbens (NAc), al área tegmental ventral (VTA), la corteza prefrontal (PFC) y la corteza cingulada anterior (ACC). Estas regiones reciben información nociceptiva a través del tallo cerebral proveniente del ganglio trigeminal [15].

Se ha propuesto que cambios en estos circuitos probablemente contribuyan en el desarrollo del dolor crónico. Es por eso que la investigación en el área de neurobiología nociceptiva, se ha enfocado en el estudio preclínico de las emociones y el dolor, estas investigaciones han dado lugar a nuevos enfoques prometedores en la creación de nuevas terapias [16,17,18].

El circuito córtico límbico, fig. 1 [19], tiene diversas funciones, entre ellas integra información motivacional del dolor, procesa la información desde la percepción hasta la toma de decisiones. Una de las regiones principales en este procesamiento es la parte ventral del núcleo estriado conocida como núcleo Accumbens (NAc), ya que recibe información nociceptiva aferente, a través de conexiones con el tálamo, la zona peribraquial (PB), la amígdala y la corteza cingulada anterior (ACC) [20].

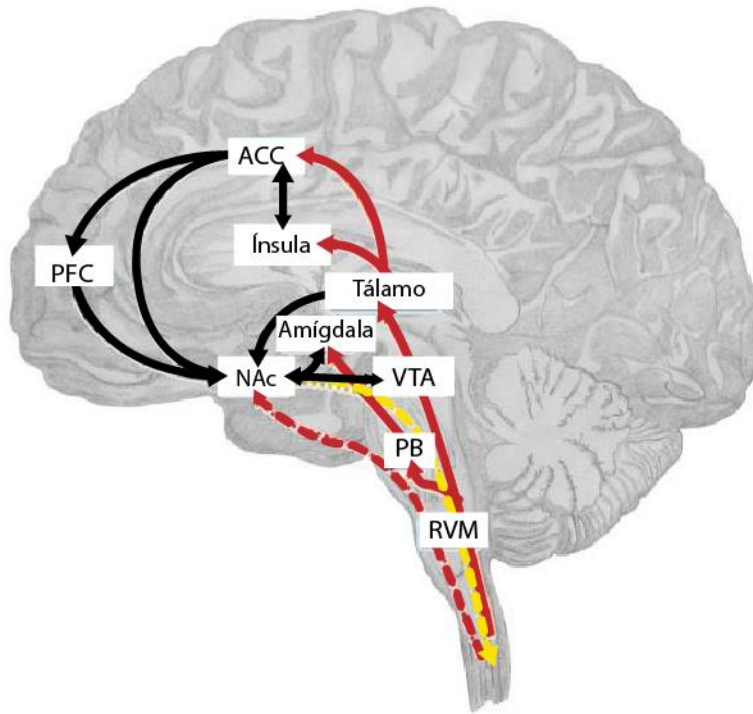


Fig 1. Circuito córtico-límbico.

(ACC) Corteza Cingulada Anterior, (PFC) Corteza Prefrontal, (NAc) Núcleo Accumbens, (VTA) Área Tegmental ventral, (PB) Área Peribraquial, (RVM) Médula Rostral Ventromedial.

El NAc no parece codificar la sensación de dolor, sino más bien darle un valor afectivo a la sensación (valor hedónico), para después ejercer una acción motora (motivación). Es por eso que está involucrado con cambios conductuales relacionados a la percepción, generando adicciones o incrementando la motivación por ciertos estímulos como lo mencionado en el punto 1 referente al etanol y a la capsaicina [21].

El NAc no es la única región que integra información nociceptiva en el sistema córtico-límbico, también el área tegmental ventral (VTA) envía señales dopaminérgicas salientes al NAc, dándole valor al dolor es decir proporciona una evaluación del daño y de la sensación dolorosa [22].

Las conexiones entre la corteza prefrontal (PFC) y la ACC codifican información emocional y cognitiva del procesamiento nociceptivo, estas regiones modulan la toma de decisiones (motivación) [23,24]. En forma general se conoce que un estímulo placentero genera la decisión de mantenerse en él, sin embargo cuando un estímulo es aversivo produce huida y escape [25].

Estímulos como el etanol, generan aversión cuando son ingeridos por primera vez, sin embargo el circuito sufre adaptaciones (plasticidad neuronal) que incrementan su consumo en forma progresiva [26]. En una búsqueda por entender cómo un estímulo aversivo puede volverse apetitivo o recompensante, se requiere evaluar desde la percepción hasta la integración de la información a nivel neuronal, el presente estudio abordará la percepción y el procesamiento trigeminal desde una perspectiva conductual y fisiológica, sin embargo en proyectos posteriores se abordará la conectómica de dicho procesamiento.

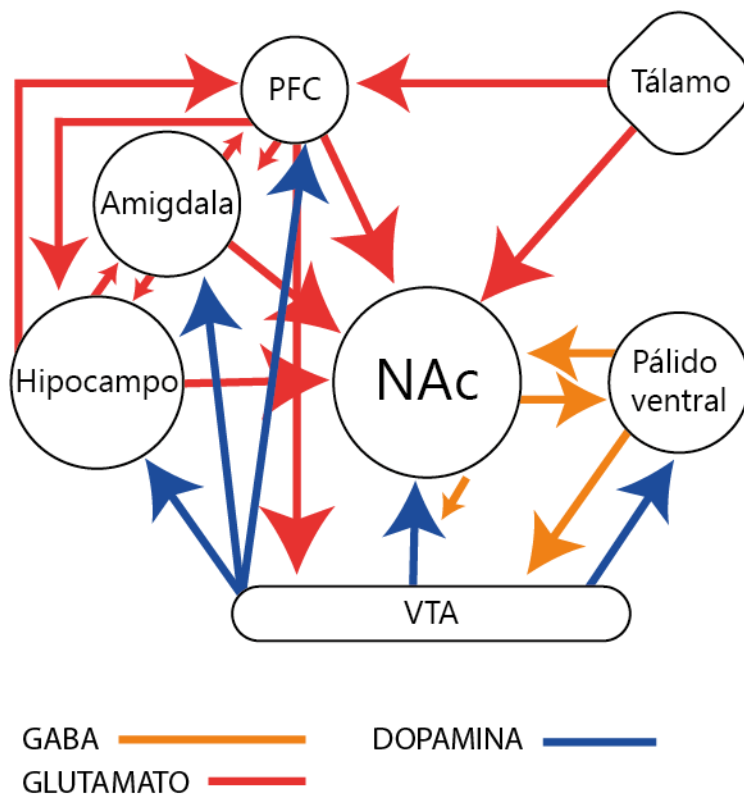
Otro elemento sumamente importante en este circuito, es la amígdala, la cual se asocia también con la toma de decisiones, especialmente ante el miedo y la ansiedad a un peligro. Las señales provenientes de la amígdala del tipo glutamatérgicas y las salidas dopaminérgicas del VTA convergen en el NAc influenciando la conducta en respuesta al estrés y la ansiedad, [27] por lo tanto estos circuitos son de suma importancia en los procesos que estudiamos en este proyecto, para la realización de proyectos posteriores.

El estudio de este circuito en relación al dolor orofacial, nos abre una gama de posibilidades, para encontrar blancos terapéuticos para el control del dolor. [28]

## Interconectividad del circuito córtico límbico

Los mecanismos celulares y moleculares exactos que subyacen la plasticidad asociada con el circuito córtico límbico aún permanecen muy poco definidos debido a las dificultades para su investigación por las condiciones tan cambiantes del cerebro [29].

Es bien sabido que el circuito cortico-límbico cuenta con 3 tipos de interconexiones principales del tipo glutamatérgico, GABAérgico y dopaminérgico (Fig. 2).



GABA ——— DOPAMINA ———  
GLUTAMATO ———

*Urbina*

Fig 2. Interconexiones.

Representación de la interconectividad existente entre las estructuras del sistema córtico-límbico.

El NAc recibe aferencias del tipo glutamatérgicas de diferentes regiones cerebrales como el PFC, la amígdala, el tálamo y el hipocampo que dependiendo de su función se activan en diferentes tipos de estimulación [30]. Por el contrario tiene dos principales salidas de tipo GABAérgica que son una proyección directa al pálido ventral y otra al VTA. El pálido ventral envía eferencias GABAérgicas al tálamo y las proyecciones glutamatérgicas del tálamo a la PFC [31].

Las proyecciones mesolímbicas dopaminérgicas se localizan en el VTA. El VTA no recibe ninguna entrada directa, pero es inervada por estructuras como la PFC, el NAc, el pálido ventral y una variedad de conexiones entre neuronas alineadas en columna a lo largo del mesencéfalo que unen a la PFC con el tallo cerebral.

Una vía glutamatérgica representa el sistema de neurotransmisión excitador más abundante en el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados, así su importancia se hace evidente en los procesos cognitivos. El glutamato, aparte de constituir uno de los veinte aminoácidos proteinogénicos, es el neurotransmisor mayoritario en el sistema nervioso central de los mamíferos. Se puede afirmar que prácticamente todas las vías tálamo-corticales, córtico-corticales y la mayoría de las aferentes de la corteza están mediadas por glutamato. Esto hace que alrededor del 60% de todas las neuronas del cerebro, incluyendo las piramidales de la corteza y las neuronas de relevo del tálamo, utilicen glutamato como neurotransmisor [32].

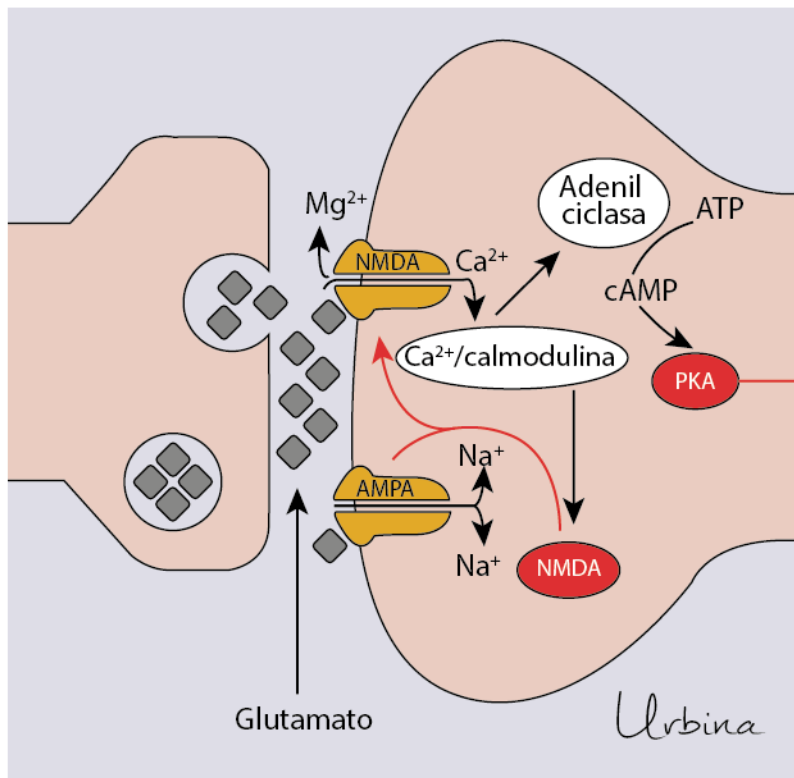


Fig 3. Sinapsis glutamatergica.

Liberación de glutamato por la célula presináptica y su aferencia con receptores AMPA y NMDA.

Una sinápsis glutamatergica, de manera general, se lleva a cabo de la siguiente forma (Fig. 3). El glutamato se acumula en el interior de las vesículas sinápticas de las neuronas glutamatergicas, es liberado por las mismas en respuesta a despolarizaciones de la neurona mediante un sistema de exocitosis dependiente de calcio, o por reversión de alguno de sus transportadores. El glutamato ya liberado se recicla mediante la intervención de transportadores específicos y dependientes de sodio, que controlan además su concentración extracelular dentro de límites muy estrechos. Esta función de regulación de concentraciones adecuadas de glutamato extracelular es tan importante que consume aproximadamente dos tercios de toda la energía metabólica generada

por el cerebro. Posteriormente, el glutamato interacciona con uno de los receptores postsinápticos o gliales cercanos al terminal nervioso completando la vía de señalización nerviosa rápida mediada por este neurotransmisor [32].

El glutamato ejerce su acción a través de receptores tanto ionotrópicos como metabotrópicos, aunque la neurotransmisión glutamatérgica rápida está mediada por los primeros puesto que los receptores metabotrópicos, a través de su asociación con proteínas G, median efectos neuromoduladores a largo plazo. Receptores ionotrópicos de glutamato hay de tres clases: receptores AMPA (por ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolenpropionico), receptores de kainato, y receptores NMDA (por N-metil-D-aspartato) [32]. Todos ellos son proteínas multiméricas de membrana que, tras su unión a glutamato, responden abriendo un canal iónico induciendo así corrientes excitatorias postsinápticas .

### Relación del procesamiento nociceptivo orofacial del nervio trigeminal con el circuito córtico-límbico.

Actualmente la mayoría modelos animales de dolor neuropático periférico tiende a efectuarse por lesiones en los nervios, que dan como resultado signos de hiperalgesia (aumento de la sensibilidad dolorosa) térmica y alodinia (percepción dolorosa a un estímulo mecánico que no provocaba dolor) en el área afectada [33].

El área orofacial está inervada principalmente por el nervio trigémino (Fig. 4), el sistema trigeminal es responsable de transmitir la información sensorial bilateral de las áreas oral, facial y craneal al sistema nervioso central (SNC) a través de 3 grandes ramas: [34]



- a) Oftálmica: Córnea, piel de la frente, cuero cabelludo, párpados, nariz, mucosa de senos paranasales, nariz.
- b) Maxilar: Piel sobre maxilar, dientes maxilares, mucosa nasal, seno maxilar, y paladar.
- c) Mandibular: Piel de la mejilla, mandíbula, dientes mandibulares, ATM, mucosa oral, porción anterior de la lengua.

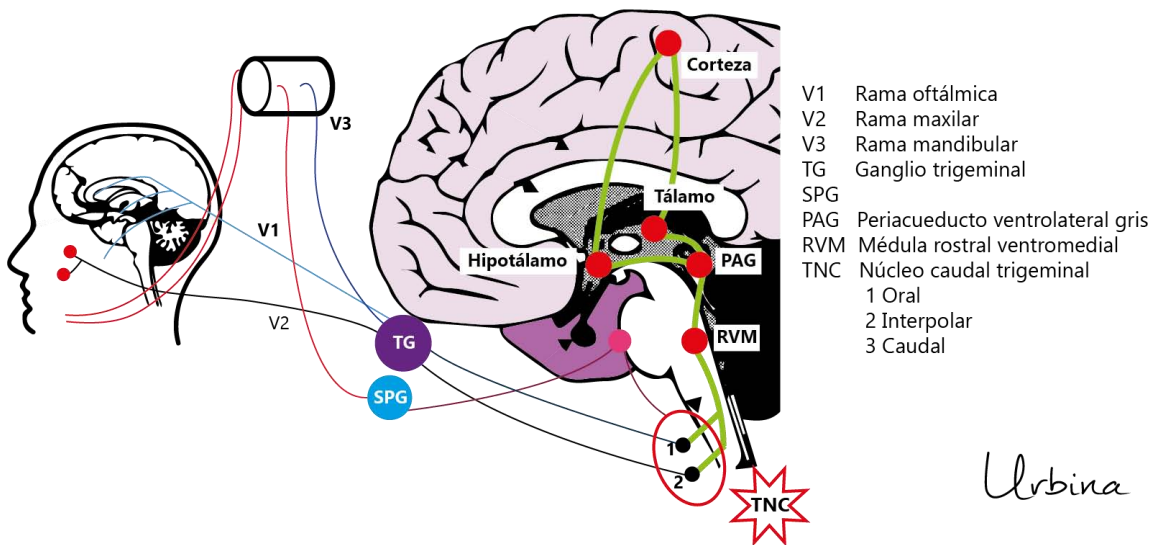


Fig 4. Sistema nociceptivo trigeminal.

Los principales nociceptores orofaciales son los receptores primarios mielinizados  $A_{\delta}$  y las fibras C no mielinizadas, además otros como los receptores transitorios vaniloideos, éstos se encuentran radicados en el ganglio trigeminal (de Gasser) y transmiten información hasta al SNC a través del complejo núcleo caudal trigeminal. Éste complejo se ha subdividido por su citología en 3: [35]

- 1) Oral

2) Interpolar

3) Caudal

El complejo núcleo caudal trigeminal lleva la información a la médula rostral ventral para subir a niveles superiores del cerebro [36].

## **Evaluación experimental de las dimensiones del dolor.**

### **Evaluación de la dimensión sensorial del procesamiento nociceptivo orofacial.**

La mayoría de los modelos animales de alteración del nervio trigeminal incluyen:

- a) La constricción, que consiste ligar completa o parcialmente los nervios periféricos V1, V2 o V3 con sutura produciendo así una lesión isquémica.
- b) La transección, que consiste en cortar o segmentar los nervios.

Este proceso de degeneración distal respecto al sitio de la lesión es conocido como degeneración Walleriana [37]. La reacción proximal respecto al punto de sección se llama degeneración primaria o retrógrada.

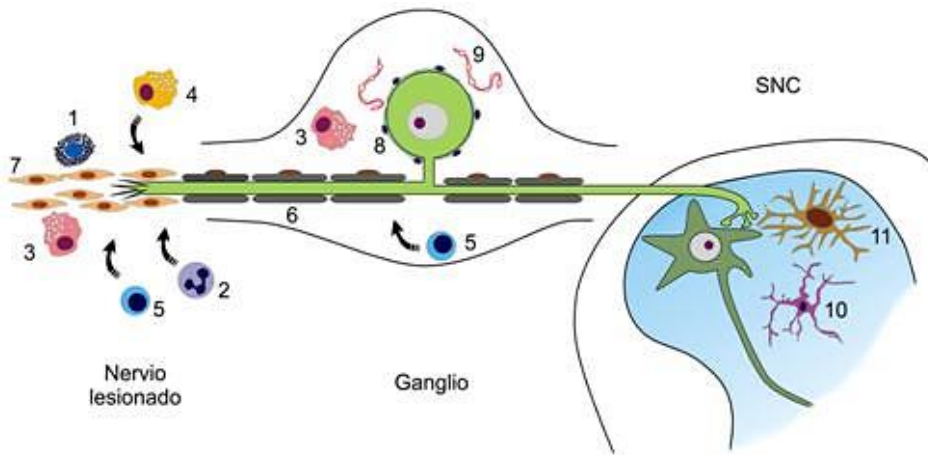


Fig 5. Degeneración Walleriana.

El objetivo de estos métodos es alterar los nervios periféricos produciendo:

a) Cambios en la expresión de canales iónicos, por la degeneración axónica producida y que en consecuencia causa una falla o pérdida de la conducción nerviosa [38].

b) Alteración de los receptores aferentes primarios, por la desmielinización segmentaria [38].

c) Liberación de neuropéptidos reguladores de dolor [39,40].

d) Además de una respuesta regenerativa el nervio, un edema local intraneural por la lesión del tejido conjuntivo del nervio [41].

Un número de técnicas se han empleado para el estudio del dolor utilizando como parámetro el reflejo a las respuestas (levantamiento de la pata trasera), comportamientos de aseo en el área lesionada o de retirada/escape (Fig. 6). Estos métodos incluyen: la aplicación de una gota de acetona [42, 43] spray de cloruro de etilo, [44] que permite provocar una hiperalgesia fría en un área específica que se quiera estudiar del

animal y contabilizar el número de reacciones que se tengan por parte del animal, de igual forma otro parámetro que puede ser evaluado es la altitud medida de levantamiento de la pata (hindpaw) como un índice de dolor.



Fig 6. Comportamientos de aseo en pruebas de hiperalgesia.

Otro modelo que evalúa la relación entre la nocicepción orofacial y la motivación es el paradigma de escape/aversión que permite medir simultáneamente las respuestas sensoriales y afectivas producidas por una estimulación táctil o térmica [45]. Como es el caso del dispositivo de evaluación del dolor orofacial (OPAD) (Fig. 7) que utiliza la relación dolor-recompensa; consiste en que el animal recibe la recompensa líquida

presionando su cara en unas placas de temperatura controlada. El animal decide entre recibir la bebida gratificante o evitar el contacto con las altas temperaturas de la placa, renunciando a la recompensa. Con estos

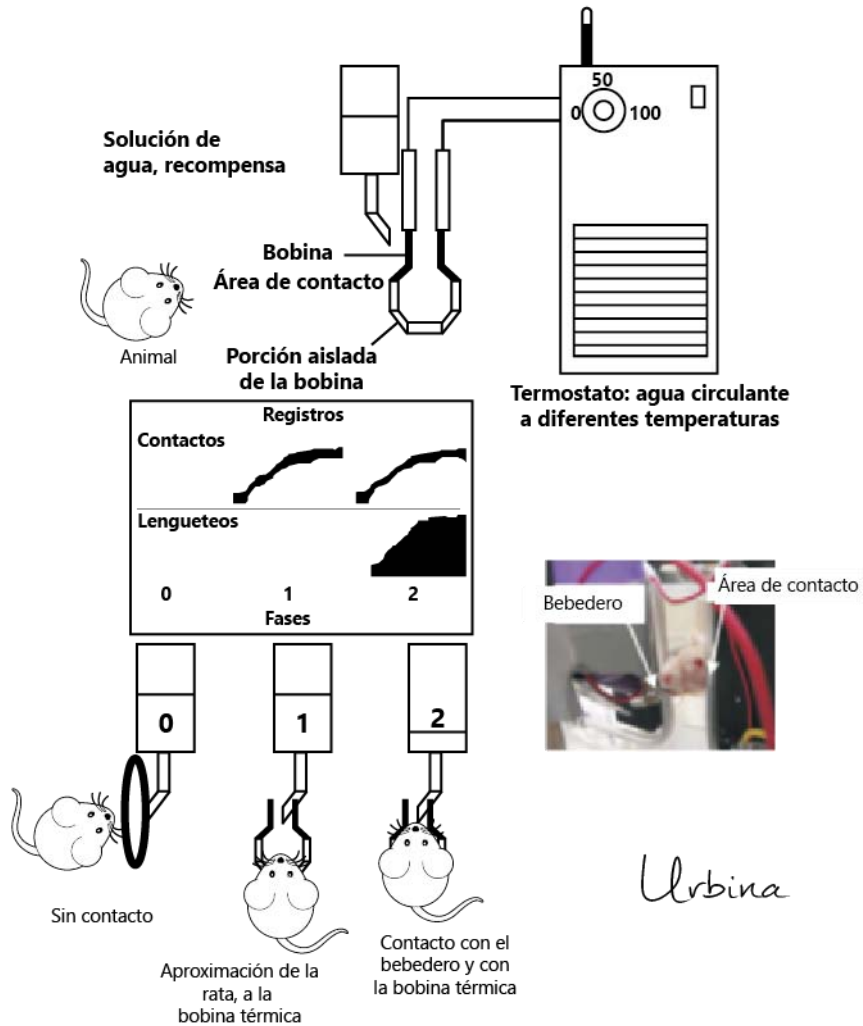


Fig 7. Representación del sistema OPAD.

Sistema de medición de sensibilidad orofacial a estímulos térmicos, en la parte superior se muestra el termostato que genera diferentes temperaturas en una bobina mediante agua circulante, en el cuadro intermedio se muestran las fases del proceso conductual (1 ensayo), en el que la rata se acerca y hace contacto con la bobina y el bebedero, también se muestran los registros del tiempo de contacto y la tasa de lengüeteos, en la fotografía (B), se muestra una fotografía de la rata haciendo contacto con el bebedero y con la bobina hidrotérmica.

ensayos se puede evaluar el complejo comportamiento del dolor en respuesta a una estimulación y su relación con la motivación por la obtención de un componente hedónico [46].

Una de las moléculas relacionada con el desarrollo de dolor neuropático orofacial es el receptor de potencial transitorio vaniloide 1 (TRPV1) [47]. El TRPV1 es un canal catiónico no selectivo de las neuronas sensoriales nociceptivas periféricas donde media la detección y trasducción de estímulos térmicos y químicos nocivos (etanol, la capsaicina, sustancias con pH ácido y calor intenso). Se piensa que los receptores TRPV1 funcionan como un sensor de calor nocivo en los nervios periféricos terminales y es esencial para el desarrollo de hipersensibilidad térmica durante un proceso inflamatorio. Además se ha implicado a los TRPV1 en el desarrollo de dolor neuropático inducido, ya que se han observado cambios en su expresión después de la lesión a los nervios periféricos [48].

Recientes hallazgos indican que los efectos estimulantes trigeminales del etanol pueden estar mediados en parte por la interacción con el receptor de potencial transitorio del canal receptor de vaniloide 1 (TRPV1) [49].

El TRPV1 se sabe que es expresado en las neuronas sensoriales primarias del ganglio trigeminal que inerva la cabeza y la cavidad oral, a su vez transmite información somatosensorial al núcleo del trigémino [50]. Estos receptores pueden ser activados por estímulos como altas temperaturas, agentes químicos con pH ácido, u otros estimulantes como capsaicina y etanol [51].

El etanol es un estímulo quimiosensorial que activa al sistema gustativo, el sistema olfatorio, y la somatosensación oral trigeminal (el

cual lo detecta y lo procesa como un agente químico nocivo). La capacidad del etanol para estimular las vías neuronales implicadas en el procesamiento trigeminal es ya conocida por estudios con diferentes especies [52]. El etanol además de evocar una respuesta dependiente de la concentración en las neuronas ganglionares del trigémino, también aumenta la expresión de TRPV1 de las células HEK (células renales de origen embrionario utilizadas en experimentación de biología celular), que son inhibidas por el receptor TRPV1 antagonista competitivo de capsazepina. Es muy interesante que el etanol potencializa respuestas electrofisiológicas del canal TRPV1 a una variedad de agonistas, incluyendo la capsaicina, protones, la endo-cannabinoide anandamida y calor. Las respuestas inflamatorias periféricas inducidas por el etanol son dependientes de la activación del receptor TRPV1. Estudios inmunohistoquímicos muestran una localización sobresaliente de los receptores TRPV1 en las fibras sensoriales que inervan el epitelio oral y el etanol es capaz de penetrar el tejido rápidamente para activarlos [53]. Por esta razón usaremos al etanol activar el sistema trigeminal vía receptores TRPV1.

### Evaluación de la dimensión cognitivo/evaluativa del procesamiento nociceptivo orofacial.

Usando paradigmas conductuales es posible evaluar el valor hedónico de estímulos orofaciales [54], uno de esos paradigmas evalúa la respuesta de precaución típica ante un estímulo novedoso, **neofobia**. Para protección, los mamíferos siempre presentan temor a lo nuevo, esto impide altos consumos de sustancias desconocidas que podrían ser potencialmente dañinas, para este propósito el sistema trigeminal participa generando señales nocivas que detienen al sistema de ingesta en un inicio, sin embargo si la sustancia no es dañina se incrementa el

consumo en forma progresiva, basándonos en experimentos con otros estímulos, usando etanol como estímulo en este paradigma, desencadenaría los procesos siguientes:

- a. Respuesta innata: La primera vez que se consume etanol se produce una reacción aversiva, lo que podríamos llamar la primera impresión, el sujeto entra en un proceso de evaluación y discriminación asociando el sabor con las consecuencias de su consumo [55].
- b. Respuesta adaptativa: Si luego de la ingesta no hay consecuencias negativas, el sabor (y el alimento) se reconoce como seguro y se consumirá más en futuros encuentros, este fenómeno es conocido como atenuación de la neofobia. Por el contrario, si el consumo va acompañado por consecuencias negativas para los animales (toxicidad, malestar intestinal) será reconocido como aversivo y será rechazado en futuras ocasiones, este aprendizaje se denomina aversión [56].

La aplicación del etanol en la lengua activa fibras periféricas aferentes linguales del nervio trigémino en el gato, la rata y los primates [57]. Este paradigma conductual nos proporciona un índice de que tan aversivo es un estímulo, en este caso el etanol, y que tan rápido puede aceptarse por el organismo.

Mecanismos cerebrales son los que determinan el grado de aversión y de aceptación de un alimento, y usan al sistema trigeminal para detectar un estímulo potencialmente dañino, en estudios posteriores se podrá dilucidar cuál es el mecanismo neurobiológico involucrado en dicha conducta.



Para explicar mejor el paradigma, en la figura 8 podemos ver una gráfica, que nos muestra los resultados de un experimento típico de neofobia, en el que 3 grupos experimentales fueron expuestos a consumo de una solución de ácido cítrico (A+), sal (A-) y sacarina (X) respectivamente (ver pie de figura). En la neofobia es común ver un retraso del consumo durante las primeras exposiciones, pero a medida que se va aceptando se espera la superación (extinción) de la aversión y la estabilización del consumo [58].

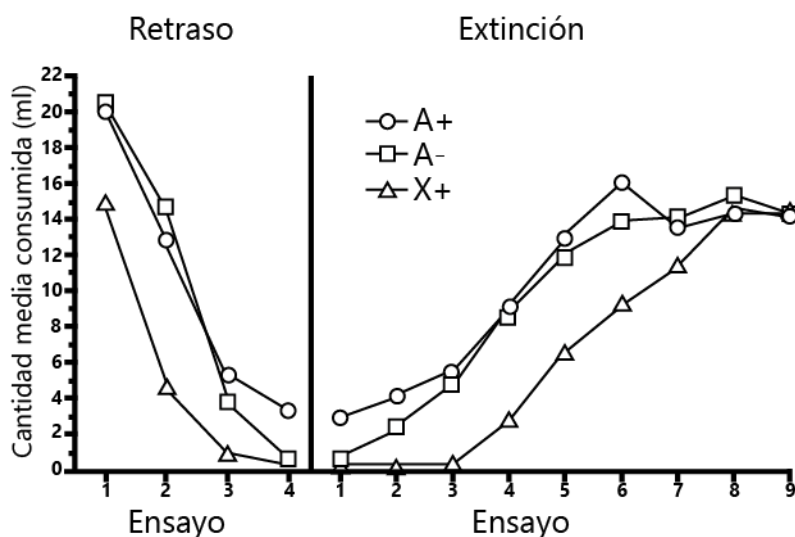


Fig 8. Neofobia.

*Retraso:* En el panel izquierdo se muestra como en todos los grupos el consumo decreció durante los primeros 4 ensayos.

*Extinción:* en el panel derecho se puede apreciar como el consumo de la solución fue aumentando progresivamente a medida que sucedieron los ensayos, hasta que finalmente alcanzaron una relativa estabilidad.

Para evaluar la preferencia posterior a la adaptación al consumo de un nuevo estímulo se usa una prueba llamada **preferencia de dos botellas** (agua vs. estímulo) antes y después de la manipulación trigeminal. Consistiendo en presentarle individualmente a cada rata dos

botellas: agua y etanol a libre acceso por cierto número de horas y se registran y compran los consumos.

### Evaluación de la dimensión motivacional/afectiva del procesamiento nociceptivo orofacial.

Los paradigmas de refuerzo han sido utilizados para evaluar las propiedades motivacionales a estímulos gustativos, como lo son los programas de reforzamiento fijo (FR) y progresivo (PR).

El reforzamiento fijo consiste en colocar al sujeto experimental en una caja conductual en el que se encuentra una palanca y un despachador de refuerzo o recompensa, el reforzamiento fijo se utiliza para que el sujeto aprenda y relacione que al activar la palanca se le entregará una recompensa; se llama reforzamiento fijo porque el requerimiento es el mismo durante toda la sesión. Por ejemplo un FR(1) consiste en 1 vez activa la palanca y 1 vez se le entrega recompensa, un FR(3) sería 3 veces activa la palanca y recibe 1 recompensa en toda la sesión [59].

El reforzamiento progresivo fue propuesto por Hodos en 1961 [60], consiste en el incremento sistemático de respuestas requeridas para obtener una recompensa hasta que el sujeto finalmente no responde en un plazo de tiempo determinado (punto de rompimiento). Por ejemplo en un PR(4) los requisitos para la entrega de la recompensa van aumentando 4, comienza en 1 palanqueo y se entrega una recompensa, después se suman 4, es decir 1,5,9, 13 y así sucesivamente. Esto nos ayuda a saber qué tan motivado está el sujeto para obtener el refuerzo, si es capaz de trabajar cada vez más por una misma recompensa. Nosotros hacemos uso de esta tarea conductual para evaluar el comportamiento hedónico de consumo de etanol, encontrar patrones de respuestas-

refuerzo y de cierta forma hacer medible algo tan complejo como es la motivación [61].

De acuerdo con toda la base teórica planteada, es posible notar que el entendimiento de los niveles sensoriales, hedónicos y motivacionales de la nocicepción del dolor es una nueva visión que puede sernos de gran ayuda en la búsqueda de mejores tratamientos analgésicos, y aunque es poca la investigación que se ha hecho enfocada en el área de la neurobiología nociceptiva orofacial, podemos hacer uso de fundamentos teóricos y otras herramientas adaptadas para la búsqueda de respuestas de acuerdo a nuestras necesidades, como en nuestro caso las mediciones motivacionales en respuesta a un estímulo hedónico, y así presentar nuevos avances en esta la misma línea de investigación.

## Planteamiento del problema.

Algunos problemas a los que nos enfrentamos cuando hablamos de estudios sobre el procesamiento de dolor orofacial son:

- a) La falta de modelos de estudio. La mayoría de los modelos animales, no toman en cuenta las dimensiones motivacionales y afectivas del dolor. Por otro lado son pocos los que se enfocan al procesamiento nociceptivo orofacial pues la mayoría evalúa procesos de dolor de otras vías.
- b) La evaluación de los aspectos motivacionales y cognitivos del dolor orofacial no sólo los aspectos sensoriales. Es de suma importancia la evaluación de estas dimensiones del dolor en los modelos experimentales, para poder extrapolar los datos al ser humano y generar alternativas para el control del dolor.
- c) La evaluación experimental de la relación entre percepción-hedonia-motivación, y su repercusión en el procesamiento cerebral así como en la conducta.

Además cabe resaltar que resulta de gran interés el conocer cómo un estímulo nuevo puede resultar aversivo, pero que al activar la vía nociceptiva y relacionarse con el circuito cortico límbico, puede transformarse y atenuarse esa aversión y cambiar a ser apetitivo, incluso llegar a ser adictivo.

Como puede notarse es de gran importancia el entendimiento del proceso sensorial, hedónico y motivacional del dolor orofacial ya que a futuro podrán proponer alternativas terapéuticas que sin duda serán de gran utilidad en la consulta dental.

## Justificación.

El dolor orofacial, independientemente de su etiología, es uno de los síntomas de consulta más frecuente en el consultorio dental, aún no se ha llegado resolver efectivamente, esto se debe a que la comprensión fisiopatológica nociceptiva aún es limitada. Las situaciones más comunes son los trastornos de la ATM, dolor dental, neuralgia del trigémino, síndrome de ardor bucal o migrañas.

De acuerdo a evidencias científicas, la sensación de dolor en humanos es una experiencia multidimensional, que comprende la dimensión sensorial, hedónica y motivacional. Actualmente nos encontramos con obstáculos en el estudio de estos componentes, pues no hay modelos animales que nos permitan estudiar todos los componentes simultáneamente en función de extrapolar la información al procesamiento nociceptivo en humanos. Por otro lado también es necesaria la búsqueda de modelos que nos permitan la evaluación precisa de variables experimentales, que no pueden ser evaluadas en el humano a nivel orofacial, pero que a su vez nos generen alternativas terapéuticas.

En una búsqueda de modelos de estudio de la percepción y el dolor orofacial en cada una de sus dimensiones, hemos hallado diferentes acercamientos al estudio del dolor orofacial, evaluaremos el efecto de los cambios en la percepción orofacial sobre paradigmas conductuales que nos representan: sensación, motivación y el valor hedónico. De esta manera podremos proponer por primera vez diferentes maneras de evaluar cada una de las dimensiones del procesamiento nociceptivo orofacial.

Las bases teóricas y experimentales generadas en esta tesis, se utilizarán para evaluar en proyectos futuros, cuales son los cambios neurofisiológicos que nos permiten huir, soportar o desear un estímulo que activa la vía del dolor.

Cabe mencionar que podremos determinar cuáles son los cambios conductuales y neurofisiológicos de alteraciones en la percepción somatosensorial oral inducida quirúrgicamente, lo cual implicaría alteraciones de forma retrógrada desde los nervios periféricos, que se traduce en cambios en la expresión de canales iónicos, receptores aferentes primarios, y neuropéptidos en las diferentes clases de neuronas sensoriales. Por último podremos reconocer por qué un estímulo que en un principio era aversivo se transforma a uno de aceptación y comprobar si la modificación de las vías nociceptivas modulan la conducta.

Todo lo anterior nos dará pautas para proponer alternativas terapéuticas más precisas al control del dolor orofacial y a la formación de hábitos nocivos de consumo, relacionados con alteraciones del sistema trigeminal.

## Hipótesis.

Las dimensiones del dolor orofacial pueden ser evaluadas desde una perspectiva fisiológica y conductual, y pueden ser alteradas modulando el sistema trigeminal.

## Objetivo General.

Evaluar experimentalmente si la lesión trigeminal neuropática crónica altera las dimensiones de dolor.

### Objetivos Particulares.

- *Evaluación sensorial:* Llevar a cabo una lesión trigeminal consecuente a la constricción del nervio mentoniano y posteriormente comprobar si existen alteraciones sensoriales mediante la prueba de hiperalgesia con acetona.
- *Evaluación cognitivo/evaluativa:* Evaluar la respuesta innata y la respuesta adaptativa al consumo de etanol a través de un modelo de neofobia de EtOH. Posteriormente usando un paradigma conductual llamado preferencia de dos botellas se compararán los cambios motivacionales de ingesta voluntaria de agua vs. etanol, con y sin una lesión trigeminal.
- *Evaluación motivacional/afectiva:* Usando dos paradigmas de refuerzo fijo y progresivo, se evaluarán las propiedades motivacionales a un estímulo gustativo (etanol), antes y después de un daño al nervio trigeminal. Al mismo tiempo se comparará con la motivación por el consumo de sucralosa el cual es un estímulo recompensante.

## Material y métodos.

### Animales.

Todos los procedimientos se llevarán a cabo de acuerdo a las normas del comité de ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (Oficio: CE/FESI/042015/1043). Los estudios conductuales se realizarán apegados a la guía de estándar ético para investigación del dolor en animales conscientes y utilizaremos el menor número posible de animales por grupo.

Utilizamos 42 ratas Wistar macho  $200 \pm 25$ gr, (36 para los paradigmas de neofobia y preferencia de dos botellas y 6 para pruebas de reforzamiento fijo y progresivo) mantenidas en ciclos de luz 12:12 día/noche en condiciones de bioterio.

Sólo las ratas sometidas al protocolo de evaluación neofóbica estuvieron privadas de agua 22 hrs/día, posterior a la sesión tendrán libre acceso a agua por 1 hora. Siempre se pesaron antes de cada sesión para vigilar y evitar pérdidas de peso debido a la privación.

### Cirugía de constricción del nervio trigeminal.

El modelo de alteración retrógrada del nervio trigeminal que usamos fue la constricción del nervio mentoniano.

#### Constricción del nervio mentoniano

[56]

#### Material

- Anestésicos: Combinación de Ketamina y Xilacina.



- Soporte estereotáxico.
- Instrumentos quirúrgicos estériles: pinzas de Adson, pinzas hemostáticas, hoja de bisturí del número 12 y 15 y mango, retractores y tijeras finas.
- Sutura de nylon 6-0 y seda 5-0.

### Método

#### 1. Anestesia e inmovilización.

Se anestesió a la rata con una combinación de Ketamina y Xilacina (90mg/kg + 5mg/kg). La piel del área del ojo la afeitamos y se colocó a la rata en el estereotáxico.

#### 2. Exposición del nervio mentoniano y ligadura.

Se realizó una incisión a la altura del foramen mentoniano, separando cuidadosamente de la fascia y el músculo exponiendo el nervio que sale a través del foramen. Se efectuó una apretada ligadura

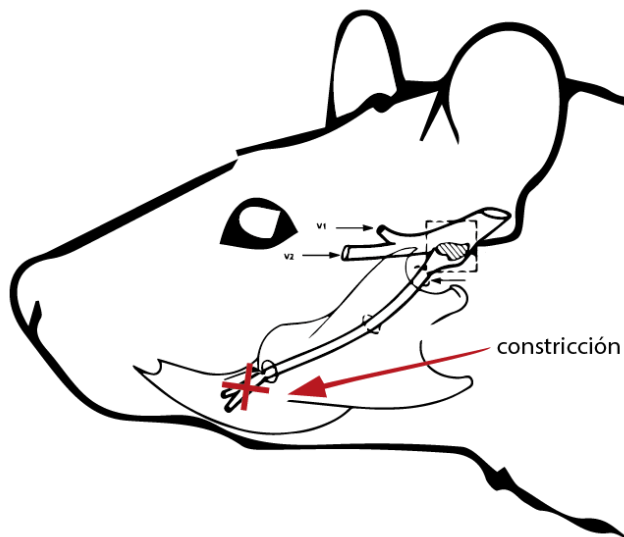


Fig. 9 Localización y constricción del nervio mentoniano

(tipo Selzer) cerca de la salida del forámen. Se cortó el sobrante de sutura. Se suturó la incisión con seda 5-0.

3. Posteriormente dejamos pasar 7 días de recuperación para cada cirugía, vigilando el peso y comportamiento de los animales.

### **Prueba de hiperalgesia con acetona.**

Esta prueba se realizó en la finalidad de evaluar el grado de hiperalgesia provocada por la lesión trigeminal.

Material

- Acetona.
- Gotero
- Caja de plexiglás.
- Cámara de video.
- Espejo

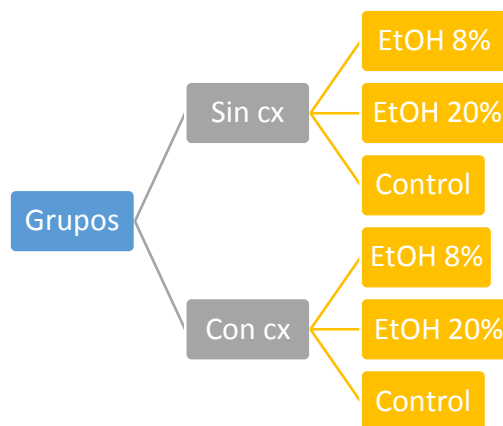
Método

- 1- Colocar el espejo detrás de la caja de plexiglás.
- 2- Con ayuda del gotero, colocar una gota sobre el área del nervio mentoniano en ambos lados.
- 3- Grabar por 15 min.
- 4- Para el conteo a doble ciego. Una persona, que desconocía si el video era de una rata que tenía lesión o no, registró el número de veces que la rata se aseara la cara durante toda la sesión en intervalos de 5 segundos. Una segunda persona realizó las pruebas estadísticas.

## Neofobia

Para evaluar la respuesta innata y de adaptación del sistema somatosensorial a la administración persistente de un estimulante del nervio trigémino. La transición del etanol como reforzamiento negativo a positivo generalmente se desarrolla durante las primeras dos semanas de exposición. Durante esta etapa el consumo es controlado y la ingesta parece ser de tipo exploratorio. Los patrones de consumo y la dosis diaria ingerida son inestables e impredecibles. Probablemente es en este estadio en que los animales aprenden a evaluar los efectos psicotrópicos del alcohol y a ajustar su comportamiento de consumo.

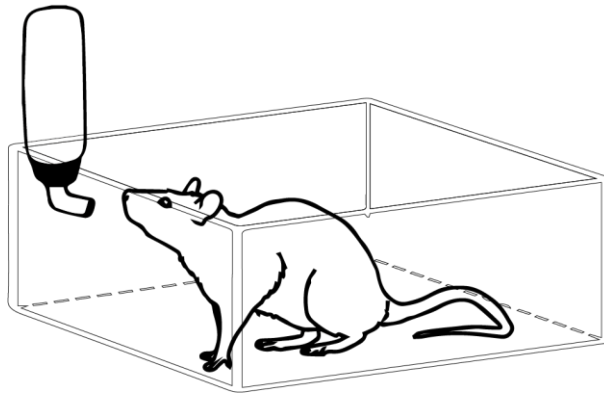
Para evaluar esta transición se tendrán 6 grupos (n=6) de  $200 \pm 25$  gr de peso, comida ad libitum, se les privaba de agua por 23 hrs anteriores a la sesión.



A la mitad de los grupos de los realizará la cirugía de constricción del nervio mentoniano para evaluar sus cambios motivacionales que influyen con esta manipulación.

El modelo consiste en darle agua por 15 minutos del 1er al 3er día para obtener la línea base de consumo en volumen (ml) de todas las ratas. Una vez recopilado los datos se separaron las ratas en 6 grupos de manera equilibrada basándonos en su consumo, de manera que 3 tuvieran lesión y 3 grupos sin lesión. Posteriormente del día 4 al día 8 se les daba una solución de etanol al 8% y 20% respectivamente, por 15 minutos (Fig 10) y se registraban los consumos; después de la sesión se les dejaba libre acceso a agua por 15 min para garantizar el cumplimiento de requerimientos diarios de agua, también se registraba este consumo.

Fig. 10

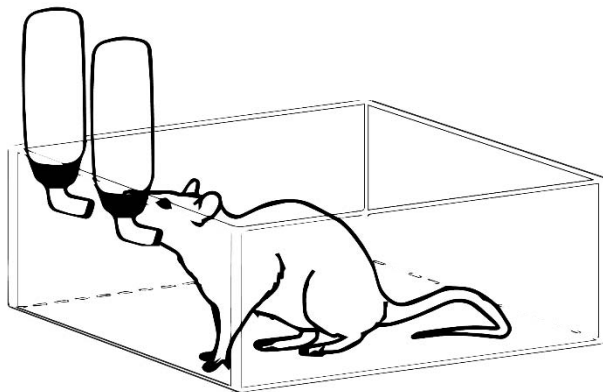


Para evaluar la preferencia posterior a la adaptación de consumo al etanol usamos la prueba de preferencia de dos botellas (agua vs. etanol) antes y después de la manipulación trigeminal. Usando los mismos grupos anteriores, se les aplicó el paradigma consistiendo en presentarle individualmente a cada rata dos botellas: agua y etanol (8/20% dependiendo de la concentración anteriormente usada para cada rata) a libre acceso por 48 hrs y registramos los consumos en volumen (ml); las botellas eran cambiadas de lugar a las 24 hrs para descartar que el consumo era por preferencia de lugar.

## Preferencia de dos botellas

Para evaluar la preferencia posterior a la adaptación de consumo al etanol usamos la prueba de preferencia de dos botellas (agua vs. etanol) antes y después de la manipulación trigeminal (Fig. 11). Usando los mismos grupos anteriores, se les aplicó el paradigma consistiendo en presentarle individualmente a cada rata dos botellas: agua y etanol (8/20% dependiendo de la concentración anteriormente usada para cada rata) a libre acceso por 48 hrs y registramos los consumos en volumen (ml); las botellas eran cambiadas de lugar a las 24 hrs para descartar que el consumo era por preferencia de lugar.

Fig. 11

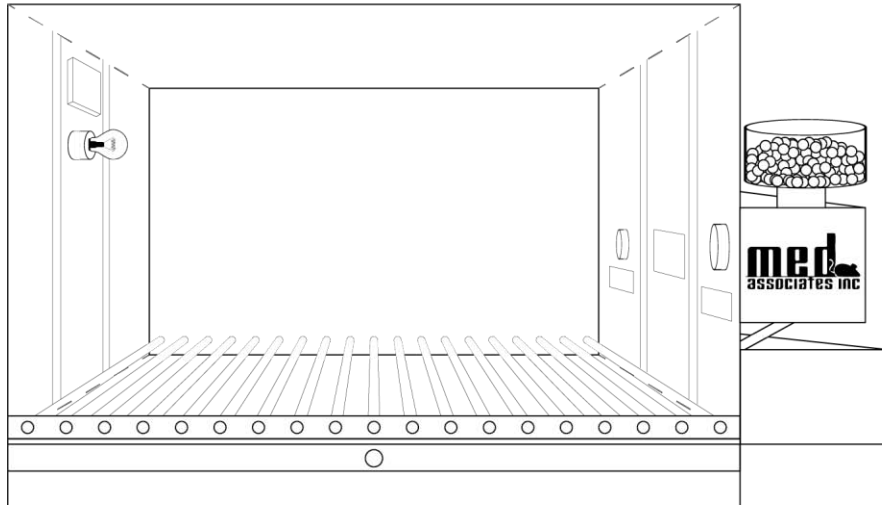


## Programa de reforzamiento fijo y progresivo

Las sesiones tanto de entrenamiento y de experimentación fueron realizadas en una cámara modular operante (Med Associates, Inc., Georgia, VT) que mide 30.5cm x 24.0cm x 29.0cm, con paredes superior, trasera y delantera de plexiglás transparente, paredes laterales de acero inoxidable. Suelo de rejilla compuesta por 19 varillas de 4.8mm (diámetro) espaciadas a 1.6cm de distancia. Cada cámara está compuesta por dos palancas retráctiles situadas en ambos lados de la pared derecha, separadas por un despachador de recompensas (sólida o líquida), el

líquido es controlado por una palanca que surte un volumen de 0.1 ml de líquido. Por último, cuenta con una luz superior en la pared opuesta que se enciende durante toda la sesión (Fig 12) [57].

Fig. 12



*Urbina*

Los datos de la sesión fueron recolectados por una computadora interfaz. El tipo de entrenamiento será programado y escrito en lenguaje de notación Medstate (Med Associates, Inc.)

### Reforzamiento fijo (FR)

Como primer objetivo buscamos la formación del hábito del consumo de etanol, sin que les resulte aversivo a las ratas, por lo que en esta fase se les condiciona a su consumo.

Las ratas son privadas con anticipación por 22 hrs aproximadamente. En el día 1, las ratas se colocan en las cajas operantes durante 1hr, en la cual cada 60 segundos se entrega libremente una disolución preparada al 0.2% de sucralosa (sin ser presionada la palanca),

con el fin de que cada rata se dé cuenta de la existencia del líquido en la caja.

En el día 2 (con misma privación previa) se programa una sesión diferente en la que la rata recibe la recompensa al presionar 1 vez la palanca izquierda, activando la entrega de 0.1ml de la solución preparada con sucralosa. Lo mismo para el día 3.

Después de todas las sesiones se da un tiempo de recuperación, aproximadamente 1hr, en la que las ratas reciben agua ad libitum. La sesión del día 2 durará sólo 30 min y se continúa con ésta hasta el día 10 aproximadamente, para asegurarnos de encontrar un comportamiento estándar entre las ratas, con el fin de obtener una base útil para las futuras comparaciones.

Una vez estandarizado el consumo de las sesiones anteriores después se prepara una disolución de 5% de etanol + 0.2% de sucralosa y se efectúa el mismo programa de sesiones por 30min. Esta fase de la prolongamos hasta el día 20 aprox. para buscar la misma estabilización anterior [58].

### Reforzamiento progresivo (PR)

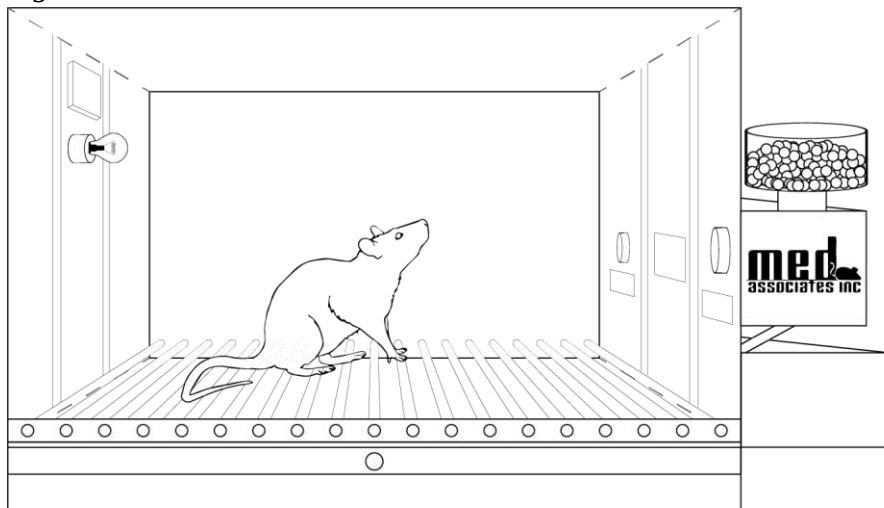
Los aspectos motivacionales pueden ser examinados mediante un programa de reforzamiento progresivo, este nos muestra la cantidad que un animal está dispuesto a trabajar para obtener el refuerzo pues el requisito de respuesta va incrementando durante la sesión.

En este caso para evaluar la motivación de los animales por la obtención del etanol se modifican el requisito comenzando con 1 palanqueo, e ir sumando 3, es decir comienza en 1, después 4, 7, 10 y así sucesivamente para obtener una sola entrega de la recompensa de

etanol. Las primeras 3 serán con privación de agua y después se les dejó agua ad libitum para descartar que su motivación no sea la sed sino comprobar que las ratas ya consumían etanol por sí solas.

Es normal que por las pausas entre cada palanqueo la duración de la sesión se prolongue mucho más. En este caso se extendió hasta las 2 horas ya que ésta entrega gradual es lenta porque las ratas no están privadas de agua, permitiendo un consumo moderado de etanol antes de llegar al punto máximo de respuestas.

Fig. 13



Urbina



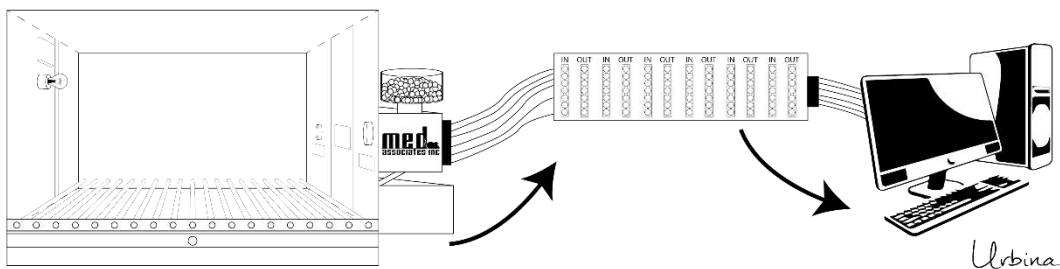
## Software y hardware

### MED-PC

MED-PC es un programa que implementa el dialecto Medstate Notation (MSN) desarrollado para la programación y control en tiempo real de las cajas de condicionamiento operante. Se ejecuta con una PC de 640 MB de RAM, que tiene la capacidad de controlar hasta 8 estaciones experimentales (cajas de condicionamiento operante) funcionando de forma independiente (cada uno con los mismos o diferentes procedimientos experimentales) de forma simultánea, con un máximo de 8 entradas y 32 salidas por cada estación. [58]

Hay 3 ventajas principales de uso de MED-PC: [55]

- La programación puede modificarse de acuerdo a las necesidades del experimento.
- La notación de lo que sucede en cada caja es registrado de forma inequívoca.
- El lenguaje en el que se registran las sesiones permite que se use otros programas para ser analizados estadísticamente de forma relativamente fácil.



## **MATLAB**

MATLAB es una plataforma integral que abarca todo el proceso de la neurociencia experimental, convirtiéndose en un instrumento poderoso y eficaz en la programación, recopilación de datos, control experimental, análisis y moldeado de datos para su utilización en múltiples representaciones gráficas. Los puntos fuertes de MATLAB son el manejo gráfico de datos con algoritmos altamente avanzados y su capacidad para generar fácilmente varios tipos de visualización de los resultados de las sesiones experimentales [55].

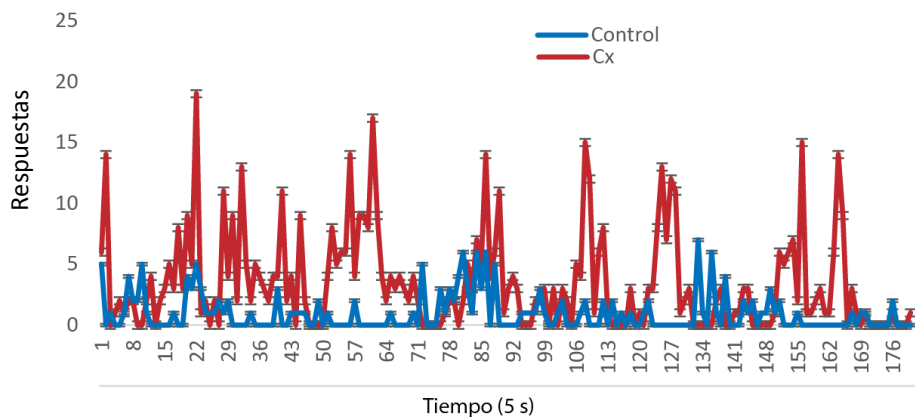
En concreto nosotros lo usamos para en análisis estadístico de los datos obtenidos en las sesiones de las cajas Med, generando dos tipos de gráficas: Temporal raster plot y Peri stimulus time histogram (descritas anteriormente).

## Resultados

### A) Existen cambios sensoriales tras una lesión nerviosa del nervio mentoniano.

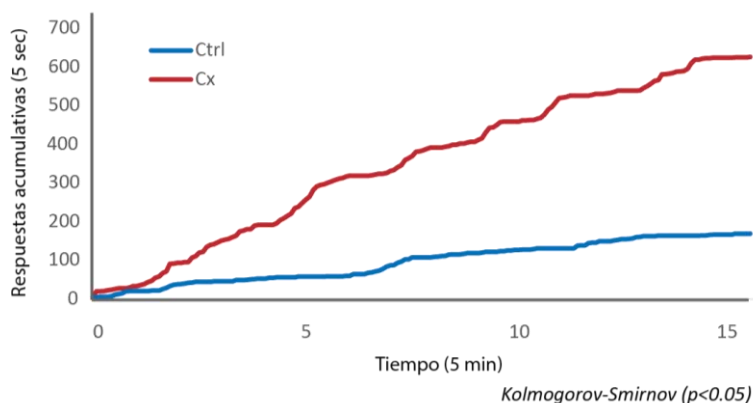
Las alteraciones sensoriales por la hiperalgesia provocada tras la transección nerviosa son claramente evidentes tras comparar el número de respuestas entre las ratas con lesión y sin lesión. Como podemos notar en la fig 14, vemos el número de respuestas es mucho mayor en las ratas con hiperalgesia (línea roja) en comparación con nuestros controles (línea azul). En ésta gráfica se representa el número de veces que las ratas respondían en intervalos de 5 segundos.

Fig. 14



Para evaluar los registros de forma estadística se recurrió a un análisis llamado Kolmogorov-Smirnov, fig 15, en el que se representan los promedios de respuestas en intervalos de 5 segundos de manera acumulativa, de tal forma que se obtienen líneas ascendentes; entre más crezca, como lo es el caso de los grupos con cirugía (línea roja), quiere decir que hubo muchas más respuestas en contraste con las ratas control (línea azul).

Fig. 15

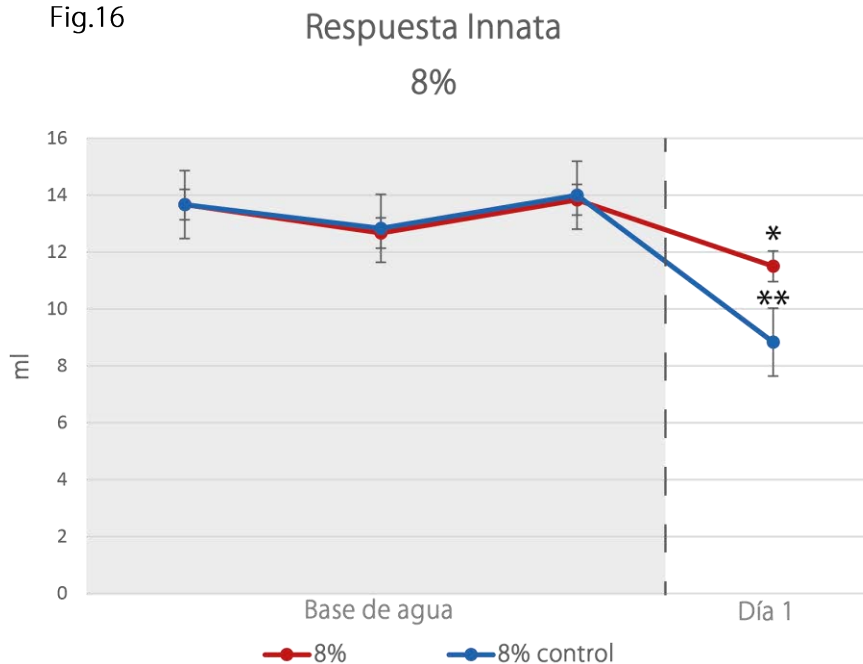


Además de representar cambios evidentes de manera sensorial, la cirugía resultó ser relativamente sencilla, de rápida recuperación y poco invasiva, lo cual es de gran importancia a tomar en cuenta especialmente en modelos de dolor, en el que se busca que el experimento sea lo menos desagradable para el animal.

## **B) La lesión trigeminal no altera la respuesta innata al consumo de EtOH.**

La primera vez que las ratas ingieren etanol presentan neofobia. La conducta neofóbica muestra que el etanol como primera impresión es percibido por la rata como una sustancia potencialmente nociva, esto se debe a que dicho estímulo se percibe por la vía del dolor a través del sistema trigeminal. En este proyecto evaluamos la respuesta neofóbica a 8 y 20% de etanol, en comparación con la base de consumo de agua (Fig. 16 y 17) área gris, sesiones 1-3 el consumo de etanol al 20% es menor en comparación con los grupos al 8% pero no presenta diferencias significativas (T Student,  $P(T \leq t) = 4.2069$ ,  $p < 0.05$ ). Por lo que podemos decir que una lesión trigeminal no altera realmente la respuesta innata al

Fig.16



Respuesta aversiva innata al 8% de EtOH.

La línea base nos muestra el consumo de agua en el área gris y posteriormente la primera impresión (día 1).

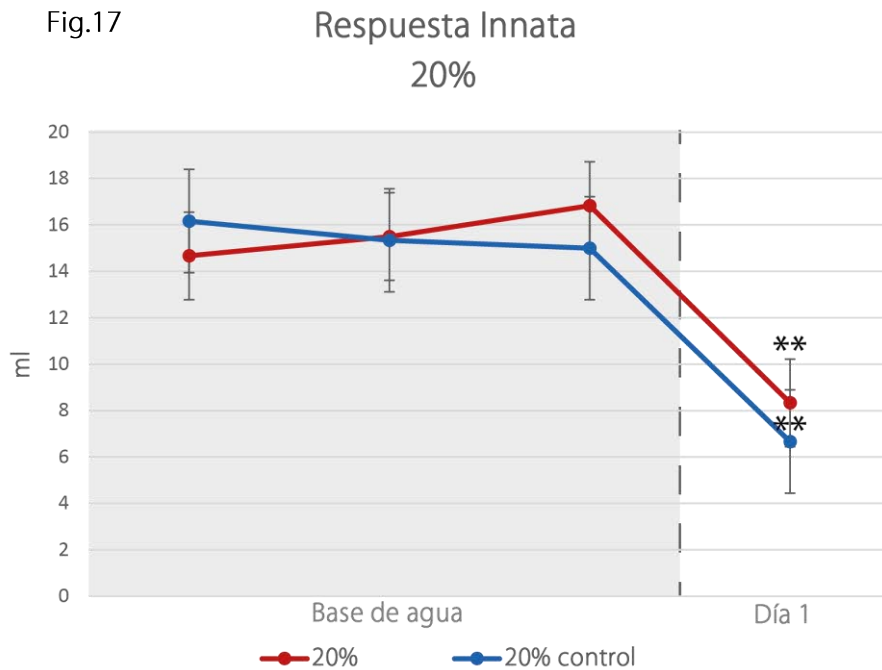
\* comparación entre EtOH y la línea base. T Student,  $p < 0.05$

\*\* comparación entre EtOH y la línea base. T Student,  $p < 0.005$

EtOH. Todas las sesiones de exposición al etanol (8 y 20%) son menores al consumo de agua, lo cual indica que el etanol en ambos casos resulta aversiva.

Una menor concentración de etanol 8%, genera un grado de aversión menor comparada con el 20%, es decir la aversión se presenta de manera proporcional a la concentración de EtOH, de tal forma que a mayor concentración, más aversivo. Además comparando la base de agua vs. el consumo del día 1 nos resultó estadísticamente diferente (8% T Student,  $P(T \leq t) = 0.004684746$ , control  $P(T \leq t) = 0.000333529$ , 20%

Fig.17



Respuesta aversiva innata al 20% de EtOH.

La línea base nos muestra el consumo de agua en el área gris y posteriormente la primera impresión (día 1).

\* comparación entre EtOH y la línea base. T Student,  $p < 0.05$

\*\* comparación entre EtOH y la línea base. T Student,  $p < 0.005$

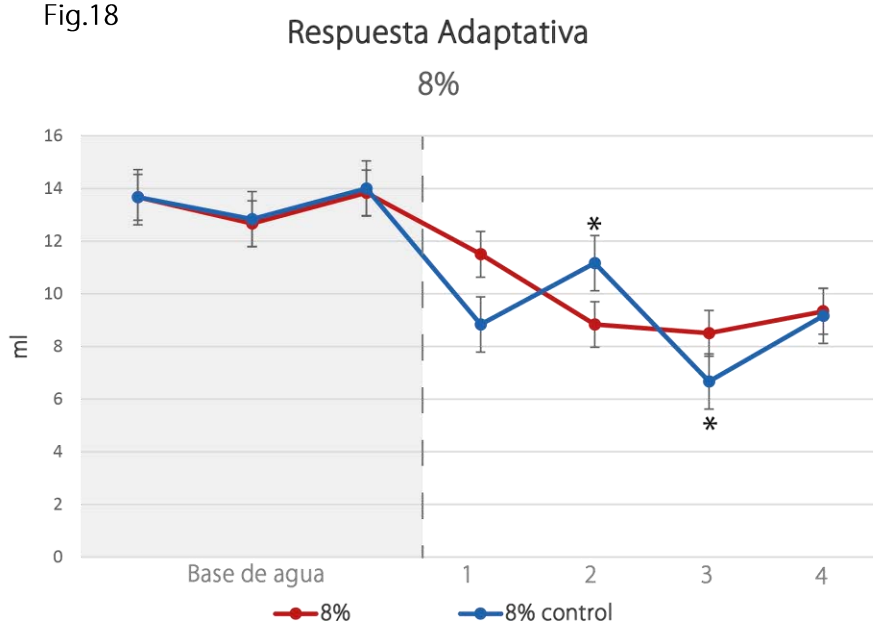
cx  $P(T \leq t) = 4.20686 \cdot 10^{-8}$ , control  $P(T \leq t) = 5.25243 \cdot 10^{-6}$ ,  $p < 0.05$ ); de tal forma que la primera exposición al EtOH despierta una respuesta neofóbica importante, la cual requiere 3 exposiciones aproximadamente para ser atenuada.

### **C) La lesión trigeminal si altera la respuesta adaptativa al consumo de EtOH.**

La respuesta adaptativa comprende el periodo posterior a la primera vez que se ingiere el etanol, en esta etapa evaluativa se reconocerá al etanol como "familiar" o "dañino", si el estímulo es dañino

no se inducirá su consumo y si es familiar su consumo incrementará en las siguientes exposiciones al estímulo. Para poder evaluarlo, tomamos en cuenta los 3 días posteriores al día 1 (día 2, 3 y 4) (Fig. 18 y 19), de tal forma que al analizarlos observamos que hay cambios estadísticamente significativos (8% cx vs. control, t Student,  $P(T \leq t) = 0.00021594$ , 20% cx vs. control,  $P(T \leq t) = 3.6552^{-09}$ ) entre los grupos con lesión y sin lesión. Es interesante como el grupo sin una lesión parece sentir su consumo dependiendo del día anterior, es decir, si bebe una cantidad considerable, de forma automática al día siguiente no bebe tanto; y al contrario, si bebe poco, al día siguiente bebe mucho más; lo mismo para ambas concentraciones. Esta respuesta preventiva no se presenta en los grupos

Fig.18

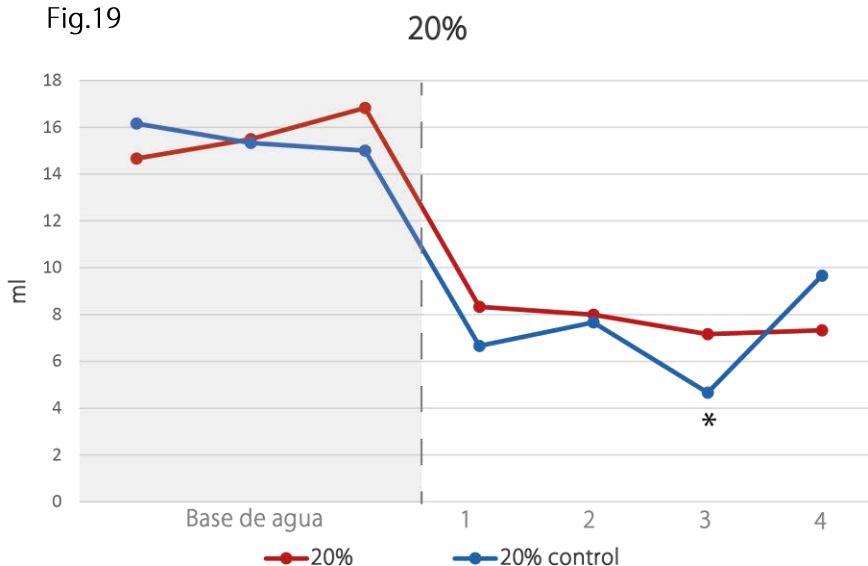


Primeros cuatro días de exposición al EtOH al 8%.

La línea base de consumo de agua se muestra en el área gris, posteriormente vemos los días de exposición 1, 2, 3 y 4 de EtOH.

\* comparación cx vs. control, t Student,  $p < 0.05$ .

Fig.19



Primeros cuatro días de exposición al EtOH al 20%.

La línea base de consumo de agua se muestra en el área gris, posteriormente vemos los días de exposición 1, 2, 3 y 4 de EtOH.

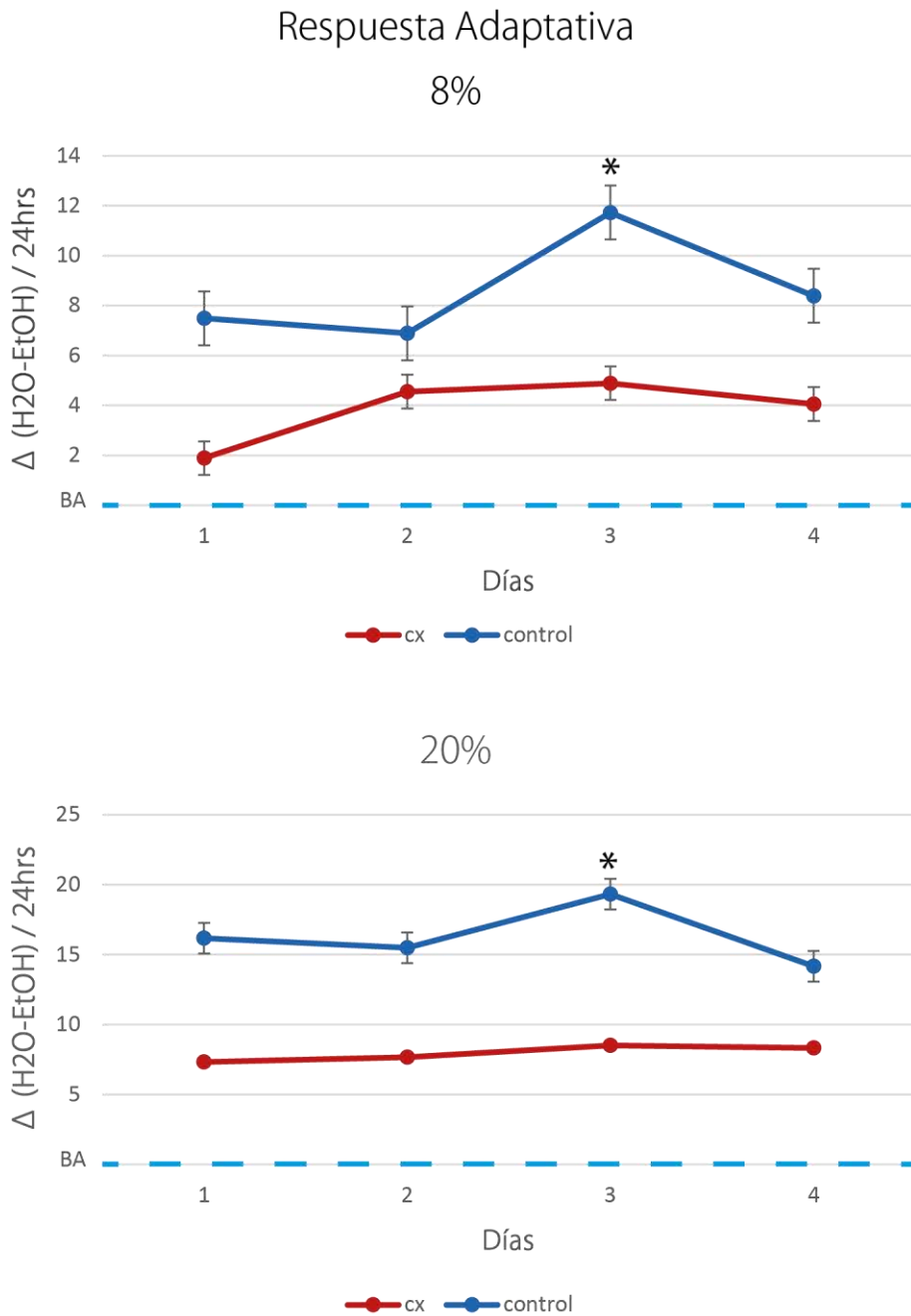
\* comparación cx vs. control, t Student,  $p < 0.05$ .

con lesión mentoniana, donde podemos apreciar que no existe esa forma homeostática al consumo de EtOH y es muy parecido durante el paso de los días.

Por otro lado, quisimos estabilizar los consumos para cada rata, ya que durante el experimento notamos que la cantidad bebida y los requerimientos diarios para cada sujeto eran muy diferentes, es decir, para una rata podía representar un consumo de EtOH mucho mayor que otra pero en realidad no era tanta la diferencia con respecto a su propio consumo previo de base de agua; por esa razón llevamos a cabo una normalización, en la que la base de agua fue tomada como 0 y la comparación con el EtOH consumido cada día vs. la línea base, representaba que tanta diferencia tenían. De esta forma obtuvimos una



Fig.20

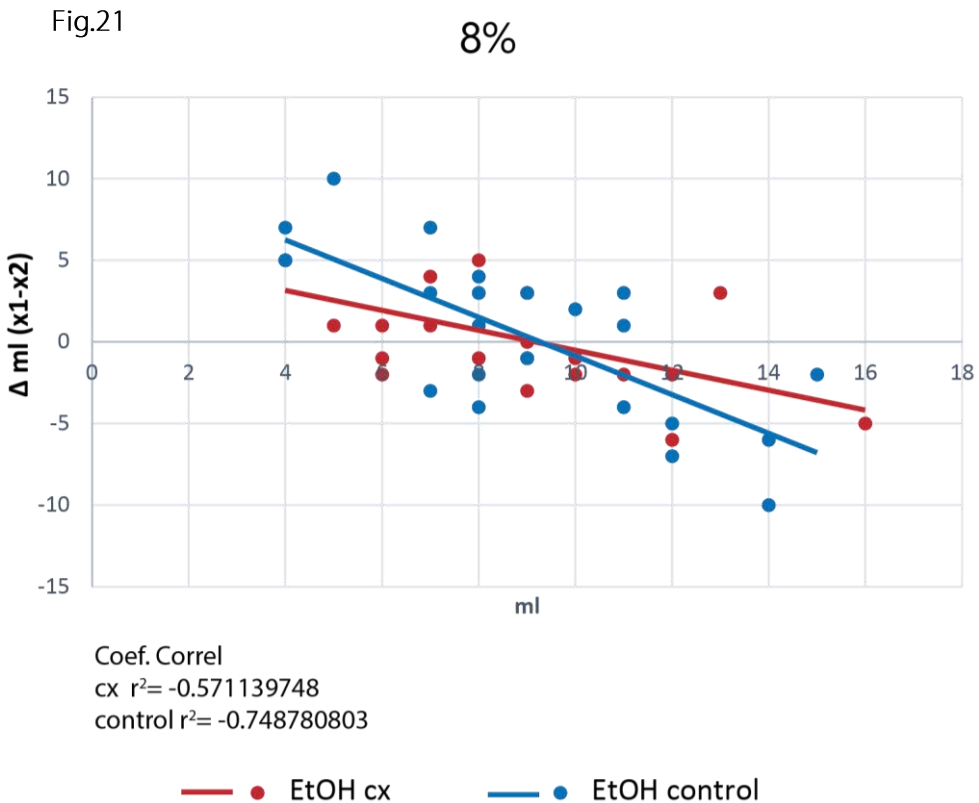


Primeros cuatro días de exposición al EtOH al 8% y 20%.  
Normalizado a la base de agua (BA).

\* comparación cx vs. control, t Student,  $p < 0.05$ .

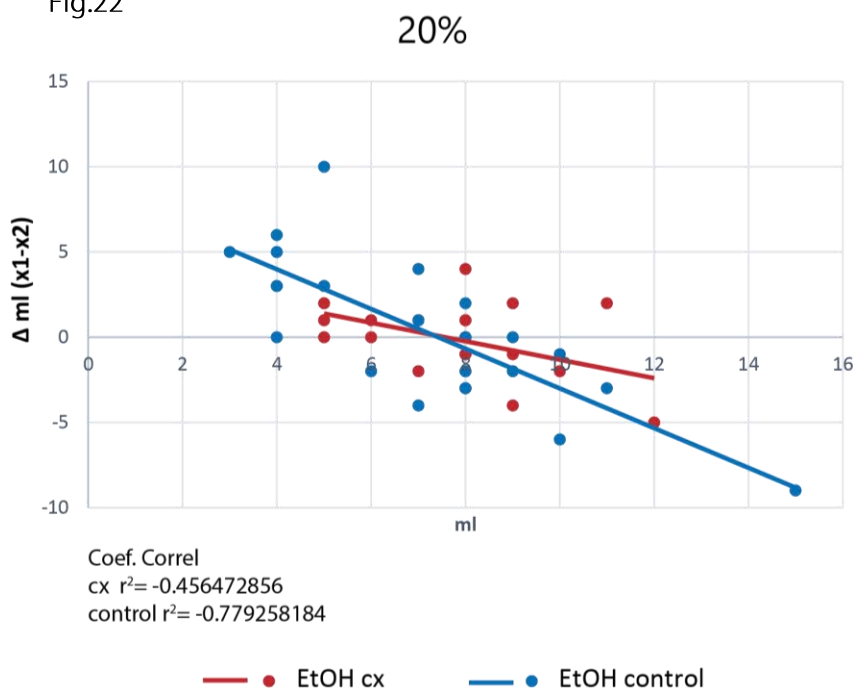
representación más evidente del comportamiento de senso al consumo de etanol (Fig. 20).

Después de encontrar estos resultados quisimos comprobar de manera matemática la relación de consumo consecuente al día precedente. Como podemos observar en la figura 21 y 22, se observa un plano en el que se considera al eje X como los ml que se consumen durante una sesión y al eje Y como la diferencia del día estudiado menos el día precedente. Es así que nos resultan unas pendientes, que entre más pronunciadas, como lo es el caso de los grupos sin lesión, nos indican que el consumo es inversamente proporcional, es decir si X vale poco, en consecuencia Y valdrá más, en otras palabras a poco consumo un día anterior, será mayor el resultado al día siguiente; cumpliéndose así que el



trigémino participa en la detección y senso del consumo de EtOH. En contraste, si la pendiente resulta ser muy plana, nos indica que X y Y casi no difieren, es decir, que el consumo está siendo muy parecido comparando un día anterior con un posterior, como lo es el caso de los grupos con lesión mentoniana, luego entonces parece ser que alteración trigeminal propicia que EtOH no esté siendo detectado como para poder ser regulada su ingesta.

Fig.22

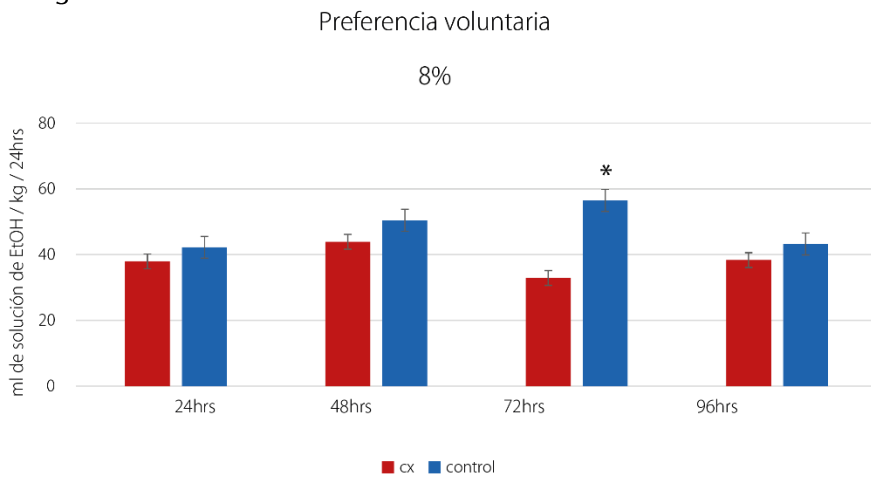


#### **D) La lesión trigeminal no altera la respuesta de preferencia al consumo voluntario de EtOH.**

La respuesta preferencial posterior a varias exposiciones previas de EtOH podría ir incrementando, pues en la mayoría de las situaciones parece ser que el sujeto va adaptándose a la concentración consumida e incluso puede llegar a aumentar considerablemente como lo es en los casos de alcoholismo. Hipotéticamente, esto podría estar alterado tras

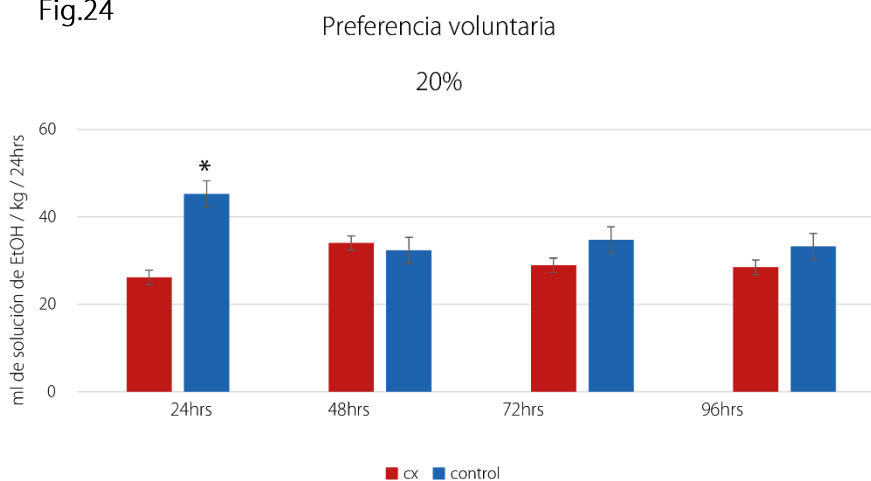
una lesión trigeminal. Una forma de medir la consecuente motivación a la respuesta adaptativa al consumo de EtOH de manera voluntaria fue el paradigma de dos botellas. En la figura 23 y 24, contrario de lo que nosotros esperábamos, no encontramos cambios significativos constantes entre las ratas con lesión y control, en ambas concentraciones (8% cx vs. control, t Student,  $P(T \leq t) = 0.0942419$ , 20% cx vs. control,  $P(T \leq t) = 0.0940$ )

Fig.23



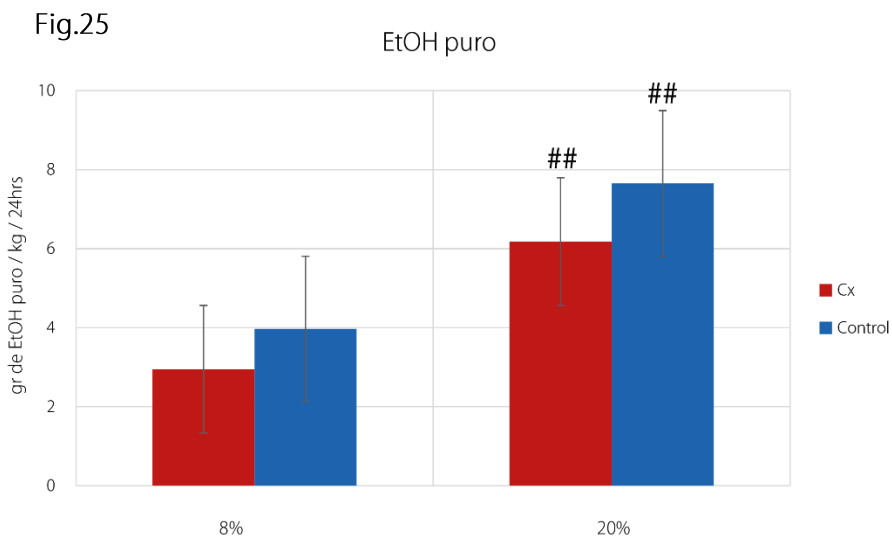
\* comparación cx vs. control / 24 hrs, t Student,  $p < 0.05$

Fig.24



\* comparación cx vs. control / 24 hrs, t Student,  $p < 0.05$

Sin embargo si realmente queríamos comparar la ingesta a EtOH, calculamos los gr de EtOH puro consumidos por los grupos con lesión y sin lesión (Fig. 25). Si comparamos estadísticamente los grupos con lesión vs. los controles no se ve ninguna diferencia para cada concentración (8% cx vs. control, t Student,  $P(T \leq t) = 0.0942419$ , 20 % cx vs. control, t Student,  $P(T \leq t) = 0.0940569$ ). No obstante al analizar los grupos, 8% vs 20%, notamos que si hay una diferencia estadística entre las concentraciones, de manera sorprendente las ratas con concentración de 20% estaban consumiendo mucho más gr de EtOH puro que las ratas con la solución al 8% (cx 8% vs. 20%, t Student,  $P(T \leq t) = 0.000407$ , control 8% vs. 20%, t Student,  $P(T \leq t) = 0.000388$ ). Esto nos refleja entre mayor sea la concentración, mayor va a ser la motivación por consumir de manera voluntaria el EtOH, pues parece ser de manera proporcional tanto en las ratas con lesión, como en los controles.



Estandarizado al peso en kg de cada rata.

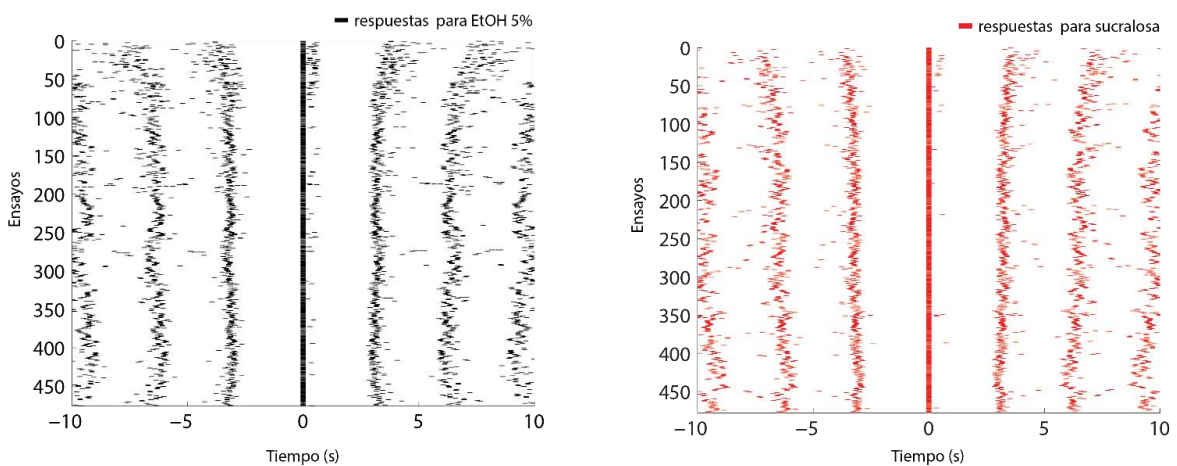
\* comparación entre cx vs. control al 8% y 20%, t Student,  $p < 0.05$

# comparación entre 8% vs. 20% con cx y controles, t Student,  $p < 0.05$ .

**E) La autoadministración de etanol a bajas concentraciones es muy similar al de sustancias dulces; a concentraciones altas es altamente aversivo.**

Para poder medir la motivación por consumir etanol, comparamos el consumo de etanol con el de sucralosa, un edulcorante artificial que no tiene efectos metabólicos post-pandriales, demostramos que son muy similares sólo a bajas concentraciones de etanol, sin embargo el etanol es escasamente recompensante y muy aversivo a altas concentraciones, la figura 26, muestra una gráfica tipo raster en la que se muestra la conducta motora para sucralosa (derecha) y para etanol al 5% (izquierda), cada punto muestra la presión de una palanca para obtener sucralosa o etanol; en cero se alinean todas las respuestas, se puede apreciar la conducta rítmica y oscilatoria 10 segundos antes y 10 segundos después de cada tiempo en el cual la rata presionó la palanca para recibir etanol, es muy claro cómo los palanqueos se agrupan de

Fig.26 Gráfica tipo raster plot , de palanqueos para etanol y para sucralosa

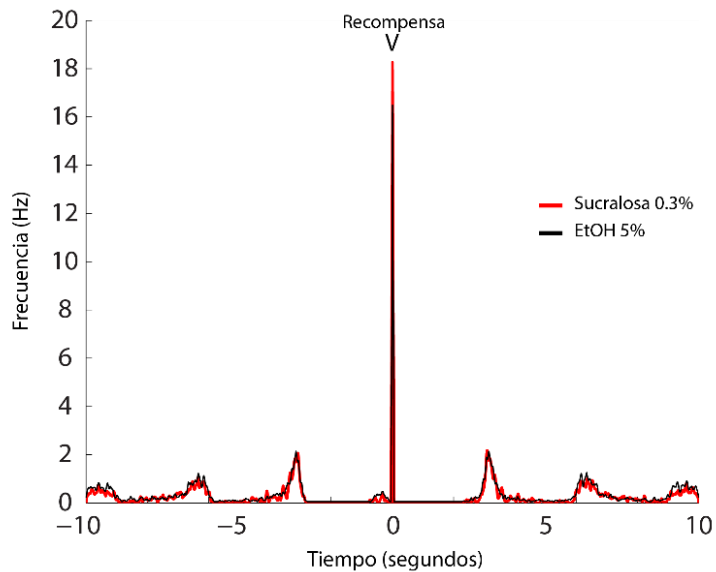


Raster plot de la respuesta motora en el consumo de sucralosa y etanol. Línea media nos muestra todos los palanqueos (ensayos) en una sesión y lo que pasa 10 segundos antes (-10) y 10 segundos después (+10)

forma rítmica y estereotipada, y que es muy similar para ambos estímulos (etanol al 5% y sucralosa al 0.3%), la figura 27 muestra el histograma centrado en el tiempo que recibe la recompensa, la correlación de Pearson ( $r^2=0.99$ ) entre el palanqueo para sucralosa y para etanol muestra la gran similitud a bajas concentraciones de etanol.

Fig.27

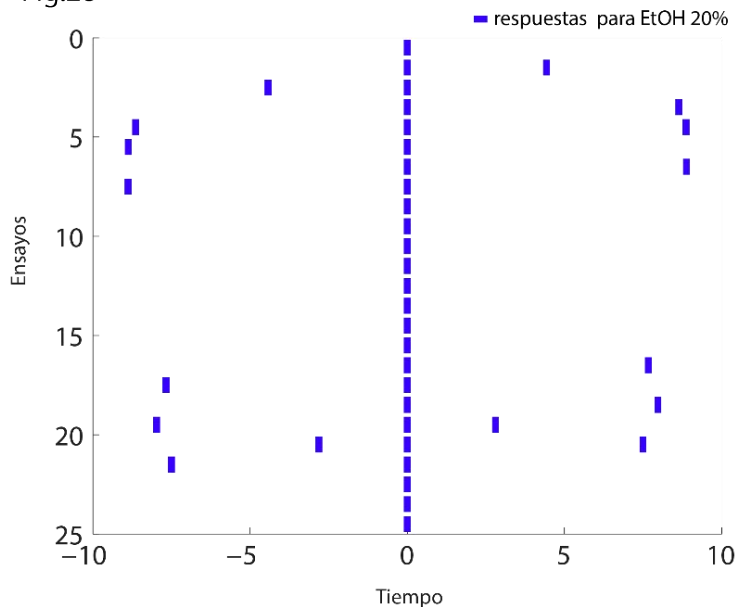
Histograma de tiempo peri-estímulo para sucralosa y etanol



Histograma que muestra la similitud de la relación rítmica entre el tiempo y frecuencia para recibir una recompensa de sucralosa y etanol.

La figura 28 muestra el consumo de etanol al 20%, en el cual la rata sólo llega a 25 ensayos, el roedor no puede mantener una conducta de administración rítmica debido al estímulo, por tal motivo no continuamos evaluando la autoadministración e intentamos evaluar motivación.

Fig.28



Raster plot de la respuesta motora en el consumo etanol al 20%. Línea media nos muestra todos los palanqueos (ensayos) sin ritmo en una sesión y lo que pasa 10 segundos antes (-10) y 10 segundos después (+10).

## **F) La lesión del nervio mentoniano altera la motivación por el consumo de etanol.**

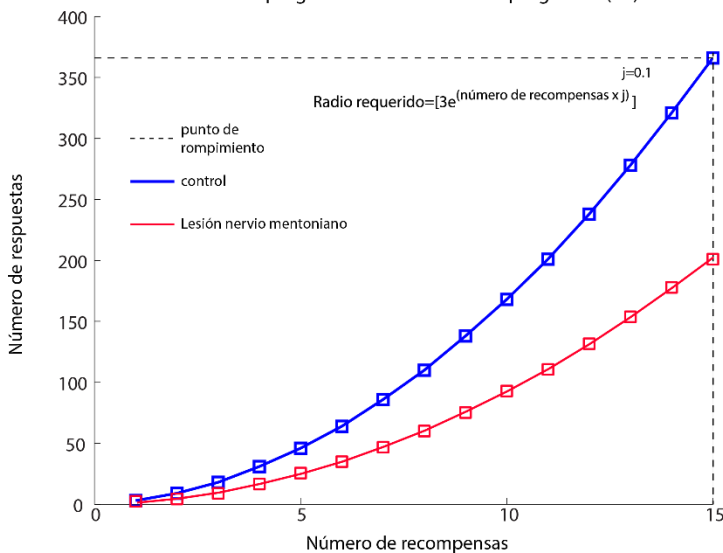
Existen diversas maneras de medir la motivación en ratas, si usamos el paradigma de autoadministración (Radio fijo) en el que deben presionar una palanca para recibir una recompensa (una gota de etanol al 20%), es posible evaluar la conducta motora y la microestructura de la misma (punto b), por otro lado si a esa conducta agregamos un mayor grado de exigencia para el roedor, no sólo evaluaremos la conducta motora sino también la motivación por obtener la misma recompensa. Por ejemplo si un trabajador debe realizar una actividad para recibir una recompensa y esta actividad se incrementa por la misma recompensa, llegará el momento en el que el trabajador desista de su trabajo, esto sucede a que la motivación cambia cuando cambia la demanda de trabajo, para mantener la motivación por dicho trabajo se requiere que el trabajador



tenga un incremento proporcional entre el trabajo y la ganancia, si sólo incrementamos el trabajo con la misma ganancia, el trabajador llegará a un punto de rompimiento, el punto máximo de trabajo por la misma recompensa.

Entonces motivación desde la perspectiva conductual se define por una relación entre la recompensa y la demanda de trabajo, en la figura 29 se muestra una relación entre el número de respuestas (trabajo en y), y el número de recompensas (ganancia en x) definido por la siguiente formula:  $R=[3e^{(\text{número de recompensas} \times j)}$

Fig.29 Relación entre el número de respuestas y el número de recompensas en una sesión del programa de reforzamiento progresivo (PR)



Donde R es el número de respuestas que se requieren para llegar al máximo número de recompensas en el menor tiempo posible, como puede apreciarse, el roedor tiene que dar más de 350 respuestas (palanqueos) para llegar a 15 recompensas (gota de 20µL de etanol), al punto de mayor número de respuestas que la rata está dispuesta a dar por un estímulo se le conoce como punto de rompimiento.

Como puede apreciarse, la conducta cambia cuando hay dolor o lesión del nervio mentoniano, hay una disminución en el número de respuestas y la recompensa fue menor en toda la sesión, como es de esperarse en dolor crónico, la motivación por cualquier conducta dirigida a la obtención de una recompensa disminuye.

## Discusión

Como pudimos apreciar, si tomamos en cuenta sólo la conducta a la respuesta innata (primera impresión) parece que una lesión trigeminal no está afectando directamente el sistema sensorial, sin embargo existen estudios (Höckfelt T y colaboradores 2013) [62], en los que plantean que una lesión neuropática altera la expresión de los canales TRPV por la degeneración axónica y desmielización producida; tomando en cuenta esto, y además agregamos que nuestros resultados de hiperalgesia a la acetona mostraron cambios evidentes, una de las alternativas sugeridas para determinar los cambios sensoriales es evaluar a nivel celular la expresión de los receptores activados por etanol (TRPV1) en cortes histológicos del epitelio lingual marcados por inmunohistoquímica a diferentes tiempos de exposición, pues si el etanol en un inicio es aversivo están sucediendo alteraciones receptoras que ayudan a los roedores a consumirlo. ¿El estímulo del EtOH podría transformarse a recompensante después de un proceso de adaptación a nivel molecular?, ¿Podría estar participando el sistema trigeminal en el desarrollo de una adicción? O al contrario, ¿podría una lesión trigeminal propiciar el exacerbar o impedir una adicción al EtOH?

Por otro lado de acuerdo con los resultados, podemos observar que las ratas presentan una aversión evidente como primera impresión al etanol, contrario a lo que proponen en un estudio anterior, donde muestran que el etanol al 20% resulta recompensante (E. Augier y colaboradores en el 2014) [63], encontramos que las ratas en condiciones normales no atenúan la neofobia sino hasta el 4° día y no alcanzan los niveles de consumo que tenían en la base de agua, es decir requieren la ingesta persistente de etanol para poder aceptarlo y atenuarlo.

Otro aspecto importante es la conducta adaptativa posterior al presentarse un nuevo estímulo, en un estudio de reciente publicación por Ji X y colaboradores de la Universidad de Massachusetts [64] encontraron que las aferencias glutamatérgicas de la amígdala, que participa en situaciones de miedo y ansiedad, eran menores al paso de las exposiciones de consumo de EtOH, lo cual explica nuestros resultados en los que en condiciones normales las ratas sienten su consumo al etanol por la participación del sistema córtico límbico y que alteraciones neuropáticas si están alterando la respuesta homeostática de prevención al consumo. Además en una publicación por el Dr Howerfields [65], explica que en un modelo realizado por el Dr. Schwartz et al [66], en roedores con dolor crónico lo que parece ser alterado son los receptores del glutamato en el NAc, es decir la expresión de los receptores AMPA era menor, lo cual explica la baja motivación que tienen los sujetos que padecen de dolor crónico. Es por eso que en los roedores con la constricción mentoniana no presentan la modulación al EtOH, haciendo su consumo bajo y de niveles constantes entre los días. Pero de forma opuesta, basándonos en nuestros resultados, es interesante cómo a pesar del dolor crónico provocado, parece ser que la motivación por el consumo a libre elección después de varias exposiciones al 8 y 20% no se ve alterado con respecto a los roedores con lesión. Incluso entre más concentración, mayor es el consumo de EtOH. ¿Estará adaptándose el sistema córtico límbico para que a pesar de las alteraciones neurodegenerativas, la motivación aumente?. Las posibles respuestas podrían ser encontradas tras la realización de estudios de optogenética para los circuitos específicamente entre en NAc y la amígdala.

Tomando en cuenta la motivación uno de los aspectos propuestos por el doctor Augier y colaboradores, es la capacidad del

etanol de mimetizar sustancias dulces a nivel orofacial. ¿Cómo podría ser similar la ingesta de etanol al dulce? Los resultados demuestran algo que el etanol es aversivo, tanto a 8 y 20 % produce una disminución en la ingesta con respecto a agua. Sin embargo usando un paradigma conductual en el que la rata debe demostrar motivación por etanol y comparamos la conducta con la motivación por sacarina, nuestros resultados reflejan que las bajas concentraciones de etanol pueden mimetizar el sabor dulce, y la conducta de ingesta es casi igual; sin embargo, no así cuando se administra al 20%. Es muy interesante que probablemente haya un componente gustativo activado durante la ingesta de etanol, por lo que lesiones del nervio facial podrían generar alteraciones en la ingesta de etanol.

En un estudio previo (K. Agnieszka, 2003) [67] en el que lesionan la cuerda del tímpano (nervio facial) reportan no encontrar cambios asociados a la ingesta y autoadministración de etanol a bajas concentraciones (2 y 4% de etanol) en el grupo con lesión, Esto nos sugiere que los receptores gustativos del nervio facial no están respondiendo al estímulo del etanol, y en consecuencia no produce alteraciones en áreas cerebrales relacionadas con la conducta. Lo anterior se comprobó por un artículo publicado en el mes de Mayo del presente año, en el que Legastelois [68] y colaboradores proponen la participación de una fosfatasa en neuronas estriatales, la cual es responsable de la conducta aversiva al etanol, probablemente los cambios inducidos a nivel de sistema nervioso central que producen un incremento en la ingesta de etanol sean la disminución de dicha fosfatasa en el circuito de recompensa. Lo anterior abre un panorama para el estudio de la expresión de la fosfatasa durante la administración persistente de etanol y sobre todo cuando hay una lesión del nervio trigémino, en cuyo caso la

expresión de receptores sensibles al etanol esta exacerbada. Los modelos conductuales propuestos en este proyecto, nos da las bases para continuar experimentos a nivel neurofisiológico para dilucidar los procesos involucrados en la fisiopatología del dolor, en la terapéutica para controlarlo y en los cambios fisiológicos que disparan las conductas compulsivas de adicción.

Visualizando la importancia y las implicaciones clínicas en los pacientes con dolor neuropático podemos encontrar alteraciones como alodinia térmica, cambios en la percepción de estimulantes sensoriales y modificaciones en la expresión de receptores periféricos del nervio, algunos otros efectos secundarios van relacionados en consecuencia de la afectación de las áreas que son dañadas tras una lesión nerviosa, como lo son trastornos de sueño, déficit de atención, estrés, cuadros de depresión y abulia. Esto nos alerta de la importancia de los investigaciones futuras, por la gran influencia de las alteraciones neurodegenerativas sobre conductas cotidianas en los pacientes que sufren dolor neuropático crónico; centrándonos en el estudio de las consecuencias específicas y en concreto encontrar más claridad en las áreas cerebrales implicadas en las que pueda estar causando alteraciones para poder así mejorar los tratamientos y que éstos sean tempranos.

## Referencias

1. Álvarez-Nemegyei JA, Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Cardiel MH, et al. Prevalence of musculoskeletal pain and rheumatic diseases in the Southeastern region of México. A COPCORD-base community survey. *J Rheumatol* 2011;86:21-25.
2. Gilbert SD, Clark TM, Flores CM. 2001. Antihyperalgesic activity of epibatidine in the formalin model of facial pain. *Pain* 89:159–165.
3. Gallas-Torreira MM, Reboiras-López MD, García-García A, Gándara-Rey J. Parestesia del nervio dentario inferior provocada por un tratamiento endodóncico. *Med Oral* 2003;8:299-303.
4. Romero-Reyes, M., S. Akerman, E. Nguyen, A. Vijjeswarapu, B. Hom, H.W. Dong, and A.C. Charles. 2012. Spontaneous Behavioral Responses in the Orofacial Region: A Model of Trigeminal Pain in Mouse. *Headache*. 53(1):137-51, 2012.
5. Melzack, R. y Casey, K.L. (1968). Sensory, motivational and central control determinants of pain: A new conceptual model. En D. Kenshalo (Ed.). *The skin senses* (pp. 423-443). Springfield: C.C. Thomas.
6. Gold, M.S. & Gebhart, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat. Med.* 16, 1248–1257 (2010).
7. Fields, H.L. Pain: an unpleasant topic. *Pain* 6 (suppl.): S61–S69 (1999).
8. Lee, M.C. & Tracey, I. Imaging pain: a potent means for investigating pain mechanisms in patients. *Br. J. Anaesth.* 111, 64–72 (2013).

9. Lee, M.C. & Tracey, I. Unravelling the mystery of pain, suffering, and relief with brain imaging. *Curr. Pain Headache Rep.* 14, 124–131 (2010).
10. Redgrave, P., Gurney, K. & Reynolds, J. What is reinforced by phasic dopamine signals? *Brain Res. Rev.* 58, 322–339 (2008).
11. Denton, D.A., McKinley, M.J., Farrell, M. & Egan, G.F. The role of primordial emotions in the evolutionary origin of consciousness. *Conscious. Cogn.* 18, 500–514 (2009).
12. Craig, A.D. How do you feel—now? The anterior insula and human awareness. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 59–70 (2009).
13. Apkarian, A.V., Baliki, M.N. & Farmer, M.A. Predicting transition to chronic pain. *Curr. Opin. Neurol.* 26, 360–367 (2013).
14. Apkarian, A.V., Baliki, M.N. & Geha, P.Y. Towards a theory of chronic pain. *Prog. Neurobiol.* 87, 81–97 (2009).
15. Bushnell, M.C., Ceko, M. & Low, L.A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 502–511 (2013).
16. Berger, J.V. et al. Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Res. Rev.* 67, 282–310 (2011).
17. Burgess, G. & Williams, D. The discovery and development of analgesics: new mechanisms, new modalities. *J. Clin. Invest.* 120, 3753–3759 (2010).
18. Dodick, D.W. et al. Safety and efficacy of LY2951742, a monoclonal antibody to calcitonin gene-related peptide, for the prevention of



- migraine: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol.* 13, 885–892 (2014).
19. Burstein, R. & Giesler, G.J. Jr. Retrograde labeling of neurons in spinal cord that project directly to nucleus accumbens or the septal nuclei in the rat. *Brain Res.* 497, 149–154 (1989).
  20. Apkarian, A.V., Bushnell, M.C., Treede, R.D. & Zubieta, J.K. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur. J. Pain* 9, 463–484 (2005).
  21. Schultz, W. Updating dopamine reward signals. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 229–238 (2013).
  22. Navratilova E., Porreca F. Reward and motivation in pain and pain relief. *Nat Neurosci.* 2014 Oct 25;17(10):1304-12.
  23. Rushworth, M.F. & Behrens, T.E. Choice, uncertainty and value in prefrontal and cingulate cortex. *Nat. Neurosci.* 11, 389–397 (2008).
  24. Rushworth, M.F., Noonan, M.P., Boorman, E.D., Walton, M.E. & Behrens, T.E. Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. *Neuron* 70, 1054–1069 (2011).
  25. Wiech, K. & Tracey, I. Pain, decisions, and actions: a motivational perspective. *Front. Neurosci.* 7, 46 (2013).
  26. Ritz, M. C.; Garcia, J. M.; Protz, D.; Rael, A. M.; George, F. R.: Ethanol reinforced behavior in P, Np, Had and Lad Rats differential genetic regulation of reinforcement and motivation. *Behav. Pharmacol.* 5:521-531 (1994).

27. Apkarian, A.V., Hashmi, J.A. & Baliki, M.N. Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain* 152, S49–S64 (2011).
28. Gear, R.W. & Levine, J.D. Nucleus accumbens facilitates nociception. *Exp. Neurol.* 229, 502–506 (2011).
29. Letzkus, J. J., Kampa, B. M., and Stuart, G. J. (2007). Does spike timing-dependent synaptic plasticity underlie memory formation? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 34, 1070–1076. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04724.
30. Haimer L., Alheid GF, De Olmos JS, et al. (1997) The Accumbens: beyond the core Shell dichotomy. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 9, 354-381.
31. Zahm DS. (2000). An integrative neuroanatomical perspective on some sub-cortical substrates of adaptative responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav Rev* 24:85-105.
32. Dingledine R., McBrian C. (2009) *Basic Neurochemistry: Glutamate and aspartate are the major excitatory transmitters in the brain.* 6th Ed. Siegel G., Agranoff B., Albers R., editos.
33. Fried K, Bongenhielm U, Boissonade FM, Robinson PP: Nerve injury-induced pain in the trigeminal system. *Neuroscientist* 7:155-165, 2001
34. Just, Tino; Pau, Hans-Wilhelm; Steiner, Susanne; Hummel, Thomas, 2007: Assessment of oral trigeminal sensitivity in humans. *European Archives of Oto Rhino Laryngology* 264(5): 545-551

35. Davies AJ, Kim YH, Oh SB: Painful Neuron-Microglia Interactions in the Trigeminal Sensory System. *The Open Pain Journal* 2010, 3:14-28.
36. Akerman S, Romero-Reyes M. Insights into the pharmacological targeting of the trigeminocervical complex in the context of treatments of migraine. *Expert Rev Neurother.* 2013;13(9):1041–1059.
37. Fei Ma, Liping Zhang, Karin N. Westlund. Trigeminal Nerve Injury Promotes Mechanical Hypersensitivity. *Anesthesiology.* Aug 2012; 117(2): 381–388.
38. Hökfelt T., Zhang X., Xu X., Wiesenfeld-Hallin Z. Central consequences of peripheral nerve damage. *Encyclopedia of Pain,* 2122-2126 (2007).
39. Villar M J, Cortés R, Theodorsson E et al. Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin. *Neuroscience,* 33(1989):587–604.
40. White D M. Intrathecal neuropeptide Y exacerbates nerve injury-induced mechanical hyperalgesia. *Brain Research* 750 (1997)(1–2):141–146.
41. Cho H J, Kim J K, Park H C et al. 1998. Changes in brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia, spinal cord, and gracile nuclei following cut or crush injuries. *Experimental Neurology* 154(1):224–230.

42. Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*. 1994;59:369–376. doi: 10.1016/0304-3959(94)90023-X. [PubMed] [Cross Ref]
43. Carlton SM, Lekan HA, Kim SH, Chung JM. Behavioral manifestations of an experimental model for peripheral neuropathy produced by spinal nerve ligation in the primate. *Pain*. 1994;56:155–166. doi: 10.1016/0304-3959(94)90090-6.
44. Hao JX, Yu W, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Capsaicin-sensitive afferents mediate chronic cold, but not mechanical, allodynia-like behavior in spinally injured rats. *Brain Res*. 1996;722:177–180. doi: 10.1016/0006-8993(96)00216-8.
45. King, C.D., Devine, D.P., Vierck, C.J., Mauderli, A. & Yeziarski, R.P. Opioid modulation of reflex versus operant responses following stress in the rat. *Neuroscience* 147, 174–182 (2007).
46. Anderson, E.M. et al. Use of the Operant Orofacial Pain Assessment Device (OPAD) to measure changes in nociceptive behavior. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/50336 (2013).
47. Caterina MJ: Vanilloid receptors take a TRP beyond the sensory afferent. *Pain* 105:5-9, 2003.
48. Kim HY, Park CK, Ch IH, Jung SJ, Kim JS, Oh SB. Differential Changes in TRPV1 expression after trigeminal sensory nerve injury. *J Pain*. 2008; 9:280–288. [PubMed: 18226965]
49. Trevisani M, Gazzieri D, Benvenuti F, Campi B, Dinh QT, Groneberg DA, Rigoni M, Emonds Alt X, Creminon C, Fischer A, Geppetti P,

- Harrison S. Ethanol causes inflammation in the airways by neurogenic and TRPV1-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004; 309:1167–1173.10.1124/jpet.103.064162 [PubMed: 14762103]
50. Jhaveri MD, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V: Inhibition of peripheral vanilloid TRPV1 receptors reduces noxious heat-evoked responses of dorsal horn neurons in naive, carrageenan-inflamed and neuropathic rats. *Eur J Neurosci* 22:361-370 (2005).
51. Elcock C, Boissonade FM, Robinson PP: Changes in neuropeptide expression in the trigeminal ganglion following inferior alveolar nerve section in the ferret. *Neuroscience* 102:655-667, 2001
52. Jarrod M. Ellingson, Bryant C. Silbaugh, and Susan M. Brassler. Reduced Oral Ethanol Avoidance in Mice Lacking Transient Receptor Potential Channel Vanilloid Receptor 1. *Behav Genet.* 2009 January ; 39(1): 62–72.
53. Ishida Y, Ugawa S, Ueda T, Murakami S, Shimada S. Vanilloid receptor subtype-1 (VR1) is specifically localized to taste papillae. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002; 107:17–22.10.1016/S0169-328X(02)00441-2 [PubMed: 12414119]
54. Cleopatra S Planeta. Animal models of alcohol and drug dependence. *Rev Bras Psiquiatr* 2013 ;35 Suppl 2:S140-6.
55. Bures, J. (1998b). The CTA paradigm: terminology, methods, and conventions. En J. Bures, F. Bermúdez-Rattoni y T. Yamamoto (Eds.), *Conditioned taste aversion: Memory of a Special Kind* (pp. 14-25). New York: Oxford University Press.

56. Núñez-Jaramillo, L., Ramírez-Lugo, L., Herrera-Morales, W. & Miranda, M. (2010). Taste memory formation: Latest advances and challenges. *Behavioural Brain Research*, 207, 232-248.
57. Ellingson JM, Silbaugh BC, Brassler SM. Reduced oral ethanol avoidance in mice lacking transient receptor potential channel vanilloid receptor 1. *Behav Genet* 2009;39:62–72.
58. Gribel, G., Belzung, C., Misslin, R. and Vogel, E. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behavior in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav. Pharmacol*, 1993. 4: 637-644.
59. Pickering C, Moreira T, Liljequist S. Delayed access to alcohol accelerates self-administration of alcohol on a progressive ratio schedule. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007 Feb;100(2):109-14.
60. Hodos, W.: Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* 134:943–944; 1961.
61. Stewart, W. J.: Progressive reinforcement schedules: A review and evaluation. *Aust. J. Psychol*. 27:9–22; 1975.
62. Hökfelt T, Zhang X, Villar MJ, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z. Central consequences of peripheral nerve damage. In: McMahon S, Koltzenburg M, Tracey I, Turk DC, editors. *Textbook of pain*. Elsevier; 2013.
63. Augier E., Flanigan M, Dulman RS, Pincus A. Wistar rats acquire and maintain self-administration of 20 % ethanol without water deprivation, saccharin/sucrose fading, or extended access training. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014 Dec;231(23):4561-8.

64. Ji X, Saha S and Martin GE (2015) The origin of glutamatergic synaptic inputs controls synaptic plasticity and its modulation by alcohol in mice nucleus accumbens. *Front. Synaptic Neurosci.* 7:12. doi: 10.3389/fnsyn.2015.00012
65. Howard L Fields. More pain, less gain. *Science* 1 August 2014: Vol. 345 no. 6196 pp. 513-514 DOI: 10.1126/science.1258477
66. N. Schwartz et al., *Science* 345, 535 (2014).
67. K. Agnieszka, et al. Chorda tympani nerve transection does not alter operant oral self-administration of ethanol in the rat. *Alcohol.* 30 (2003) 211–215.
68. Legastelois R., Darcq E., et al. Striatum-enriched protein tyrosine phosphatase controls responses to aversive stimuli: Implication for ethanol drinking. *PLoS ONE.* 2015; 10(5): e0127408. Doi:10.1371/journal.pone.0127408.