



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DEL MODELO DE LESIÓN
NEUROPÁTICA TRIGEMINAL COMO BASE EXPERIMENTAL PARA LA
DISECCIÓN FUNCIONAL DE CIRCUITOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CLAUDIA DANIELA MONTES ÁNGELES

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ISAAC OBED PÉREZ MARTÍNEZ (FESI)

COMITÉ TUTOR:

DR. ABIMAEEL GONZÁLEZ HERNÁNDEZ (INB)

DR. PAVEL ERNESTO RUEDA OROZCO (INB)

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, MARZO 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Los miembros del jurado del examen certificamos que la tesis elaborada por: Claudia Daniela Montes Ángeles, cuyo título es: **“Caracterización conductual del modelo de lesión neuropática trigeminal como base experimental para la disección funcional de circuitos”**, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y de calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

Secretario

Dr. Isaac Obed Pérez Martínez

Vocal

Dra. Aracely Evangelina Chávez Piña

Suplente

Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco

Suplente

Dr. Luis Alberto Tellez Lima

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Maricela Luna Muñoz

Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología) de la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por permitirme formar parte del programa de becas para la realización de estudios de posgrado. CVU/Becario No.: 629850.

Al Dr. Isaac Obed Pérez Martínez, por dirigir el presente trabajo y por el apoyo y guía en mi formación académica y profesional.

Al Dr. Abimael González Hernández y al Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco, miembros de mi comité tutorial, por su atención y contribuciones al desarrollo de este proyecto y de mi formación académica.

A los integrantes del Laboratorio de Neurobiología de las Sensaciones Orales, así como del Laboratorio de Inmunidad Oral y Regulación Ósea, por las contribuciones a este trabajo, además del apoyo a mi crecimiento académico y personal.

El presente proyecto fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología de las Sensaciones Orales de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el financiamiento del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). Proyecto: RA205018.

A mi familia, mis raíces:

David Montes Acosta

Teresita Ángeles Contreras

Miriam Montes Ángeles

ÍNDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Dolor crónico neuropático orofacial.....	4
1.2 Procesamiento del dolor en el sistema trigeminal	4
1.2.2 Procesamiento a nivel central	6
1.3 Desarrollo de dolor crónico neuropático orofacial	9
1.3.1 Alteraciones a nivel periférico	11
1.3.2 Alteraciones a nivel central	12
1.3.3 Estructuras cerebrales involucradas en el desarrollo de dolor crónico neuropático	13
2. ANTECEDENTES	19
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos particulares.....	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1 Sujetos de estudio.....	26
6.2 Lesión del nervio mentoniano	26
6.3 Evaluación de la dimensión sensorial	27
6.3.1 Evaluación de respuestas espontáneas (observación de la conducta de acicalamiento).....	27
6.3.2 Evaluación de respuestas provocadas (prueba de estimulación mecánica)	28
6.4 Evaluación de la dimensión afectiva	29
6.4.1 Tarea de evitación/escape	29
6.5 Evaluación de conductas de bienestar general.....	30
6.6 Evaluación de la dimensión cognitiva	31
6.6.1 Tarea switch	31
6.6.2 Tarea de elección forzada de dos alternativas	34
6.6.3 Tarea de cambio de posición (set shifting)	34
6.6.4 Tarea de aprendizaje en reversa	35

6.7 Registros electrofisiológicos extracelulares en ratones en un modelo de cabeza fija	35
6.7.1 Implantación de barra para modelo de cabeza fija y ubicación de Pf	35
6.7.2 Registros electrofisiológicos extracelulares	37
6.7.3 Esquema de estimulación mecánica.....	37
6.8 Análisis estadístico.....	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Efecto de la lesión en la dimensión sensorial	39
7.1.1 La lesión de constricción crónica induce signos de dolor neuropático...	39
7.2 Efecto de la lesión en la dimensión afectiva	42
7.3 Efecto de la lesión en la conducta de bienestar general	43
7.3.1 La lesión de constricción del nervio mentoniano no afecta el bienestar general de los ratones	43
7.4 Efecto de la lesión en la dimensión cognitiva.....	44
7.4.1 La lesión de constricción del nervio mentoniano altera el tiempo de respuesta a estímulos relevantes	44
7.4.2 Efecto de la lesión en una tarea de discriminación simple.....	47
7.4.3 La lesión del nervio mentoniano altera la adaptación a los cambios en las demandas del medio.....	49
7.5 Registros electrofisiológicos en el modelo de cabeza fija en ratones lesionados.....	53
8. DISCUSIÓN	59
8.1 Efecto de la lesión en la dimensión sensorial	59
8.2 Efecto en la dimensión afectiva/emocional del dolor.....	63
8.4 Efecto de la lesión en la dimensión cognitiva.....	67
8.5 Utilidad del modelo de constricción del nervio mentoniano para la realización de registros electrofisiológicos	74
9. CONCLUSIONES	76
10. REFERENCIAS	77
11. ÍNDICE DE FIGURAS	87

ABREVIATURAS

ACC*	Corteza cingulada anterior
CL	Núcleo central lateral del tálamo
CM	Núcleo centromedial del tálamo
CI	Corteza insular
CnM	Constricción del nervio mentoniano
GT	Ganglio trigeminal
LC	Locus coeruleus
NAc	Núcleo Accumbens
NP*	Nose poke
NS*	Neuronas nociceptivas específicas
PAG*	Sustancia gris periacueductal
PbN*	Núcleo parabraquial
PC	Núcleo paracentral del tálamo
Pf	Núcleo parafascicular del tálamo
PFC*	Corteza prefrontal
RVM*	Médula rostroventral medial
SI	Corteza somatosensorial primaria
SII	Corteza somatosensorial secundaria
Sp5c*	Subnúcleo caudal
Sp5i*	Subnúcleo interpolar
Sp5o*	Subnúcleo oral
STR*	Estriado
V	Nervio trigémino
V1	Rama oftálmica del trigémino
V2	Rama maxilar del trigémino
V3	Rama mandibular del trigémino
VPM	Núcleo ventral posteromedial del tálamo

WDR*

Neuronas de amplio rango dinámico

*Por sus siglas en inglés

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El dolor neuropático orofacial resulta de una lesión en el sistema somatosensorial trigeminal e involucra cambios anatómicos y fisiológicos en el sistema nervioso central y periférico. Para su adecuado estudio y tratamiento, debe ser abordado desde sus dimensiones sensorial, afectiva y cognitiva. Sin embargo, la aproximación de la mayoría de los estudios realizados ha sido limitada a la dimensión sensorial, considerando sólo una parte del problema. **OBJETIVO:** Caracterizar conductualmente el desarrollo del dolor neuropático orofacial producido por una lesión trigeminal en un modelo de ratón C57BL/6. **MATERIALES Y MÉTODOS:** La lesión trigeminal fue realizada a partir de la constricción con sutura del nervio mentoniano. Se realizaron pruebas conductuales para cada una de las dimensiones del dolor, así como para evaluar el bienestar general de los roedores. Se realizaron, también, registros electrofisiológicos en el núcleo parafascicular del tálamo y en la corteza cingulada anterior en su porción rostral, para evaluar los efectos de dicha lesión en un modelo en cabeza fija. **RESULTADOS:** Los roedores que sufrieron la lesión de constricción del nervio mentoniano presentaron signos de hiperalgesia a la aplicación de estímulos mecánicos y una conducta de evitación/escape aumentada. Los ratones lesionados no mostraron alteraciones en las conductas de bienestar general; sin embargo, dicha lesión fue suficiente para inducir un deterioro en la capacidad de adaptación a los requerimientos conductuales del medio. Se demostró también, que es un modelo útil para el estudio funcional de estructuras como el núcleo parafascicular y la corteza anterior cingulada al evaluar la respuesta electrofisiológica a la estimulación mecánica en ratones en cabeza fija. **CONCLUSIONES:** La lesión de constricción del nervio mentoniano es un modelo eficiente para el estudio del dolor orofacial en ratones, pues produce alteraciones en las diferentes dimensiones del dolor. La intensidad y temporalidad de los efectos en las dimensiones sensorial y afectiva, así como en las conductas de bienestar general lo hacen un modelo menos agresivo para los roedores, siendo aún suficiente para la generación de alteraciones cognitivas. El presente trabajo ofrece una base conductual sólida para el estudio electrofisiológico de los circuitos neuronales involucrados en el procesamiento del dolor crónico neuropático orofacial.

SUMMARY

BACKGROUND: Chronic neuropathic orofacial pain results from an injury to the trigeminal somatosensory system and it involves anatomical and physiological changes in both peripheral and central nervous systems. The adequate study and treatment of this pathology should consider its different dimensions: sensory, affective and cognitive. Nevertheless, the approach used by most studies has been mainly limited to the assessment of the sensory dimension, considering only one part of the problem. **AIM:** To behaviorally characterize the development of chronic neuropathic orofacial pain induced by a trigeminal injury in a C57BL/5 mouse model. **MATERIALS AND METHODS:** Trigeminal injury was induced by a chronic constriction of mental nerve, an experimental and a sham-control group were employed. Behavioral tests were conducted to assess the different dimensions of pain, as well as to evaluate the rodents' general wellbeing. **RESULTS:** Compared to the sham group, rodents who went through mental nerve constriction, compared to sham group, showed signs of hyperalgesia when mechanical stimuli were applied, as well as an increased escape/avoidance behavior. Injured mice showed no alterations in general wellbeing behaviors, yet the injury was sufficient to induce impairment in the ability to adapt to the environmental behavioral requirements. It was also shown that it is a useful model for the functional study of structures such as parafascicular nucleus and rostral anterior cingulate cortex, through the assessment of the electrophysiological response to mechanical stimulation in head fixed mice. **CONCLUSIONS:** Mental nerve constriction injury is an efficient model for the study of chronic neuropathic orofacial pain in mice, capable of inducing impairment in the different dimensions of pain. Intensity and temporality of its effects in both sensory and affective dimensions, as well as general wellbeing behaviors make our model less aggressive, yet effective to generate cognitive impairment in rodents. The current work provides a solid foundation for the electrophysiological study of the neural circuits involved in the processing of chronic neuropathic orofacial pain.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Dolor crónico neuropático orofacial

El dolor es considerado un problema de salud pública a nivel mundial. y se define como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada a un daño tisular real o potencial, descrita en términos de dicho daño. El dolor neuropático es definido como aquel causado por una lesión o enfermedad en el sistema nervioso somatosensorial (Scholz et al., 2019). Se estima que, en México, alrededor de 28 millones de personas sufren de algún tipo de dolor crónico, y que 60% de los pacientes padecen de dolor neuropático (Covarrubias, 2010, 2015).

El dolor, al ser crónico, pierde su función protectora y deja de ser un signo de enfermedad para convertirse en la enfermedad en sí, pues pierde su relación con el agente causal. Aunque comúnmente la temporalidad es el elemento más usado para describirlo, el determinante principal del establecimiento de dolor crónico son los fenómenos de neuroplasticidad que ocurren en su desarrollo (Kato, Sugimura, & Takahashi, 2018).

En el caso del dolor neuropático orofacial, este puede ser resultado de complicaciones de enfermedades, de infecciones virales, de la compresión por parte de arterias adyacentes, o de traumas realizados durante procedimientos dentales de rutina (Tinastepe & Oral, 2013). La porción del nervio trigémino que se ve afectada de manera más común, en el último caso, es la rama mandibular (Hillerup, 2007).

1.2 Procesamiento del dolor en el sistema trigeminal

1.2.1 Procesamiento a nivel periférico

El nervio trigémino (V), considerado el más grande de los pares craneales, tiene una función mixta. Además de dar inervación motora a los músculos de la masticación, sus fibras somáticas aferentes procesan información sensorial, incluyendo tacto, temperatura y dolor de la región facial y estructuras de la cavidad oral, así como de las meninges. Las fibras aferentes de gran diámetro ($A\beta$) terminan en los tejidos en forma de mecanorreceptores, activados por estímulos táctiles y

propioceptivos. Algunas de las aferentes más pequeñas ($A\delta$ y C) terminan como receptores sensibles a la temperatura, así como en terminaciones nerviosas libres, que funcionan como nociceptores, activados por estímulos nocivos (Lavigne & Sessle, 2016). El sistema trigeminal emerge de la porción del puente en el tallo cerebral, y aloja los cuerpos celulares de sus fibras en el ganglio trigeminal en la base del cráneo, para dividirse en sus tres ramas mayores: oftálmica (V1), maxilar (V2) y mandibular (V3) (figura 1).

La rama V1 provee de inervación sensitiva del tercio superior de la cara, la rama V2 al tercio medio y la rama V3 al tercio inferior. Esta última se divide en una porción motora, dirigida a los músculos de la masticación; y una sensorial dirigida a la articulación temporomandibular, mandíbula, dientes, periodonto, lengua y encías, además de una porción de la membrana timpánica (Go, Kim, & Zee, 2001). Estas fibras aferentes provenientes de las regiones anatómicas de cabeza y cuello previamente descritas, se integran en el ganglio trigeminal y se dirigen hacia el tallo cerebral, al complejo nuclear trigeminal para su procesamiento a nivel central.

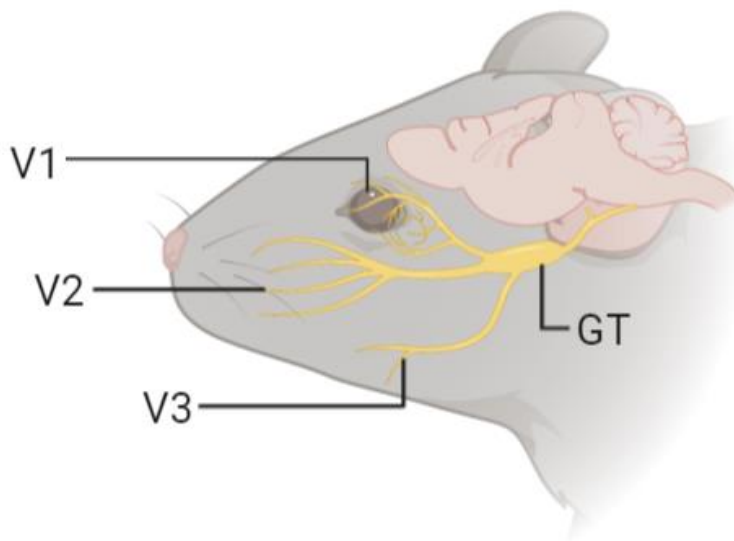


Figura1. División del nervio trigémino en ratón. V1, rama oftálmica; V2, rama maxilar; V3, rama mandibular. Figura elaborada con BioRender®.

Después de una la lesión de los tejidos orofaciales, distintos mediadores químicos son producidos y liberados tanto por la terminación sensorial primaria

como por células no nerviosas, como son macrófagos, neutrófilos y mastocitos. Los mediadores químicos liberados en el sitio de la lesión constituyen lo que se conoce como la “sopa inflamatoria”, compuesta por citocinas proinflamatorias, prostaglandinas, protones, ATP, serotonina, histamina, sustancia P, entre otras (Bista & Imlach, 2019; Ellis & Bennett, 2013; Julius & Basbaum, 2001). Estos favorecen la despolarización de las aferentes nociceptivas trigeminales, aumentando la excitabilidad neuronal y generando el fenómeno de sensibilización periférica, que contribuye a los fenómenos de hiperalgesia (sensibilidad y/o respuesta aumentada a un estímulo que normalmente es doloroso) y alodinia (dolor resultante de un estímulo que normalmente no lo produciría) (Bista & Imlach, 2019).

1.2.2 Procesamiento a nivel central

En el tallo cerebral, el complejo nuclear trigeminal está compuesto por cuatro núcleos: El núcleo sensitivo principal, el núcleo mesencefálico, el núcleo motor y el núcleo espinal, que a su vez consta de tres subdivisiones: oral (Sp5o), interpolar (Sp5i) y caudal (Sp5c) (Henssen et al., 2016). Las fibras aferentes de mayor diámetro terminan en dicho núcleo y activan en él a las neuronas mecanosensitivas de bajo umbral. Las fibras activadas por estímulos térmicos y nocivos terminan en la porción caudal de la división espinal del núcleo trigeminal (Sp5c) activando a neuronas nociceptivas específicas (NS), así como a neuronas de amplio rango dinámico (WDR). Las terminales centrales de las fibras trigeminales pueden liberar neuroquímicos excitatorios que pueden activar a neuronas de segundo orden (Chichorro, Porreca, & Sessle, 2017; Lavigne & Sessle, 2016)

Posteriormente, las neuronas de segundo orden en el complejo nuclear trigeminal se dirigen a distintas estructuras supraespinales. Estas estructuras no son específicas para el procesamiento del dolor, también median otros procesos sensoriales, afectivos y cognitivos. De esta forma, el papel del cerebro en el procesamiento del dolor no es únicamente el de recibir y detectar información nociva o potencialmente peligrosa, sino que es capaz de modular, seleccionar y filtrar dicha información en una red de estructuras a la que Ronald Melzack llamó la matriz del dolor (“neuromatrix”) (Melzack & Casey, 1968). De acuerdo con estudios de

neuroimagen, las estructuras principales que participan en la representación y modulación de la experiencia del dolor son la corteza somatosensorial primaria (S1) y secundaria (S2), la corteza cingulada anterior (ACC), la corteza insular (CI), la corteza prefrontal (PFC) y el tálamo; también se ha observado, aunque de una manera menos uniforme, la participación de estructuras como el cerebelo y los ganglios basales (Almeida, Roizenblatt, & Tufik, 2004; Apkarian, Bushnell, Treede, & Zubieta, 2005; Moriarty, McGuire, & Finn, 2011; Shibasaki, 2004). Así, la neuromatrix incluye estructuras somatosensoriales, límbicas y de asociación, y su actividad puede ocurrir como circuito en serie y/o en paralelo para producir la experiencia del dolor (Melzack & Casey, 1968; Melzack, 1999). Dicha experiencia está compuesta por tres diferentes dimensiones o componentes:

- a) La dimensión sensorial/discriminativa, que involucra a los aspectos de detección, ubicación e intensidad de los estímulos nocivos.
- b) La dimensión afectiva/motivacional, que comprende tanto el aspecto desagradable de la sensación, como sus aspectos emocionales (ej. el sufrimiento asociado y la necesidad por detener, disminuir o evitar el dolor).
- c) La dimensión cognitivo/evaluativa, que involucra la capacidad de adaptación a las condiciones del medio, así como aspectos de aprendizaje y de memoria de experiencias previas (Groh et al., 2018; Melzack & Casey, 1968; Saadé et al., 2007).

Dichas dimensiones o componentes del dolor son procesadas en diferentes estructuras, organizadas en vías que pueden actuar tanto de forma continua, como también de forma simultánea y relativamente independiente (Almeida et al., 2004). Estos son los llamados sistemas medial y lateral (figura 2). Así, el sistema lateral está asociado al componente sensorial/discriminativo e involucra a las fibras dirigidas al complejo ventrobasal del tálamo, tratándose, en el caso del sistema trigeminal, del núcleo ventral posteromedial (VPM); para dirigirse hacia S1 y S2, así como a otras regiones corticales como ACC. Por otra parte, el sistema medial está asociado al procesamiento de la dimensión afectiva/motivacional. Involucra a aquellas fibras que se dirigen a los núcleos intralaminares y de la línea media del tálamo, como son los núcleos parafascicular y mediodorsal, así como a regiones

límbicas como la amígdala, la ínsula, ACC y PFC. Asimismo, el sistema medial ha sido asociado al procesamiento de la dimensión cognitivo/evaluativa, en la que también está involucrada la interacción entre distintas regiones corticales (Melzack & Casey, 1968; Xiao & Zhang, 2018).

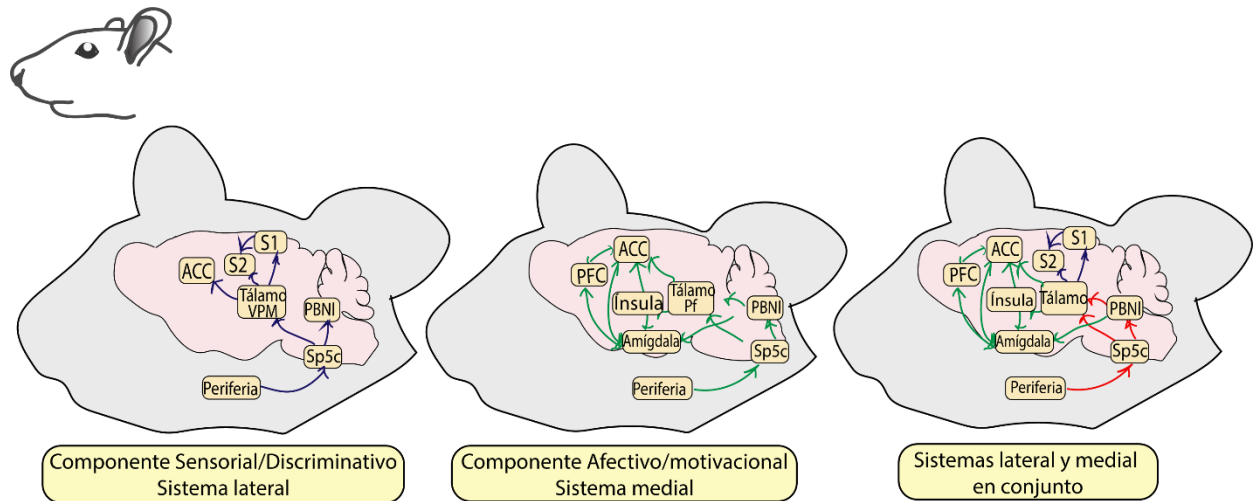


Figura 2. Estructuras centrales involucradas en el procesamiento del dolor. Sistemas lateral y medial. Sp5c, porción central del núcleo espinal trigeminal; PBNI, núcleo parabraquial lateral; VPM, núcleo ventral posteromedial del tálamo; S1, corteza somatosensorial primaria; S2, corteza somatosensorial secundaria; ACC, corteza anterior cingulada; Pf, núcleo parafascicular del tálamo; PFC, corteza prefrontal. Modificado de Xiao & Zhang, 2018.

Adicionalmente a los sistemas ascendentes mencionados, existe evidencia que sugiere la participación de un circuito que involucra al núcleo parabraquial (PbN) y sus proyecciones en la conexión entre el procesamiento sensorial-emocional del dolor, así como en el proceso de cronificación del dolor (Gauriau & Bernard, 2002; Kato et al., 2018). En el caso del sistema trigeminal, recientemente se ha descubierto un circuito monosináptico, dirigido del ganglio trigeminal a PbN en su porción lateral. Este circuito ha sido asociado al procesamiento de la dimensión afectivo/motivacional del dolor; y podría ser un sistema subyacente a las diferencias entre el procesamiento del dolor en la región orofacial y otras regiones corporales (Rodríguez et al., 2017).

La modulación del dolor en el sistema trigeminal se atribuye a que Sp5c tiene una variedad de conexiones con otras estructuras en el tallo cerebral, como la

formación reticular (RF), el locus coeruleus (LC), los núcleos del rafé, la sustancia gris periacueductal (PAG), el núcleo parabraquial (PbN) y la médula rostroventral medial (RVM), así como con estructuras subcorticales, como el hipotálamo o la amígdala; y corticales, como las cortezas somatosensorial, cingulada anterior y prefrontal. Estas estructuras pueden ejercer una acción moduladora a través de mediadores químicos, como son el ácido gamma-aminobutírico (GABA), glicina, histamina, serotonina (5-HT), noradrenalina, dopamina, orexina y opioides (encefalinas, endorfinas). Asimismo, las conexiones con dichas estructuras pueden tener un efecto bidireccional, es decir, los impulsos nerviosos pueden ser facilitados o inhibidos (Chichorro et al., 2017; Lavigne & Sessle, 2016).

1.3 Desarrollo de dolor crónico neuropático orofacial

A partir de estudios en modelos animales de lesiones trigeminales, así como de estudios de imagen en humanos, se han determinado distintos cambios en el sistema trigeminal en el desarrollo del dolor crónico orofacial, tanto en la periferia, como en estructuras a nivel central. Entre de los mecanismos involucrados en el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico neuropático orofacial (figura 3) se encuentran:

- a) Generación de impulsos ectópicos en fibras periféricas
- b) Excitación cruzada de los nervios lesionados con los no lesionados
- c) Cambios fenotípicos, tanto en las neuronas dañadas como en las no dañadas, que involucran cambios en la expresión de moléculas de señalización o de proteínas de membrana, así como alteraciones en la función de canales iónicos
- d) Interacciones neuro-gliales
- e) Activación de fibras simpáticas
- f) Cambios en la modulación ascendente y descendente
- g) Fenómenos de plasticidad neuronal (Bista & Imlach, 2019; Tinastepe & Oral, 2013)

Estos cambios producen modificaciones de las propiedades eléctricas de las fibras nerviosas de la periferia hacia el sistema nervioso central, que a su vez generan perturbaciones en el balance entre la señalización excitatoria e inhibitoria, de modo que estos sistemas se encuentran alterados. Así, dichas modificaciones se reportan como un aumento en la excitación y facilitación de los impulsos nerviosos, y una aparente pérdida de su inhibición, manifestándose a través de los síntomas característicos del dolor crónico neuropático: alodinia, hiperalgesia y episodios de dolor espontáneo (Colloca et al., 2017). Tanto la alodinia como la hiperalgesia son considerados fenómenos de hipersensibilidad: la alodinia consiste en el dolor producido por un estímulo que normalmente no lo produciría, mientras que la hiperalgesia consiste en una respuesta aumentada a un estímulo que normalmente es doloroso (Loeser & Treede, 2008). En el caso del dolor espontáneo, este se entiende como aquel dolor causado por cambios internos, no con respecto a estímulos externos, en el sistema somatosensorial (Bennett, 2012).

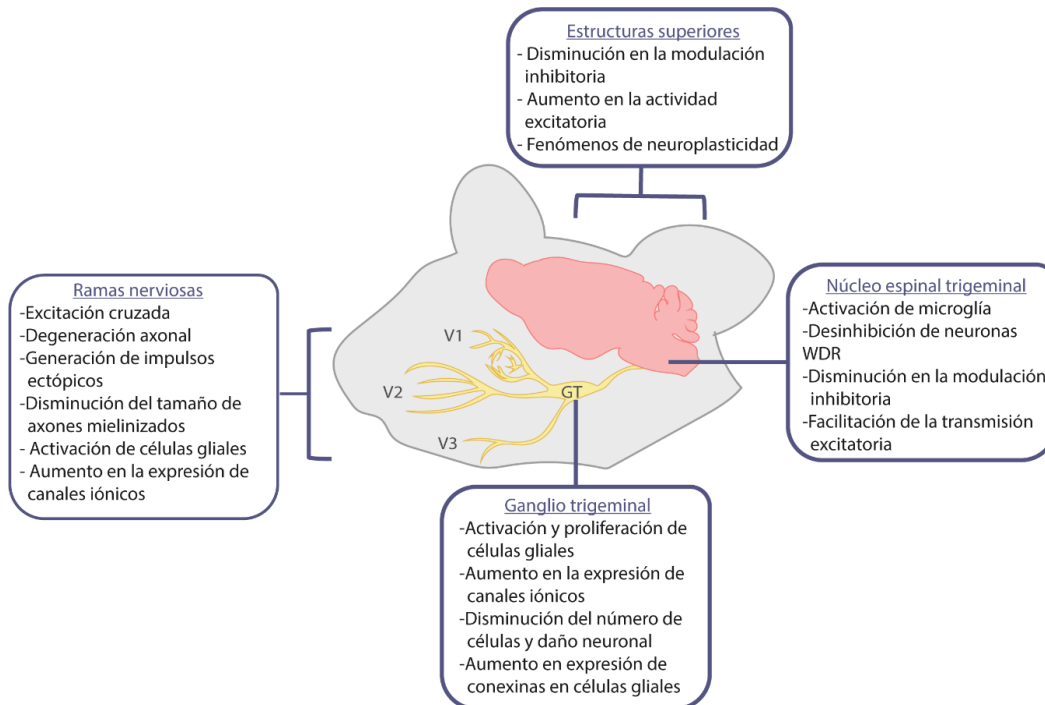


Figura 3. Posibles mecanismos del desarrollo de dolor crónico neuropático orofacial en los sistemas nervioso central y periférico.

1.3.1 Alteraciones a nivel periférico

Se ha encontrado que, posterior a una lesión neuropática del nervio mentoniano en ratas, existe degeneración axonal, que se identifica desde el tercer día posterior al procedimiento. Hay cambios en los patrones de inervación tanto sensorial como autónoma en la región del labio inferior, existe inervación ectópica de fibras autónomas en la región del labio inferior (Grelik, Bennett, & Ribeiro-da-Silva, 2005), disminución de fibras sensoriales peptidérgicas y un aumento en la longitud de fibras no peptidérgicas (Grelik, Allard, & Ribeiro-da-Silva, 2005; Taylor & Ribeiro-Da-Silva, 2011). Estos cambios inician, en dicho modelo, dentro de un período de 7 días, y dicha condición permanece entre cuatro y ocho semanas. Tales eventos coinciden con un aumento en la conducta de acicalamiento orofacial, signo de dolor espontáneo, y con una disminución en el umbral de respuesta a estímulos mecánicos (alodinia y/o hiperalgesia), signo característico del desarrollo de dolor neuropático (Grelik, Allard, et al., 2005). Estos signos se han determinado después de la constricción y transección del nervio mentoniano en la región ipsilateral de las vibrisas (Takahashil et al., 2011), una zona inervada por la rama maxilar del trigémino. Esto sugiere una modificación del sistema trigeminal que va más allá del sitio inicial de la lesión.

Además de lo mencionado anteriormente, se ha identificado un aumento en la expresión de ATF3, un marcador de daño axonal en el ganglio trigeminal, consecuencia de una lesión neuropática de la rama mandibular. De forma muy interesante, en las neuronas que no presentan daño axonal existe un aumento en la expresión de canales TRPV1, mientras que en las que sí lo presentan, la expresión de los canales TRPV1 está disminuida (Kim et al., 2008), lo que sugiere que una modificación en el fenotipo de las estructuras no dañadas podría estar participando en el desarrollo de dolor crónico neuropático. Después de 180 días posteriores a la transección del nervio mentoniano, hay una disminución del número y volumen de células en el ganglio trigeminal y que, si bien el volumen puede recuperarse posteriormente, se mantiene una menor densidad (Zuniga, 1999).

Otro de los factores que han sido propuestos como mecanismos del desarrollo de dolor neuropático orofacial, es la respuesta inmune a la lesión nerviosa, a partir de la inflamación. Se ha sugerido que existe una interacción cruzada entre células del sistema nervioso y células del sistema inmune: el daño nervioso lleva a una activación de células inmunes y de células de la microglía, y éstas liberan los mediadores químicos de la inflamación que constituyen la sopa inflamatoria. Dichos mediadores estimulan a las terminaciones nerviosas, contribuyendo al fenómeno de sensibilización periférica, que posteriormente da lugar a la sensibilización central. Así, la sopa inflamatoria también tiene una participación en el establecimiento y desarrollo de dolor neuropático orofacial (Hossain, Unno, Ando, Masuda, & Kitagawa, 2017).

Además de las modificaciones en la función neuronal, se ha propuesto que las células de la glía desempeñan un papel importante en el establecimiento y mantenimiento del dolor crónico neuropático. Se ha reportado activación de la microglía (Piao et al., 2006), además de un aumento en la expresión de la conexina 43 en las células satelitales gliales, lo cual sugiere una comunicación aumentada entre las células de la glía en el ganglio trigeminal ante una lesión nerviosa. Estas modificaciones, además de la proximidad de las células satelitales gliales con los cuerpos neuronales en el ganglio trigeminal, podrían causar un aumento en la señalización parácrina, favoreciendo la sensibilización de las neuronas a partir de la actividad de ATP sobre receptores a purinas, cuya activación aumenta la concentración de calcio intracelular (Hossain et al., 2017).

1.3.2 Alteraciones a nivel central

A nivel central, en el tallo cerebral, se han realizado evaluaciones en la división caudal del núcleo espinal trigeminal (Sp5c), sitio de convergencia para el procesamiento de información nociceptiva y no nociceptiva, y el lugar en donde se efectúa la primera sinapsis en la vía sensitiva del trigémino. En este sentido, distintos estudios en roedores y en humanos han demostrado que la actividad en dicha estructura se encuentra alterada (Alshelh et al., 2016; Martin, Malmierca, Avendaño, & Nuñez, 2010). En estudios experimentales, se ha identificado en las

neuronas de amplio rango dinámico (WDR) en Sp5c, un aumento en las respuestas espontáneas y evocadas posterior a la constricción del nervio infraorbitario en ratas. Esta desinhibición podría estar mediada en parte, por una disminución en la transmisión por GABA, pues se observó que hay una disminución en la expresión de la enzima GAD65, responsable de la expresión de GABA (Martin et al., 2010). Otra de las estructuras centrales involucradas en el desarrollo del dolor neuropático orofacial es el núcleo parabraquial, del que se ha demostrado que presenta hiperexcitabilidad en procesos de dolor neuropático trigeminal (Uddin et al., 2018).

1.3.3 Estructuras cerebrales involucradas en el desarrollo de dolor crónico neuropático

Múltiples estructuras supraespinales han sido asociadas a la presencia y desarrollo de dolor crónico. Asimismo, en dicho proceso han sido involucrados cambios anatómicos y fisiológicos en el sistema nervioso central. Mediante estudios de imagen por resonancia magnética funcional en humanos, se ha demostrado un aumento en la conectividad funcional entre Sp5c y estructuras del tallo cerebral involucradas en la modulación del dolor, como es la médula rostroventral (RVM), así como entre la sustancia gris periacueductal (PAG) y el locus coeruleus (LC) con estructuras como el hipocampo y el núcleo accumbens (NAc) (Mills et al., 2018). Se ha propuesto también que las modificaciones que ocurren en un sujeto para desarrollar dolor crónico se deben a cambios en la actividad tálamo-cortical, pues el volumen del tálamo somatosensorial se ve disminuido en pacientes con dolor trigeminal (Alshelh et al., 2016; Henderson et al., 2013). Las regiones activadas en pacientes con dolor crónico parecen ser diferentes, e incluso podrían depender del tipo de dolor. Por ejemplo, mientras el dolor crónico de tipo inflamatorio, derivado de trastornos temporomandibulares, está asociado a mayor actividad de la corteza cerebelar, premotora y anterior cingulada, el dolor crónico neuropático orofacial está asociado a, además de un aumento en la actividad de la corteza premotora y la corteza prefrontal dorsolateral, a una disminución en la actividad del tálamo (Youssef et al., 2014).

Con respecto a estudios con roedores, se ha encontrado una participación importante de ACC en el inicio, desarrollo y mantenimiento de dolor crónico ya que, en presencia de este, ACC presenta un aumento de actividad que está asociado tanto con alteraciones en la dimensión sensorial, como con alteraciones en la dimensión afectiva, mostrando conductas de escape aumentadas (Kramer et al., 2017; Moon et al., 2017; Xiao et al., 2019).

Otra de las estructuras asociadas con el desarrollo de dolor neuropático es el tálamo ventrobasal, cuya actividad se encuentra incrementada en condiciones de dolor crónico (Kramer et al., 2017; Moon et al., 2017). Sin embargo, se ha observado que otros núcleos talámicos también están involucrados en el procesamiento del dolor crónico. Estos núcleos son el mediodorsal, que forma parte de los núcleos de la línea media, y los núcleos intralaminares, que incluyen al núcleo centromedial y parafascicular. Al formar parte del sistema medial, antes mencionado, sus alteraciones en condiciones de dolor crónico han sido vinculadas con las alteraciones en las dimensión afectiva y cognitiva del dolor (Meda et al., 2019; Weigel & Krauss, 2004). Sin embargo, hacen falta estrategias experimentales para estudiar su participación en el desarrollo de dolor crónico.

1.3.3.1 Núcleo parafascicular del tálamo

Los núcleos intralaminares del tálamo, junto con los núcleos de la línea media, son conocidos como núcleos “inespecíficos” o difusos (Sadikot & Rymar, 2009). Forman un grupo separado del resto de los núcleos talámicos, debido a su localización y distribución a sitios subcorticales y corticales, así como por estar aparentemente involucrados en procesos de activación y atención. En roedores, el grupo intralaminar se divide en dos: el grupo rostral, compuesto por los núcleos centro medial (CM), paracentral (PC), y central lateral (CL); y el grupo caudal, compuesto por el núcleo parafascicular (Pf), dividido en lateral (PfL) y medial (PfM).

El núcleo Pf recibe aferencias de núcleos sensoriomotores, como son los núcleos vestibulares, el complejo espinal trigeminal, los colículos superiores, la sustancia nigra pars reticulata, el núcleo entopeduncular, aferencias autonómicas y viscerales, como son aquellas que provienen del núcleo del tracto solitario (NTS), la

sustancia gris periacueductal (PAG) y el núcleo parabraquial (PbN) (Gerfen, 2004). El núcleo Pf también recibe aferencias de la corteza cerebral y de la porción interna del globo pálido. La modulación ascendente de este núcleo es mediada por estructuras del tallo cerebral, a través de núcleos colinérgicos y glutamatérgicos de la región parabraquial, así como del núcleo pedunculopontino y los núcleos laterodorsales tegmentales (Sadikot & Rymar, 2009).

El núcleo parafascicular es considerado la fuente más importante de las proyecciones tálamo-estriatales. Sus principales blancos son regiones de la corteza sensoriomotora y del estriado dorsal (caudado-putamen), con proyecciones adicionales al estriado ventral o núcleo accumbens (NAc) y la amígdala. Este núcleo ejerce una influencia excitatoria importante de tipo glutamatérgico en las neuronas gabaérgicas del estriado (Sadikot & Rymar, 2009; Smith, Galvan, Raju, & Wichmann, 2010).

En cuanto a sus aspectos funcionales, las neuronas del núcleo parafascicular responden a estímulos multimodales significativos, particularmente en el contexto de eventos no predichos o eventos contrarios a las predicciones (Naoyuki Matsumoto, Minamimoto, Graybiel, & Kimura, 2001). Matsumoto observó en primates no humanos que, al aplicar estímulos sensoriales, si estos ocurrían repetidamente, la respuesta neuronal era disminuida y que esta era mayor cuando el evento era inesperado. De igual manera, las neuronas de Pf son moduladas temporalmente, es decir, pueden generar de manera oportuna respuestas discretas a diversos estímulos sensoriales (Matsumoto, Minamimoto, Graybiel, & Kimura, 2001). Esto indica un posible papel en la codificación de la información atencional, posiblemente a través de la regulación del sistema cortico estriatal. La relación entre el estriado y el núcleo parafascicular provee un sustrato a través del cual los eventos sensoriales contribuyen a un cambio conductual (“switch”) y al reforzamiento (Sadikot & Rymar, 2009).

Kimura y colaboradores han sugerido de manera hipotética que el Pf es un sistema que clasifica sus funciones en dos: a) como un monitor (top-down) mediante el sistema cortico-ganglios basales para la selección de señales de acción y

cognición, b) acción de cambio (“switching”) (bottom-up), basado en las señales de eventos externos salientes (Matsumoto et al., 2001).

Recientemente, se ha determinado el papel del complejo intralaminar en la selección y adaptación de respuestas ante estímulos visuales conductualmente significativos en un modelo roedor. Kato (2018) y colaboradores demostraron que la eliminación de las neuronas del núcleo Pf altera la selección de respuestas en una tarea de discriminación visual, tanto en una fase de adquisición como en el desempeño de dicha tarea. Posteriormente, el mismo grupo encontró a través de la eliminación de las neuronas del núcleo central lateral (CL) del mismo complejo, que este controla la adaptación de las respuestas y la flexibilidad conductual ante cambios en un paradigma que también involucra la discriminación de estímulos visuales, pero que requería cambios en la estrategia para su solución, basados en la detección de estímulos relevantes. Asimismo, demostraron que la participación de CL es predominante en el desempeño general de la tarea y no durante la fase de adquisición (Kato et al., 2018). Con respecto a la evidencia en humanos, se han obtenido resultados concordantes con los obtenidos en los modelos en primates no humanos. Mediante registros electrofisiológicos en pacientes a quienes les fueron implantados electrodos en CM-Pf para estimulación cerebral profunda como tratamiento para el dolor crónico, se encontró que dicho complejo es activado en procesos de orientación atencional y de flexibilidad conductual en la selección de una conducta apropiada en tareas de detección de estímulos tanto visuales como auditivos (Schepers et al., 2017).

Recientemente, Mandelbaum et al. realizó la disección de Pf en un modelo de ratón. Demostró que las neuronas en Pf están organizadas de forma anatómica, transcripcional y genética (figura 4). Así, sugiere que, por sus conexiones con regiones distintas del estriado, Pf participa en tres circuitos independientes de forma paralela: un circuito límbico, asociativo y somatosensorial (Mandelbaum et al., 2019).

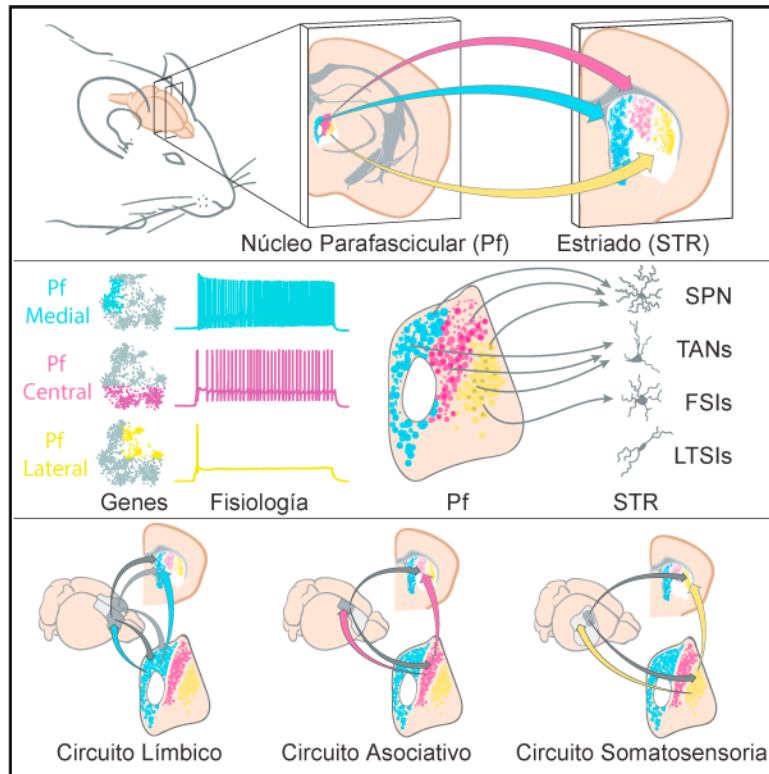


Figura 4. Organización del núcleo parafascicular. Por la organización anatómica, genética y electrofisiológica del núcleo parafascicular (Pf), así como sus proyecciones a divisiones y grupos neuronales específicos del estriado (STR), se ha propuesto que Pf participa de manera paralela en un circuito límbico, con su porción medial (azul), un circuito asociativo, mediante su porción central (rosa), y un circuito somatosensorial, a través de su división lateral (amarillo). Modificado de Mandelbaum et al., 2019.

1.3.3.2 Procesamiento del dolor en el núcleo parafascicular

El papel de los núcleos intralaminares en el procesamiento del dolor ha sido descrito como parte del sistema medial que, en el tálamo, comprende a los núcleos de la línea media y a los intralaminares, así como a sus proyecciones dirigida a cortezas de asociación y a estructuras límbicas, de forma que ha sido asociado al componente afectivo del dolor (Melzack & Casey, 1968; Saadé et al., 2007).

Las aferencias del complejo intralaminar provenientes de la corteza están organizadas topográficamente: Mientras que la corteza prefrontal proyecta hacia el complejo CM-Pf, la corteza motora proyecta hacia CM y CL. Adicionalmente, al recibir también proyecciones de la sustancia gris periacueductal (PAG), entre otras estructuras subcorticales, el papel del complejo parafascicular ha sido asociado

principalmente con el proceso de modulación de la sensación dolorosa (Weigel, & Krauss, 2004).

Con respecto al componente sensorial del dolor, se ha encontrado, en distintos modelos animales (roedores, gatos y primates no humanos), que CM-Pf presenta neuronas responsivas electrofisiológicamente a estímulos nociceptivos; además de expresar de manera temprana el marcador de actividad neuronal c-fos después de aplicar dichos estímulos (Bullit, 1989; Dang, 1978). Asimismo, la activación de las neuronas de dicho complejo varía con la intensidad de la estimulación dolorosa. Lesiones electrolíticas y el bloqueo con lidocaína del núcleo parafascicular produce una atenuación transitoria, pero significativa de las manifestaciones de dolor neuropático (Saadé et al., 2007). Su papel en procesos de modulación del dolor, posiblemente sea a través de la participación de receptores opioides; el uso de antagonistas a dichos receptores bloquea el efecto antinociceptivo en un modelo de dolor trigeminal por irritación de la córnea (Tamaddonfard, Farshid, Seiednejhad, & Morvaridi, 2011).

En el caso de la dimensión afectiva del dolor, el tálamo intralaminar ha sido usado como blanco para intervenciones quirúrgicas en pacientes en los que este no responde a otros tipos de terapia, pues se ha encontrado que la ablación del complejo Cm-Pf, y del núcleo centrolateral reduce el sufrimiento emocional asociado a dolor crónico en humanos, además de alivio del dolor en su dimensión sensorial (Pirrota et al., 2013; Steiner, Forster, Leksell, Meyerson, & Boethius, 1980).

Se ha encontrado también, un efecto importante a partir de la estimulación cerebral profunda en dichas regiones en el alivio del dolor. Sin embargo, ha sido difícil determinar si dicho efecto es debido a un alivio en la percepción del dolor en sí misma o a un cambio en la actitud de los pacientes hacia él (Gao et al., 2010; Pirrota et al., 2013; Sindou, Jeanmonod, & Mertens, 1990; Weigel et al., 2004)(Dostrovsky, 2000; Gao et al., 2010; Jeanmonod & Morel, 2009; Pirrota et al., 2013; Weigel & Krauss, 2004; Willis & Westlund, 1997). De forma interesante, el proceso afectivo del dolor está relacionado con la necesidad del individuo que lo

padece de huir de la sensación dolorosa, o de adaptarse a condiciones que predicen estímulos aversivos o un castigo.

Desde una dimensión cognitiva del dolor no hay evidencias de la participación de regiones intralaminares en las alteraciones inducidas cognitivas por el dolor crónico. Se ha observado en humanos, que aquellos pacientes con lesiones por infarto localizadas en CM-Pf, presentaban un desempeño deficiente en la prueba de cartas de Wisconsin, una tarea que evalúa la capacidad de ajuste de la conducta ante reglas cambiantes (Liebermann, Ploner, Kraft, Kopp, & Ostendorf, 2013). Es probable que regiones intralaminares del tálamo también participen en las alteraciones en procesos cognitivos inducidos por dolor crónico.

2. ANTECEDENTES

Para el estudio del dolor crónico neuropático orofacial se han empleado diferentes modelos que han permitido identificar distintos mecanismos, periféricos y centrales, involucrados en su establecimiento y mantenimiento.

Vos (Vos, Strassman, & Maciewicz, 1994) propuso la lesión de constricción del nervio infraorbitario como modelo de estudio de dolor neuropático orofacial en ratas. En dicho estudio, identificó cambios en el comportamiento de las ratas como indicadores de una conducta de tipo dolorosa. Estos cambios fueron observados a partir de una conducta de acicalamientos anormal, en donde los roedores lesionados dirigían sus patas delanteras a la región orofacial, a diferencia del grupo control, cuyos acicalamientos eran distribuidos en todo el cuerpo. Dicha conducta es interpretada como signo de dolor espontáneo. Vos y Strassman observaron también, que a partir de dicha lesión se modificaba la respuesta a estímulos mecánicos, como signos de los fenómenos de alodinia e hiperalgesia, características clínicas del dolor neuropático. Este modelo de lesión por constricción del nervio infraorbitario en ratas ha sido el más utilizado para el estudio del dolor crónico neuropático orofacial. Sin embargo, se han señalado ciertas limitaciones para este modelo. Entre esas limitaciones, se encuentra la dificultad técnica para realizarla, y la necesidad del uso de estereotáxico y de un microscopio quirúrgico

para llevarla a cabo, además de la agresión que supone para el animal, por la extensión de las superficies inervadas y por la manipulación requerida para acceder al nervio (Ding et al., 2017). Ante esta problemática, Ding (2017) realizó una modificación al modelo, realizando la constricción en la porción distal del nervio infraorbitario en ratas, a partir de un abordaje más pequeño sobre la piel facial. Posteriormente, evaluaron conductualmente el efecto de dicha constricción, determinando que dicha lesión también es capaz de generar alteraciones sensoriales, disminuyendo el umbral de retracción a estímulos mecánicos, y aumentando la conducta de acicalamiento orofacial.

Además del nervio infraorbitario, se ha empleado la rama mandibular del trigémino, a partir de la lesión del nervio alveolar inferior y de su rama terminal, el nervio mentoniano. Esta última, fue implementada por Grelik y colaboradores, mediante una constricción con sutura (Grelik, Bennett, et al., 2005), y usada como modelo para evaluar los cambios en la inervación del labio inferior posteriores a la lesión en ratas. Además, encontró que dichos cambios coinciden temporalmente con un aumento de acicalamientos orofaciales, como signo de dolor espontáneo, proponiendo este modelo como una alternativa útil para el estudio del dolor neuropático trigeminal. La lesión del nervio mentoniano en ratas ha sido utilizada para evaluar distintos mecanismos involucrados en alteraciones sensoriales causadas por dolor neuropático orofacial, desde la periferia hasta niveles centrales (Piao et al., 2006; Taylor & Ribeiro-Da-Silva, 2011), realizando también modificaciones en la técnica de lesión, a partir de la transección del nervio (Piao et al., 2006; Takahashil et al., 2011; Zuniga, 1999), o su lesión por aplastamiento (Barghash, Larsen, Al-Bishri, & Kahnberg, 2013; Li et al., 2012; Savignat et al., 2008).

A pesar del uso de los modelos ya mencionados, el abordaje de estos se ha limitado a la evaluación del componente sensorial del dolor, dejando de lado sus componentes afectivo/motivacional y cognitivo. En un proyecto anterior del laboratorio, se caracterizaron los efectos multidimensionales de la lesión por constricción del nervio mentoniano en un modelo de rata (Montes-Angeles et al.,

2017). En dicho estudio se encontró que el modelo de constricción del nervio mentoniano es suficiente para generar alteraciones en las dimensiones sensorial, afectiva/emocional y cognitiva. En el caso de la dimensión sensorial, se observaron conductualmente signos de dolor espontáneo, así como de alodinia mecánica e hiperalgesia. Con respecto a la dimensión emocional, se observó que la lesión provocaba una disminución en la motivación por el consumo de una recompensa dulce, como signo de anhedonia y, en el caso de la dimensión cognitiva, los resultados mostraron que las ratas lesionadas tenían dificultades para adaptar su comportamiento ante los cambios en las reglas en las tareas conductuales realizadas.

Otra de las limitaciones a las que se ha enfrentado el estudio del dolor neuropático orofacial, es el uso predominante de modelos en rata, y a la falta de modelos implementados en ratón. Una de las principales ventajas que tiene el empleo de ratones en el estudio del desarrollo del dolor crónico es la posibilidad de uso de líneas de ratones transgénicos, en los que se pueden manipular variables muy específicas (Rigaud et al., 2008). En respuesta a este problema, Hardt et al. (Hardt, Fischer, Vogel, Wilken-Schmitz, & Tegeder, 2019) desarrollaron en ratones el modelo de lesión del nervio infraorbitario en su porción distal propuesto por Ding. En este estudio, se encontró que la lesión genera alodinia térmica y mecánica, y una mayor duración en la memoria aversiva a estímulos mecánicos.

En ratones, los eventos posteriores a la lesión trigeminal no han sido completamente descritos o caracterizados. En el caso del modelo de lesión por constricción del nervio mentoniano, el uso de ratones también ha sido escaso, y limitado a la evaluación del componente sensorial del dolor neuropático. Seino (Seino, Seo, Maeda, & Someya, 2009), empleó esta lesión en ratones, y evaluó conductual e histológicamente sus efectos. Observaron además una disminución en el umbral de respuesta a estímulos mecánicos, así como cambios en la distribución de Sustancia P en el ganglio trigeminal.

Se ha propuesto que el origen de las alteraciones cognitivas y emocionales reportadas es diferente con respecto al tipo de dolor que se padece. Mientras que

en el caso del dolor agudo estas alteraciones parecen derivar de una limitación de los recursos atencionales por una hipervigilancia al dolor (Attal, 2014; Lavie, 2005), en el dolor crónico éstas se han asociado a modificaciones maladaptativas a nivel del sistema nervioso central. Estos cambios pueden ser a largo plazo y permanecer incluso en casos en los que el dolor remite (Miguel Pais-Vieira, Lima, & Galhardo, 2009; Schwartz et al., 2014).

En relación con las respuestas acorde a los estímulos salientes, se sabe que son de vital importancia para la conducta flexible orientada a metas (Schepers et al., 2017). Sin embargo, se ha observado que, en modelos de roedores de una lesión del nervio ciático, al realizar una tarea que evalúa el tiempo de reacción a estímulos visuales, éste está aumentado, además de que el número de respuestas correctas está disminuido con respecto a un grupo control, como signo de falta de adaptación (Higgins et al., 2015).

Por otro lado, la participación de diferentes estructuras centrales en el procesamiento del dolor, además de su asociación con procesos cognitivos y emocionales han permitido establecer relaciones entre dolor y alteraciones sensoriales, cognitivas y afectivo-emocionales. Una de las estructuras asociadas al procesamiento motivacional y afectivo del dolor es el tálamo, a través de complejo parafascicular (Pf), parte de los núcleos intralaminares, mediante sus aferencias provenientes de vías somatosensoriales y sus proyecciones dirigidas a regiones corticales paralímbicas y asociativas (Jeanmonod & Morel, 2009).

En roedores, la participación de los núcleos intralaminares en el procesamiento sensorial del dolor ha sido evaluada en ratas. Saadé demostró que, después de realizar una lesión en el nervio ciático, las lesiones o el bloqueo de los núcleos intralaminares atenuaban los signos de dolor neuropático en respuesta a estímulos mecánicos y térmicos (Saadé et al., 2007). Adicionalmente, se ha encontrado que la administración de morfina en Pf aumenta el umbral de retracción y las vocalizaciones ante la aplicación de un choque eléctrico en la cola en un modelo de rata (Harte, Lagman, & Borszcz, 2000).

Asimismo, el tálamo intralaminar ha sido descrito como una estructura mediadora de cambios atencionales a estímulos multimodales salientes (Matsumoto et al., 2001), así como de la selección de acciones apropiadas en respuesta a estos (Kato, 2011, 2018).

Como se mencionó previamente, Mandelbaum caracterizó la organización del núcleo parafascicular y, con base en sus características anatómicas, transcripcionales y electrofisiológicas, así como las propiedades de sus conexiones con distintas partes del estriado, atribuyó sus funciones en tres circuitos distintos: Límbico, de asociación y somatosensorial (Mandelbaum et al., 2019). Esta orientación multidimensional anatómica y funcional, además de su participación en diferentes componentes del dolor en condiciones de salud y patológicas, podrían hacer a los núcleos intralaminares una estructura de gran relevancia para el procesamiento del dolor, y formar parte de los circuitos involucrados en el desarrollo de su cronicidad.

3. JUSTIFICACIÓN

El dolor crónico es una condición debilitante para quien lo padece, y disminuye considerablemente su calidad de vida. En el caso del dolor crónico orofacial de origen neuropático, este puede resultar como complicación de otra enfermedad, infecciones virales o de procedimientos dentales de rutina, como tratamientos de conductos y procesos quirúrgicos como extracciones y colocación de implantes, siendo comúnmente la rama mandibular del nervio trigémino la más afectada.

Una de las complicaciones para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo del dolor neuropático orofacial es la dificultad del abordaje del nervio más comúnmente empleado, el nervio infraorbitario. Como solución a este problema, se han propuesto alternativas de modelos, como son la constricción del nervio infraorbitario en su porción distal y del nervio mentoniano, demostrando que en ambos casos existen alteraciones sensoriales tanto a nivel periférico como central.

Sin embargo, la mayoría de los estudios han sido realizados tomando en cuenta únicamente la dimensión sensorial del dolor que han permitido describir diferentes procesos que participan en su cronificación. De esta forma, dejan un espacio en la evaluación sus dimensiones afectiva y cognitiva, en las que clínicamente también existe un impacto importante y que afectan directamente la calidad de vida de quienes sufren de dolor crónico neuropático orofacial. Asimismo, el uso predominante de un modelo animal (rata), ha limitado el uso de estrategias experimentales que involucren herramientas como la modificación de genes específicos, para la búsqueda de mecanismos y alternativas terapéuticas.

Es por esto que es necesaria tanto la implementación de un modelo de dolor de acceso y ejecución simple en ratones, como la caracterización multidimensional de sus efectos. Dicha caracterización permitirá sentar las bases para la búsqueda de alteraciones en estructuras y circuitos específicos, como es el caso del núcleo parafascicular del tálamo y la corteza cingulada anterior, de los cuales se ha sugerido su participación en el desarrollo de dolor crónico neuropático en sus diferentes dimensiones. En este sentido, el establecimiento de las bases conductuales de un modelo específico de dolor neuropático orofacial, así como la evaluación de las estructuras involucradas en su procesamiento, permitiría también el estudio de métodos de modulación específica a nivel central y periférico, para la búsqueda de alternativas efectivas en el control del dolor y la posible prevención o reversión de sus efectos en sus dimensiones sensorial, afectiva y cognitiva.

El presente proyecto pretende caracterizar los efectos conductuales de una lesión neuropática de la región orofacial desde un abordaje multidimensional para así determinar la actividad de los sustratos neuronales en los que podrían converger distintas alteraciones sensoriales, afectivas y cognitivas producidas por dolor crónico.

4. HIPÓTESIS

La lesión de constricción del nervio mentoniano induce alteraciones sensoriales típicas del dolor neuropático. La lesión del nervio mentoniano también altera la respuesta de adaptación a estímulos del ambiente, por lo que puede ser utilizado como un modelo ideal para el estudio de la actividad neuronal de subcircuitos que subyacen las alteraciones emocionales y cognitivas inducidas por dolor neuropático crónico orofacial.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar conductualmente desde una perspectiva multidimensional el desarrollo del dolor crónico neuropático orofacial producido por una lesión trigeminal en un modelo de ratón C57BL/6.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar los cambios en la dimensión sensorial del dolor posterior a una lesión de constricción del nervio mentoniano.
- Caracterizar cambios en la respuesta de evitación/escape cuando hay dolor crónico neuropático orofacial.
- Establecer los cambios en procesos cognitivos de adaptación a:
 - La respuesta a estímulos relevantes.
 - La respuesta a cambios en las exigencias del medio
- Determinar la presencia de cambios en la actividad electrofisiológica del núcleo parafascicular del tálamo y la corteza cingulada anterior en su porción rostral bajo la influencia de la lesión trigeminal en un modelo de cabeza fija.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Sujetos de estudio

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con 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). Se utilizaron ratones macho y hembra de la cepa C57/BL6, con un peso inicial de 20 a 30 g. Fueron alojados en cajas de policarbonato en un cuarto con temperatura de 23°C, con agua y alimento *ad libitum*. Se dividieron aleatoriamente en dos grupos: el grupo experimental (cirugía de constricción del nervio mentoniano, CnM) y el grupo control (cirugía sham).

6.2 Lesión del nervio mentoniano

Para la lesión de constricción crónica, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de Ketamina/xilacina (en una solución de 1.18 mL Ket + 0.59 mL xil en 10 mL de solución salina) en una dosis de 0.1 mL/10 g de peso. La cirugía se realizó con control visual directo. Se realizó una incisión en la piel facial sobre la mandíbula para la exposición del nervio mentoniano (figura 1). Una vez localizado, su constricción fue hecha con una ligadura con sutura de catgut crómico 4-0, pasando la sutura por debajo del nervio y realizando un nudo. Posteriormente, la incisión fue suturada y se administró tratamiento antibiótico a una dosis de 0.3 mL de Baytril 2.5%/kg/día vía intraperitoneal. Para el grupo control, en la cirugía sham se realizó la misma incisión, se observó el nervio mentoniano sin ligarlo, y la incisión fue suturada. Ambas cirugías, de constricción del nervio mentoniano y aparente (sham), fueron hechas del lado derecho, dejando el lado izquierdo intacto.

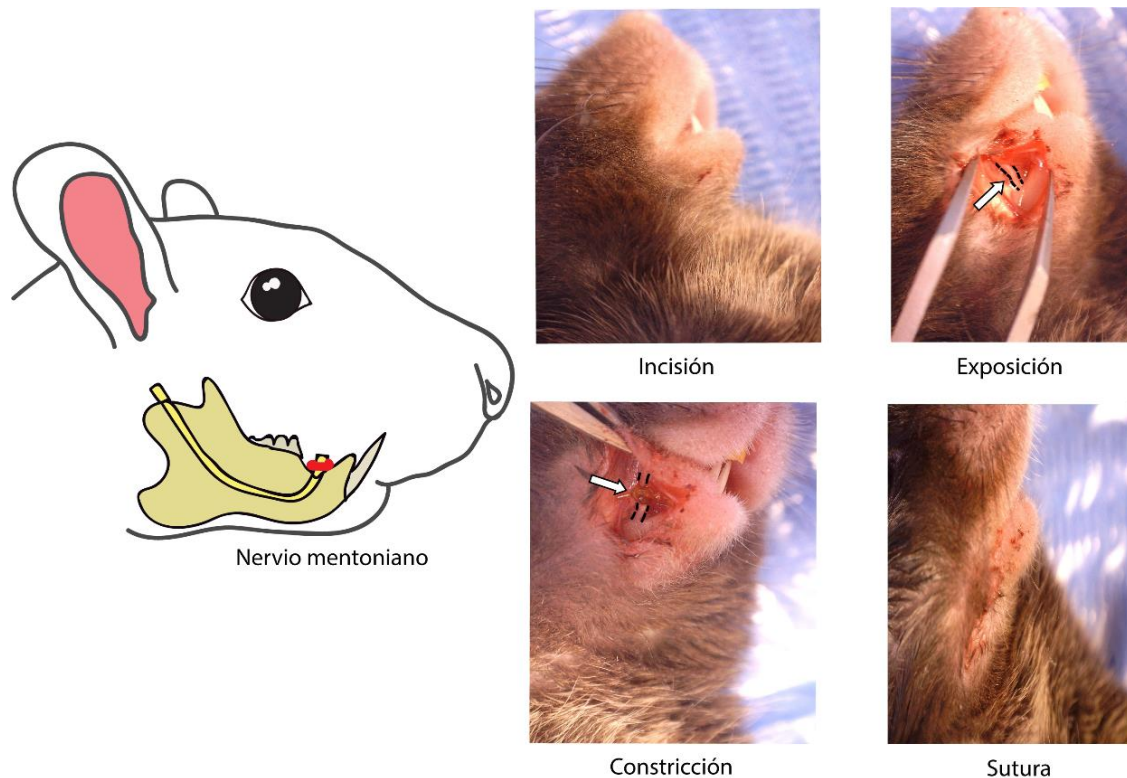


Figura 5. Lesión de constricción del nervio mentoniano. Las flechas indican la ubicación del nervio mentoniano en el panel superior derecho, y del nudo de sutura, en el panel inferior izquierdo.

6.3 Evaluación de la dimensión sensorial

6.3.1 Evaluación de respuestas espontáneas (observación de la conducta de acicalamiento)

Los ratones fueron colocados individualmente en un cilindro de acetato transparente de 15cm de diámetro y 25cm de altura y se colocaron dos espejos en la parte posterior, en un espacio iluminado. Previa habituación a dicho espacio por 10 minutos, los ratones fueron videograbados durante 10 minutos. Para evaluar la conducta de respuesta espontánea, se identificaron los episodios de acicalamiento orofacial, es decir, aquellos episodios en los que las patas delanteras del roedor entraban en contacto con la región orofacial. Dichos eventos fueron cuantificados en número y duración y, para ser incluidos en las mediciones no debían estar precedidos o sucedidos por acicalamientos en el resto del cuerpo (Kristof Deseure & Hans, 2015).

6.3.2 Evaluación de respuestas provocadas (prueba de estimulación mecánica)

Los ratones fueron colocados individualmente en cajas plásticas transparentes de 17cm x 9cm x10cm y se permitió su habituación a la caja por 10 minutos más. Se utilizó una serie graduada de filamentos de von Frey para la aplicación de estímulos mecánicos. La fuerza necesaria para doblar cada uno de los filamentos era: 0.4g, 0.6g, 1g, 1.4g, 2g, 4g, 6g, 8g y 10g. Para habitar a los ratones a los movimientos del observador con los filamentos, cada 30 segundos, durante 10 minutos, el mango de los filamentos era posicionado dentro de la caja, sin aplicar el estímulo sobre el ratón. La aplicación de los estímulos se realizó mientras los ratones no se encontraban en movimiento.

Se estimuló bilateralmente la región mentoniana de los ratones con los filamentos, aplicándolos en orden ascendente, y su respuesta fue graduada asignándole un puntaje, de acuerdo con la escala propuesta por Vos (Vos et al., 1994):

0, en ausencia de respuesta

1, si el ratón detectaba el estímulo

2, si existía una reacción de retroceso

3, ante una reacción de escape al filamento (el roedor evitaba el contacto posterior), o de ataque a este

4, si se presentaba una conducta de acicalamiento prolongado posterior a la aplicación del estímulo (si las patas delanteras contactaban con el área al menos tres veces).

6.4 Evaluación de la dimensión afectiva

6.4.1 Tarea de evitación/escape

Para evaluar el componente afectivo/emocional en diferentes momentos posteriores a la cirugía se utilizó el paradigma conductual de evitación/escape (LaBuda & Fuchs, 2000). Dicho paradigma permite al animal elegir un ambiente asociado con la aplicación de un estímulo mecánico sobre la región del lado en el que se realiza la cirugía o sobre una región no operada. Si el animal huye de la estimulación de la zona afectada, permanecerá más tiempo del lado iluminado a pesar de que el animal prefiera de forma natural el lado oscuro. Por lo tanto, la naturaleza aversiva del dolor puede medirse a través de la evitación o el escape de una locación que es preferida normalmente.

Los sujetos fueron colocados individualmente en una caja de plexiglás, dividida en dos compartimentos comunicados, uno de ellos oscuro y el otro iluminado con luz blanca; y se les permitió libre movimiento durante los 20 minutos de duración de la tarea, previa habituación a la caja por 10 minutos. El estímulo mecánico consistió en la aplicación de un filamento de von Frey de 1.4g sobre la región mentoniana a un intervalo constante de 15 segundos. Si el animal se encontraba en el lado oscuro de la cámara, el estímulo era aplicado sobre la región del lado del cual se realizó la lesión, y si se encontraba del lado luminoso, se aplicaba sobre una región corporal diferente, no operada (figura 6). Se registró la cantidad de tiempo que los animales pasaron en el lado luminoso de la cámara mediante sensores infrarrojos durante los 20 minutos de duración de la tarea. Dicha evaluación tuvo lugar antes de realizarse la constricción, así como 4, 8, 15, 22, 29, 36 y 43 días posteriores a la cirugía de lesión del nervio mentoniano.

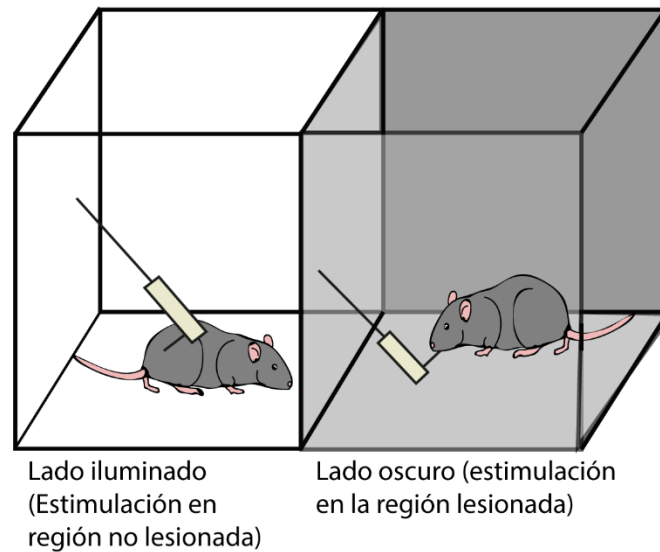


Figura 6. Representación de la tarea de evitación-escape

6.5 Evaluación de conductas de bienestar general

Para determinar si el bienestar general de los ratones era afectado por la lesión de constricción del nervio mentoniano, se implementaron las tareas de construcción de la madriguera y construcción del nido. Dichas conductas son consideradas “actividades de la vida diaria”, y fueron propuestas por Deacon y cols., como una forma de evaluar su deterioro como signo de una disfunción conductual (Deacon, 2006, 2012) Para la tarea de construcción de la madriguera, se emplearon cilindros plásticos de 20cm de largo x 7cm de diámetro, con uno de los extremos sellado. El extremo abierto estaba ligeramente elevado del piso mediante dos tornillos metálicos de 5cm, con una distancia de 2cm entre ellos (figura 7). La duración de la evaluación fue de dos horas, comenzando dos horas antes del cambio de ciclo a fase oscura. Los cilindros se llenaron con 200g de alimento estándar, y fueron colocados individualmente en cajas plásticas, sin alimento extra fuera de los cilindros y con agua *ad libitum*. Cada uno de los animales fue colocado en una caja y, transcurridas dos horas, el cilindro fue removido y se midió la cantidad de alimento desplazado hacia el exterior del cilindro. Dicha tarea consistió en una sesión de habituación, una sesión pre-quirúrgica y tres sesiones posteriores a la lesión del nervio mentoniano (5, 7 y 21 días).

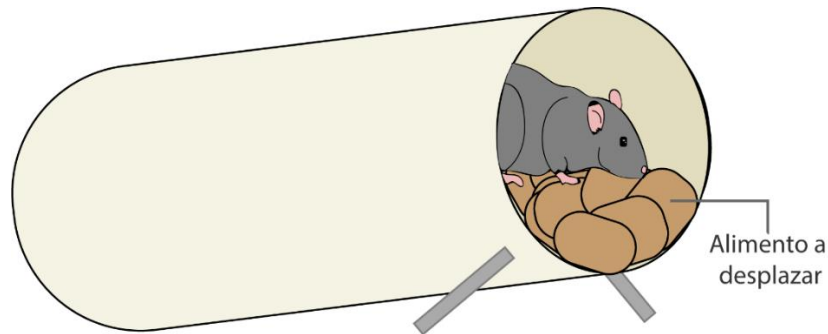


Figura 7. Equipo empleado para la evaluación de construcción de la madriguera. Consiste en un tubo plástico, cerrado en uno de los extremos y, en el otro, dos tornillos para elevarlo y minimizar el riesgo de que el alimento sea desplazado por movimientos no asociados a la conducta de evaluar.

Evaluación de construcción del nido: después de la conducta anterior, en la misma caja se colocó material para la construcción del nido (dos hojas de papel higiénico de 9.5cm x 10cm). Los resultados fueron evaluados a la siguiente mañana, mediante la asignación de un puntaje de complejidad del nido construido:

- 1, si el material de construcción del nido estaba intacto.
- 2, si el material estaba parcialmente rasgado.
- 3, si el material estaba desgarrado, pero no había un nido identificable.
- 4, si existía un nido identificable, pero de superficie plana.
- 5, si existía un nido identificable, con apariencia de cráter.

Dicha prueba fue realizada durante los mismos días de evaluación de la tarea de excavación de la madriguera.

6.6 Evaluación de la dimensión cognitiva

6.6.1 Tarea switch

Los experimentos descritos a continuación se realizaron en una caja operante (figura 8). Una de las paredes tenía dos luces frontales y dos puertos con un emisor infrarrojo asociado a un sensor, el cual registraba constantemente la entrada de la señal. Dicho circuito era interrumpido con la introducción del hocico del ratón en el puerto, conducta denominada "nose poke" (NP), que fungió como la respuesta que

dicho animal debía emitir ante un estímulo. En la pared opuesta, se encontraba un puerto dispensador de recompensas (solución de sacarosa al 5%), que también contaba con un sensor infrarrojo que detectaba cuando el roedor ingresaba a beber su recompensa. Dicha caja operante fue controlada mediante las interfaces de los programas Arduino y Matlab.

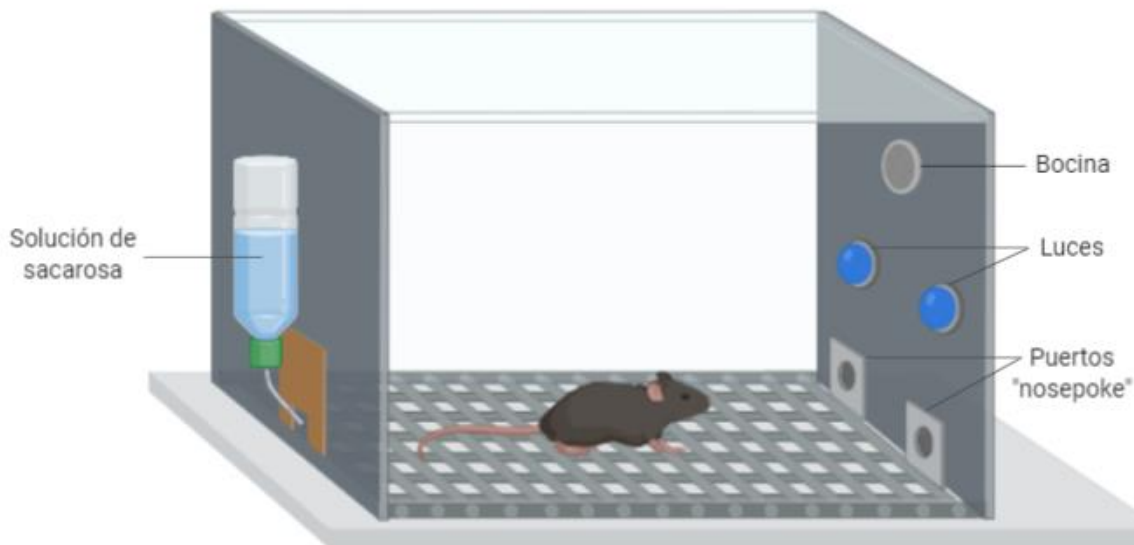


Figura 8. Caja operante. El equipo cuenta con un altavoz, dos luces frontales, dos puertos infrarrojos en donde el roedor debe introducir el hocico y un puerto de recompensas, en donde se administra una solución de sacarosa. Imagen elaborada con BioRender®

Para evaluar la respuesta de los roedores a estímulos relevantes, se utilizó una tarea de tipo switch basada en la propuesta por Leenaars (Leenaars et al., 2012). En la fase inicial del entrenamiento, los roedores fueron entrenados para asociar la conducta NP con la obtención de una recompensa de sacarosa. Una vez que los ratones lograron una relación de 15-20 NP en sesiones de 10 minutos se consideró que establecieron dicha asociación. Posteriormente, se llevó a cabo una tarea de discriminación en la cual el sujeto debía distinguir entre dos estímulos (tono 1: 100Hz, tono 2:200Hz) para decidir hacia cuál puerto dirigirse (puerto A o B). En una tesis previa en el laboratorio se determinó que estos tonos pueden ser utilizados para la tarea ya que el animal los puede detectar y discriminar correctamente (Herrera, 2018).

La tarea comenzaba con la presentación, durante un segundo, de alguno de los dos estímulos, el estímulo que se presentó primero fue elegido al azar mediante programación. Si el animal se dirigía al puerto correcto (*i.e.* puerto A si recibió el tono 1, puerto B si recibió el tono 2), este ensayo era considerado como correcto y el animal debía ir al puerto de recompensas para recibirla. Si se dirigía al puerto contrario, el ensayo era considerado como erróneo, la recompensa no era liberada y el estímulo era nuevamente presentado después de 5s. En el caso de que el animal no respondiera en una ventana de tiempo de 5 segundos, dicho ensayo era considerado una omisión (figura 9).

Los animales fueron evaluados en sesiones de 30 minutos. Con el fin de evitar que la presentación del estímulo switch se volviera predecible, el cambio en el tono se realizaba al azar entre el ensayo 2 al 4; en un proyecto piloto determinamos que este era el número ideal de ensayos para observar la conducta de cambio en el tiempo de sesión que utilizamos (datos no mostrados). Así, la estructura de la tarea permitió tener ensayos en los que el ratón, de forma inesperada, debía cambiar su estrategia de respuesta (*i.e.* dejar de responder continuamente en el mismo puerto, para dirigirse al otro). A estos ensayos los denominamos ensayos “switch” (ver figura 9). Como cada bloque tenía al menos 2 ensayos del mismo tono, el tercer ensayo fue elegido como el ensayo de cambio (switch) o el de repetición. Para el análisis de esta conducta, se tomaron en cuenta únicamente los ensayos “switch”, en los que se calculó la fracción de respuestas correctas, la latencia de respuesta, definida como el tiempo transcurrido entre la presentación del tono y la respuesta del ratón en el puerto NP; así como los ensayos de omisión, es decir, aquellos ensayos que no fueron respondidos dentro de la ventana de respuesta (5 segundos).

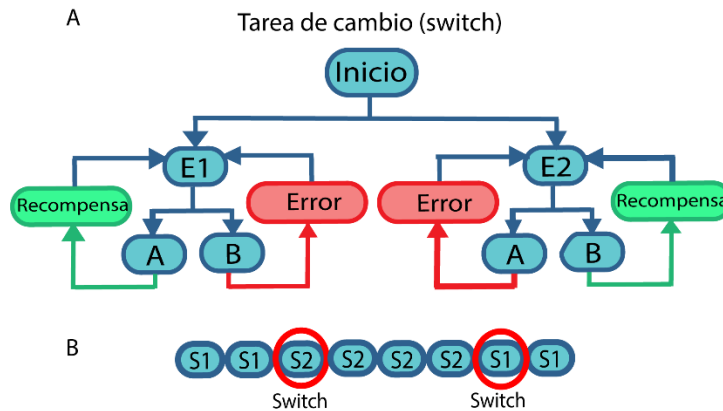


Figura 9. Tarea switch. A. Estructura de un ensayo de la tarea. B. La tarea está organizada en bloques de ensayos, el ensayo en donde el estímulo cambiaba, era considerado como ensayo “switch”

6.6.2 Tarea de elección forzada de dos alternativas

Se empleó también una tarea de elección forzada de dos alternativas (Two-alternative forced choice). En ella, como en la tarea switch previamente descrita, los roedores debían distinguir entre dos estímulos auditivos (tonos 1 y 2) para elegir a qué puerto dirigirse (puertos A y B). Sin embargo, en esta tarea los ensayos no fueron realizados de forma agrupada, sino que los tonos por ensayo se aplicaron de manera aleatoria. Dicha tarea tenía una duración de 30 minutos. Se calculó la fracción de respuestas correctas y el tiempo de reacción (latencia).

6.6.3 Tarea de cambio de posición (set shifting)

Una vez que los ratones aprendieron la tarea de elección forzada de dos alternativas, fueron sujetos a una tarea de cambio de posición de acuerdo con el protocolo de Kato (Kato et al., 2018). Esta tarea consiste en evaluar el proceso de adaptación a cambios en la regla conductual; para tal fin, la única regla era responder en el puerto derecho para obtener la recompensa de sacarosa, es decir, debe cambiar la estrategia en la que los tonos eran determinantes para la respuesta y recompensa y enfocarse en sólo responder al puerto derecho de forma independiente del tono que recibía (figura 10).

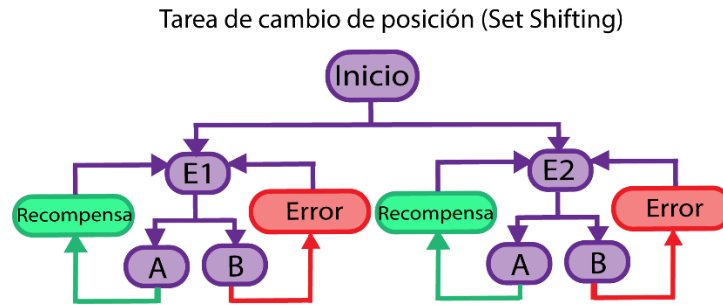


Figura 10. Tarea de cambio de posición (set-shifting). Estructura de un ensayo.

6.6.4 Tarea de aprendizaje en reversa

Posteriormente a la tarea de cambio de posición ya descrita, los ratones fueron sujetos a una tarea de aprendizaje en reversa, en donde la regla de aprendizaje de la tarea de cambio de posición fue invertida, es decir, los ratones debían dirigirse al puerto izquierdo, sin importar cuál de los tonos era aplicado, o cuál de las luces frontales era encendida (figura 11).

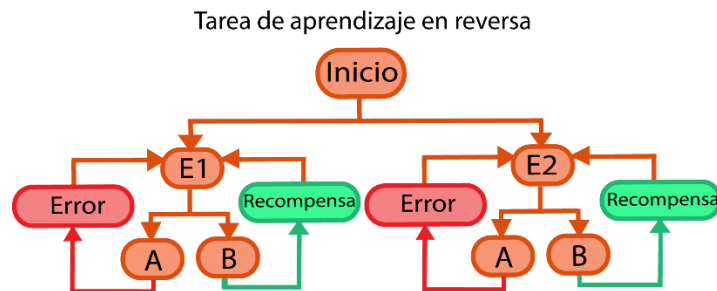


Figura 11. Tarea de aprendizaje en reversa. Estructura de un ensayo.

6.7 Registros electrofisiológicos extracelulares en ratones en un modelo de cabeza fija

6.7.1 Implantación de barra para modelo de cabeza fija y ubicación de Pf

El sistema de cabeza fija fue diseñado en el software Sketch-up® e impreso con el software Ultimater Cura 6®. Para la implantación de la barra en el cráneo del ratón, este fue anestesiado con la solución de ketamina /xilazina mencionada previamente y se afeitó la región correspondiente a la piel que cubre el cráneo. El animal fue colocado en un aparato estereotáxico, se realizó una incisión en sentido

anteroposterior, se identificó bregma y se registraron las coordenadas para la región del núcleo parafascicular del tálamo (AP -2.2mm, ML \pm 0.7mm, DV -3mm) contralateral a la lesión del nervio mentoniano. Una vez ubicadas las coordenadas, se realizó una trepanación de 1x1 mm y se cortaron las meninges para exponer la superficie del cerebro (figura 12). Posteriormente, la barra para fijar al ratón al sistema conductual se cementó sobre la superficie del cráneo con resina dental (Ketac Cem®), dejando libre la trepanación para el registro neuronal y esta fue cubierta temporalmente por silicón dental (Xantopren®). Se administró antibiótico a una dosis de 0.3 mL de Baytril 2.5%/kg/día vía intraperitoneal.

Para corroborar que las coordenadas eran las correctas, se administró Fluorogold (FG) al 1% (400nL) mediante una inyección por iontoforesis (2-8 μ A por 5-8 minutos, con pulsos de 5s). Posteriormente, el animal fue perfundido, fijado con paraformaldehído al 4% y el cerebro fue removido. Se cortaron secciones de 40 μ m, y fueron observadas en el microscopio.

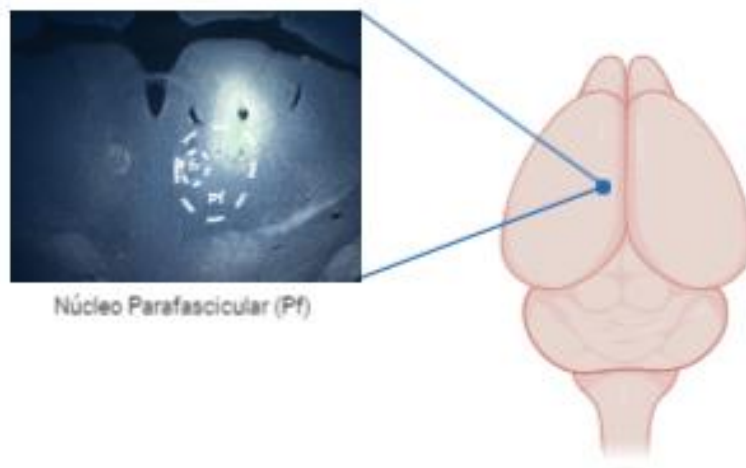


Figura 12. Sitio de registro electrofisiológico de Pf. Inyección de FG en Pf. Imagen elaborada con BioRender®

El procedimiento de implantación de la barra para el sistema de cabeza fija fue realizado también para evaluar la corteza anterior cingulada (ACC) (figura 13). En este caso, la trepanación fue realizada en las coordenadas AP +1.6mm, ML \pm 0.4mm, DV -3mm, y se llevó a cabo el procedimiento antes mencionado.

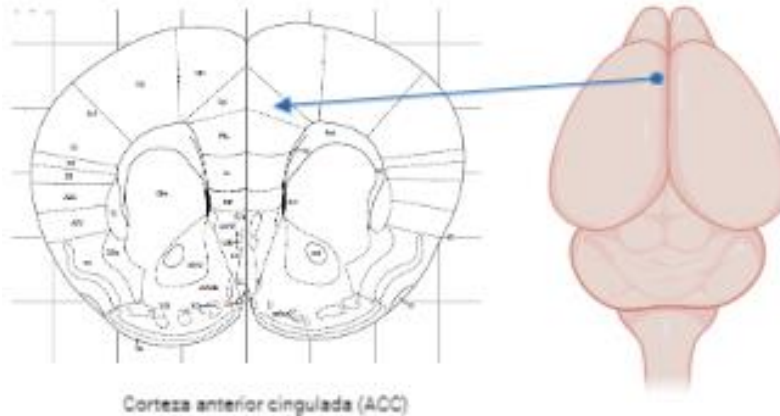


Figura 13. Sitio de registro electrofisiológico de ACC. Imagen elaborada con BioRender®

6.7.2 Registros electrofisiológicos extracelulares

Se utilizó un arreglo de electrodos, que consiste en una punta muy delgada que contiene 16 microelectrodos (Neuronexus®). El área de registro de cada electrodo es de 35 μm de diámetro y 5mm de longitud, y están distribuidos en una superficie menor a 500 μm^2 .

Se empleó el procesador de adquisición multicanal OpenEphys®, sólo las neuronas individuales con potenciales de acción con una relación de señal/ruido mayor a 3:1 fueron analizadas. Es importante destacar que es posible registrar más de una neurona por cada electrodo. Los potenciales de acción fueron aislados en línea mediante una modificación del software Kilosort (Matlab/Python) y Wave_Clust 3 (Matlab). Los potenciales de campo local fueron amplificados 1000X, filtrados de 0.7-300Hz y digitalizados a 1KHz.

6.7.3 Esquema de estimulación mecánica

Los animales fueron sedados con una inyección intraperitoneal de Midazolam/Propofol/Fentanilo (en una solución de 1 mL midazolam, 6 mL propofol, 1.2 mL fentanilo en 10 mL de solución salina) en una dosis de 0.1 mL/10 g de peso, y colocados en el sistema de cabeza fija, sostenido en el aparato estereotáxico.

Durante el registro se realizó estimulación mecánica bilateral en la región mentoniana con filamentos de von Frey (0.4 g, 4 g y 10 g) con un intervalo de 10 segundos entre cada estímulo, en un esquema de 5 estimuciones por lado. Los registros electrofisiológicos en presencia de estimulación mecánica fueron realizados en una sesión prequirúrgica y seis sesiones posteriores a la lesión del nervio mentoniano (3, 7, 14, 21, 35 y 42 días posteriores a la lesión).

6.8 Análisis estadístico

Los datos de las figuras mostradas son presentados como promedios \pm el error estándar de la media (E.E.M). Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software MATLAB R2017b o GraphPad Prism 6. Para comparar las respuestas evocadas (prueba de von Frey) se utilizó la prueba de Wilcoxon; de la misma forma la actividad neuronal de 3 segundos antes y tres segundos después del estímulo mecánico se comparó usando wilcoxon signed rank test y se determinó como neurona modulada si tenía diferencias significativas. En el caso del índice de preferencia por el compartimento oscuro en la tarea de evitación-escape, así como la evaluación del desempeño en las tareas de evaluación cognitiva a lo largo de los días entre el grupo de lesión del nervio mentoniano y el grupo de cirugía sham, se utilizó una prueba de ANOVA de dos vías, seguida de una prueba post-hoc de Bonferroni, en el caso de ser necesario. Para analizar el desempeño en las tareas de evaluación cognitiva comparando las medias entre grupos, se utilizó una prueba t de student para muestras independientes. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la lesión en la dimensión sensorial

7.1.1 La lesión de constricción crónica induce signos de dolor neuropático

Con el objetivo de determinar los cambios en la dimensión sensorial, se evaluó la conducta de respuestas espontáneas, así como de respuestas provocadas por estímulos mecánicos. En el caso de las respuestas espontáneas, se cuantificaron los acicalamientos orofaciales, como una conducta representativa de dolor espontáneo. Las respuestas provocadas por estímulos mecánicos fueron evaluadas a través de la aplicación de una serie de filamentos de von Frey (0.4g, 0.6g, 1g, 1.4g, 2g, 4g,6g,8g,10g). La figura 14 muestra los resultados del análisis de las respuestas orofaciales espontáneas.

El análisis de los acicalamientos orofaciales se muestra en la figura 14A. Se observan, en forma de suma acumulada, los eventos de acicalamiento a lo largo de cada una de las sesiones de videograbación. Ambos grupos mostraron la tendencia a disminuir el número de acicalamientos; sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los grupos a lo largo de las sesiones después de realizar la lesión, excepto en el día 35, en donde el número de eventos de acicalamiento es mayor en el grupo lesionado. Este comportamiento también es observable en la figura 14B, que muestra, en forma de un mapa de rastreo, los eventos de acicalamiento orofacial para cada uno de los ratones, en cada una de las sesiones de evaluación, cabe mencionar que es una conducta muy difícil de evaluar; este es el primer trabajo que muestra este comportamiento espontáneo en ratón.

ambos grupos. Sin embargo, en el día 7 post operatorio, el puntaje de respuesta a los filamentos de menor fuerza es mayor en el grupo lesionado. Estas diferencias son más notorias hacia el día 21 post operatorio, en donde el puntaje de respuesta es mayor, tanto para los filamentos que ejercen las fuerzas menores, como para los que ejercen las mayores, lo que representa un signo de hipersensibilidad (alodinia e hiperalgesia) mecánica. En las sesiones posteriores, el puntaje de respuesta disminuyó para ambos grupos. Sin embargo, en dichas sesiones, este siguió siendo mayor para el grupo con lesión trigeminal. Estas diferencias se presentaron de forma bilateral, con una predominancia en la región ipsilateral a la lesión, y ocurrieron en todas las sesiones posteriores a la cirugía.

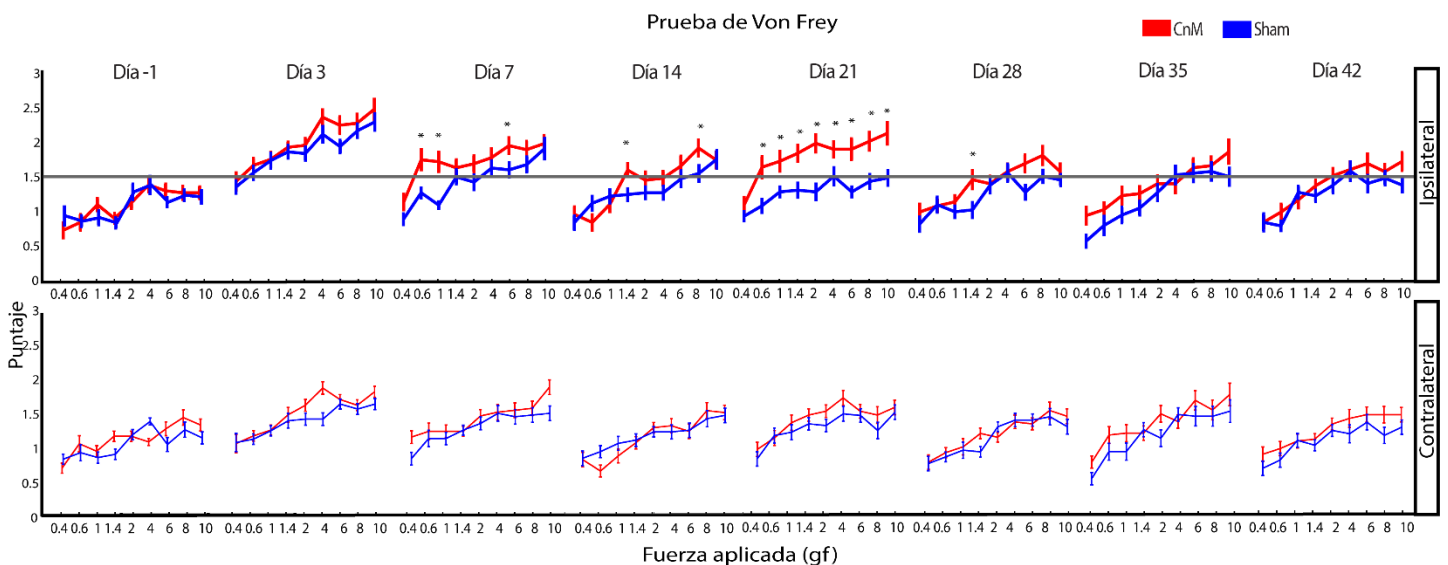


Figura 15. Evaluación de las respuestas provocadas por estímulos mecánicos. Se observa el puntaje de respuesta para cada fuerza aplicada en la región ipsilateral (panel superior) y contralateral (panel inferior) a la lesión, *wilcoxon, $p < 0.05$. N=14.

7.2 Efecto de la lesión en la dimensión afectiva

7.2.1 La lesión de constricción del nervio mentoniano modifica la conducta de evitación/escape

Para evaluar la dimensión afectiva/emocional del dolor se empleó un paradigma de evitación/escape, en el cual un ratón debe elegir entre un lugar asociado a la aplicación de un estímulo mecánico aplicado en la región afectada, y otro asociado a la aplicación del mismo estímulo, en una región no lesionada. Dicha evaluación se realizó con una sesión pre-operatoria y 7 post operatorias, 4, 8, 15, 22, 29, 36 y 43 días después de lesionar el nervio mentoniano.

La figura 16 muestra el índice de preferencia por el compartimento oscuro a lo largo del tiempo de duración del paradigma, para cada una de las sesiones de evaluación. Durante la sesión pre operatoria, o día -1, ambos grupos muestran preferencia por el lado oscuro, en el que se aplicó el estímulo en la región mentoniana derecha. En el día 4 post operatorio, dicha preferencia disminuyó en el grupo lesionado, y fue menor que la observada en el grupo sham (t -test, $p < 0.05$), cuya preferencia por el compartimento oscuro fue similar a la mostrada en la sesión pre operatoria y se mantuvo así a lo largo de las demás sesiones. Esto sugiere que la estimulación en la región lesionada, que desarrolló hipersensibilidad mecánica, resulta aversiva para los ratones del grupo experimental, a diferencia de los ratones no lesionados. Se observó también que, para el grupo con lesión del nervio mentoniano, la preferencia por el compartimento oscuro se restableció en el día 8 post operatorio, y continuó en aumento durante las sesiones posteriores.

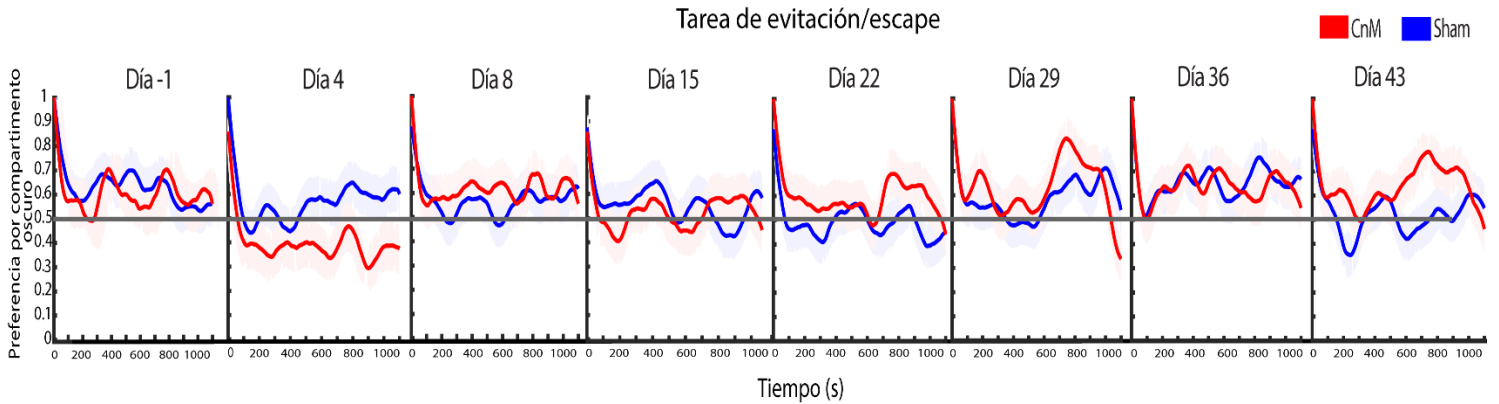


Figura 16. Índice de preferencia por el compartimento oscuro en la tarea de evitación/escape para el grupo lesionado (rojo) y el grupo sham (azul). N=14.

7.3 Efecto de la lesión en la conducta de bienestar general

7.3.1 La lesión de constricción del nervio mentoniano no afecta el bienestar general de los ratones

Para evaluar el impacto de la lesión del nervio mentoniano en el bienestar general de los roedores, se emplearon dos paradigmas de construcción de la madriguera y de construcción de nido.

En la figura 17A se muestra la cantidad de alimento desplazado, para cada una de las sesiones de evaluación. En ellas, los grupos de lesión del nervio mentoniano y sham muestran un comportamiento similar, sin diferencias significativas en la cantidad de alimento desplazado, incrementando ésta con el paso de los días de evaluación (t-test, $p > 0.05$).

Con respecto a la conducta de construcción del nido, se obtuvieron resultados similares. Como se muestra en la figura 17B, el puntaje de complejidad del nido fue similar en ambos grupos, para cada una de las sesiones de evaluación.

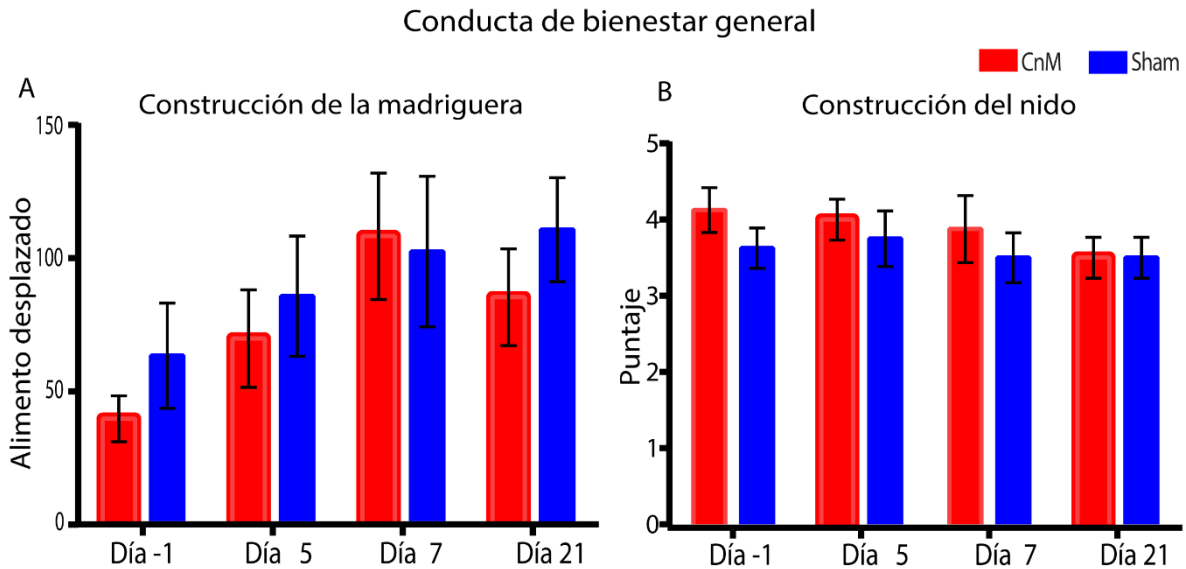


Figura 17. Evaluación de las conductas de bienestar general. A. Cantidad de alimento desplazado en la conducta de construcción de la madriguera. N=16. B. Puntaje de complejidad del nido construido. N=16.

7.4 Efecto de la lesión en la dimensión cognitiva

7.4.1 La lesión de constricción del nervio mentoniano altera el tiempo de respuesta a estímulos relevantes

La evaluación de la respuesta a estímulos relevantes se realizó a través de una tarea de cambio (switch). En ella se analizó la respuesta al estímulo switch o de cambio, es decir, aquel tono que era diferente del bloque de tonos antes presentado.

Se calculó la latencia a las respuestas tanto correctas como incorrectas. Dicho período comprende el tiempo que transcurre entre la presentación del tono switch y la llegada del roedor al puerto de respuesta. La figura 18 muestra el desempeño de los ratones en la tarea switch. La figura 18A muestra la función de distribución acumulada de la latencia de respuesta para ambos grupos, tomando en cuenta tanto las respuestas correctas como las incorrectas. Se encontró que, para el caso de las respuestas correctas, la latencia fue mayor en el grupo lesionado (t-test, $p > 0.05$). Sin embargo, la latencia cuando las respuestas eran equivocadas fue menor para el grupo lesionado. Estas diferencias también se observaron al comparar los promedios entre grupos, como muestra la figura 18B.

Además, se analizaron de forma independiente aquellos ensayos que no fueron respondidos hasta 5 segundos después de la presentación del tono. Dichos ensayos fueron denominados ensayos de omisión, y son presentados en la figura 18C. La figura muestra que el grupo lesionado tuvo un mayor número de ensayos de omisión, con respecto al grupo control, en bloques de 4 sesiones cada uno. La diferencia se redujo en los últimos bloques de sesiones.

Para evaluar el aprendizaje en la tarea, se calculó la fracción de respuestas correctas, es decir, el cociente de los ensayos respondidos correctamente entre el total de respuestas emitidas. En el caso de esta tarea, los animales mostraron un desempeño similar (figura 18D). Sin embargo, hacia el último bloque de sesiones, ninguno de los dos grupos había alcanzado el criterio de aprendizaje establecido.

Con el objetivo de determinar el papel de la motivación sobre el desempeño de los ratones, se evaluó el número de ensayos respondidos a través de las sesiones, fueran éstos correctos o incorrectos. La figura 18E muestra que los grupos no presentaron diferencias en el número de intentos para obtener una recompensa.

Tarea de Cambio (Switch)

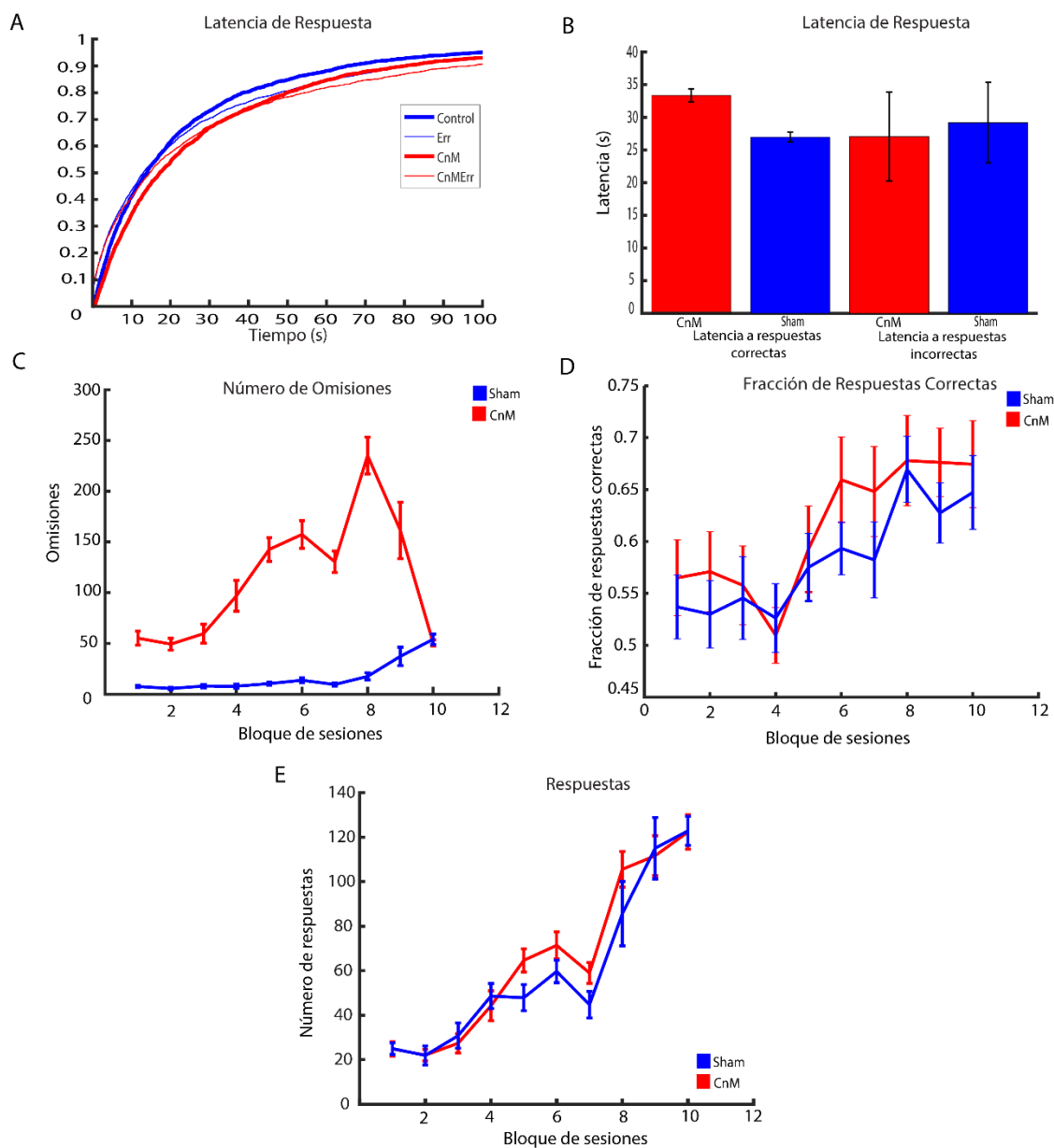


Figura 18. Evaluación de la tarea de cambio (Switch). A. Función de distribución acumulada de latencia a respuestas correctas (líneas gruesas) y a respuestas incorrectas (líneas delgadas), para el grupo lesionado (CnM) y el grupo control (Sham). B. Promedio de latencias a respuestas correctas e incorrectas. C. Número de ensayos no respondidos en el tiempo requerido (omisiones) a lo largo de las sesiones de evaluación. D. Fracción de respuestas correctas a lo largo de las sesiones. E. Número de respuestas emitidas a lo largo de las sesiones. N=9.

7.4.2 Efecto de la lesión en una tarea de discriminación simple

Durante la tarea de elección forzada de dos alternativas se encontraron diferencias en la latencia a las respuestas correctas a lo largo de los días, siendo menor en el grupo experimental (figura 19A). Sin embargo, al evaluar la latencia cuando los ensayos fueron incorrectos, se encontró que esta fue mayor para el grupo control ($p=0.0086$), como se observa en la figura 19B. Estas diferencias fueron significativas a partir del tercer bloque de sesiones. Al comparar el promedio de las latencias entre grupos, como se presenta en la figura 19C no se observaron diferencias significativas ($p=0.1976$).

Por otro lado, se evaluó la fracción de respuestas correctas, encontrando un desempeño similar entre los grupos, a lo largo de las sesiones ($p=0.4072$) y al comparar los promedios ($p=0.1203$). Dicha fracción aumentó progresivamente con el paso de los días, y ambos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje establecido (figura 19D).

En el caso de los ensayos de omisión (figura 19E), no se observaron diferencias significativas a lo largo de los días ($p=0.1705$). Al evaluar el número de respuestas emitidas a lo largo de las sesiones, fueran estas correctas o incorrectas, se encontró que este fue similar en las sesiones ($p=0.1019$).

Tarea de Elección Forzada de Dos Alternativas

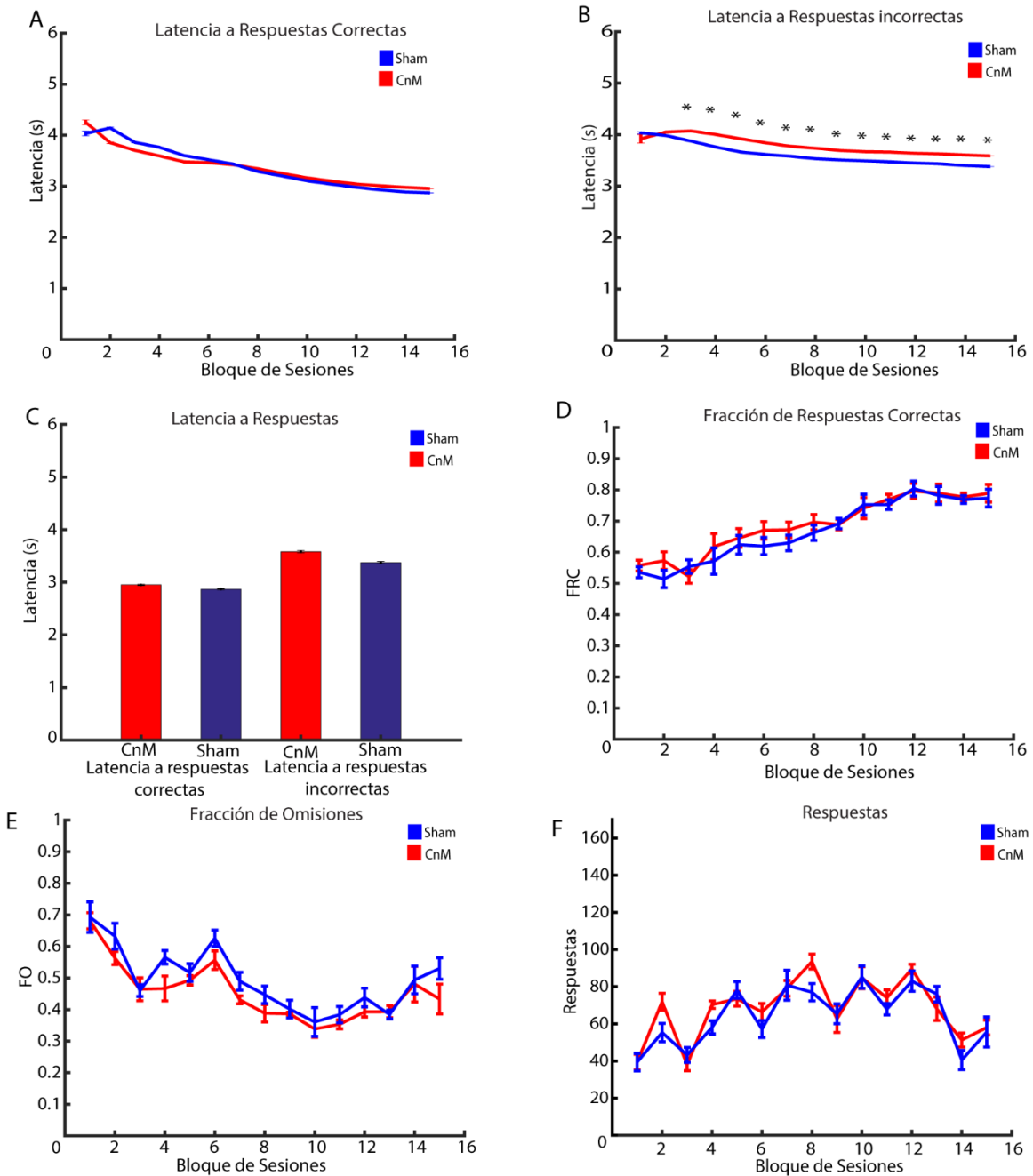


Figura 19. Evaluación de la tarea de elección forzada de dos alternativas. A. Latencia a respuestas correctas para el grupo lesionado (CnM) y para el grupo control (Sham) a lo largo de las sesiones de evaluación. B. Latencia a respuestas incorrectas a lo largo de las sesiones de evaluación. C. Promedio de latencia a respuestas correctas e incorrectas. D. Fracción de respuestas correctas a lo largo de las sesiones. E. Fracción de ensayos no respondidos a tiempo (omisiones). F. Número de ensayos respondidos a través de las sesiones. N=9.

7.4.3 La lesión del nervio mentoniano altera la adaptación a los cambios en las demandas del medio

Para evaluar la capacidad de adaptación a nuevas exigencias del medio se empleó una tarea de cambio de posición (set shifting). En ella, después de haber adquirido la asociación entre un tono y un puerto de respuesta, los ratones debían responder a un solo puerto, independientemente del tono presentado, funcionando éste únicamente como indicador para emitir dicha respuesta. Para esta tarea se evaluó la latencia a ensayos respondidos de forma correcta, incorrecta, la fracción de ensayos respondidos correctamente, la fracción de ensayos no respondidos (ensayos de omisión), y el número de ensayos respondidos. Se tomó como criterio de aprendizaje aquella sesión en la que los ratones alcanzaron el 70% de ensayos respondidos correctamente.

Como se muestra en la figura 20A, el tiempo de respuesta fue distinto entre ambos grupos: se observó, para todas las sesiones, una latencia aumentada a las respuestas correctas en el grupo lesionado con respecto al control ($p < 0.0001$), al igual que una latencia mayor al evaluar el promedio de todas las sesiones ($p = 0.0004$) (figura 20C). De manera interesante, se encontró que dicha condición estaba invertida cuando la respuesta era incorrecta, es decir, los ratones lesionados presentaron una latencia menor a los ensayos incorrectos. Dichos resultados se mantuvieron desde la primera hasta la última sesión de entrenamiento ($p < 0.0001$), sin haber diferencias en la comparación de promedios entre los grupos ($p = 0.0988$) (figuras 20B, 20C).

En la tarea ya mencionada, se observó una fracción de respuestas creciente para ambos grupos ($p = 0.8433$), en donde estos alcanzaron el criterio de aprendizaje de forma similar (figura 20D). Se observó también un número similar en los ensayos no respondidos ($p = 0.0197$; $p = 0.6834$), que fue decreciendo conforme avanzaban las sesiones (figura 20E). Asimismo, como muestra la figura (20F), los grupos no mostraron diferencias en el número de respuestas a lo largo de las sesiones.

Tarea de Cambio de Posición (Set Shifting)

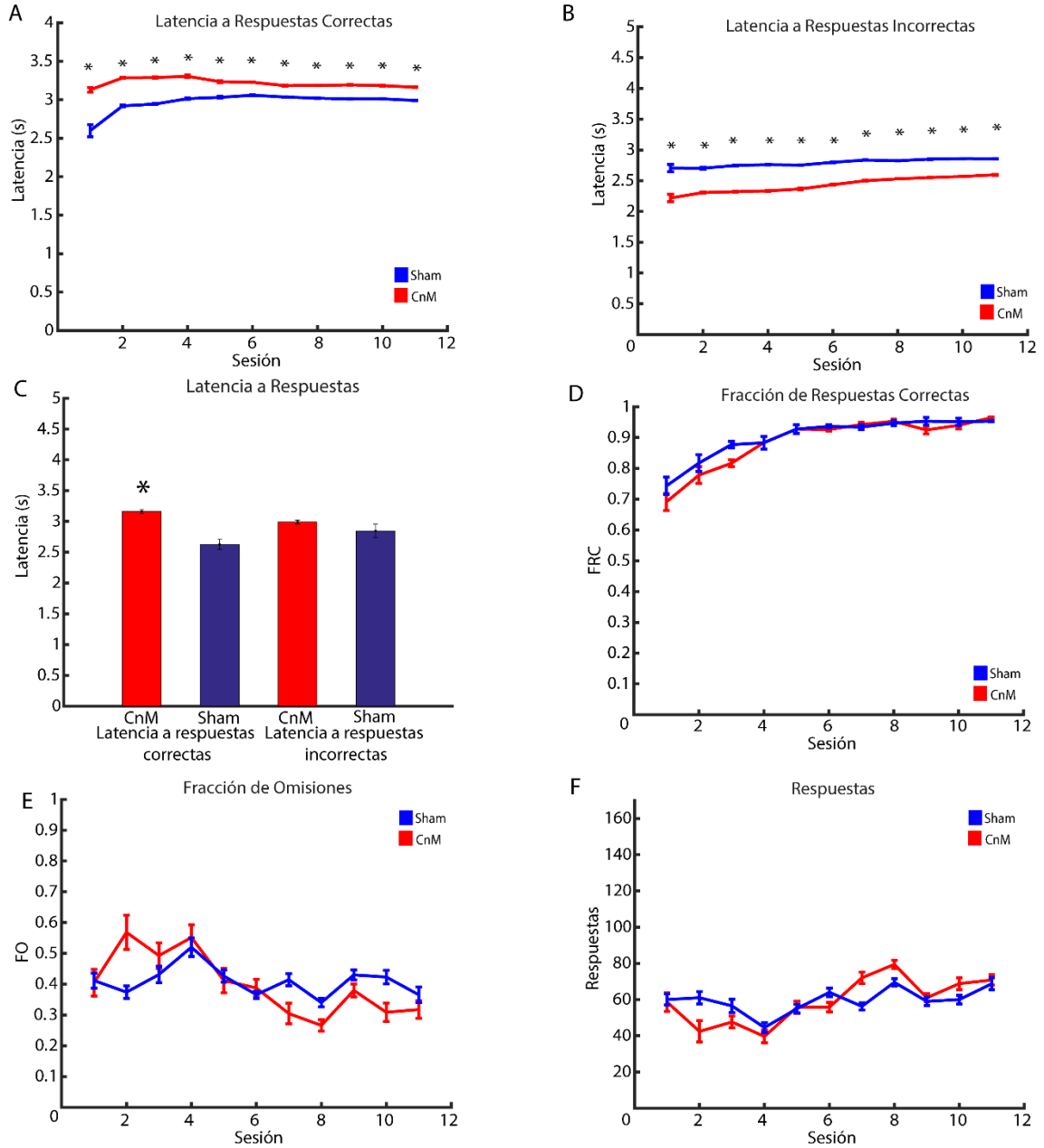


Figura 20. Evaluación de la tarea de cambio de posición (Set Shifting). A. Latencia a respuestas correctas para el grupo lesionado (CnM) y para el grupo control (Sham) a lo largo de las sesiones de evaluación. B. Latencia a respuestas incorrectas a lo largo de las sesiones de evaluación. C. Promedio de latencia a respuestas correctas e incorrectas. D. Fracción de respuestas correctas a lo largo de las sesiones. E. Fracción de ensayos no respondidos a tiempo (omisiones). F. Número de ensayos respondidos a través de las sesiones. N=9.

En el caso de la tarea de aprendizaje en reversa, la regla de la tarea de cambio de posición fue invertida, para que los ratones se dirigieran al puerto contrario, independientemente de cuál de los dos tonos era presentado. En esta tarea, (figura 21A), la latencia de respuesta fue similar entre ambos grupos cuando la respuesta era correcta ($p=0.3939$). Sin embargo, al evaluar la latencia a las respuestas incorrectas (figura 21B) se observó un fenómeno similar al encontrado durante la tarea de cambio de posición: la latencia era menor en el grupo lesionado, siendo dicha diferencia significativa en todas las sesiones de evaluación ($p=0.0084$; $p=0.4859$).

Con respecto a la fracción de respuestas correctas (figura 21D), se observó un aumento progresivo para ambos grupos a lo largo de las sesiones, en las que estos lograron alcanzar el criterio de aprendizaje. Se observa también, en la figura 21E, que la fracción de ensayos de omisión fue similar entre los grupos ($p=0.1010$). Así mismo, se encontró que, para esta tarea, el número de respuestas emitidas tampoco fue diferente entre los grupos experimental y control (figura 21F).

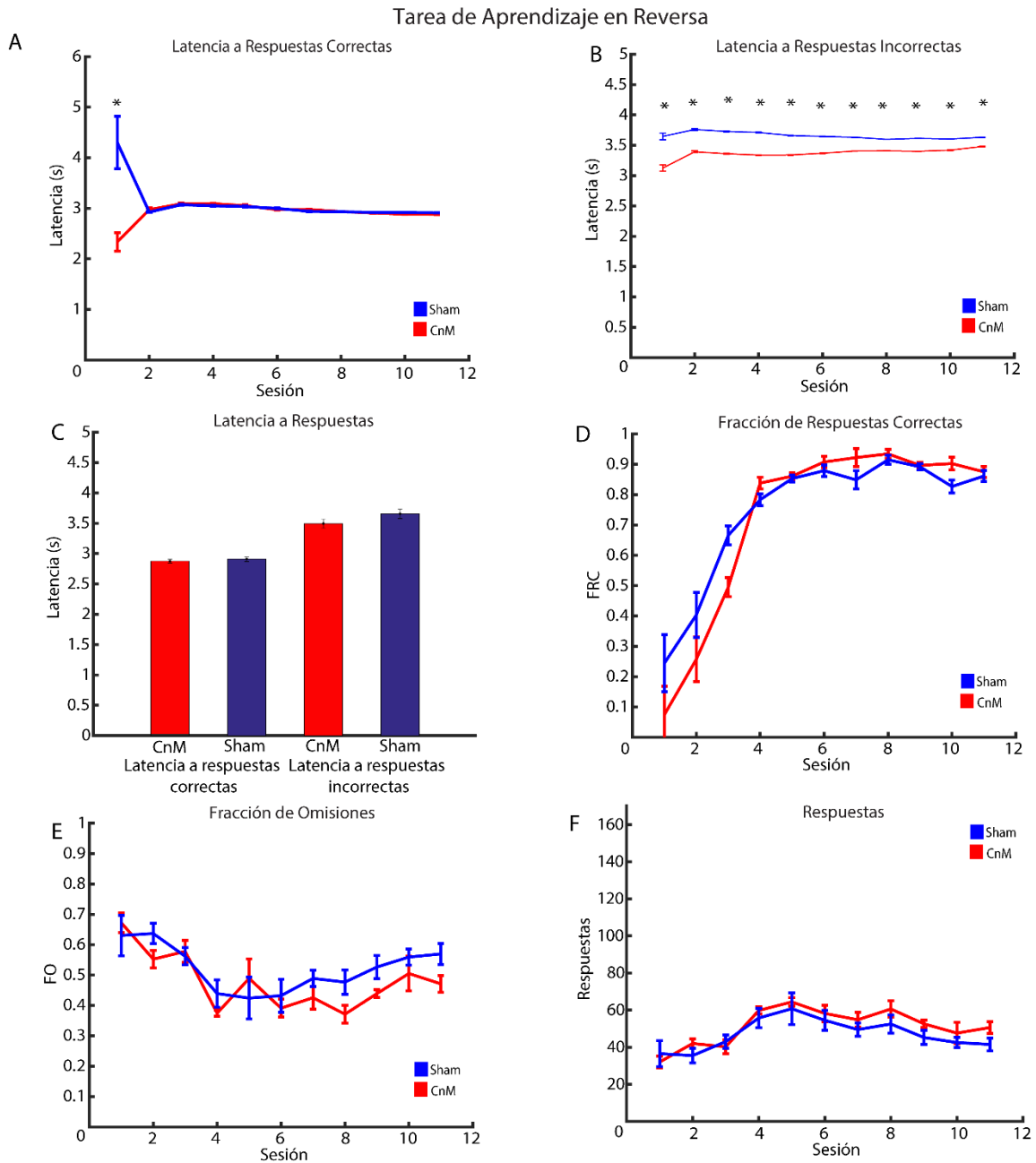


Figura 21. Evaluación de la tarea de Aprendizaje en Reversa. A. Latencia a respuestas correctas para el grupo lesionado (CnM) y para el grupo control (Sham) a lo largo de las sesiones de evaluación. B. Latencia a respuestas incorrectas a lo largo de las sesiones de evaluación. C. Promedio de latencia a respuestas correctas e incorrectas. D. Fracción de respuestas correctas a lo largo de las sesiones. E. Fracción de ensayos no respondidos a tiempo (omisiones). F. Número de ensayos respondidos a través de las sesiones. N=9

7.5 Registros electrofisiológicos en el modelo de cabeza fija en ratones lesionados

Las figuras 22 y 23 muestran la frecuencia de disparos registrada en el núcleo parafascicular, en la región ipsilateral y contralateral a la constricción del nervio mentoniano, respectivamente. La actividad fue normalizada a puntaje Z en cada una de las sesiones de evaluación, para cada una de los estímulos aplicados en la región mentoniana. Se muestra también, para ambas figuras, la media poblacional de las neuronas moduladas.

A partir del día 14 posterior a la lesión, para la estimulación en la región ipsilateral a la constricción, se observan cambios en la frecuencia de disparo en los 2.5 segundos posteriores a la estimulación. Se observa también que, mientras en el día 14, dicha modulación es más notoria al aplicar el estímulo de mayor intensidad, en el día 21 lo es al aplicar el estímulo de menor intensidad.

En el caso de los registros al estimular la región contralateral a la lesión, los cambios en la frecuencia de disparo también se observan a partir del día 14, mostrándose con mayor claridad en el día 21, en los primeros 2.5 segundos posteriores a la aplicación del estímulo de menor intensidad.

Para cuantificar la proporción de neuronas que estaban siendo moduladas, se empleó la prueba de Wilcoxon ($p < 0.05$). La figura 24 muestra que, mientras que en el día 3 hubo un bajo porcentaje de neuronas que respondieron en el núcleo parafascicular, este aumentó en las sesiones posteriores. Asimismo, el porcentaje de neuronas moduladas fue más alto en la aplicación del filamento de mayor fuerza en la mayoría de los casos, siendo mayor con la aplicación contralateral. La mayor proporción de neuronas moduladas se encontró hacia el día 14, no sólo para la aplicación de los estímulos con el filamento de mayor fuerza, sino también para la aplicación de los estímulos de menor intensidad.

Núcleo Parafascicular Ipsilateral

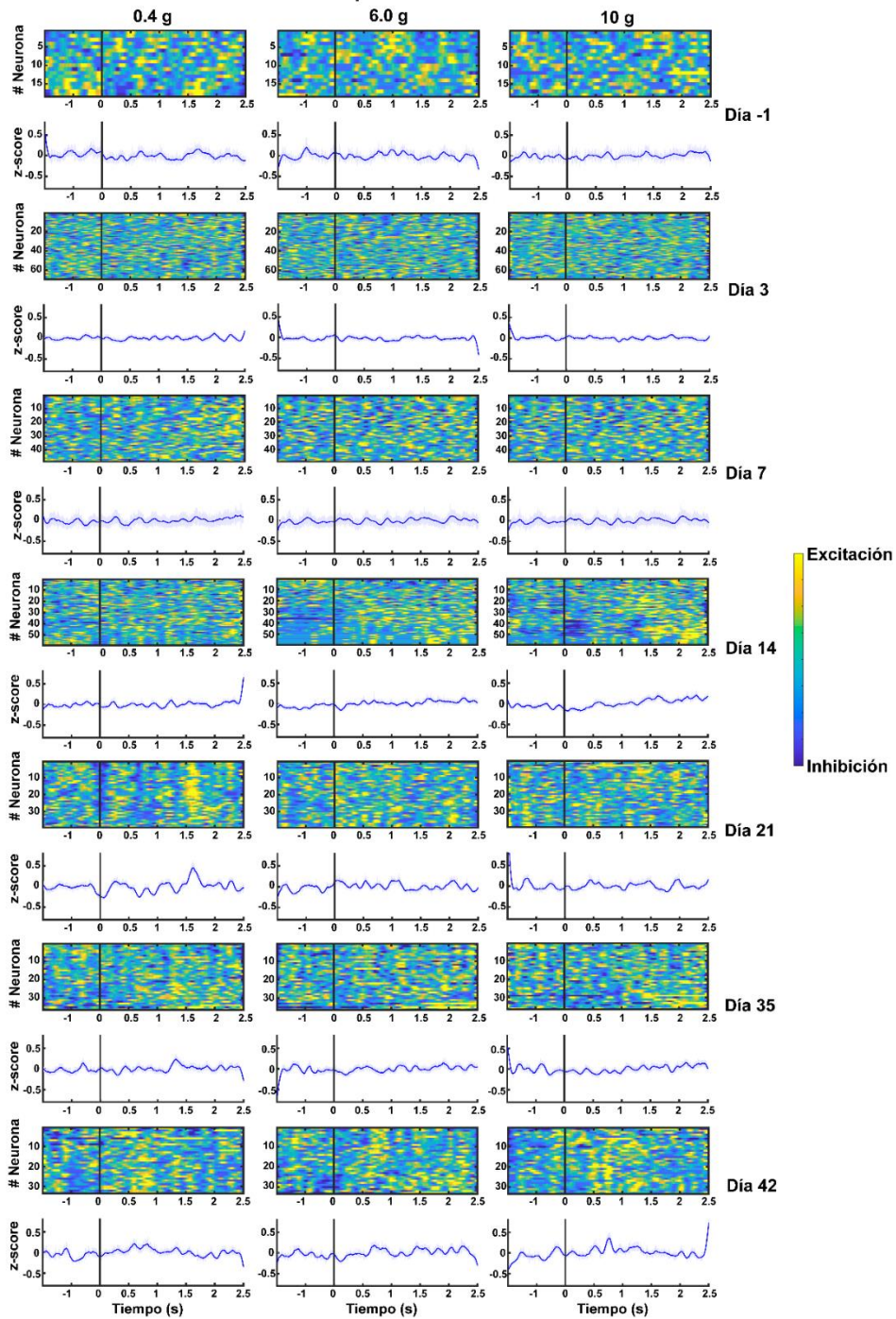


Figura 22. Actividad en Pf durante estimulación mecánica ipsilateral en ratones lesionados (ipsilateral). Frecuencia de disparo convertida a puntaje Z a la aplicación de estímulos mecánicos, y media poblacional de neuronas moduladas a lo largo de 7 sesiones de evaluación. La línea vertical en t=0 indica la aplicación del estímulo mecánico.

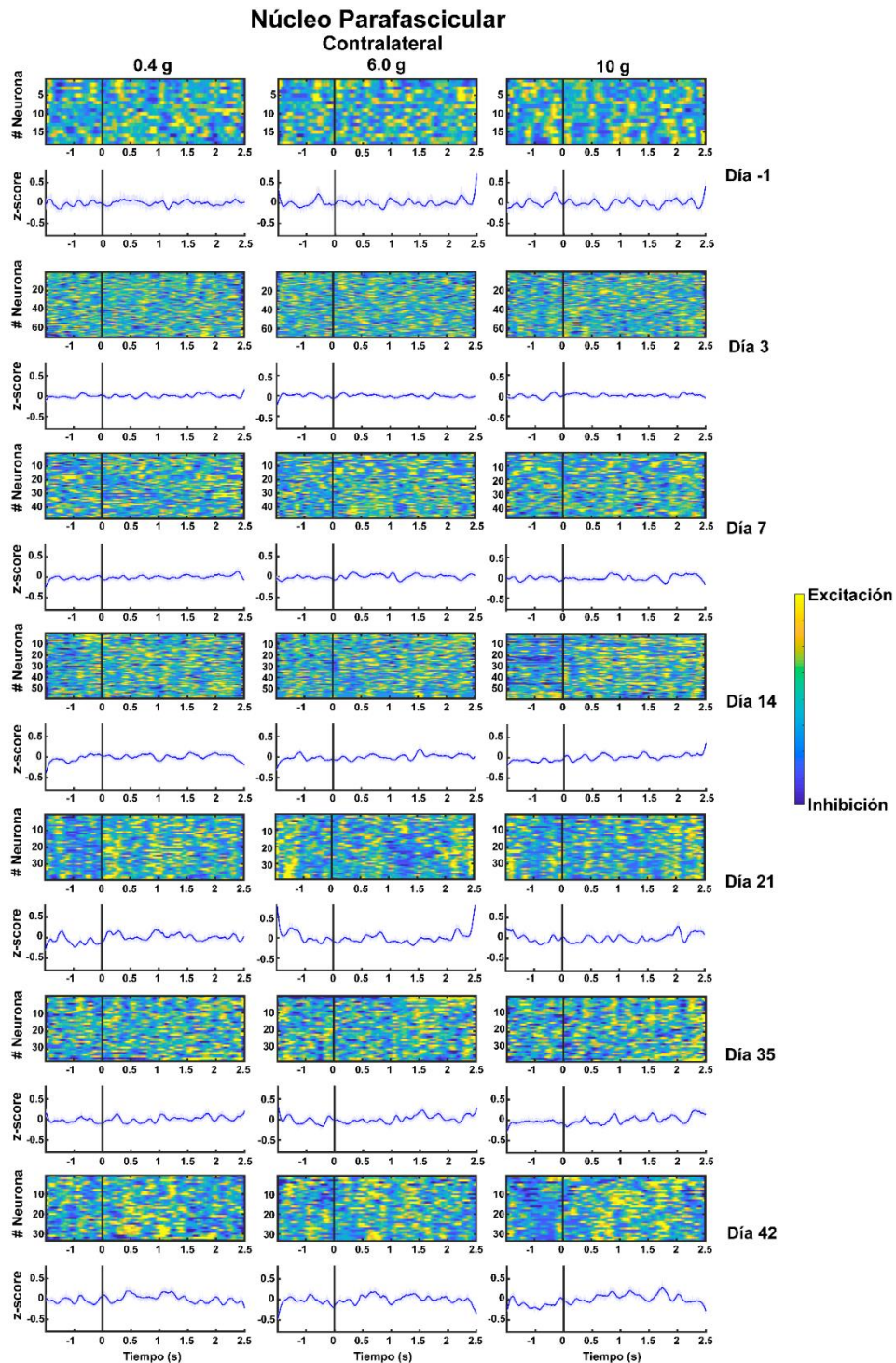


Figura 23. Actividad en Pf durante estimulación mecánica contralateral en ratones lesionados (contralateral). Frecuencia de disparo convertida a puntaje Z a la aplicación de estímulos mecánicos, y media poblacional de neuronas moduladas a lo largo de 7 sesiones de evaluación. La línea vertical en $t=0$ indica la aplicación del estímulo mecánico.

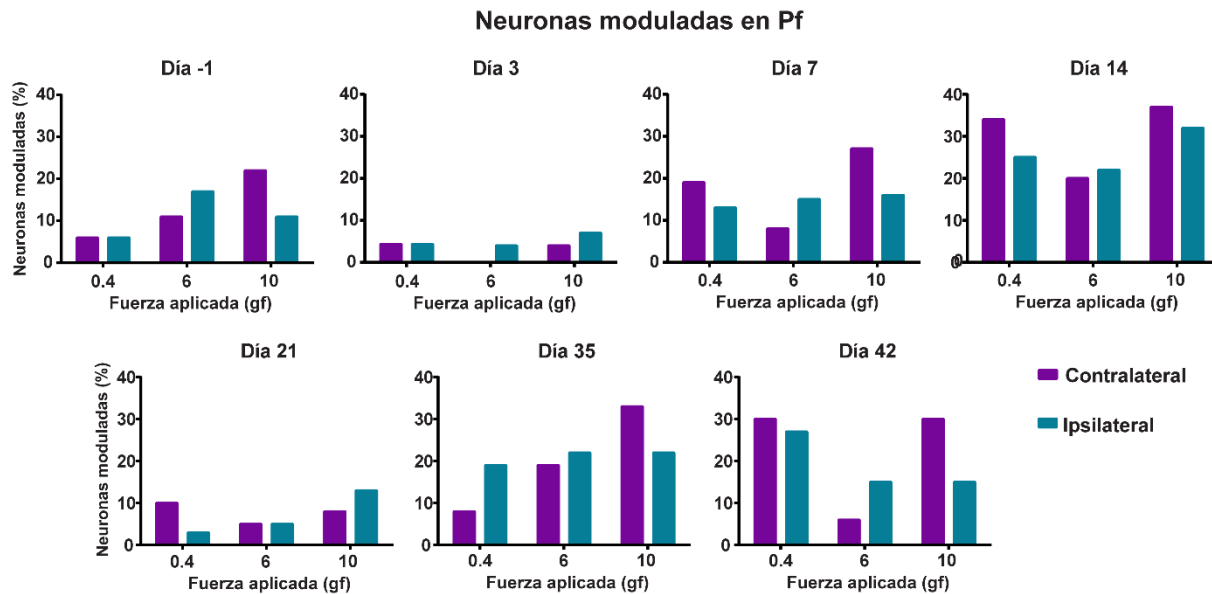


Figura 24. Neuronas moduladas en Pf bajo estimulación mecánica posterior a la lesión del nervio mentoniano. Porcentaje de neuronas moduladas para la aplicación de diferentes estímulos mecánicos ipsilateral y contralateral a la lesión.

La frecuencia de disparo calculada de los registros realizados en ACC se presenta en la figura 25, mientras que en las figuras 26 y 27 se muestra la media poblacional de neuronas moduladas. En ellas, se compara a un grupo lesionado contra un grupo control, para los días 7 y 14 post operatorios. En el grupo lesionado se observa, hacia el día 14, un aumento en la actividad, tanto excitatoria como inhibitoria, dentro de los primeros 500 milisegundos posteriores a la estimulación. Esta modulación ocurrió para la aplicación de los estímulos mecánicos de cada una de las fuerzas empleadas. Al comparar el porcentaje de neuronas moduladas ($p < 0.05$), se observa que este es mayor desde el día 7 para el grupo lesionado, y que dicha condición permanece en el día 14 (figura 28).

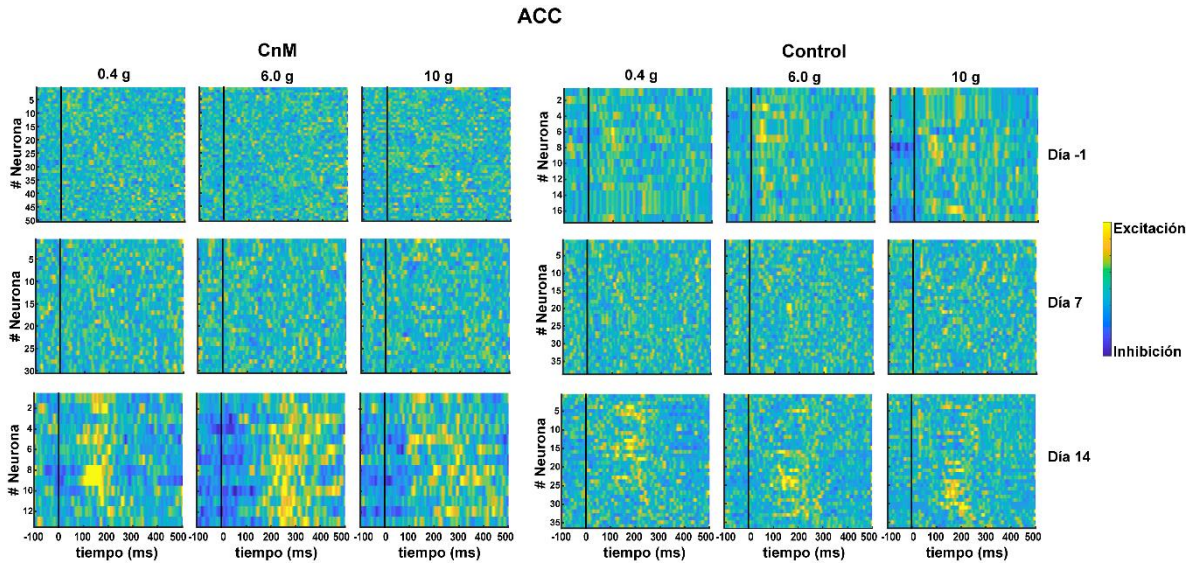


Figura 25. Actividad en ACC durante estimulación mecánica en ratones lesionados. Frecuencia de disparo convertida a puntaje Z a la aplicación de estímulos mecánicos, a lo largo de 7 sesiones de evaluación. La línea vertical en $t=0$ indica la aplicación del estímulo mecánico.

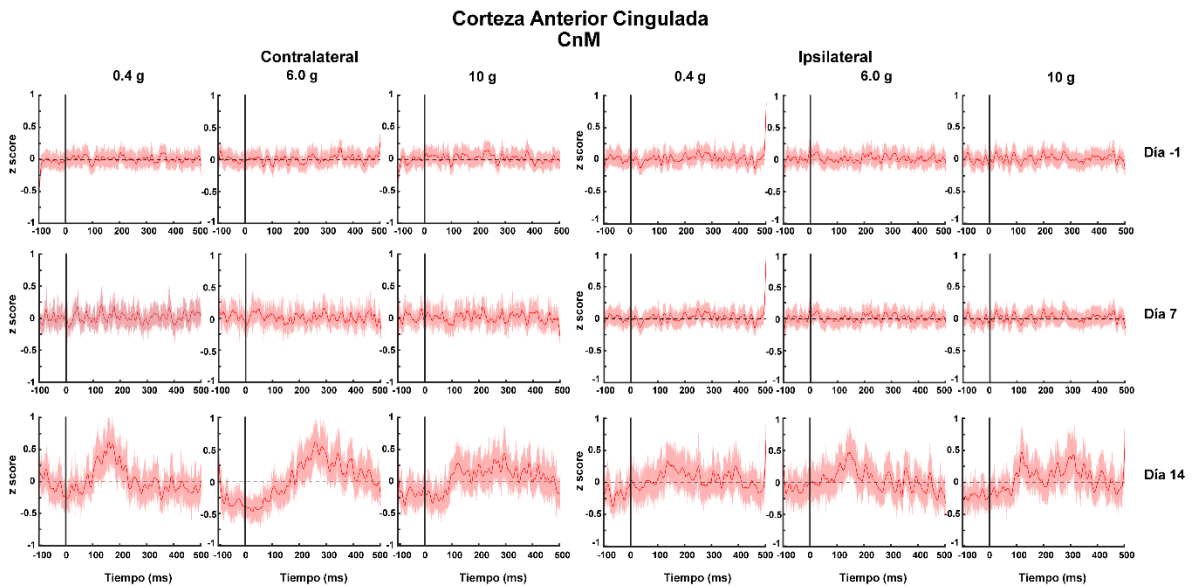


Figura 26. Actividad poblacional en ACC durante estimulación mecánica en ratones lesionados. Media poblacional de neuronas moduladas a la aplicación de estímulos mecánicos (línea negra), a lo largo de 3 sesiones de evaluación.

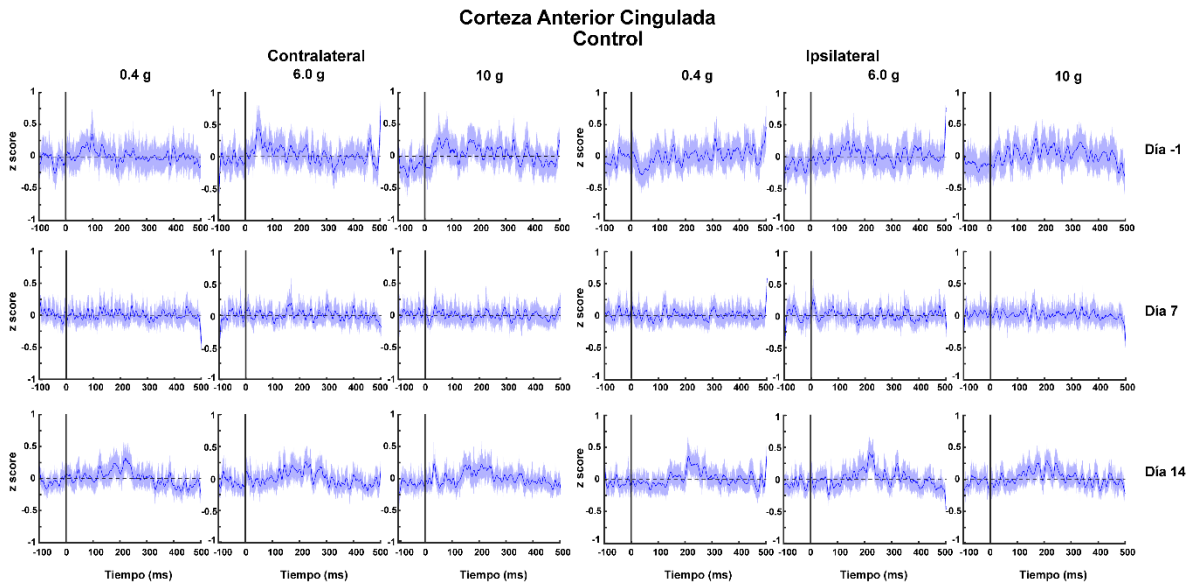


Figura 27. Actividad poblacional en ACC durante estimulación mecánica en ratones no lesionados. Media poblacional de neuronas moduladas a la aplicación de estímulos mecánicos (línea negra), a lo largo de 3 sesiones de evaluación.

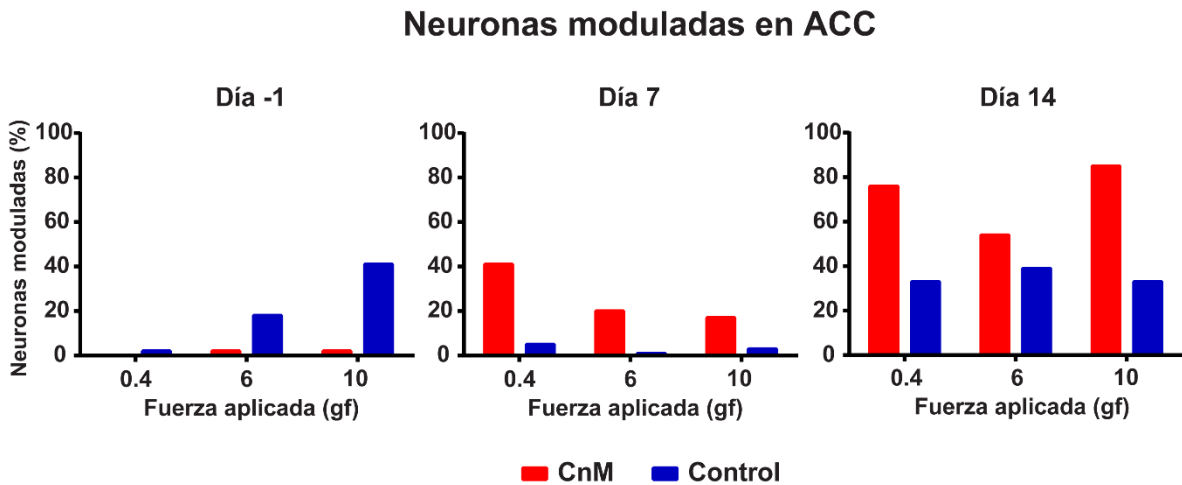


Figura 28. Neuronas moduladas en ACC bajo estimulación mecánica posterior a la lesión del nervio mentoniano. Porcentaje de neuronas moduladas para la aplicación de diferentes estímulos mecánicos en el grupo lesionado y sham.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo presentamos la caracterización conductual, desde una perspectiva multidimensional, de los efectos de una lesión de constricción del nervio mentoniano en ratones, como modelo experimental para el estudio del dolor neuropático orofacial, así como las estructuras y circuitos involucrados en su desarrollo y sus efectos. Para la realización este estudio, se emplearon diferentes paradigmas conductuales que evaluaban los componentes sensorial, afectivo y cognitivo del dolor, en los que encontramos alteraciones con respecto a un grupo de animales sanos. Lo anterior es de gran relevancia, pues pasar de evaluaciones conductuales simples a tareas operantes más complejas supone una mejor aproximación para investigar la experiencia del dolor, sus dimensiones, la interacción entre ellas y su procesamiento en estructuras superiores (Fuchs, Peng, Boyette-Davis, & Uhelski, 2014).

8.1 Efecto de la lesión en la dimensión sensorial

El modelo de dolor crónico por lesión de constricción del nervio mentoniano en ratas fue propuesto por Grelik (Grelik et al., 2005). Este modelo le permitió evaluar, por medio de un análisis conductual y, con técnicas de Inmunohistoquímica, alteraciones sensoriales en el sistema trigeminal posteriores a la lesión. Posteriormente, en un trabajo anterior del laboratorio (Montes-Angeles et al., 2017), se evaluó dicho modelo en la misma especie, tomando en cuenta no sólo la dimensión sensorial, sino también la afectiva y la cognitiva; y se demostró que dicha lesión es capaz de generar alteraciones en cada una de las dimensiones mencionadas.

Con respecto a la lesión en un modelo de ratones, esta ya ha sido implementada, pero la caracterización de sus efectos ha sido limitada a la dimensión sensorial (Seino et al., 2009). Esto representa una limitación en el estudio del dolor, ya que, de acuerdo con Melzack, tomar en cuenta solamente sus propiedades sensoriales sin estudiar sus otras dimensiones determinantes, implica un abordaje incompleto del problema, si lo que se busca es comprender al dolor como una

experiencia conjunta y extrapolable a lo que ocurre en humanos o en otras especies (Melzack & Casey, 1968).

Como parte de la caracterización del dolor neuropático en su dimensión sensorial se realizó la evaluación de las respuestas espontáneas de acicalamiento orofacial. La conducta de acicalamiento es aquella conducta compleja e innata, que está involucrada en el mantenimiento de la superficie corporal, en procesos como la higiene, termorregulación y comunicación social. En el caso de estos procesos, dicha conducta tiene una progresión céfalo-caudal: comienza por el contacto con la nariz, continúa con el resto de la cabeza, el cuerpo y termina con la cola y los genitales. Asimismo, sigue un patrón en cadena, es decir, una vez que es iniciada, la secuencia tiende a ser completada (Kalueff et al., 2016). Sin embargo, el contacto dirigido a una región, que no sigue el patrón en cadena de la conducta de acicalamiento corporal es empleado como una medida para evaluar las conductas espontáneas (aquellas no provocadas y que el animal no puede evitar o controlar), como un signo de dolor espontáneo (Romero-Reyes et al., 2013). En este sentido, Vos y Strassman (Vos et al., 1994) emplearon esta prueba para evaluar los efectos de la constricción del nervio infraorbitario, encontrando que las ratas que tenían dicha lesión realizaban un mayor número de acicalamientos orofaciales y que éstos tenían una mayor duración, con respecto a un grupo control.

La evaluación de la conducta de acicalamiento orofacial representa una herramienta útil pues funciona como una medida que sugiere la presencia de dolor espontáneo (Kristof Deseure & Hans, 2015), una característica importante del dolor crónico neuropático. El presente trabajo muestra por primera vez esta evaluación aplicada a ratones. En ella, las diferencias entre grupos fueron observadas únicamente en el día 35 posterior a la lesión. Esta alteración conductual podría ser consecuencia de las alteraciones anatómicas reportadas después de una lesión trigeminal. Es el caso de la inervación ectópica por fibras autónomas observada por Grelik y colaboradores en ratas con el nervio mentoniano lesionado. Grelik demostró que dicha inervación alcanzaba un pico máximo de 4 a 6 semanas después de la lesión. Cabe mencionar que, en el mismo período, el número de eventos de

acicalamiento orofacial también alcanzó un pico máximo (Grelík, Bennett, et al., 2005), lo que sugiere que estas modificaciones anatómicas podrían estar involucradas en los cambios en la conducta de acicalamiento orofacial encontrados en el presente trabajo.

Otro de los elementos de la caracterización de los efectos de la lesión en la dimensión sensorial del dolor, fue la evaluación de la conducta de respuesta a estímulos mecánicos (prueba de Von Frey). En ella, se encontró una respuesta de hipersensibilidad a la aplicación de los filamentos, con una predominancia ipsilateral. Se observó que, a los tres días post operatorios, ambos grupos presentaron un aumento en la intensidad de las respuestas a la aplicación de los filamentos. Sin embargo, este aumento pudo deberse al efecto del procedimiento quirúrgico de incisión y sutura de la región, realizado en ambos grupos.

Hacia el día siete se observó, para el grupo lesionado, un aumento en el puntaje de respuesta a las menores fuerzas aplicadas. En el día 21 se observó que este aumento de este puntaje se dio tanto para las fuerzas menores como para las mayores, lo que representa un signo de alodinia. Los resultados mostrados son consistentes con la hipersensibilidad reportada por distintos autores al lesionar alguna de las ramas del nervio trigémino, por lo que nuestros resultados confirman que la lesión del nervio mentoniano induce signos conductuales de alodinia e hiperalgesia. Dicho fenómeno se ha observado desde el primer día posterior a la cirugía (Piao et al., 2006), y continúa a lo largo del tiempo, que puede ir desde 28 días, hasta 16 semanas después (Kim et al., 2008; Li et al., 2012; Piao et al., 2006; Takahashil et al., 2011). Sin embargo, en este caso, este puntaje se restablece hacia el día 42. Esto puede deberse al restablecimiento de ciertas condiciones observadas en diferentes estudios de lesión trigeminal. Este es el caso del conteo de células de la microglía y la astrogía en el ganglio trigeminal, que cinco días después de realizar la constricción del nervio alveolar inferior, aumenta, pero hacia los 42 días posteriores a la lesión vuelve a sus niveles basales; y en donde a su vez se observa el restablecimiento en el umbral de retirada a la aplicación de estímulos mecánicos (Kiyomoto et al., 2018). Adicionalmente, se ha encontrado que la

activación de la microglía posterior a la transección del nervio alveolar inferior regresa a sus valores basales entre 28 y 60 días después de realizar la lesión (Piao et al., 2006) y que, dentro de un período similar, el aumento en la expresión de los receptores TRPV1, derivado de la lesión del nervio alveolar inferior y mentoniano, también vuelve a sus niveles iniciales (Kiyomoto et al., 2018), por lo que dichos fenómenos podrían estar implicados en los cambios a lo largo del tiempo en las evaluaciones de estimulación mecánica.

Existe cierta variabilidad en los estudios que reportan el día de inicio de las manifestaciones de hipersensibilidad en presencia de lesiones del nervio trigémino. Mientras que en algunos casos esta se ha mostrado un día después de lesionar el nervio (Piao et al., 2006), en otros se ha observado que los roedores pasan por un período de hiposensibilidad que dura alrededor de una semana, y es seguido por hipersensibilidad a la estimulación, que se mantiene hasta el final de las sesiones de evaluación (Deseure & Hans, 2015; Vos et al., 1994). Tanto la temporalidad como la duración del efecto podrían deberse a las variaciones en el material de sutura y el calibre empleado para la constricción del nervio, pues se ha reportado que el efecto de la lesión a nivel sensorial depende de la fuerza de constricción: si el punto de sutura no se realiza con la presión suficiente, no se observa una conducta de tipo doloroso, mientras que, si se ejerce demasiada tensión en esta, existe un efecto de anestesia (parestesia), manifestado a partir de una disminución en la respuesta a la estimulación (Krzyzanowska & Avendaño, 2012), como reportó Seino (Seino et al., 2009) al constreñir el nervio mentoniano en ratones empleando sutura de seda de calibre 5-0, y observar posteriormente un aumento en el umbral de sensibilidad mecánica.

Por tanto, y de acuerdo con los resultados, el uso de sutura catgut 4-0 en la constricción del nervio mentoniano en ratones resultó efectivo para generar un efecto de alodinia, que se mantiene a lo largo de las sesiones.

Las lesiones en el sistema somatosensorial pueden conducir a una transmisión alterada y desordenada de señales sensoriales al sistema nervioso central. En la periferia y a nivel central puede existir un aumento en la facilitación y

una disminución en la inhibición de la transmisión nerviosa, lo que puede llevar a un individuo a un perfil pro nociceptivo, involucrando los fenómenos de dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia similares a los que se observan a nivel clínico (Colloca et al., 2017). En el caso del dolor neuropático orofacial, estos fenómenos se han observado a nivel conductual a partir de lesiones trigeminales, y se han propuesto diferentes mecanismos involucrados, entre los que están los cambios en fibras simpáticas (Grelík, Bennett, et al., 2005), modificaciones fenotípicas que incluyen cambios en la expresión de canales iónicos tanto en neuronas dañadas como no dañadas (Kim et al., 2008; Zakir et al., 2012), en la expresión de moléculas de señalización (Dieb, Ouachikh, Durif, & Hafidi, 2016; Piao et al., 2006; Takahashil et al., 2011), de proteínas de membrana (Ouachikh, Hafidi, Boucher, & Dieb, 2018; Vit, Jasmin, Bhargava, & Ohara, 2006); así como alteraciones en la modulación y fenómenos de plasticidad (Alshelh et al., 2016; Martin et al., 2010; Mills et al., 2018; Savignat et al., 2008).

8.2 Efecto en la dimensión afectiva/emocional del dolor

El procesamiento del dolor requiere de la evaluación sensorial en relación con su contexto. La dimensión afectiva del dolor está conformada por el carácter desagradable de la sensación, así como por las emociones involucradas en sus implicaciones futuras, es decir, el sufrimiento asociado (Price, 2000). Así, el deseo por disminuir, escapar o evitar un evento doloroso es indicador de una respuesta afectiva ante un estímulo nocivo o una lesión (LaBuda & Fuchs, 2000).

Es por lo mencionado anteriormente que se utilizó el paradigma de evitación/escape (LaBuda & Fuchs, 2000), ya que fue propuesto como una alternativa efectiva para investigar la interacción entre los componentes afectivo y sensorial del dolor. En él, los ratones debían “elegir” cuál compartimento de la caja consideraban menos aversivo: uno oscuro, considerado no ansiogénico, en donde la región lesionada era estimulada, o un compartimento iluminado, considerado ansiogénico, en donde se estimulaba una región corporal diferente a la lesionada. A diferencia del paradigma de preferencia condicionada de lugar, o del paradigma de aversión condicionada del lugar, en el paradigma de evitación/escape, el

estímulo mecánico es aplicado durante la evaluación, y no en la sesión previa a la experimentación, por lo que representa un conflicto entre la tendencia natural de los roedores a evitar la luz, por una parte, y por otra, la evitación de un estímulo que podría ser nocivo (Bravo, Mico, Rey-Brea, Camarena-Delgado, & Berrocoso, 2016; Refsgaard, Hoffmann-Petersen, Sahlholt, Pickering, & Andreasen, 2016).

Se contó con una evaluación previa a la lesión del nervio mentoniano, y siete sesiones post operatorias, a los 4, 8, 15, 22, 29, 36 y 43 días, en los que se calculó el índice de preferencia por el compartimento oscuro. En la sesión pre operatoria, ambos grupos mostraron preferencia por el compartimento oscuro, una tendencia natural en roedores en condiciones de salud. Sin embargo, cuatro días después de realizar la lesión del nervio mentoniano o la cirugía sham, los ratones lesionados mostraron una disminución en el índice de preferencia por el compartimento oscuro, que se observó desde los primeros cinco minutos de la sesión, y se mantuvo así hasta el final de la tarea. Escapar del compartimento oscuro o evitarlo ante la aplicación de un estímulo mecánico es una indicación clara de que dicho estímulo resultó aversivo para los ratones que tuvieron la constricción del nervio mentoniano. Estos resultados son similares a los que se han observado en ratas en presencia de dolor neuropático, tres días después de lesionar el nervio espinal L5 (LaBuda & Fuchs, 2000), y una semana después de lesionar el nervio ciático (Bravo et al., 2016).

Para que exista una conducta de escape, debe ocurrir la detección de una condición que suponga una amenaza (Evans, Stempel, Vale, & Branco, 2019), lo que requiere la integración de la información somatosensorial y del procesamiento cognitivo y afectivo, para darle una valencia emocional al estímulo, y poder tomar una decisión conductualmente relevante para responder a este (Price, 2000), en este caso, escapar o permanecer en uno de los compartimentos. El cambio conductual, que se observó en la disminución en la preferencia por el compartimento oscuro en los roedores con lesión neuropática no sólo sugiere una alteración en el procesamiento sensorial, sino que refleja también una alteración en el

procesamiento afectivo que, en este caso, le dio el carácter de aversivo al estímulo mecánico cuando fue aplicado en una región lesionada (LaBuda & Fuchs, 2000).

Con respecto a la temporalidad de los efectos observados, esta es diferente a la de los efectos en la dimensión sensorial, particularmente, en la evaluación a las respuestas evocadas por estímulos mecánicos. Esto se debe a que el componente desagradable del dolor puede estar o no relacionado con la intensidad de la sensación (Price, 2000). Asimismo, el deterioro de una dimensión del dolor podría ocurrir en diferente intensidad que el de otra, mientras que las situaciones emocionales aversivas pueden procesarse independientemente de la percepción sensorial (Bravo et al., 2016).

Como se mencionó previamente, en el procesamiento del dolor a nivel central se ha propuesto la participación de dos distintos sistemas que pueden actuar tanto en serie como en paralelo, para dar origen a las dimensiones sensorial, afectiva y cognitiva del dolor (Price, 2000; X. Xiao & Zhang, 2018). Así, el sistema medial, es al que se le ha atribuido el procesamiento de la dimensión afectiva del dolor. Este sistema se proyecta hacia los núcleos de la línea media e intralaminares del tálamo, para llegar a estructuras como ACC. En este sentido, distintos estudios se han enfocado en investigar el papel de ACC en la dimensión afectiva del dolor, mediante el paradigma de evitación/escape o tareas similares a dicho paradigma. En ellos encontraron que una lesión excitotóxica de rACC reduce el efecto aversivo del dolor crónico inducido por formalina, en un paradigma de evitación condicionada de lugar (Johansen, Fields, & Manning, 2001), así como en el paradigma de evitación/escape (LaGrazie et. al., 2004).

Adicionalmente, la menor duración del efecto de la lesión sobre el componente afectivo, con respecto a la observada en la dimensión sensorial resalta la importancia de cada una de estas evaluaciones pues, como se ha propuesto, dichas dimensiones pueden ser procesadas de forma distinta en el sistema nervioso central (Bravo et al., 2016; Gomtsian et al., 2018). Es importante también, mencionar que las evaluaciones del componente cognitivo fueron realizadas posteriormente a

este período, para descartar la influencia del componente afectivo sobre el desempeño cognitivo.

8.3 Efecto de la lesión en la conducta de bienestar general

La conducta de construcción de la madriguera, así como del nido han sido empleadas como una medida para evaluar aquello que se considera las actividades cotidianas de un individuo. Es por ello que su alteración es interpretada como una disfunción conductual, generalmente, como síntoma de enfermedad (Deacon, 2006, 2012). En este trabajo, dichas conductas fueron evaluadas en una sesión pre-operatoria y a los 5, 7 y 21 días post-operatorios. Dichos períodos se eligieron, por una parte, debido a que se han reportado alteraciones en los primeros 5 días posteriores a una lesión neuropática (Deseure & Hans, 2018); y por otra, de acuerdo con los resultados de la evaluación de respuesta a los filamentos de von Frey, en la que las diferencias en el puntaje se observaron en el día 7 y fueron mayores hacia el día 21 post-operatorio.

Como se describió en los resultados (figura 17), la lesión de constricción del nervio mentoniano no produjo alteraciones en ninguna de las dos conductas, en ninguno de los días de evaluación, a diferencia de lo que ha sido observado en ratas, en modelos de dolor por agentes quimioterapéuticos, inflamatorios y lesiones de nervios espinales (Andrews et al., 2012; Whittaker, Lymn, Nicholson, & Howarth, 2015). Estos resultados han sido diferentes también, del modelo de dolor orofacial a partir de la lesión del nervio infraorbitario, en donde, cinco días después de inducir dicha lesión, la cantidad de alimento desplazado del tubo plástico (construcción de la madriguera) disminuye, como signo de detrimento en el bienestar general de los roedores (Deseure & Hans, 2018). La ausencia de diferencias significativas en esta conducta después de la lesión del nervio mentoniano resulta benéfica para el modelo desarrollado, pues este permite observar alteraciones sensoriales, afectivas y cognitivas, sin generar un daño severo en el bienestar general de los ratones.

8.4 Efecto de la lesión en la dimensión cognitiva

Para experimentarse conscientemente, el dolor requiere de procesos cognitivos. Así la dimensión cognitiva o componente cognitivo-evaluativo del dolor involucra al aprendizaje y el recuerdo de experiencias, además de funciones ejecutivas, como la toma de decisiones, atención y flexibilidad conductual (Moriarty et al., 2011). En presencia de dolor, las deficiencias cognitivas son una de las consecuencias referidas por los pacientes, y reportadas en estudios clínicos y de laboratorio. Sin embargo, el origen de dichas deficiencias podría ser diferente si el dolor es agudo o si es crónico. Mientras que en el dolor agudo las alteraciones cognitivas son atribuidas al reclutamiento de los recursos atencionales, siendo estas alteraciones restauradas cuando el dolor cesa (Pais-Vieira et al., 2009), se sugiere que en el caso del dolor crónico las deficiencias cognitivas son producto de los cambios neuroplásticos y la reorganización neuronal en el sistema nervioso central que ocurren en el desarrollo de dicha enfermedad (Hart, Martelli, & Zasler, 2000; Hart, Wade, & Martelli, 2003; Moriarty et al., 2011).

El efecto de la lesión trigeminal en esta dimensión fue determinado con cuatro tareas que evaluaron la capacidad de los ratones para adaptar su respuesta conductual a estímulos relevantes y cambiantes, así como a los cambios en las exigencias del medio, es decir, evaluamos el efecto del dolor crónico neuropático orofacial en el proceso de flexibilidad conductual a largo plazo. La capacidad de modificar la conducta de acuerdo con los cambios en el contexto de un organismo es fundamental para su supervivencia, y requiere integrar información de su interior (ej. hambre, sed, estrés) y de su exterior (ej. ausencia de una recompensa en condiciones en las que antes hubo una) (Baker & Mizumori, 2017). Por tanto, el deterioro de dicha capacidad en presencia de una lesión nerviosa tendría un impacto directo en las acciones de quien la sufre.

En todas las tareas se cuantificó la latencia de respuesta, que era el tiempo transcurrido entre la presentación del sonido y el momento en el que el ratón introducía el hocico en el puerto de respuesta. Se evaluó también la razón de

respuestas correctas, los ensayos de omisión y el número de respuestas emitidas durante la tarea.

Es importante mencionar que dichas tareas se llevaron a cabo después de 42 días posteriores a la realización de la lesión trigeminal, esto con el objetivo de evitar que su efecto en las dimensiones afectiva y sensorial influenciara el desempeño de los ratones y esto representara un factor de confusión en los resultados.

La tarea de cambio (switch), se utilizó para evaluar la respuesta de los ratones a estímulos relevantes. Inicialmente, los ratones debían establecer una asociación entre un tono y un puerto de respuesta, en donde debían introducir la nariz. Los tonos estaban organizados en bloques de un mismo estímulo y, el ensayo en el que el tono cambiaba, fue considerado el ensayo “switch” o de cambio (Leenaars et al., 2012). Únicamente los ensayos de este tipo fueron tomados en cuenta para el análisis, por ser considerados los ensayos que contenían el estímulo relevante. Los resultados mostraron que la latencia a las respuestas, cuando estas eran correctas, fue mayor para los ratones lesionados, lo que sugiere que a los ratones que pasaron por un proceso de dolor neuropático orofacial les tomó más tiempo responder correctamente a una condición que le requería cambiar su estrategia de respuesta. De manera interesante, se observó que la latencia de respuesta no era significativamente diferente del grupo control cuando las respuestas eran incorrectas. La alteración en la adaptación ya mencionada también se ve reflejada en el número de ensayos de omisión, aquellos que no fueron respondidos dentro del período establecido.

Como previamente se ha reportado, uno de los efectos del dolor neuropático en ratas es la disminución en la motivación, como signo de depresión (Schwartz et al., 2014). Para descartar que las alteraciones en la latencia hayan sido producto de una disminución en la motivación por una recompensa, se cuantificó el número de respuestas, fuesen correctas o incorrectas. Estas no mostraron diferencias significativas, lo que sugiere que la motivación en ambos grupos por obtener una recompensa fue similar. Por lo tanto, es posible que los cambios en la latencia de

respuesta sean atribuibles a un deterioro en la dimensión cognitiva del dolor cuando este es patológico.

Se cuantificó además la fracción de respuestas correctas, para evaluar tanto el aprendizaje de la tarea, como el desempeño a lo largo de los días. Un aumento gradual en dicha fracción sin diferencias significativas entre los grupos demuestra que ambos son capaces de adquirir la tarea. Sin embargo, se encontró que ninguno de los dos grupos alcanzó el criterio de aprendizaje establecido.

Ante estos resultados, se empleó la tarea de elección forzada de dos alternativas, que fue una tarea de discriminación simple en la que ambos grupos alcanzaron el criterio de aprendizaje de una forma similar, además de que no se observaron diferencias en la latencia de respuesta cuando los ensayos eran correctos. Estos resultados eran esperados, ya que una tarea de discriminación simple, a diferencia de la primera tarea mencionada, el sujeto únicamente requiere prestar atención en el tono que es presentado, sin que la secuencia de estímulos sea relevante para su desempeño. A evaluar la latencia de respuesta en los ensayos respondidos incorrectamente, se observó que esta era mayor en los roedores lesionados, además de que la motivación por la obtención de una recompensa no fue alterada.

Para evaluar la capacidad de adaptación a los cambios en las exigencias del medio, otro aspecto importante en la flexibilidad conductual, se emplearon las tareas de cambio de posición (Set-Shifting) y de aprendizaje en reversa. En ellas, los animales debían adaptarse para dejar de usar una estrategia de respuesta que dejó de ser recompensada, para usar una alternativa que sí lo era, es decir, dejar de prestar atención a los tonos presentados, y responder únicamente en un puerto de respuesta. En ambas tareas, tanto el grupo lesionado como el grupo control mostraron la capacidad de adquirir la tarea, alcanzando de forma similar el criterio de aprendizaje, y mostraron también un nivel de motivación similar.

Sin embargo, y de forma muy interesante, se observó que el efecto del dolor crónico inducido por la lesión trigeminal en la latencia de respuesta fue diferente para cada tarea: mientras que en la tarea de cambio de posición (set-shifting) a los

ratones lesionados les tomó más tiempo responder correctamente, en la tarea de aprendizaje en reversa el dolor neuropático pareciera no tener un efecto importante.

Una de las explicaciones a las que se pueden atribuir estos resultados es la diferencia en la dificultad de las circunstancias a las cuales los ratones debían adaptar su conducta. La transición de la tarea de elección forzada de dos alternativas hacia la tarea de cambio de posición (set shifting) involucra atender a diferentes dimensiones de la tarea, es decir, dejar de emplear como estrategia la discriminación de tonos para basarse en responder en una sola locación. Adaptarse a esta condición podría ser más difícil para los ratones, que la transición de la tarea de cambio de posición a la de aprendizaje en reversa, en donde, aunque la contingencia del paradigma fue invertida de manera inesperada para los sujetos, el elemento del medio al cual había que atender se mantenía en la misma dimensión de la tarea, responder en una sola locación.

Otra de las posibles explicaciones a este fenómeno consiste en la participación de diferentes estructuras centrales en el procesamiento de cada una de las tareas, y, por tanto, el efecto diferencial de este modelo de dolor neuropático en dichas estructuras. Si bien tanto la tarea de cambio de posición como la de aprendizaje en reversa son comúnmente empleadas para evaluar el proceso de flexibilidad cognitiva, y este proceso es asociado a la actividad en la corteza prefrontal (PFC, por sus siglas en inglés), se ha descrito que diferentes subdivisiones de PFC procesan cada una de estas tareas. Así, la corteza prefrontal medial (mPFC) estaría involucrada en la flexibilidad conductual en aquellas tareas como la de cambio de posición (set-shifting), y la corteza orbitofrontal (OFC) desempeñaría un rol en la flexibilidad cognitiva que involucra las tareas de aprendizaje en reversa (Baker & Mizumori, 2017; Hamilton & Brigman, 2015; Logue & Gould, 2014).

En el presente trabajo se encontraron alteraciones en la dimensión afectiva del dolor en una temporalidad diferente a las alteraciones observadas en la dimensión cognitiva, lo que refuerza la propuesta de que las dimensiones del dolor

pueden deteriorarse de forma distinta gracias al procesamiento en paralelo de diferentes vías anatómicas (Bravo et al., 2016; Xiao & Zhang, 2018).

Resulta de gran interés evaluar electrofisiológicamente las estructuras involucradas en dichas vías, pues estas podrían ser un sitio de convergencia para el procesamiento de las dimensiones del dolor y su afectación a partir de este modelo de lesión nerviosa. Una de estas estructuras es el núcleo parafascicular del tálamo, que, como ya se ha mencionado en este trabajo, podría ser este lugar de convergencia, pues se ha demostrado su papel en el desarrollo de dolor crónico en su dimensión afectiva. Se ha demostrado también, que condiciones de salud, el tálamo intralaminar participa en el procesamiento de respuesta a estímulos conductualmente relevantes, es decir, en conductas de tipo “switch” en modelos de ratón y en primates no humanos (Kato et al., 2018; Matsumoto et al., 2001; Sadikot & Rymar, 2009). Recientemente, Mandelbaum et al. caracterizó de manera anatómica, genética y electrofisiológica diferentes divisiones de Pf y determinó que, por sus proyecciones a divisiones específicas del estriado, tiene participación en tres circuitos, con tres diferentes funciones: cognitiva, afectiva y emocional (Mandelbaum et al., 2019). Es por esto que resultaría muy interesante determinar cómo está participando en el procesamiento del dolor crónico, ya no sólo en una dimensión afectiva, como se ha estudiado, sino también en los otros componentes del dolor.

El deterioro de la dimensión cognitiva del dolor cuando es crónico ha sido estudiado en procesos como atención, memoria de trabajo, toma de decisiones, aprendizaje y flexibilidad cognitiva. Estos han mostrado diferentes efectos, dependiendo de los procesos evaluados, el origen del dolor crónico (inflamatorio o neuropático), y el modelo empleado para inducirlo (inyección de agentes inflamatorios, lesiones de constricción y/o transección del nervio ciático o nervios espinales) (Ji et al., 2010; Moriarty et al., 2016; Pais-Vieira, Mendes-Pinto, Lima, & Galhardo, 2009).

En el caso del estudio de la flexibilidad conductual bajo la influencia de lesiones neuropáticas, este ha sido, en su mayoría, realizado en modelos de rata, a

partir de lesiones en nervios periféricos. Se ha observado que, a partir de la ligadura de los nervios espinales L5 y L6, la flexibilidad conductual evaluada a partir de paradigmas de laberinto acuático y en cámaras operantes está afectada, sin generar alteraciones en la adquisición de las tareas o en la motivación por realizarlas (Cowen et al., 2018; Moriarty et al., 2016). Si bien en el caso del dolor crónico las alteraciones cognitivas varían en su presentación e intensidad, los autores mencionados previamente han sugerido que la flexibilidad conductual podría ser un proceso especialmente susceptible al efecto del dolor neuropático.

En el presente trabajo se demostró que la lesión de constricción del nervio mentoniano es suficiente para generar alteraciones cognitivas a largo plazo. Al tener esta lesión un nivel de alodinia e hiperalgesia de menor grado y menor duración que lo reportado en otros modelos, en donde estos fenómenos permanecen incluso después de 65 semanas posteriores a las lesiones (Moriarty et al., 2016), las deficiencias cognitivas no son atribuibles a la distracción por hipervigilancia al dolor, sino que permanecen a pesar de la atenuación del componente sensorial.

De igual manera, estos resultados no se deben a una disminución en la motivación por la obtención de una recompensa, pues esta no fue alterada por la lesión, como se muestra en el número de ensayos respondidos. Estos resultados son consistentes con los de otros trabajos en los que se encontraron alteraciones en procesos de aprendizaje, atención y flexibilidad cognitiva causadas por dolor crónico neuropático, pero que tampoco mostraron deterioro en la motivación (Cowen et al., 2018; Higgins et al., 2015).

Los componentes de la red de estructuras centrales involucradas en el procesamiento del dolor son también críticos para el procesamiento de las funciones cognitivas (Moriarty et al., 2011), por lo que un déficit en estas funciones, como es la flexibilidad conductual, podría representar un síntoma de un trastorno neurológico (Gomez-Ramirez, Hysaj, & Niebur, 2016), en este caso, de alteraciones inducidas por la lesión neuropática trigeminal.

Es importante resaltar que son muy pocos los trabajos realizados en modelos de ratón que evalúan los efectos de las lesiones nerviosas en la región orofacial

más allá de su componente sensorial. Entre las ventajas del presente modelo de dolor crónico neuropático orofacial se encuentra la facilidad de su realización, además de ser poco invasiva, ya que la extensión de la incisión para acceder al nervio es pequeña y puede efectuarse bajo control visual directo. En conjunto con la ventaja de su facilidad de su ejecución, no requiere del uso de un estereotáxico para inmovilizar al ratón, ni del uso de microscopio quirúrgico, como sucede en el caso de las lesiones del nervio infraorbitario. Asimismo, consideramos que el modelo es menos agresivo para los ratones, pues la región de inervación es menos extensa que la del nervio infraorbitario (Deseure & Hans, 2015; Seino et al., 2009), Sin embargo, como se demostró, es suficiente para generar las alteraciones multidimensionales descritas.

La duración del efecto de la lesión en la dimensión afectiva del dolor representa otra ventaja para su uso en la evaluación de procesos cognitivos, pues al ser esta de una duración relativamente corta, permite evaluar la dimensión cognitiva del dolor crónico sin la influencia de su efecto en el componente motivacional en un período de tiempo razonable.

Si bien ningún modelo de experimentación básica refleja en su totalidad o de forma exacta las condiciones humanas, el modelo de constricción del nervio mentoniano puede considerarse adecuado, pues clínicamente, las neuropatías trigeminales derivan, en muchos casos, de iatrogenias en la rama mandibular del trigémino (Hillerup, 2007).

La caracterización de las diferentes dimensiones del dolor orofacial cuando este es provocado por una lesión neuropática, ofrece una base conductual útil y efectiva para el estudio de distintos mecanismos que participan en el procesamiento de la experiencia del dolor y su cronificación. Estas bases conductuales permitirán la futura evaluación de estructuras centrales específicas, como es el núcleo parafascicular del tálamo, de cuya participación en el procesamiento del dolor en diferentes dimensiones ha sido propuesta, pero cuyas posibles alteraciones bajo la influencia de dolor crónico neuropático orofacial no han sido descritas. Asimismo, sentar las bases conductuales de este modelo en ratones, favorece y facilita el uso

de animales con modificaciones genéticas específicas, que pueden emplearse tanto para estudiar procesos específicos (Hardt et al., 2019) como para la modulación de estructuras a nivel central y periférico, a partir de herramientas como la optogenética o la quimiogenética.

De esta forma, las pruebas conductuales aquí propuestas permitirán el estudio de la actividad neurofisiológica, en este caso, del núcleo parafascicular del tálamo bajo la influencia de dolor neuropático orofacial, asociándola a cada una de sus dimensiones para comprender cómo se integran estos procesos. Asimismo, dichas pruebas serían de utilidad para evaluar la efectividad de técnicas de neuromodulación en el control del dolor, así como estudiar la posible reversión de sus efectos, para la búsqueda de alternativas terapéuticas efectivas para el tratamiento del dolor crónico neuropático orofacial.

8.5 Utilidad del modelo de constricción del nervio mentoniano para la realización de registros electrofisiológicos

Para validar la utilidad de la lesión de constricción del nervio mentoniano como base experimental para la evaluación funcional de circuitos, se realizaron registros electrofisiológicos en ratones en un modelo de cabeza fija bajo estimulación mecánica de diferentes intensidades. Estos registros fueron realizados en el núcleo parafascicular del tálamo (Pf), siguiendo el esquema de evaluación a lo largo de las distintas sesiones post operatorias, así como en la corteza cingulada anterior (ACC). En estas evaluaciones, se encontró que hay cambios en la modulación en dichas estructuras, después de realizar la lesión de constricción del nervio mentoniano.

Como se mencionó anteriormente, recientemente se demostró que la organización de Pf en ratones le permite a esta estructura participar en un circuito asociativo, límbico y somatosensorial (Mandelbaum et al., 2019). En el caso del procesamiento del dolor, la lesión o el bloqueo farmacológico de esta estructura atenúa los signos de dolor neuropático (Saadé et al., 2007), así como la respuesta a estímulos nociceptivos (Harte et al., 2000), además que desempeña un papel importante en la dimensión afectiva en presencia de dolor crónico, y en el procesamiento cognitivo, que ha sido evaluado en condiciones de salud. Así, podría

ser una estructura clave para el desarrollo y establecimiento de dolor crónico neuropático, pues representaría un sitio de convergencia para el procesamiento del dolor en sus diferentes dimensiones. Es por esto que se empleó la estrategia de evaluación del modelo de lesión trigeminal con estimulación mecánica como primera aproximación para el estudio desde una perspectiva electrofisiológica. Otra estructura involucrada tanto en el procesamiento sensorial como afectivo del dolor es ACC (Xiao & Zhang, 2018), que también fue evaluada bajo el mismo esquema de estimulación sensorial. ACC también participa en la cronicidad al dolor en modelos de constricción nerviosa (Meda et al., 2019).

La presencia de modulación asociada a la aplicación de los estímulos, así como los cambios observados con el paso de los días sugieren que la lesión de constricción del nervio mentoniano no sólo es útil como modelo experimental para el estudio de circuitos neuronales, sino que estos cambios podrían estar involucrados en las alteraciones conductuales observadas en el presente trabajo.

Resulta de gran interés analizar en mayor profundidad dichos resultados, así como, en un futuro, considerar la posibilidad de realizar los experimentos mencionados en animales despiertos, además de implementar tareas para la evaluación de la actividad electrofisiológica en procesos afectivos y cognitivos en condiciones de dolor crónico por lesión trigeminal, en modelos de roedores con cabeza fija y en libre movimiento. Asimismo, las estrategias presentadas en este trabajo pueden ser empleadas para el estudio de técnicas de modulación para la búsqueda el control del dolor orofacial, a nivel central o periférico, así como de sus efectos en sus diferentes dimensiones.

9. CONCLUSIONES

La lesión de constricción del nervio mentoniano es un modelo adecuado para el estudio de dolor neuropático orofacial, ya que tiene efectos conductuales en sus diferentes dimensiones:

- En la dimensión sensorial, a partir de las respuestas espontáneas y provocadas por estímulos mecánicos, como signos de alodinia, hiperalgesia y dolor espontáneo.
- En la dimensión afectiva, al mostrar alteraciones en la conducta de evitación/escape.
- En la dimensión cognitiva, al observarse alteraciones en la flexibilidad conductual, manifestadas como cambios en la capacidad de adaptación a las exigencias del medio.

10. REFERENCIAS

- Almeida, T. F., Roizenblatt, S., & Tufik, S. (2004). Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Research*, 1000(1–2), 40–56. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.10.073>
- Alshelh, Z., Di Pietro, F., Youssef, A. M., Reeves, J. M., Macey, P. M., Vickers, E. R., ... Henderson, L. A. (2016). Chronic Neuropathic Pain: It's about the Rhythm. *The Journal of Neuroscience*, 36(3), 1008–1018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2768-15.2016>
- Andrews, N., Legg, E., Lisak, D., Issop, Y., Richardson, D., Harper, S., ... Rice, A. S. C. (2012). Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *European Journal of Pain*, 16(4), 485–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2011.07.012>
- Apkarian, A. V., Bushnell, M. C., Treede, R.-D., & Zubieta, J.-K. (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *European Journal of Pain*, 9(4), 463–463. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2004.11.001>
- Baker, P. M., & Mizumori, S. J. Y. (2017). Control of behavioral flexibility by the lateral habenula. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 162(7), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.07.012>
- Barghash, Z., Larsen, J. O., Al-Bishri, A., & Kahnberg, K.-E. (2013). Degeneration and regeneration of motor and sensory nerves: a stereological study of crush lesions in rat facial and mental nerves. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 42(12), 1566–1574. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2013.04.017>
- Bennett, G. J. (2012). What Is Spontaneous Pain and Who Has It? *The Journal of Pain*, 13(10), 921–929. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2012.05.008>
- Bista, & Imlach. (2019). Pathological Mechanisms and Therapeutic Targets for Trigeminal Neuropathic Pain. *Medicines*, 6(3), 91. <https://doi.org/10.3390/medicines6030091>
- Bravo, L., Mico, J. A., Rey-Brea, R., Camarena-Delgado, C., & Berrocoso, E. (2016). Effect of DSP4 and desipramine in the sensorial and affective component of neuropathic pain in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 70, 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.05.002>
- C. Gerfen. (2004). *The Rat Nervous System*.
- Chichorro, J. G., Porreca, F., & Sessle, B. (2017). Mechanisms of craniofacial pain. *Cephalalgia*, 37(7), 613–626. <https://doi.org/10.1177/0333102417704187>
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., ... Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease Primers*,

3(1), 17002. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>

Cowen, S. L., Phelps, C. E., Navratilova, E., McKinzie, D. L., Okun, A., Husain, O., ... Porreca, F. (2018). Chronic pain impairs cognitive flexibility and engages novel learning strategies in rats. *Pain*, *159*(7), 1403–1412. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001226>

Deacon, R. (2012). Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, (59), 1–11. <https://doi.org/10.3791/2607>

Deacon, R. M. J. (2006). Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nature Protocols*, *1*(1), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19>

Deseure, K., & Hans, G. (2018). Orofacial neuropathic pain reduces spontaneous burrowing behavior in rats. *Physiology & Behavior*, *191*(March), 91–94. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.04.020>

Deseure, Kristof, & Hans, G. H. (2015). Chronic Constriction Injury of the Rat's Infraorbital Nerve (IoN-CCI) to Study Trigeminal Neuropathic Pain. *Journal of Visualized Experiments*, *53167*(103), 53167–53791. <https://doi.org/10.3791/53167>

Dieb, W., Ouachikh, O., Durif, F., & Hafidi, A. (2016). Nigrostriatal dopaminergic depletion produces orofacial static mechanical allodynia. *European Journal of Pain*, *20*(2), 196–205. <https://doi.org/10.1002/ejp.707>

Ding, W., You, Z., Shen, S., Yang, J., Lim, G., Doheny, J. T., ... Mao, J. (2017). An Improved Rodent Model of Trigeminal Neuropathic Pain by Unilateral Chronic Constriction Injury of Distal Infraorbital Nerve. *The Journal of Pain*, *18*(8), 899–907. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2017.02.427>

Ellis, A., & Bennett, D. L. H. (2013). Neuroinflammation and the generation of neuropathic pain. *British Journal of Anaesthesia*, *111*(1), 26–37. <https://doi.org/10.1093/bja/aet128>

Evans, D. A., Stempel, A. V., Vale, R., & Branco, T. (2019). Cognitive Control of Escape Behaviour. *Trends in Cognitive Sciences*, *23*(4), 334–348. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2019.01.012>

Fuchs, P. N., Peng, Y. B., Boyette-Davis, J. A., & Uhelski, M. L. (2014). The anterior cingulate cortex and pain processing. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *8*(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00035>

Gao, H.-R., Shi, T.-F., Yang, C.-X., Zhang, D., Zhang, G.-W., Zhang, Y., ... Xu, M.-Y. (2010). The effect of dopamine on pain-related neurons in the parafascicular nucleus of rats. *Journal of Neural Transmission*, *117*(5), 585–591. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0398-3>

Gauriau, C., & Bernard, J.-F. (2002). Pain Pathways and Parabrachial Circuits in the Rat. *Experimental Physiology*, *87*(2), 251–258.

<https://doi.org/10.1113/eph8702357>

- Go, J. L., Kim, P. E., & Zee, C.-S. (2001). The trigeminal nerve. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 22(6), 502–520. [https://doi.org/10.1016/S0887-2171\(01\)90004-6](https://doi.org/10.1016/S0887-2171(01)90004-6)
- Gomez-Ramirez, M., Hysaj, K., & Niebur, E. (2016). Neural mechanisms of selective attention in the somatosensory system. *Journal of Neurophysiology*, 116(3), 1218–1231. <https://doi.org/10.1152/jn.00637.2015>
- Gomtsian, L., Bannister, K., Eyde, N., Robles, D., Dickenson, A. H., Porreca, F., & Navratilova, E. (2018). Morphine effects within the rodent anterior cingulate cortex and rostral ventromedial medulla reveal separable modulation of affective and sensory qualities of acute or chronic pain. *PAIN*, 159(12), 2512–2521. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001355>
- Grelik, C., Allard, S., & Ribeiro-da-Silva, A. (2005). Changes in nociceptive sensory innervation in the epidermis of the rat lower lip skin in a model of neuropathic pain. *Neuroscience Letters*, 389(3), 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.07.056>
- Grelik, C., Bennett, G. J., & Ribeiro-da-Silva, A. (2005). Autonomic fibre sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the rat lower lip skin following chronic constriction injury. *European Journal of Neuroscience*, 21(9), 2475–2487. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04089.x>
- Groh, A., Krieger, P., Mease, R. A., & Henderson, L. (2018). Acute and Chronic Pain Processing in the Thalamocortical System of Humans and Animal Models. *Neuroscience*, 387, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.09.042>
- Hamilton, D. A., & Brigman, J. L. (2015). Behavioral flexibility in rats and mice: Contributions of distinct frontocortical regions. *Genes, Brain and Behavior*. <https://doi.org/10.1111/gbb.12191>
- Hardt, S., Fischer, C., Vogel, A., Wilken-Schmitz, A., & Tegeder, I. (2019). Distal infraorbital nerve injury. *Pain*, 160(6), 1431–1447. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001518>
- Hart, R. P., Martelli, M. F., & Zasler, N. D. (2000). Chronic pain and neuropsychological functioning. *Neuropsychology Review*, 10(3), 131–149. <https://doi.org/10.1023/a:1009020914358>
- Hart, Robert P, Wade, J. B., & Martelli, M. F. (2003). Cognitive impairment in patients with chronic pain: The significance of stress. *Current Pain and Headache Reports*, 7(2), 116–126. <https://doi.org/10.1007/s11916-003-0021-5>
- Harte, S. E., Lagman, A. L., & Borszcz, G. S. (2000). Antinociceptive effects of morphine injected into the nucleus parafascicularis thalami of the rat. *Brain Research*, 874(1), 78–86. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02583-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02583-X)
- Henderson, L. A., Peck, C. C., Petersen, E. T., Rae, C. D., Youssef, A. M.,

- Reeves, J. M., ... Gustin, S. M. (2013). Chronic Pain: Lost Inhibition? *Journal of Neuroscience*, 33(17), 7574–7582.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-13.2013>
- Henssen, D. J. H. A., Kurt, E., Kozicz, T., van Dongen, R., Bartels, R. H. M. A., & van Cappellen van Walsum, A.-M. (2016). New Insights in Trigeminal Anatomy: A Double Orofacial Tract for Nociceptive Input. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00053>
- Higgins, G. A., Sileniaks, L. B., Van Niekerk, A., Desnoyer, J., Patrick, A., Lau, W., & Thevarkunnel, S. (2015). Enduring attentional deficits in rats treated with a peripheral nerve injury. *Behavioural Brain Research*, 286, 347–355.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.050>
- Hillerup, S. (2007). Iatrogenic injury to oral branches of the trigeminal nerve: records of 449 cases. *Clinical Oral Investigations*, 11(2), 133–142.
<https://doi.org/10.1007/s00784-006-0089-5>
- Hossain, M., Unno, S., Ando, H., Masuda, Y., & Kitagawa, J. (2017). Neuron–Glia Crosstalk and Neuropathic Pain: Involvement in the Modulation of Motor Activity in the Orofacial Region. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2051. <https://doi.org/10.3390/ijms18102051>
- Ji, G., Sun, H., Fu, Y., Li, Z., Pais-Vieira, M., Galhardo, V., & Neugebauer, V. (2010). Cognitive Impairment in Pain through Amygdala-Driven Prefrontal Cortical Deactivation. *Journal of Neuroscience*, 30(15), 5451–5464.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0225-10.2010>
- Johansen, J. P., Fields, H. L., & Manning, B. H. (2001). The affective component of pain in rodents: Direct evidence for a contribution of the anterior cingulate cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 8077–8082. <https://doi.org/10.1073/pnas.141218998>
- Julius, D., & Basbaum, A. I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852), 203–210. <https://doi.org/10.1038/35093019>
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., Song, C., Berridge, K. C., Graybiel, A. M., & Fentress, J. C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), 45–59.
<https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>
- Kato, F., Sugimura, Y. K., & Takahashi, Y. (2018). Pain-Associated Neural Plasticity in the Parabrachial to Central Amygdala Circuit. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1099, pp. 157–166).
https://doi.org/10.1007/978-981-13-1756-9_14
- Kato, S., Fukabori, R., Nishizawa, K., Okada, K., Yoshioka, N., Sugawara, M., ... Kobayashi, K. (2018). Action Selection and Flexible Switching Controlled by the Intralaminar Thalamic Neurons. *Cell Reports*, 22(9), 2370–2382.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.016>

- Kim, H. Y., Park, C.-K., Cho, I.-H., Jung, S. J., Kim, J. S., & Oh, S. B. (2008). Differential Changes in TRPV1 Expression After Trigeminal Sensory Nerve Injury. *The Journal of Pain*, 9(3), 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.11.013>
- Kiyomoto, M., Shiota, T., Moriya, T., Sato, H., Nakamura, S., & Inoue, T. (2018). Experimental Study on Involvement of the Central Nervous System in Inferior Alveolar Nerve Damage-Associated Hyperalgesia of the Mental Region. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 76(10), 2089.e1-2089.e8. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.06.021>
- Kramer, P. R., Strand, J., Stinson, C., Bellinger, L. L., Kinchington, P. R., Yee, M. B., ... Peng, Y. B. (2017). Role for the Ventral Posterior Medial/Posterior Lateral Thalamus and Anterior Cingulate Cortex in Affective/Motivation Pain Induced by Varicella Zoster Virus. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 11(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnint.2017.00027>
- Krzyzanowska, A., & Avendaño, C. (2012). Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain and Behavior*, 2(5), 678–697. <https://doi.org/10.1002/brb3.85>
- LaBuda, C. J., & Fuchs, P. N. (2000). A Behavioral Test Paradigm to Measure the Aversive Quality of Inflammatory and Neuropathic Pain in Rats. *Experimental Neurology*, 163(2), 490–494. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7395>
- LaGrazie Differential effect of ACC lesion on mechanical hypersensitivity and escape avoidance behavior in an animal model of neuropathic pain.pdf. (n.d.).
- Lavigne, G. J., & Sessle, B. . (2016). The Neurobiology of Orofacial Pain and Sleep and Their Interactions. *Journal of Dental Research*, 95(10), 1109–1116. <https://doi.org/10.1177/0022034516648264>
- Leenaars, C. H. C., Joosten, R. N. J. M. A., Zwart, A., Sandberg, H., Ruimschotel, E., Hanegraaf, M. A. J., ... van Someren, E. J. W. (2012). Switch-Task Performance in Rats Is Disturbed by 12 h of Sleep Deprivation But Not by 12 h of Sleep Fragmentation. *Sleep*, 35(2), 211–221. <https://doi.org/10.5665/sleep.1624>
- Li, B.-H., Kim, S.-M., Yoo, S. B., Kim, M.-J., Jahng, J. W., & Lee, J.-H. (2012). Recombinant human nerve growth factor (rhNGF- β) gene transfer promotes regeneration of crush-injured mental nerve in rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 113(3), e26–e34. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.07.002>
- Liebermann, D., Ploner, C. J., Kraft, A., Kopp, U. A., & Ostendorf, F. (2013). A dysexecutive syndrome of the medial thalamus. *Cortex*, 49(1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2011.11.005>
- Loeser, J. D., & Treede, R.-D. (2008). The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology☆. *Pain*, 137(3), 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>

- Logue, S. F., & Gould, T. J. (2014). The neural and genetic basis of executive function: Attention, cognitive flexibility, and response inhibition. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 123, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.08.007>
- Mandelbaum, G., Taranda, J., Haynes, T. M., Hochbaum, D. R., Huang, K. W., Hyun, M., ... Sabatini, B. L. (2019). Distinct Cortical-Thalamic-Striatal Circuits through the Parafascicular Nucleus. *Neuron*, 102(3), 636-652.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.02.035>
- Martin, Y. B., Malmierca, E., Avendaño, C., & Nuñez, A. (2010). Neuronal disinhibition in the trigeminal nucleus caudalis in a model of chronic neuropathic pain. *European Journal of Neuroscience*, 32(3), 399–408. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07302.x>
- Matsumoto, N., Minamimoto, T., Graybiel, A. M., & Kimura, M. (2001). Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events. *Journal of Neurophysiology*, 85(2), 960–976. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.2.960>
- Matsumoto, Naoyuki, Minamimoto, T., Graybiel, A. M., & Kimura, M. (2001). Neurons in the thalamic CM-Pf complex supply striatal neurons with information about behaviorally significant sensory events. *Journal of Neurophysiology*, 85(2), 960–976. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.85.2.960>
- Meda, K. S., Patel, T., Braz, J. M., Malik, R., Turner, M. L., Seifkar, H., ... Sohal, V. S. (2019). Microcircuit Mechanisms through which Mediodorsal Thalamic Input to Anterior Cingulate Cortex Exacerbates Pain-Related Aversion. *Neuron*, 102(5), 944-959.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.042>
- Melzack, R., & Casey, K. (1968). Sensory, motivational, and central control determinants of pain. *The Skin Senses*. Springfield, IL: CC Thomas, (June), 423–439. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC496610/> <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Sensory,+motivational,+and+central+control+determinants+of+pain#9>
- Melzack, Ronald. (1999). From the gate to the neuromatrix. *Pain*, 82(SUPPL.1), S121–S126. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(99\)00145-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(99)00145-1)
- Mills, E. P., Di Pietro, F., Alshelh, Z., Peck, C. C., Murray, G. M., Vickers, E. R., & Henderson, L. A. (2018). Brainstem Pain-Control Circuitry Connectivity in Chronic Neuropathic Pain. *The Journal of Neuroscience*, 38(2), 465–473. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1647-17.2017>
- Montes-Angeles, C. D., Gutierrez-Castañeda, N., Sosa, C., Jiménez, J., Miranda, F., & Pérez-Martínez, I. O. (2017). Multidimensional study of orofacial chronic neuropathic pain: An experimental study in rats. *Journal of Oral Research*, 6(10), 270–275. <https://doi.org/10.17126/joralres.2017.076>
- Moon, H. C., Heo, W. I., Kim, Y. J., Lee, D., Won, S. Y., Kim, H. R., ... Park, Y. S.

- (2017). Optical inactivation of the anterior cingulate cortex modulate descending pain pathway in a rat model of trigeminal neuropathic pain created via chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *Journal of Pain Research, Volume 10*, 2355–2364. <https://doi.org/10.2147/JPR.S138626>
- Moriarty, O., Gorman, C. L., McGowan, F., Ford, G. K., Roche, M., Thompson, K., ... Finn, D. P. (2016). Impaired recognition memory and cognitive flexibility in the rat L5–L6 spinal nerve ligation model of neuropathic pain. *Scandinavian Journal of Pain, 10*(1), 61–73. <https://doi.org/10.1016/j.sjpain.2015.09.008>
- Moriarty, O., McGuire, B. E., & Finn, D. P. (2011). The effect of pain on cognitive function: A review of clinical and preclinical research. *Progress in Neurobiology, 93*(3), 385–404. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.002>
- Ouachikh, O., Hafidi, A., Boucher, Y., & Dieb, W. (2018). Electrical Synapses are Involved in Orofacial Neuropathic Pain. *Neuroscience, 382*, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.041>
- Pais-Vieira, M., Mendes-Pinto, M. M., Lima, D., & Galhardo, V. (2009). Cognitive impairment of prefrontal-dependent decision-making in rats after the onset of chronic pain. *Neuroscience, 161*(3), 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.011>
- Pais-Vieira, Miguel, Lima, D., & Galhardo, V. (2009). Sustained attention deficits in rats with chronic inflammatory pain. *Neuroscience Letters, 463*(1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.07.050>
- Piao, Z. G., Cho, I.-H., Park, C. K., Hong, J. P., Choi, S.-Y., Lee, S. J., ... Oh, S. B. (2006). Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain, 121*(3), 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.12.023>
- Pirrotta, R., Jeanmonod, D., McAleese, S., Aufenberg, C., Opwis, K., Jenewein, J., & Martin-Soelch, C. (2013). Cognitive Functioning, Emotional Processing, Mood, and Personality Variables Before and After Stereotactic Surgery. *Neurosurgery, 73*(1), 121–128. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000429845.06955.70>
- Price, D. D. (2000). Psychological and Neural Mechanisms of the Affective Dimension of Pain. *Science, 288*(5472), 1769–1772. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1769>
- Refsgaard, L. K., Hoffmann-Petersen, J., Sahlholt, M., Pickering, D. S., & Andreasen, J. T. (2016). Modelling affective pain in mice: Effects of inflammatory hypersensitivity on place escape/avoidance behaviour, anxiety and hedonic state. *Journal of Neuroscience Methods, 262*, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.01.019>
- Rigaud, M., Gemes, G., Barabas, M.-E., Chernoff, D. I., Abram, S. E., Stucky, C. L., & Hogan, Q. H. (2008). Species and strain differences in rodent sciatic nerve anatomy: Implications for studies of neuropathic pain. *Pain, 136*(1),

188–201. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.01.016>

- Rodriguez, E., Sakurai, K., Xu, J., Chen, Y., Toda, K., Zhao, S., ... Wang, F. (2017). A craniofacial-specific monosynaptic circuit enables heightened affective pain. *Nature Neuroscience*, *20*(12), 1734–1743. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0012-1>
- Romero-Reyes, M., Akerman, S., Nguyen, E., Vijjeswarapu, A., Hom, B., Dong, H., & Charles, A. C. (2013). Spontaneous Behavioral Responses in the Orofacial Region: A Model of Trigeminal Pain in Mouse. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, *53*(1), 137–151. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2012.02226.x>
- Saadé, N. E., Al Amin, H., Abdel Baki, S., Chalouhi, S., Jabbur, S. J., & Atweh, S. F. (2007). Reversible attenuation of neuropathic-like manifestations in rats by lesions or local blocks of the intralaminar or the medial thalamic nuclei. *Experimental Neurology*, *204*(1), 205–219. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.10.009>
- Sadikot, A. F., & Rymar, V. V. (2009). The primate centromedian–parafascicular complex: Anatomical organization with a note on neuromodulation. *Brain Research Bulletin*, *78*(2–3), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.09.016>
- Savignat, M., Vodouhe, C., Ackermann, A., Haikel, Y., Lavallo, P., & Libersa, P. (2008). Evaluation of Early Nerve Regeneration Using a Polymeric Membrane Functionalized With Nerve Growth Factor (NGF) After a Crush Lesion of the Rat Mental Nerve. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *66*(4), 711–717. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.06.654>
- Schepers, I. M., Beck, A.-K., Bräuer, S., Schwabe, K., Abdallat, M., Sandmann, P., ... Krauss, J. K. (2017). Human centromedian-parafascicular complex signals sensory cues for goal-oriented behavior selection. *NeuroImage*, *152*(March), 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.03.019>
- Scholz, J., Finnerup, N. B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R., Bennett, M. I., ... Treede, R. D. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: Chronic neuropathic pain. *Pain*. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001365>
- Schwartz, N., Temkin, P., Jurado, S., Lim, B. K., Heifets, B. D., Polepalli, J. S., & Malenka, R. C. (2014). Decreased motivation during chronic pain requires long-term depression in the nucleus accumbens. *Science*, *345*(6196), 535–542. <https://doi.org/10.1126/science.1253994>
- Seino, H., Seo, K., Maeda, T., & Someya, G. (2009). Behavioural and histological observations of sensory impairment caused by tight ligation of the trigeminal nerve in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, *181*(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.04.020>
- Shibasaki, H. (2004). Chapter 5 Central mechanisms of pain perception. *Supplements to Clinical Neurophysiology*, *57*(C), 39–49.

[https://doi.org/10.1016/S1567-424X\(09\)70341-1](https://doi.org/10.1016/S1567-424X(09)70341-1)

- Sindou, M., Jeanmonod, D., & Mertens, P. (1990). Ablative neurosurgical procedures for the treatment of chronic pain. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology*, 20(5), 399–423. [https://doi.org/10.1016/S0987-7053\(05\)80207-2](https://doi.org/10.1016/S0987-7053(05)80207-2)
- Smith, Y., Galvan, A., Raju, D., & Wichmann, T. (2010). Anatomical and Functional Organization of the Thalamostriatal Systems. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 20, pp. 381–396). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374767-9.00022-6>
- Steiner, L., Forster, D., Leksell, L., Meyerson, B. A., & Boethius, J. (1980). Gammathalamotomy in intractable pain. *Acta Neurochirurgica*, 52(3–4), 173–184. <https://doi.org/10.1007/BF01402072>
- Takahashil, K., Watanabel, M., Suekawal, Y., Itol, G., Inubushil, T., Hirosel, N., ... Tannel, K. (2011). IL-1beta in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to extra-territorial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury. *European Journal of Pain*, 15(5), 467.e1-467.e14. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2010.10.006>
- Tamaddonfard, E., Farshid, A.-A., Seiednejhad, S., & Morvaridi, A. (2011). Role of the thalamic parafascicular nucleus cholinergic system in the modulation of acute corneal nociception in rats. *Veterinary Research Forum*, 2(4), 226–230.
- Taylor, A. M. W., & Ribeiro-Da-Silva, A. (2011). GDNF levels in the lower lip skin in a rat model of trigeminal neuropathic pain: Implications for nonpeptidergic fiber reinnervation and parasympathetic sprouting. *Pain*, 152(7), 1502–1510. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.02.035>
- Tinastepe, N., & Oral, K. (2013). Neuropathic pain after dental treatment. *Ağrı - The Journal of The Turkish Society of Algology*, 25(1), 1–6. <https://doi.org/10.5505/agri.2013.55477>
- Uddin, O., Studlack, P., Akintola, T., Raver, C., Castro, A., Masri, R., & Keller, A. (2018). Amplified parabrachial nucleus activity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neurobiology of Pain*, 3(November 2017), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.02.002>
- Vit, J.-P., Jasmin, L., Bhargava, A., & Ohara, P. T. (2006). Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. *Neuron Glia Biology*, 2(4), 247–257. <https://doi.org/10.1017/S1740925X07000427>
- Vos, B. P., Strassman, A. M., & Maciewicz, R. J. (1994). Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(5 Pt 1), 2708–2723. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182437>
- Weigel, R., Weigel, R., Krauss, J. K., & Krauss, J. K. (2004a). Center Median-

- Parafascicular Complex and Pain Control. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 82(2–3), 115–126. <https://doi.org/10.1159/000079843>
- Weigel, R., Weigel, R., Krauss, J. K., & Krauss, J. K. (2004b). Center Median-Parafascicular Complex and Pain Control. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 82(2–3), 115–126. <https://doi.org/10.1159/000079843>
- Whittaker, A. L., Lymn, K. A., Nicholson, A., & Howarth, G. S. (2015). The assessment of general well-being using spontaneous burrowing behaviour in a short-term model of chemotherapy-induced mucositis in the rat. *Laboratory Animals*, 49(1), 30–39. <https://doi.org/10.1177/0023677214546913>
- Xiao, X., & Zhang, Y.-Q. (2018). A new perspective on the anterior cingulate cortex and affective pain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 90(January), 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.03.022>
- Xiao, Z., Martinez, E., Kulkarni, P. M., Zhang, Q., Hou, Q., Rosenberg, D., ... Chen, Z. S. (2019). Cortical Pain Processing in the Rat Anterior Cingulate Cortex and Primary Somatosensory Cortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(April), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00165>
- Youssef, A. M., Gustin, S. M., Nash, P. G., Reeves, J. M., Petersen, E. T., Peck, C. C., ... Henderson, L. A. (2014). Differential brain activity in subjects with painful trigeminal neuropathy and painful temporomandibular disorder. *Pain*, 155(3), 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.11.008>
- Zakir, H. M., Mostafaezur, R. M., Suzuki, A., Hitomi, S., Suzuki, I., Maeda, T., ... Kitagawa, J. (2012). Expression of TRPV1 Channels after Nerve Injury Provides an Essential Delivery Tool for Neuropathic Pain Attenuation. *PLoS ONE*, 7(9), e44023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044023>
- Zuniga, J. R. (1999). Trigeminal ganglion cell response to mental nerve transection and repair in the rat. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 57(4), 427–437. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(99\)90284-7](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(99)90284-7)

11. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. División del nervio trigémino en ratón.....	5
Figura 2. Estructuras centrales involucradas en el procesamiento del dolor	8
Figura 3. Posibles mecanismos del desarrollo de dolor crónico neuropático orofacial.....	10
Figura 4. Organización del núcleo parafascicular.....	17
Figura 5. Lesión de constricción del nervio mentoniano.....	27
Figura 6. Representación de la tarea de evitación-escape.....	30
Figura 7. Equipo empleado para la evaluación de construcción de la madriguera	31
Figura 8. Caja operante	32
Figura 9. Tarea switch	34
Figura 10. Tarea de cambio de posición (set-shifting).....	35
Figura 11. Tarea de aprendizaje en reversa.....	35
Figura 12. Sitio de registro electrofisiológico de Pf.....	36
Figura 13. Sitio de registro electrofisiológico de ACC.....	37
Figura 14. Evaluación de las respuestas orofaciales espontáneas	40
Figura 15. Evaluación de las respuestas provocadas por estímulos mecánicos ..	41
Figura 16. Índice de preferencia por el compartimento oscuro en la tarea de evitación/escape.....	43
Figura 17. Evaluación de las conductas de bienestar general.....	44
Figura 18. Evaluación de la tarea de cambio (Switch).....	46
Figura 19. Evaluación de la tarea de elección forzada de dos alternativas	48
Figura 20. Evaluación de la tarea de cambio de posición (Set Shifting)	50
Figura 21. Evaluación de la tarea de Aprendizaje en Reversa	52
Figura 22. Actividad en Pf durante estimulación mecánica ipsilateral en ratones lesionados (ipsilateral).....	54
Figura 23. Actividad en Pf durante estimulación mecánica contralateral en ratones lesionados (contralateral)	55
Figura 24. Neuronas moduladas en Pf bajo estimulación mecánica posterior a la lesión del nervio mentoniano.....	56
Figura 25. Actividad en ACC durante estimulación mecánica en ratones lesionados	57
Figura 26. Actividad poblacional en ACC durante estimulación mecánica en ratones lesionados	57

Figura 27. Actividad poblacional en ACC durante estimulación mecánica en ratones no lesionados 58

Figura 28. Neuronas moduladas en ACC bajo estimulación mecánica posterior a la lesión del nervio mentoniano 58