



**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO.
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA.**

TESIS:

**“CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LAS NEURONAS COLINÉRGICAS DE LA AMÍGDALA
BASOLATERAL DURANTE DOLOR CRÓNICO DENTAL. UN ESTUDIO EN RATA SPRAGUE-
DAWLEY”**

**PRESENTA: ESTEFANÍA GONZÁLEZ DEL VALLE
MATRÍCULA: 217450011**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN PEDIATRÍA**

**DIRECTOR DE TESIS: DC. ISMAEL JUÁREZ DÍAZ
ID: 100517019**

**DIRECTOR METODOLÓGICO: DC. DIANA DEL CARMEN PAZOS GUARNEROS
ID: 100524009**

**DIRECTOR DISCIPLINARIO: DC. JULIA FLORES TOCHIHUITL
ID: 100228022**

**ASESOR: DC. ALBERTO VINICIO JEREZANO DOMÍNGUEZ
ID: NSS524009**

**LECTOR: MSP. ROSENDO GERARDO CARRASCO GUTIÉRREZ
ID: 10000865**

ABRIL 2019

Desarrolla una pasión por aprender.

Si lo haces, nunca dejarás de crecer.

-Anthony J. D'Angelo.

DEDICATORIA

Con mucho cariño y amor a mis padres **Carmen y Leobardo**, por ser mi principal fuente de inspiración para superarme cada día y por siempre caminar de mi mano en este largo viaje.

A mi hermano **Leo**, por darme ánimos desde lejos cada vez que me sentía sin ganas de seguir.

A mis grandes **compañeras** y **amigas** por escucharme y aconsejarme acertadamente en los momentos que más las necesitaba.

A **Ofe** por cuidarme, y por su gran compañía en este camino.

Y sobre todo a **Dios** por permitir que todas las veredas se abrieran para poder culminar con amor esta etapa profesional.

¡Gracias a todos!

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Ismael Juárez Díaz** del laboratorio de fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitirme ser parte de este interesante proyecto de investigación, por su paciencia al momento de explicarme las mil y una dudas que se me atravesaron en este camino y, sobre todo por su contribución de principio a fin para la elaboración del mismo.

A la **Dra. Diana del Carmen Pazos Guarneros** del laboratorio de fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por su dedicación, comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.

De igual manera a la **Dra. Julia Flores Tochihuitl** del laboratorio multidisciplinario de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por su apoyo y aporte en este proyecto.

Al **Dr. Alberto Vinicio Jerezano Domínguez** y al **Dr. Rosendo Carrasco Gutiérrez** miembro del grupo de docentes de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por su orientación y trabajo en el área de la metodología y estadística.

A las estudiantes de licenciatura en estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla **Fernanda e Ivette** por su tiempo y empeño.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	3
2.1.1 AMÍGDALA CEREBRAL.....	3
2.1.2 DOLOR.....	11
2.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	21
4. JUSTIFICACIÓN.....	21
5. HIPÓTESIS.....	22
6. OBJETIVOS.....	22
6.1 GENERAL.....	22
6.2 ESPECÍFICOS.....	22
7. MATERIALES Y MÉTODO.....	22
7.1 DISEÑO DE ESTUDIO.....	22
7.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	23
7.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	24
7.4 VARIABLES.....	25
7.5 ESTANDARIZACIÓN Y CAPACITACIÓN DEL INVESTIGADOR.....	26
7.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTO.....	26
7.7 LOGÍSTICA.....	33
7.7.1 RECURSOS HUMANOS.....	33
7.7.2 RECURSOS MATERIALES.....	34
7.7.3 RECURSOS FINANCIEROS.....	34
8. BIOÉTICA.....	35
9. CRONOGRAMA.....	35
10. RESULTADOS.....	36
11. DISCUSIÓN.....	44
12. CONCLUSIÓN.....	50
13. DIAGRAMA DE FLUJO.....	51
14. BIBLIOGRAFÍA.....	52
15. ANEXOS.....	54

RESUMEN

A pesar que la amígdala cerebral ha sido estudiada ampliamente, aún se desconoce si existe o no una relación íntima con el complejo dentino-pulpar; parte nerviosa y vital de un órgano dental. Motivo por el cual se decidió realizar el presente estudio, que tiene como objetivo principal investigar los cambios en la morfología neuronal del complejo basolateral de la amígdala, en un roedor.

En esta investigación se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, las cuales se seleccionaron aleatoriamente en dos grupos: un grupo experimental y un grupo control. En el grupo experimental se provocó un estímulo nocivo, al realizar comunicación con el tejido pulpar del primer molar superior derecho con la ayuda de una pieza de alta velocidad, al mismo tiempo y con el fin de potencializar el proceso inflamatorio se inoculó LPS (*Escherichia coli*, Sigma, St. Louis, Missouri, EU) dentro de la cavidad; el grupo control no fue sometido a ningún procedimiento, ambos grupos fueron pesados y cuidados diariamente por 28 días, periodo de tiempo adecuado, para que el estímulo provocado evolucione a un dolor crónico.

Para la obtención de datos se necesitó efectuar la reconstrucción bidimensional de las neuronas con la ayuda de un microscopio óptico (Microscopio DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y una cámara lúcida después de haber obtenido el tejido cerebral y haber examinado la morfología neuronal con el análisis de Sholl a través de la tinción de Golgi-Cox.

Los resultados de este estudio reportaron mayor arborización ($P=0.0001$) y longitud ($P=0.027$) dendrítica en las neuronas ubicadas en la amígdala basolateral del grupo experimental. Con estas evidencias, se puede inferir que existe una relación significativa, entre ambos complejos cuando existe un estímulo nociceptivo con carácter emocional y sobre todo contribuyen al mejor entendimiento del manejo del dolor en el área odontológica.

“CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LAS NEURONAS COLINÉRGICAS DE LA AMIGDALA BASOLATERAL DURANTE DOLOR CRÓNICO DENTAL. UN ESTUDIO EN RATA SPRAGUE DAWLEY”

1. INTRODUCCIÓN

Es un tanto desafiante hablar acerca de dolor, debido a sus diversos componentes, en especial los afectivos o emocionales, así mismo la subjetividad y las experiencias de cada individuo, lo convierten en una experiencia compleja y muchas veces desagradable. Esto se complica aún más cuando la duración del dolor se alarga por procesos o entidades patológicas de evolución crónica, ya que específicamente este tipo de pacientes, independientemente de la sensación nociceptiva, experimentan emociones negativas como el miedo, ansiedad, comportamiento defensivo y depresión a causa de un alto índice de reactividad emocional.

La amígdala es una estructura cerebral nociceptiva que forma parte del sistema límbico, es conocida por desempeñar un papel clave en el procesamiento emocional, en los trastornos neuropsiquiátricos y en la dimensión emocional-afectiva del dolor; consta de aproximadamente 12 regiones diferentes, cada una de las cuales se puede dividir en varias subregiones. Las áreas de mayor relevancia para el condicionamiento del miedo son el núcleo lateral (LA), basal (B), accesorio basal (AB) y central (CE) y las conexiones entre estos. El término complejo basolateral se usa a veces para referirse a LA y B (y a veces AB) juntos, es esta área la de principal interés en este proyecto puesto que es el sitio de entrada para la información afectiva que enviada por el tálamo mediante una conexión directa que existe entre ellos, por dicho motivo se desea investigar la posible respuesta de las neuronas de esta área cerebral ante un estímulo como lo es el dolor crónico provocado por un proceso inflamatorio en la pulpa dental de un órgano dentario, observando los cambios morfológicos a nivel de dendritas y espinas dendríticas; parte receptiva y esencial para la transmisión de los impulsos nerviosos.

Actualmente el campo de la neurociencia ha puesto su interés al área emocional, y en consecuencia se han realizado estudios experimentales sobre varias estructuras del sistema límbico, incluyendo a la amígdala cerebral. Sin embargo, cabe mencionar que sigue sin existir un estudio que relacione el complejo basolateral de la amígdala y el complejo dentino-pulpar, de modo que ayudaría a generar conocimientos básicos de manera que ayude al estomatólogo a comprender de mejor manera los mecanismos celulares del dolor y en consecuencia permitirles proponer opciones para el manejo del miedo en especial cuando este se enfrente a un paciente pediátrico con una terrible conducta.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES GENERALES

2.1.1 AMÍGDALA CEREBRAL

Definición

La amígdala es una estructura cerebral nociceptiva pequeña y compleja localizada bilateralmente en el lóbulo temporal anteromedial ventral al núcleo lentiforme del que está separado por el complejo neuronal magnocelular basal, juega un papel clave en la evaluación emocional de los estímulos sensoriales, el aprendizaje emocional, la memoria, los estados y trastornos afectivos ¹⁻²

Desarrollo de la amígdala cerebral

Existen pocos estudios en la literatura en relación al desarrollo estructural de la amígdala humana; Sin embargo, existe evidencia, por ejemplo, de que el complejo amígdaloide comienza a desarrollarse temprano en la gestación, derivado de la eminencia ganglionar, un engrosamiento de la zona proliferativa telencefálica y diencefálica, que sobresale en la cavidad ventricular. ³

En base a investigaciones sobre la ontogenia de la amígdala en ratas, se ha especulado que existen distintas etapas de desarrollo postnatal las cuales reflejan la maduración de los distintos procesos celulares y circuitos de la amígdala cerebral. La primera etapa se distingue por un crecimiento dramático en volumen, de los núcleos baso-laterales, basal y accesorio en el periodo de 1 a 3 semanas de edad. Estos núcleos están altamente interconectados con la neocorteza, y su expansión volumétrica es efectivamente paralela a la expansión volumétrica del resto del cerebro. En contraste con estos núcleos el núcleo central exhibe un aumento mucho menor en volumen y el núcleo medial no muestra crecimiento volumétrico. Estos dos núcleos están conectados principalmente con el tálamo, el hipotálamo y el tronco encefálico. A diferencia de las conexiones corticales, las interconexiones entre la amígdala y las regiones talámicas, sustancia innominada o núcleo accumbens, se establecen al nacimiento o muy poco después.⁵

En la segunda etapa (mielinización), se observa un crecimiento volumétrico constante a partir de las 3 semanas y hasta los 7 meses de edad que involucra todos los núcleos, coincidiendo con un aumento en el número de oligodendrocitos. Lo cual sugiere que la mielinización de los circuitos de la amígdala puede ser la base, en parte, del crecimiento tardío y continuo de los núcleos de la amígdala después de las 3 semanas de edad y que por igual coincide con cambios significativos en los comportamientos defensivos, ya que las ratas reaccionan con mayor rapidez ante una amenaza.⁵

El desarrollo postnatal de la amígdala cerebral en ratas tiene mucha similitud con el desarrollo en monos, con excepción del núcleo central, el crecimiento exponencial se da antes en monos, esto debido a que la neurogénesis de la amígdala cerebral se da en la primera mitad de la gestación de los monos a comparación de las ratas que se da en las últimas etapas (Tabla 1).⁴⁻⁶

Monos Rheus	Ratas Sprague Dawley
--------------------	-----------------------------

La neurogénesis en la amígdala ocurre durante la primera mitad de la gestación cita. ⁴	La neurogénesis ocurre durante las últimas etapas de la gestación. ⁵
Los núcleos basales lateral, basal y accesorio exhiben un gran aumento en el volumen desde el nacimiento hasta los 3 meses. ⁴	Los núcleos basales lateral, basal y accesorio exhiben un gran aumento en el volumen de 1 semana a 3 semanas de edad. ⁵
El núcleo medial es volumétricamente maduro muy temprano y exhibe solo un ligero aumento lineal desde el nacimiento hasta la adultez temprana. ⁴	El núcleo medial es volumétricamente maduro muy temprano y exhibe solo un ligero aumento lineal desde el nacimiento hasta la adultez temprana. ⁵
El crecimiento exponencial del núcleo central de la rata puede ocurrir antes del nacimiento. ⁴	El crecimiento exponencial del núcleo central es entre 1 y 2 semanas de edad. ⁵
Núcleo paralaminar presente. ⁴	Ausencia de núcleo paralaminar. ⁴
El número de oligodendrocitos aumentó continuamente en todos los núcleos de la amígdala desde la edad postnatal temprana hasta la edad adulta. ⁴	El número de oligodendrocitos aumentó continuamente en todos los núcleos de la amígdala desde la edad postnatal temprana hasta la edad adulta. ⁵
El número de astrocitos en toda la amígdala no disminuyó postnatalmente. ⁴	El número de astrocitos en toda la amígdala disminuyó postnatalmente. ⁵

Tabla 1-. Comparación del desarrollo posnatal de la amígdala cerebral entre monos y ratas. ⁽⁴⁻⁵⁾

Anatomía de la amígdala

El complejo amígdaloide ha sido ampliamente estudiado en primates, y ratas con avances recientes en técnicas de imagen que facilitan el examen más detallado de la amígdala in vivo en humanos. ⁷ La amígdala consiste en un conjunto de núcleos, y la segmentación de sus componentes ha sido ampliamente estudiada. ⁸ Los estudios citoarquitectónicos apoyan la segmentación de los núcleos de amígdala en tres grupos principales: (1) superficial, (2) laterobasal y (3) centromediales. ⁹ Muy recientemente, esta parcelación fue corroborada en seres humanos utilizando tanto imágenes de tensor de difusión como imágenes estructurales de alta resolución. ¹⁰ La subdivisión superficial está adyacente al grupo basolateral e incluye núcleos corticales implicados con el olfato. El complejo basolateral se compone de los núcleos lateral, basolateral, basomedial y basoventral. Estos núcleos están muy involucrados en procesos de aprendizaje

asociativo, como el condicionamiento del miedo a través de aferentes de regiones corticales y subcorticales que incluyen el hipocampo, el tálamo y la corteza prefrontal.¹¹ El núcleo lateral sirve como la principal región de entrada y el sitio inicial de la convergencia sensorial en la amígdala. El aprendizaje asociativo y la plasticidad en los circuitos lateral-basolateral desempeñan un papel clave en los estados afectivos y trastornos como el miedo y la ansiedad. Esta información altamente procesada con contenido "afectivo" se transmite desde los circuitos lateral-basolateral al núcleo central, el núcleo de salida para las principales funciones de la amígdala. Los núcleos centromediales desempeñan un papel importante en la generación de respuestas conductuales a través de proyecciones al tronco encefálico, así como regiones corticales y estriadas, como el caudado.¹² Aunque la "amígdala extendida" se refiere a veces como una región dentro del complejo amígdala, también se describe como el núcleo del lecho de la *stria terminalis* que recibe proyecciones aferentes de la región centromedial.⁸

Clasificación de las neuronas en la amígdala basolateral humana.

Las neuronas de la amígdala basolateral humana se clasifican en tres tipos principales: tipo I - células piramidales, tipo II - células piramidales modificadas y tipo III - células no piramidales.¹³

Las células piramidales son el tipo celular predominante en los núcleos de la amígdala basolateral. El contorno de su soma es cónico con una apical gruesa y muchas dendritas basales más delgadas. Todas las neuronas piramidales se caracterizan por la presencia de numerosas espinas dendríticas. La mayoría de las espinas dendríticas tienen tallos delgados y muy cortos con pequeñas terminales. Las espinas dendríticas son mayores en densidad a medida que aumenta la distancia del soma. El axón de las células piramidales surge de la base del cuerpo celular, o de una de las dendritas primarias cerca del cuerpo celular. Sobre la base de su forma, tamaño y patrones dendríticos, se diferenciaron dos subtipos de células piramidales: finas y robustas. Las células piramidales finas son

dos veces más altas que anchas. Su dendrita apical es larga y robusta. El tamaño de su soma y longitud dendrítica total son más grandes y largos que en las células piramidales robustas. Las células piramidales robustas son tan altas como anchas y sin una dendrita apical evidente (Fig. 1).¹³

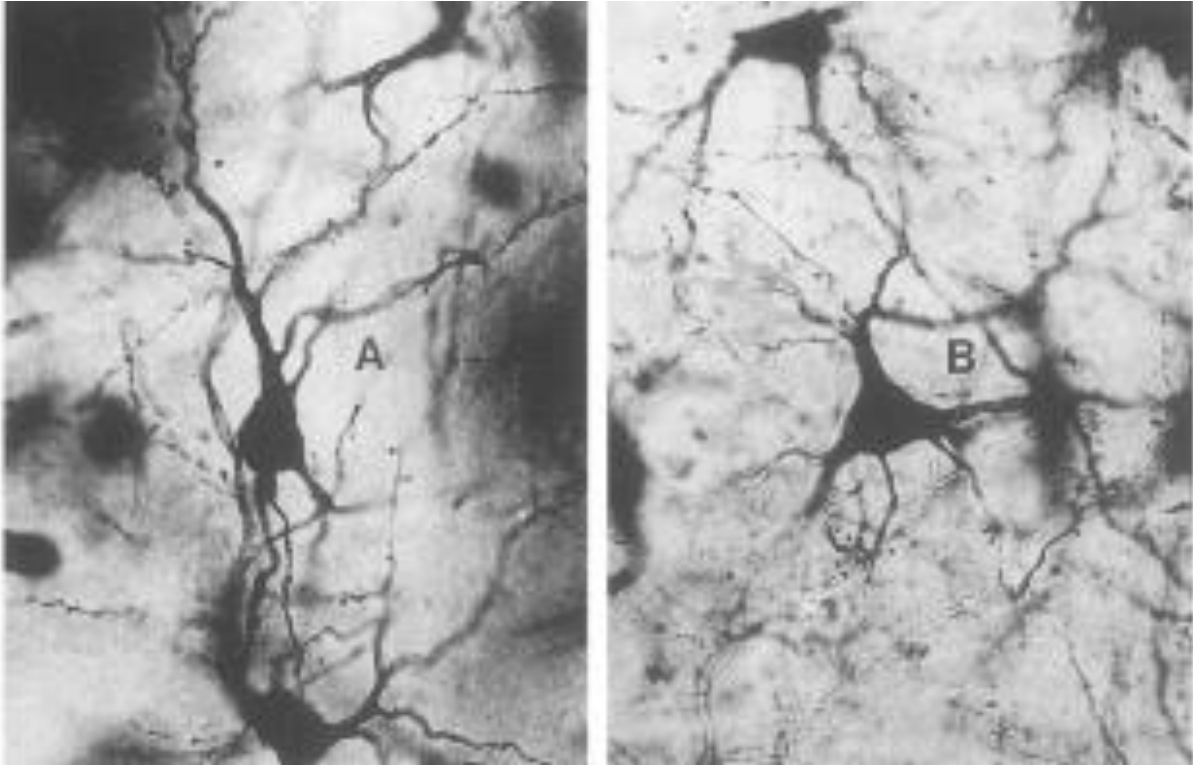


Figura 1.- Microfotografías de células piramidales (Tipo I) de la amígdala basolateral humana impregnadas con Golgi. A: Neurona “fina” piramidal en el núcleo amígdaloide lateral. B: Neurona “robusta” piramidal en núcleo amígdaloide basal.¹³

Las células piramidales modificadas tienen un soma más redondo, tienen menos espinas dendríticas y la arborización de los segmentos iniciales de las células piramidales modificadas es mayor en comparación con las verdaderas células piramidales. A partir de sus dendritas apicales, las células piramidales modificadas se subdividen en dos subtipos: único apical y doble apical. Las células apicales únicas tienen una sola dendrita apical dominante que se estrechaba gradualmente desde el cuerpo celular. Las apicales dobles tienen dos dendritas apicales gruesas irradiando en la misma dirección desde el cuerpo de la célula (Fig. 2).¹³

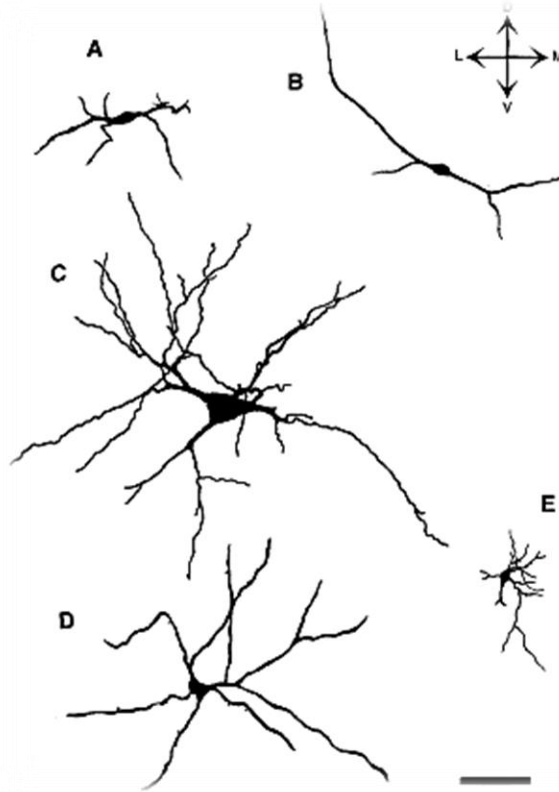


Figura 2.- Dibujos de células piramidales (Tipo I) y piramidales modificadas (Tipo II) de la amígdala basolateral humana impregnadas con tinción de Golgi. A: Neurona fina piramidal en el núcleo lateral. B: Neurona robusta piramidal en el núcleo basal accesorio. C: Neurona piramidal modificada con un único apical en el núcleo basal. D: Neurona piramidal modificada con doble apical en el núcleo paralamina amígdaloide. Nótese la presencia de numerosas espinas dendríticas en comparación con las células piramidales modificadas. Cruz indica orientación. Escala = 50 μ m.¹³

Las células no piramidales representan un tipo morfológicamente heterogéneo, situado entre las neuronas piramidales en todos los núcleos de la amígdala basolateral. Sus cuerpos celulares varían en forma y tamaño. Las dendritas irradian en todas direcciones desde sus cuerpos celulares y se ramifican modestamente en la proximidad de su soma. Presentan muchas menos espinas dendríticas que las piramidales y las células piramidales modificadas.¹³

Conectividad de la amígdala

Las conexiones aferentes y eferentes de la amígdala son extensas. Cada núcleo de la amígdala recibe información de múltiples regiones cerebrales ¹⁴ y las proyecciones eferentes de la amígdala son generalizadas, incluyendo las regiones corticales y subcorticales.¹⁵ El núcleo lateral del complejo laterobasal es visto a menudo como el guardián de la amígdala, recibiendo entradas excitatorias de sistemas visual, auditivo, somatosensorial (incluyendo dolor), olfativo y de gusto en el tálamo y corteza sensorial. Aunque el núcleo lateral recibe la mayoría de las conexiones aferentes en la amígdala, otras áreas del complejo laterobasal realizan sinapsis con proyecciones primarias de las cortezas frontales.¹⁶ Los núcleos centromediales desempeñan un papel prominente en las conexiones eferentes, pero también identifican a esta región como un receptor importante de señales puramente nociceptivas.¹⁷

Se ha observado en estudios involucrados con el condicionamiento del miedo, que toda la información procedente de las vías tálamo-amígdala y de las vías cortico-amígdala convergen hacia el núcleo lateral, para luego ser distribuidos a través de las vías internas de la amígdala, convergiendo en el núcleo central.¹⁸⁻¹⁹

La mayoría de la aferencia se origina en los núcleos lateral, laterobasal, accesorio basal y cortical posterior, estos inervan al menos dos componentes del sistema hipocampo / parahipocampal. Por lo tanto, las regiones del hipocampo y del parahipocampo reciben insumos monosinápticos de esos núcleos amígdaloides que están interconectados con las áreas corticales y talámicas relacionadas con los sentidos, la corteza prefrontal, el sistema olfativo y el sistema motor estriatal. De lo contrario, los núcleos amígdaloides que están más fuertemente interconectados con los centros autónomo y endocrino en el tronco encefálico y el hipotálamo (núcleos central y medial, respectivamente) no proporcionan ninguna actividad monosináptica a las áreas hipocampal y parahipocampal (excepto la proyección del núcleo medial a la corteza entorrinal).²⁰

Un núcleo amígdaloide o división nuclear podría inervar diferentes áreas hipocampales y parahipocampales en paralelo, es decir, una división nuclear podría influir en el procesamiento de la información a diferentes niveles de los circuitos del hipocampo.²⁰

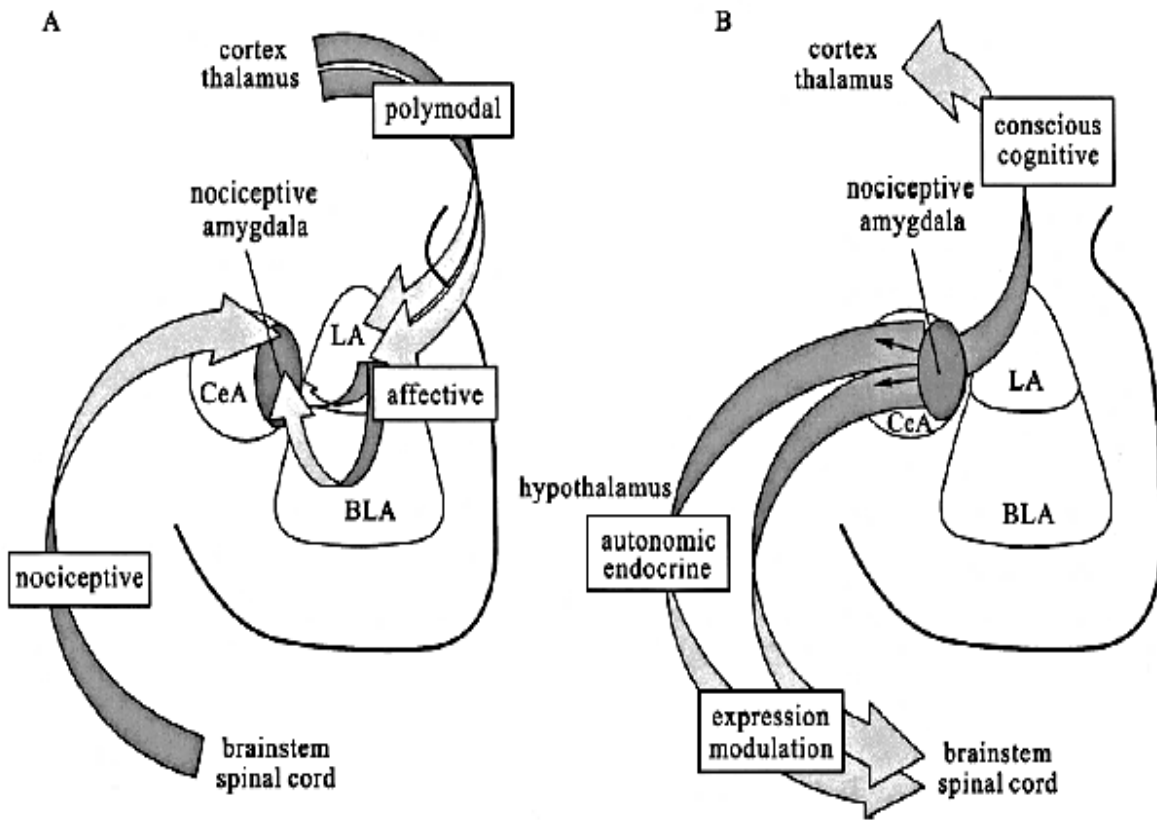


Figura 3.- Procesamiento de información sensorial y nociceptiva en la amígdala.²⁰

(A). Conexiones aferentes de la amígdala nociceptiva.

El núcleo lateral de la amígdala (LA) recibe e integra información polimodal de las áreas talámicas y corticales. La LA representa el sitio inicial de convergencia sensorial y plasticidad asociativa en la amígdala. Esta información altamente procesada con contenido afectivo se distribuye entonces a otros núcleos amígdaloides, incluyendo el núcleo central (CeA), ya sea directamente o a través

del núcleo basolateral (BLA). La división capsular lateral del CeA (CeLC) representa la "amígdala nociceptiva".²⁰

(B). Conexiones eferentes de la amígdala nociceptiva.

La CeA es el principal núcleo de salida de la amígdala y forma extensas conexiones con las áreas del cerebro anterior y del tronco encefálico. Las proyecciones del tronco encefálico son directas o indirectas a través del hipotálamo lateral; Incluyen el área parabraquial y la materia gris periaqueductal (Fig.3).²⁰

2.1.2 DOLOR

Definición

El dolor es una experiencia consciente y subjetiva que se evoca en respuesta a un estímulo que causa, o tiene el potencial de causar daño. Diferentes aspectos constituyen la experiencia global del dolor; esto incluye el aspecto sensorial y la respuesta emocional.²¹ La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor definió el dolor como "una experiencia sensitiva y emocional desagradable, asociada a una lesión tisular real o potencial".²²

Clasificación de dolor según el tiempo de duración

Dolor agudo

Inicialmente el dolor agudo se definió simplemente en términos de duración, pero en la actualidad se define como "una experiencia desagradable y compleja con factores cognitivos y sensoriales que suceden como respuesta a un trauma tisular". A diferencia con el dolor crónico, en el dolor agudo existe una correlación importante entre la intensidad del dolor y la patología desencadenante y su evolución natural es disminuir progresivamente hasta desaparecer una vez se

produce la curación de la lesión subyacente. Cuando hablamos del dolor agudo, nos referimos generalmente al dolor nociceptivo, aunque también puede ser neuropático. Las causas comunes incluyen trauma, cirugía (dolor postoperatorio), procedimientos médicos, y enfermedades agudas.²³

El dolor agudo tiene una importante función biológica de protección para evitar la extensión de la lesión. Se suele acompañar de una gran cantidad de reflejos protectores como, por ejemplo, el reflejo de retirada de una extremidad dañada, el espasmo muscular y las respuestas autonómicas. Sin embargo, las respuestas hormonales al estrés, motivadas por una lesión aguda también pueden tener efectos adversos tanto fisiológicos como emocionales. Hay que remarcar que incluso breves periodos de estimulación dolorosa pueden producir cambios neuronales, que contribuirán en el desarrollo de estados de dolor crónico, por lo tanto, cada vez más se está prestando más atención en la prevención y el tratamiento agresivo de dolor agudo para reducir las complicaciones, incluyendo la progresión del dolor agudo a dolor crónico, un ejemplo muy demostrativo es el manejo de dolor postoperatorio.²³

Dolor crónico

El dolor crónico se define tradicionalmente como una experiencia desagradable de más de 6 meses de evolución que a diferencia del dolor agudo ya no cumple con una función biológica de protección. Esta definición basada en la temporalidad deja de lado componentes clave que acompañan al paciente con dolor crónico, como son la discapacidad y la consiguiente reducción de la actividad física, generando un aumento del ausentismo laboral, reducción significativa de la calidad de vida y un gran impacto socioeconómico.²²⁻²⁴⁻²⁵

Según la Clasificación Internacional de Funcionalidad, la Discapacidad y la Salud, la discapacidad es un fenómeno multifactorial en el que se alteran funciones físicas, psíquicas o emocionales y que está presente en el dolor crónico.²⁴

Estructuras involucradas en la vía del dolor

La detección de estímulos nocivos mecánicos, químicos y térmicos se produce a través de la estimulación de los receptores del dolor (nociceptores), situados en las terminales de las fibras A δ y C. Estas fibras aferentes primarias llevan información nociceptiva de la periferia al cuerno dorsal de la médula espinal, que a su vez proyecta a una amplia gama de estructuras supraespinales, lo que explica las múltiples dimensiones de la experiencia del dolor.²⁶

Las neuronas de proyección del cuerno dorsal se dirigen a una serie de regiones que están involucradas en la respuesta autonómica al dolor, como sustancia gris periacueductual, médula dorsal-ventral, hipotálamo y el núcleo del tracto solitario. La mayoría de las estructuras dirigidas por el cuerno dorsal también están involucradas en la modulación del dolor, ya sea a través de proyecciones directas o indirectas de nuevo al cuerno dorsal. El cuerno dorsal también envía fuertes proyecciones al tálamo, que puede transmitir información nociceptiva a la corteza responsable de la discriminación sensorial y respuestas motivacionales y la amígdala, que está involucrada en la expresión de las emociones. Finalmente, el núcleo parabraquial, en particular, recibe algunas de las proyecciones más grandes del cuerno dorsal y, a su vez, proyecta a la sustancia gris periacueductal, hipotálamo, amígdala y de nuevo al cuerno dorsal, desempeñando potencialmente un papel importante tanto en las respuestas autonómicas como emocionales y se ha encontrado que están involucrados en la inhibición descendente de la nocicepción a través de las conexiones recíprocas con el cuerno dorsal.²⁷

Lipopolisacárido.

El lipopolisacárido (LPS) o endotoxina es un componente importante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, desempeña un papel esencial en la protección de las bacterias de ambientes hostiles, en la resistencia a los medicamentos y en la patogénesis. ⁽²⁸⁻²⁹⁾

El LPS está compuesto por una región lípida y una glicosídica con funciones separadas y/o sinérgicas lo que hace de esta molécula uno de los factores de virulencia más complejos de comprender. La molécula se compone de dos regiones principalmente, un glucolípidio llamado lípido A y un heteropolisacárido conocido como el núcleo o core unidos entre sí por un azúcar. El lípido A se le reconoce como la fracción biológicamente activa de la molécula, se trata de un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos que por lo general son ácido caproíco, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico los cuales están insertos en la membrana externa de la bacteria.³⁰

El core se subdivide en core externo (formado por hexosas) y en core interno (formado por heptosas). En algunos microorganismos el LPS presenta una región sacárida adicional conocida como antígeno O el cual es un polímero de unidades repetidas que consta de 1 a 8 residuos glicosídicos altamente variable entre especies bacterianas (Fig. 4).³⁰

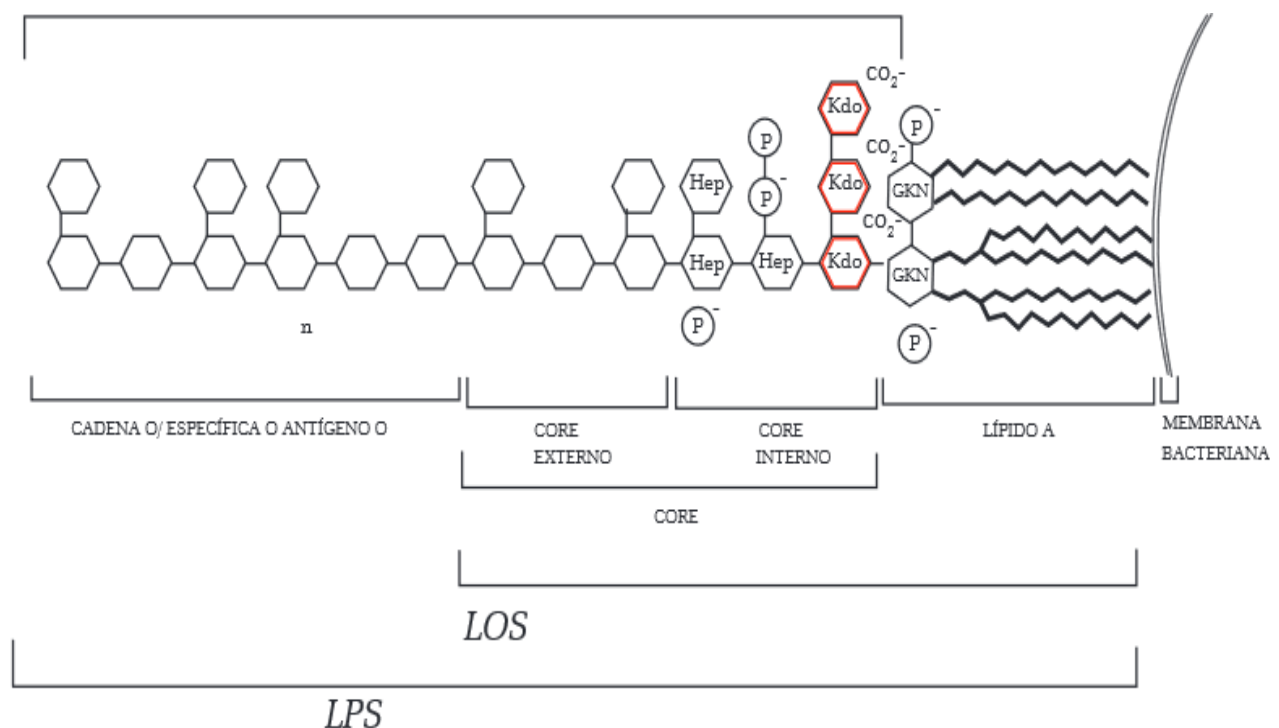


Figura 4.- Estructura general del LPS.³⁰

Cuando el LPS es liberado de la membrana como consecuencia de la multiplicación o lisis, entra en contacto con varias proteínas del huésped, dentro de las que se destacan la proteína de unión al LPS (LBP) y los receptores CD14, TLR4 y MD-2.³¹⁻³²⁻³³ La proteína LBP es la encargada de capturar al LPS y formar el complejo LPS-LBP facilitando, de esta manera, la asociación del LPS con el receptor CD14, el CD14 es una glicoproteína que se encuentra en forma soluble o anclada a la superficie celular de monocitos, macrófagos, polimorfonucleares y células endoteliales que no posee dominio intracitoplasmático y que tiene como función principal transferir el LPS al complejo encargado de su reconocimiento (TLR4/MD-2).³⁴⁻³⁵ La MD-2 es una proteína soluble que se asocia con el receptor TLR4 (receptor toll o receptor de proteína transmembrana) para llevar a cabo la transducción del LPS. Nuevas investigaciones sugieren que esta proteína es capaz de unirse al LPS en ausencia del receptor TLR4 originando en menor proporción los efectos del LPS sobre las células del hospedero, por lo que parece que la presencia del TLR4 es esencial tanto para el reconocimiento como para la magnitud de la respuesta generada por el LPS.³⁶

Una vez formado el complejo LPS-TLR4/MD-2, el TLR4 sufre una oligomerización de la cual se inicia una reacción que comienza con la interacción con proteínas celulares que poseen dominios TIR (Receptores Toll de Interleuquina 1), encargadas de mediar la relación entre el TLR4 y las proteínas celulares de transducción del LPS.³⁶

La estimulación del receptor TLR4, la producción de interferones tipo 1 y de citoquinas proinflamatorias inducen varios tipos de respuestas en el organismo tales como, aumento en la permeabilidad vascular, aumento en la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales (Cohen, 2002), estimulación de la producción de nuevas citocinas y quimiocinas, extravasación de neutrófilos para que migren a través del endotelio a los epitelios, activación del factor XII de la coagulación, la fibrinólisis y la vía clásica del complemento. Por

esta razón deben existir vías de inhibición de la señal de transducción del LPS que tiene como fin proteger al hospedero del daño inducido por el LPS.³⁶

El bloqueo de la señal emitida por el TLR4 puede ocurrir a través de proteínas de superficie celular o por proteínas a nivel citoplasmático; a nivel citoplasmático se encuentran las proteínas TIRAF1 – TIRAF4 e IRAK-M (Kinasa 4 asociada al receptor de IL-1) que inhiben al NF- κ B y a la proteína MyD88 respectivamente; las proteínas RP105 (radioprotector 105), ST2L (análogo del receptor de IL-1) y la SIGIRR (molécula relacionada con la inmunoglobulina 1) se expresan en la superficie de las células e inhiben directamente al receptor TLR4, a la proteína MyD88 y al TIRAP respectivamente. Cuando los mecanismos inhibitorios se agotan y prevalecen las respuestas inducidas por el LPS, los eventos mencionados pueden terminar en shock endotóxico, falla multiorgánica y muerte del huésped (Fig. 5).³⁶

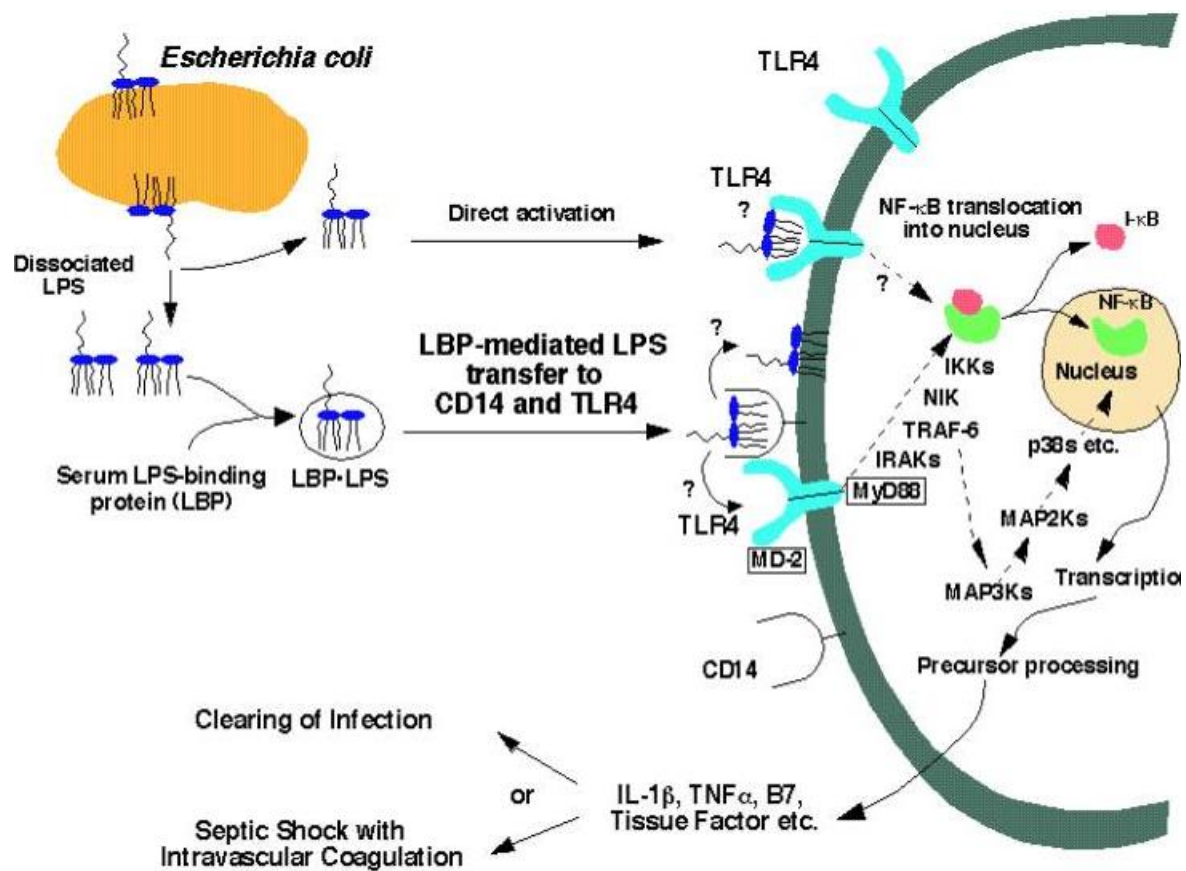


Figura 5.- Reconocimiento y vías de transducción del LPS de la bacteria *Escherichia Coli*.³⁶

La bacteria que ha sido más estudiada en relación con el LPS es sin duda la *Escherichia Coli*, y ha sido encontrada en los conductos pulpares necróticos de los órganos dentales humanos junto con otras bacterias, en su mayoría Gram-negativas. Sin embargo, cuando existe un proceso inicial de caries las bacterias que más predominan son Gram-positivas y en particular de la familia *Streptococcaceae* (Tabla 2-3).³⁷

BACTERIAS	TINCIÓN GRAM	AUTORES Y AÑO.
<i>Streptococcus salivarius</i>	POSITIVO	Miller W-1894, Orland FJ-1955, Gibbons-1968, Krasse B-1970.

<i>Streptococcus sanguis</i>	POSITIVO	Miller W-1894, Schklair IL-1967, Guggenheim B-1968.
<i>Streptococcus mitis</i>	POSITIVO	Miller W-1894, Gibbons Rj-1968
<i>Streptococcus mutans</i>	POSITIVO	Miller W-1894, Edwardsson S-1968, Berkowitz RJ- 1975.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	POSITIVO	Miller W-1894, Krasse 1954.

Tabla 2.- Bacterias más comúnmente encontradas en lesión de caries dental.³⁷

BACTERIAS	TINCIÓN GRAM	AUTORES Y AÑO.
<i>Fusubacterium nuclateum</i>	NEGATIVO	Sundqvist- 1989, Debelian-1995, Waltimo-1997, Kuriyama-Karasawa en el 2000, Fouad-2002.
<i>Fusubacterium necrophorum</i>	NEGATIVO	Gomes- 2004.
<i>Porphyromonas endodontalis y gingivalis</i>	NEGATIVO	Siqueira- 1998 y 2003, Bogen-1999.
<i>Prevotella intermedia</i>	NEGATIVO	Sundqvist-1992, Siqueira- 1998, Kuriyama-Karasawa en el 2000, Peters-2002.
<i>Peptostreptococcus micros</i>	POSITIVO	Sundqvist-1992.
<i>Enterococcus faecalis</i>	POSITIVO	Gomes-1996, Love-2001, Sassone-2007.
<i>Escherichia coli</i>	NEGATIVO	Molander-1998.

Tabla 3.- Bacterias más comúnmente encontradas en conductos necróticos y lesiones periodontales.³⁷

2.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

En los últimos 20 años ha incrementado notablemente el interés sobre el estudio del papel que juega la amígdala cerebral en los procesos nociceptivos, y los diferentes aspectos que engloban la experiencia del dolor incluyendo el aspecto sensorial y la respuesta emocional dada tanto por estímulos positivos como por ejemplo la alimentación y el sexo, por estímulos desagradables: ansiedad, miedo, agresión, comportamiento defensivo y depresión. Por esta razón se ha realizado estudios experimentales para demostrar y documentar las vías, la modulación, su respuesta ante diferentes estímulos, etc.^{1, 11, 12, 18, 19}

Quirk y col. en 1997, realizaron un estudio experimental con ratas macho de la cepa Sprague- Dawley de 300-350 g, a las cuales se les anestesió por vía intraperitoneal con nembutal para poder implantar estratégicamente un disco móvil con microcables en áreas de la corteza auditiva las cuales se proyectan al núcleo lateral de la amígdala. Las ratas se colocaron en una caja de prueba con un suelo de rejilla electrificable y la parte superior abierta, y esta caja se encerró en una cámara de atenuación de sonido. Después de los 5 días de dicha implantación pasaron por un condicionamiento de miedo, por medio de la emisión de sonidos. Sus resultados demostraron que el rápido condicionamiento de las respuestas de miedo a estímulos potencialmente peligrosos depende de la plasticidad en la amígdala, mientras que las áreas corticales pueden estar particularmente involucradas en el procesamiento cognitivo de las experiencias de miedo.¹⁹

Han y Neugebauer en 2004, realizaron un estudio que tenía como objetivo analizar la plasticidad sináptica en el núcleo central (CeA) de la amígdala cerebral, en un modelo de dolor visceral por medio de inyecciones de zimosan en el colon. Se realizaron registros de neuronas de la parte laterocapsular de la CeA por medio de cortes cerebrales de ratas macho Sprague-Dawley las cuales se seleccionaron aleatoriamente en dos grupos: grupo control y grupo con colitis inducida. Las respuestas monosinápticas fueron provocadas por estimulación eléctrica de aferentes del núcleo parabraquial pontino (PB) y de la amígdala basolateral (BLA). Se observó una transmisión sináptica mejorada en la sinapsis nociceptiva PB-CeA, pero no en la sinapsis polimodal BLA-CeA, en ratas con colitis. La frecuencia de los potenciales de acción provocados por la inyección de corriente directa se incrementó en las neuronas CeA de ratas con colitis, lo que sugiere una mayor excitabilidad neuronal. Proporcionando resultados novedosos que evidencian el papel importante que desempeña el núcleo central en el dolor visceral y que se modula diferencialmente entre dolor somático y visceral.¹

De igual manera Tran y col. en el 2012 realizaron un estudio enfocado en el núcleo central (CeA) de la amígdala, su propósito fue investigar las propiedades anatómicas importantes de la activación de la amígdala, sus efectos sobre la ansiedad y la percepción del dolor. Para este estudio también se utilizaron ratas a las cuales se les colocó implantes mediante cirugía estereotáxica de microgránulos de colesterol (CORT) en los márgenes dorsales izquierdo, derecho o ambos del CeA. Después de la implantación (5-7 días), se evaluó el comportamiento similar a la ansiedad en un laberinto elevado en cruz (EPM), se midió la alodinia somática usando filamentos de Von Frey y se cuantificó la sensibilidad visceral como respuesta visceromotora (VMR) a la distensión colorrectal (CRD) a 0-60 mmHg. Los estudios clínicos y preclínicos sugieren un funcionamiento lateralizado de la amígdala. Estos resultados proporcionan evidencia de que no hay lateralización hemisférica del CeA involucrado en el comportamiento similar a la ansiedad mediado por corticoides y el aumento de dolor. También se ha informado que el procesamiento de emociones como la depresión se lateraliza al hemisferio derecho en estudios de resonancia magnética funcional.³⁸

Por otro lado, Chen y col. en 2014 evaluaron las alteraciones en las propiedades neurofisiológicas del ganglio trigeminal (GT) e investigaron la participación de los receptores P2X en la sensibilización causada por la inflamación de la pulpa dental en ratas Wistar. Sus resultados reportan que la aplicación de LPS a la pulpa dental induce una mayor expresión de c-fos, un marcador de actividad neuronal, de igual manera en los receptores ionotrópicos purinérgicos (P2X) que contribuyen de manera crítica al desarrollo y mantenimiento de la hipersensibilidad neuronal; específicamente los tipos P2X2, P2X3 Y P2X5. Es decir que, a mayor estímulo, mayor liberación de neurotransmisor y por lo tanto una mayor actividad neuronal en el TG. De igual manera concluyeron que el LPS produce un comportamiento nocifensivo y alodinia mecánica.³⁹

Similar al estudio anteriormente mencionado Tarsa y col. en el año 2010, realizaron una investigación para determinar los efectos de la inflamación periférica a nivel del ganglio trigeminal (GT), utilizando un modelo de inflamación de la pulpa dental, y evaluando los niveles de neurotrofina derivado del cerebro neurotrófico (BDNF), un modulador establecido de la señalización nociceptiva en la columna vertebral, encontrado en estudios anteriores en neuronas del ganglio del trigémino de ratas neonatales y adultas. Las cavidades se prepararon en el primer y segundo molares superiores del lado derecho de los sujetos de experimentación (ratas Sprague-Dawley y ratones C57BL/6J) de 4 semanas de edad, y se dejaron abiertas a la microflora oral. La expresión de BDNF en el GT derecho se comparó con el GT contralateral del mismo animal, y con el GT derecho de los controles operados de forma ambulatoria, 7 y 28 días después de la preparación de la cavidad. Sus resultados obtenidos por la prueba de ELISA indican que la exposición de la pulpa dental durante 28 días, con inflamación confirmada, conduce a una regulación positiva y significativa de BDNF en el GT ipsilateral en los dientes afectados.⁴⁰

Después de realizar una revisión exhaustiva de los antecedentes que asocian directamente las variables de interés en este estudio, se considera la gran relación que tiene la amígdala cerebral con el dolor crónico y su componente emocional. Pero desafortunadamente no hay estudios realizados específicamente que tenga como objetivo la plasticidad inducida en el núcleo basolateral por un dolor crónico dental.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El dolor representa el principal síntoma por el que los pacientes acuden con profesionales de la salud. También, se sabe que el dolor es una sensación desagradable que es difícil de evaluar de forma asertiva ya que las escalas no siempre son las más idóneas. La situación se complica aún más cuando la

sensación nociceptiva se relaciona con sensaciones emocionales, ya que son capaces de influir tanto de manera negativa aumentando la sensación del dolor como de manera positiva provocando analgesia, todo esto ha despertado el interés por parte de la comunidad científica, y se ha empezado a realizar reportes sobre la participación de la amígdala cerebral en la integración del dolor crónico.

3.1 PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Existen cambios morfológicos en las neuronas colinérgicas de la amígdala basolateral de ratas Sprague-Dawley durante dolor crónico dental?

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la amígdala cerebral ha sido estudiada ampliamente, no hay reporte de investigaciones sobre la plasticidad en las neuronas colinérgicas piramidales en el sub-núcleo basolateral (BLA) durante un dolor crónico pulpar en ratas macho Sprague-Dawley. Más recientemente, la atención se ha centrado en las proyecciones de la médula espinal a la región parabraquial de la protuberancia dorsolateral, ya que la salida de esta región proporciona una conexión muy rápida con la amígdala, una región generalmente considerada para procesar información relevante para procesar la experiencia del dolor emocional. Debido a que el dolor es una sensación desagradable de alerta a un daño física real o potencial, que lleva al paciente pediátrico a la consulta odontológica para resolver el problema y recuperar la salud bucal.

5. HIPÓTESIS

5.1 Hipótesis científica

El dolor crónico dental causa cambios morfológicos en las neuronas colinérgicas de la amígdala basolateral en ratas Sprague-Dawley.

5.2 Hipótesis nula

El dolor crónico dental no causa cambios morfológicos en las neuronas colinérgicas de la amígdala basolateral en ratas Sprague-Dawley.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la plasticidad de las neuronas colinérgicas de la amígdala basolateral ante un estímulo nocivo (LPS) en un órgano dentario de un modelo animal (rata Sprague- Dawley).

6.1.1 Objetivos específicos

- Determinar la longitud dendrítica de neuronas colinérgicas de la amígdala cerebral basolateral por medio del análisis de Sholl.
- Determinar el grado de arborización dendrítica en las neuronas colinérgicas de la amígdala cerebral basolateral por medio del análisis de Sholl.

7. MATERIALES Y MÉTODO

7.1 DISEÑO DE ESTUDIO

- El estudio es de tipo experimental, transversal, ambilectivo con muestreo probabilístico o aleatorio simple.

7.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

- Población: Roedores. Ratas machos con 28 días de edad de la cepa Sprague-Dawley del bioterio central de la BUAP “Claude Bernard”.

- Muestra: Un grupo experimental y un grupo control con un número de 10 ratas macho con 28 días de edad de la cepa Sprague-Dawley del bioterio central de la BUAP “Claude Bernard”.
- Tamaño de la muestra: Población finita de 20 ratas macho.

El número de animales utilizados se redujo al mínimo sin comprometer los objetivos del proyecto. Para ello se tomaron los datos de 10 animales utilizados en proyectos anteriores similares (aprobados y ejecutados, que generaron tesis de licenciatura y maestría), y se obtuvieron la desviación estándar, error estándar, la dimensión deseada del intervalo de confianza, el nivel de confianza deseada y la magnitud de la varianza de la población. Los resultados fueron los siguientes: $\sigma=(13.97)$, $d=(8.66)$, con una $p < 0.05$; $z=(1.96)$. Al sustituir los valores en la forma 1 y 2 nos arroja una “n” experimental de 9.99. Para lo cual se ocuparon las siguientes fórmulas:

$$1. \quad d = z \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

$$2. \quad n = \frac{z^2 \sigma^2}{d^2} \longrightarrow \frac{(3.84)(195.16)}{74.99} = 9.99$$

7.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.

➤ UNIDADES DE MUESTREO

Criterios de inclusión.

- Ratas machos de la cepa Sprague-Dawley de 28 días de edad, con un rango de peso de 50 a 80 gr y sin presencia de caries.

Criterios de exclusión.

- Ratas machos de la cepa Sprague-Dawley con signos de enfermedad sistémica, neurológica o con caries.

Criterios de eliminación.

- Animales que muestren signos de desnutrición (que disminuyan en un 30% o más su peso corporal).
- Animales que expiraren durante el desarrollo experimental.

➤ **NEURONAS COLINÉRGICAS DE LA AMÍGDALA BASOLATERAL**

Criterios de inclusión

- Neurona bien teñida.
- Neurona no fragmentada.
- Neurona suficientemente aislada como para poder distinguir las dendritas de la neurona elegida.

Criterios de exclusión

- Todo parámetro que no cumpla los criterios de inclusión.

Criterios de eliminación

- Neurona fragmentada
- Neurona no teñida

7.4 VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA	PRUEBA ESTADÍSTICA
LONGITUD DENDRÍTICA.	Distancia entre el inicio y fin de las prolongaciones protoplásmicas ramificadas de la neurona (dendritas), dedicadas principalmente a la recepción de estímulos.	Determinar longitud de las dendritas a través del análisis de Sholl la.	Cuantitativa Dimensional Discreta.	T- Student para grupos independientes.
ARBORIZACIÓN DENDRÍTICA	Ramificación terminal en forma de árbol de las células nerviosas y otros elementos anatómicos.	Determinar a través del análisis de Sholl el número de intersecciones de dendritas por cada círculo concéntrico	Cuantitativa Dimensional Discreta.	T- Student para grupos independientes.

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA	PRUEBA ESTADÍSTICA
Dolor crónico dental	Experiencia desagradable de más de 6 meses de evolución como consecuencia a una lesión pulpar no tratada.	Evaluar a través de la prueba de algesia.	Cuantitativa Dimensional Continua.	T- Student para grupos independientes.

7.5 ESTANDARIZACIÓN Y CAPACITACIÓN DEL INVESTIGADOR

En el presente estudio, no se requirió llevar a cabo una estandarización para la reconstrucción bidimensional de las neuronas ni la capacitación del manejo de

animales de laboratorio, ya que este, es un estudio de tipo ambilectivo, y la estandarización y la capacitación fue tomada por el responsable del proyecto original, por lo tanto, las muestras del tejido cerebral se encontraban disponibles para continuar con la investigación.

7.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

Lesión pulpar.

Los roedores se prepararon con ayuno de 12 horas previas. Se realizó la introducción de LPS en la pulpa dental en el primer molar superior derecho en el laboratorio de fisiología de la FEBUAP. Se dio inicio al procedimiento con la administración del anestésico para rata (ketamina 100mg/kg y xilacina 10 mg/kg) vía intraperitoneal con una secuencia del 1 al 10 previamente marcadas, en intervalos de tiempo de 5 minutos.

Al obtener el efecto esperado se prosiguió a realizar la comunicación pulpar mediante un acceso oclusal (Fig. 6A) con pieza de mano de alta velocidad y fresa dental de ¼ de bola de carburo en el primer molar superior derecha, una vez cohibido el sangrado, se introdujo LPS (*Escherichia coli*, Sigma, St. Louis, Missouri, EU) con una dosis de 6-10 mg/diente disueltos en 0,9% NaCl y posteriormente se obturaron (Fig. 6B) las molares con resina fluida (Filtek Z350XT flow 3M). Este procedimiento requirió de una técnica de trabajo a 4 manos para el cuidado, la conservación de tejidos blandos y de la temperatura de los roedores impidiendo su descenso por efecto de la droga administrada hasta su completa recuperación.³⁹

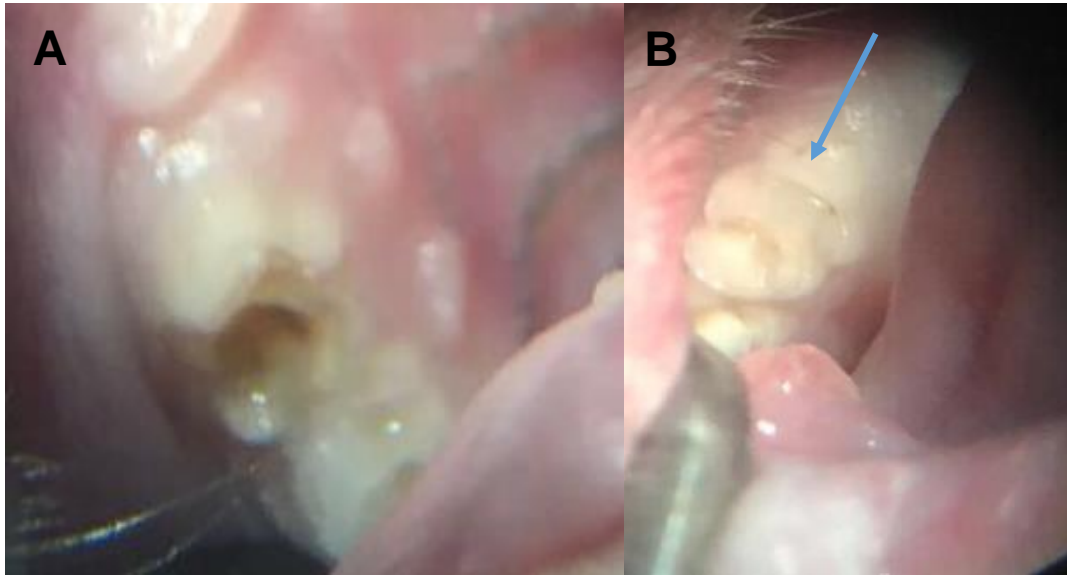


Figura 6.- A: Acceso oclusal del primer molar superior derecho en el sujeto de experimentación. B: Flecha azul señala el mismo molar con obturación a base de resina fluida. (Fuente propia).

Todos los procedimientos descritos en este protocolo fueron aprobados por el Comité de Cuidado Animal de la BUAP y las líneas gubernamentales (Norma Oficial Mexicana NOM-062-zoo-1999).

Posterior al procedimiento quirúrgico se esperó la recuperación total de los animales para ser devueltos al bioterio Claude Bernard, donde fueron cuidados por personal capacitado. Las ratas experimentales como control fueron pesadas tres veces a la semana durante 28 días, tiempo suficiente para que la lesión realizada evolucione a dolor crónico.⁴⁰

Prueba de Algesia

La prueba de algesia se realizó antes de efectuar la eutanasia de los sujetos de experimentación, en primer lugar, se vertió agua a 45 grados centígrados en un vaso precipitado. Con el fin de mantener la misma temperatura, esta se monitoreó a lo largo de la prueba con la ayuda de un termómetro. Posteriormente se envolvió

el cuerpo de las 20 ratas con un paño, se dejó expuesta la cola para dejarla caer por gravedad en el vaso de ensayo y finalmente se contó el tiempo (segundos) que tardó cada una de las ratas en retirar la cola del estímulo térmico. Esta prueba nos permite sugerir que, a menor tiempo transcurrido durante el retiro, mayor nivel de algesia, es decir que el estímulo doloroso que en este caso fue la comunicación pulpar con la inoculación del LPS, desencadenó alteraciones de la vía del dolor, como la algesia que es un fenómeno donde los estímulos normalmente dolorosos provocan dolor de mayor intensidad

Obtención del tejido nervioso

- Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de Ketamina-Xilacina.
- Se perfundieron con solución de cloruro de sodio al 0.9% por el ventrículo izquierdo con la finalidad de limpiar tejido nervioso de tejido sanguíneo y se realizó un corte a la aurícula derecha para favorecer su drenaje (Fig. 7).
- Se removieron los cerebros y fueron fijados en 20 ml de la solución de Golgi-Cox.

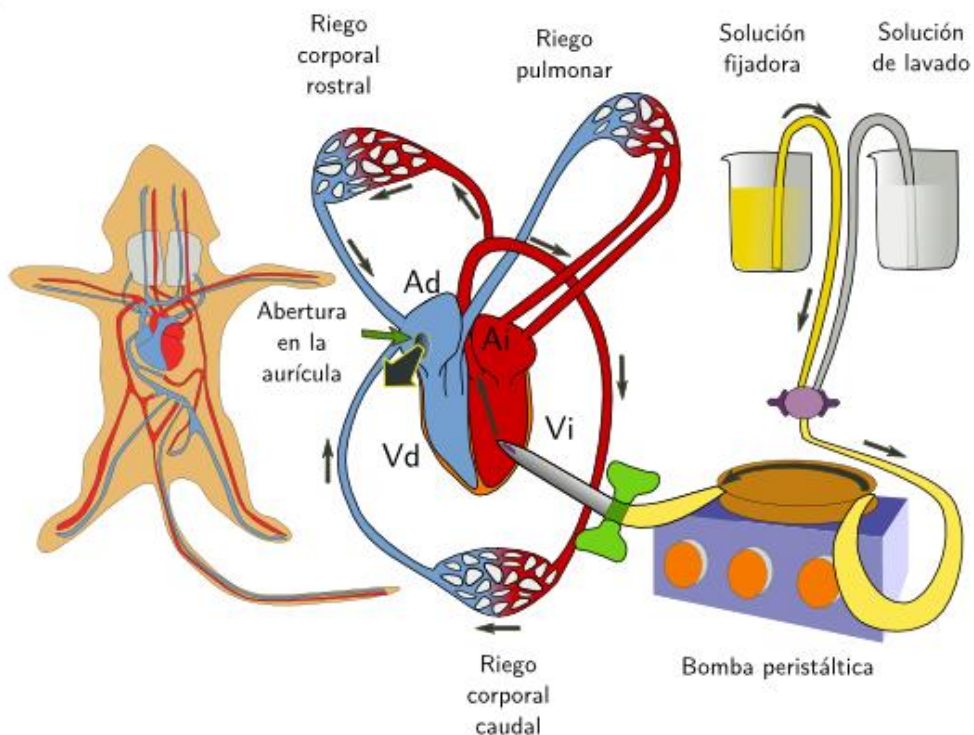


Figura 7.- Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas, métodos de fijación.

Impregnación de cerebro con la solución de Golgi-Cox.

La solución de Golgi-Cox está compuesta por:

- Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) 170 mM
- Cloruro de mercurio ($HgCl_2$) 200 mM
- Cromato de potasio (K_2CrO_4) 200 mM

Misma que se almacenó en un recipiente de vidrio ámbar por 5 días, después de ese tiempo se filtró para retirar el precipitado que se forma.

- a) Los cerebros se almacenaron en total oscuridad durante 14 días, después de este tiempo la solución de Golgi-Cox se reemplazó por una solución de sacarosa al 30% y se almacenó nuevamente en total oscuridad por 5 días más antes de seccionarlos; este último paso confirió al tejido flexibilidad por lo que fue menos propenso a la fractura cuando se cortó y se secó. En este cambio de soluciones se realizó previamente la división de hemisferios en el tejido (izquierdo y derecho), por un corte sagital.
- b) Se retiró el exceso de solución de sacarosa del cerebro para ser montado en la platina del vibratomo motorizado modelo MA752, y se sumergió en solución de sacarosa a una temperatura de 40 grados centígrados hasta cubrir el tejido.

- c) Se seccionó el tejido en orientación coronal de cada hemisferio con un grosor de 200um y se fijó en laminillas (Fig.8) previamente gelatinizada al 2% bajo presión.
- d) Se mantuvo a las laminillas en una cámara húmeda y se procedió a revelar la tinción en total oscuridad, de la siguiente manera:
1. Enjuague con agua destilada, 1 minuto.
 2. Hidróxido de amonio, 30 minutos.
 3. Enjuague con agua destilada, 1 minuto.
 4. Fijador rápido de kodak al 50%, 30 minutos.
 5. Enjuague con agua destilada, 1 minuto.
 6. Deshidratación de tejido con concentraciones crecientes de etanol, 50, 70 y 95% 1 minuto en cada uno, para finalizar con 5 minutos en alcohol absoluto (2 veces).
 7. Quince minutos en xileno.
 8. Se cubrió el tejido con resina sintética (al 60% en xilol, marca Hycel) y se resguardo en oscuridad para su secado.

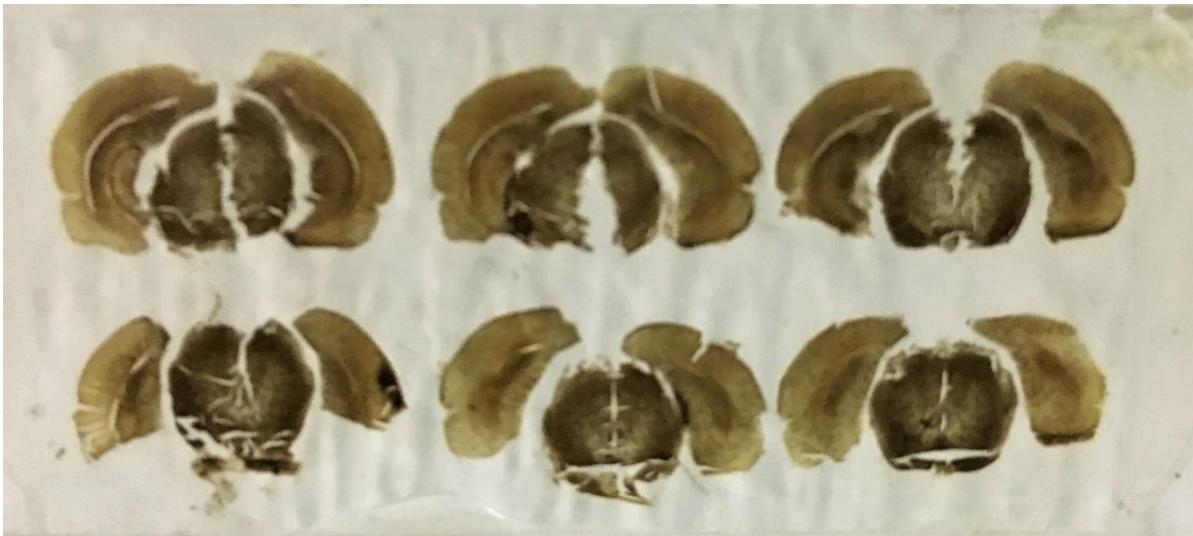


Figura 8.- Fijación del tejido nervioso en laminillas. (Fuente propia)

Análisis morfológico

Kolb (1998) propone los siguientes criterios para la elección de neuronas para dibujar y analizar:

- Que la neurona se encuentre bien teñida.
- Que no esté fragmentada.
- Que se encuentre lo suficientemente aislada como para poder distinguir las dendritas de la neurona elegida.

Se localizaron y seleccionaron 10 neuronas por núcleo cerebral por medio de la observación de un microscopio óptico (Microscopio DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) para ser reconstruidas bidimensionalmente (Fig. 9) con la ayuda de una cámara lúcida.



Figura 9.- Reconstrucción bidimensional de neuronas piramidales del complejo basolateral de la amígdala cerebral. (Fuente propia)

Análisis morfológico de Sholl.

Una vez que se obtuvieron las reproducciones bidimensionales de las neuronas (Fig. 10 A y B), éstas fueron analizadas con el análisis de Sholl, el cual consiste en sobreponer una placa transparente con una serie de círculos concéntricos con un equivalente de 10 μm de separación, sobre el dibujo, tratando de centrar el soma en el primer círculo del centro. El número de círculos que intercepte cada dendrita es usado para estimar la longitud dendrítica total. Es importante que antes de realizar el análisis morfológico se ilumine los distintos números de orden para facilitar y agilizar la recolección de los datos (Fig. 10 C).

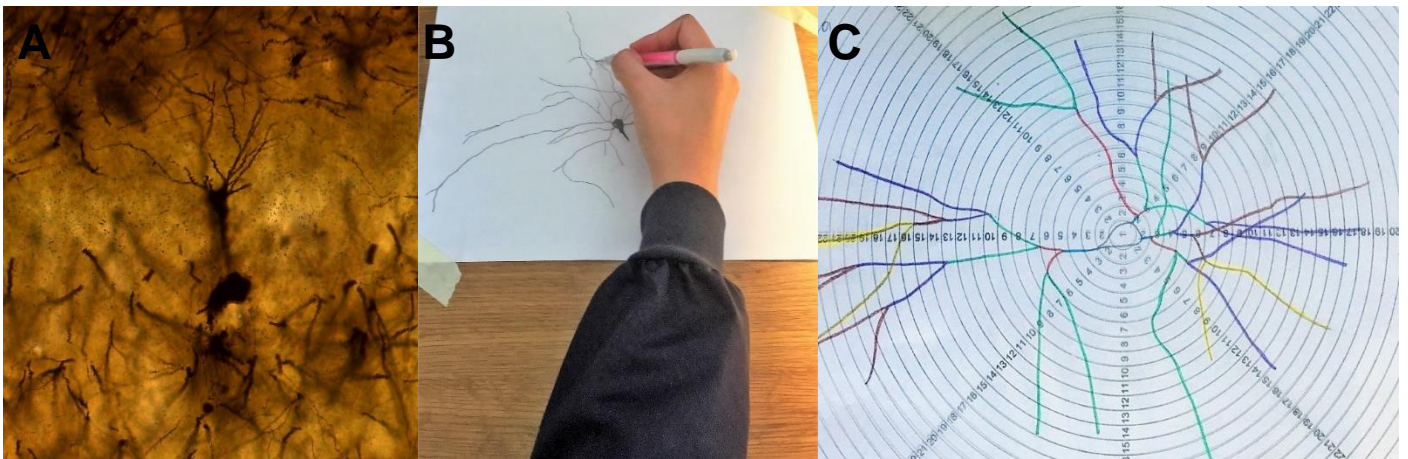


Figura 10.- A: Neurona piramidal con tinción de Golgi-Cox. B: Reconstrucción bidimensional terminada de la neurona de la figura A. C: Se puede observar la iluminación de cada orden dendrítico en diferente color y la placa de Sholl colocada correctamente.

Análisis de datos

- Los resultados obtenidos del análisis de Sholl, se recopilaron por medio de una tabla de cálculo diseñada en el programa de Microsoft Excel, posteriormente estos datos se capturaron en el programa SPSS Versión 22. Se realizó la prueba estadística T de Student para las variables

independientes: Longitud y arborización dendrítica, finalmente se expresaron los resultados en forma gráfica y en tablas.

7.7 LOGÍSTICA

7.7.1 Recursos humanos:

Científicos:

- Director del proyecto de tesis.

Investigadores:

- Alumna de maestría en estomatología con opción terminal en pediatría.

7.7.2 Recursos materiales:

- Anestésico para rata (Ketamina/Xilacina) con una dosis de 0.2 ml/100 g de peso por vía intraperitoneal.
- Pieza de mano dental de alta velocidad y fresa dental de ¼ de bola de carburo.
- Lipopolisacárido (*Escherichia coli*, Sigma, St. Louis, Missouri, EU) con una dosis de 6-10 mg/diente disueltos en 0,9% NaCl.
- Tinción de Golgi-Cox: La solución de Golgi-Cox está compuesta por:
 - ✓ Dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) 170mM
 - ✓ Cloruro de mercurio (HgCl₂) 200mM
 - ✓ Cromato de potasio (K₂CrO₄) 200mM
- Solución de sacarosa al 30%
- Laminillas previamente gelatinizadas al 2% bajo presión.
- Agua destilada
- Hidróxido de amonio
- Fijador rápido de kodak al 50%
- Etanol 50, 70 y 95%
- Xileno

- Resina sintética (al 60% en xilol, marca Hycel)
- Microscopio de luz
- Cámara lucida
- Vibratomo
- Lámpara de luz

7.7.6 Recursos financieros

El financiamiento del trabajo de investigación fue proporcionado por el Laboratorio de Fisiología de la FEBUAP y la Vicerrectoría de Investigación y estudios de Posgrado (VIEP).

8. BIOÉTICA

- Norma Oficial Mexicana NOM-062-zoo-1999
- Norma NOM-087-ECOL-94, así como a la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente.

9. CRONOGRAMA

Año 2018	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Revisión Bibliográfica	■	■										
Elaboración de protocolo de investigación			■	■								
Registro de protocolo ante CIFE					■							
Correcciones sugeridas						■	■					
Aprobación de protocolo								■				
Análisis de Sholl.									■	■	■	

Año 2019	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Captura de datos y estadística descriptiva	■			

e inferencial.				
Revisión de datos y discusión.				
Revisión por lector y últimas correcciones.				
Presentación Del Proyecto/ Examen Profesional.				

10. RESULTADOS

La muestra histológica obtenida a través del método de Golgi–Cox, fue observada con ayuda de un microscopio óptico (Microscopio DM 2000, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) sincronizado con un software llamado Leica application suite versión 3.0 (Fig. 11 A y B), con el que se comprobó la buena ejecución de la técnica y la correcta obtención de la muestra histológica. Para justificar el análisis estadístico correcto, se procedió a realizar lo siguiente: se analizaron un total de 200 neuronas colinérgicas de la amígdala basolateral provenientes de 20 sujetos de experimentación, los cuales, fueron seleccionados aleatoriamente como se describe en el diagrama 1.

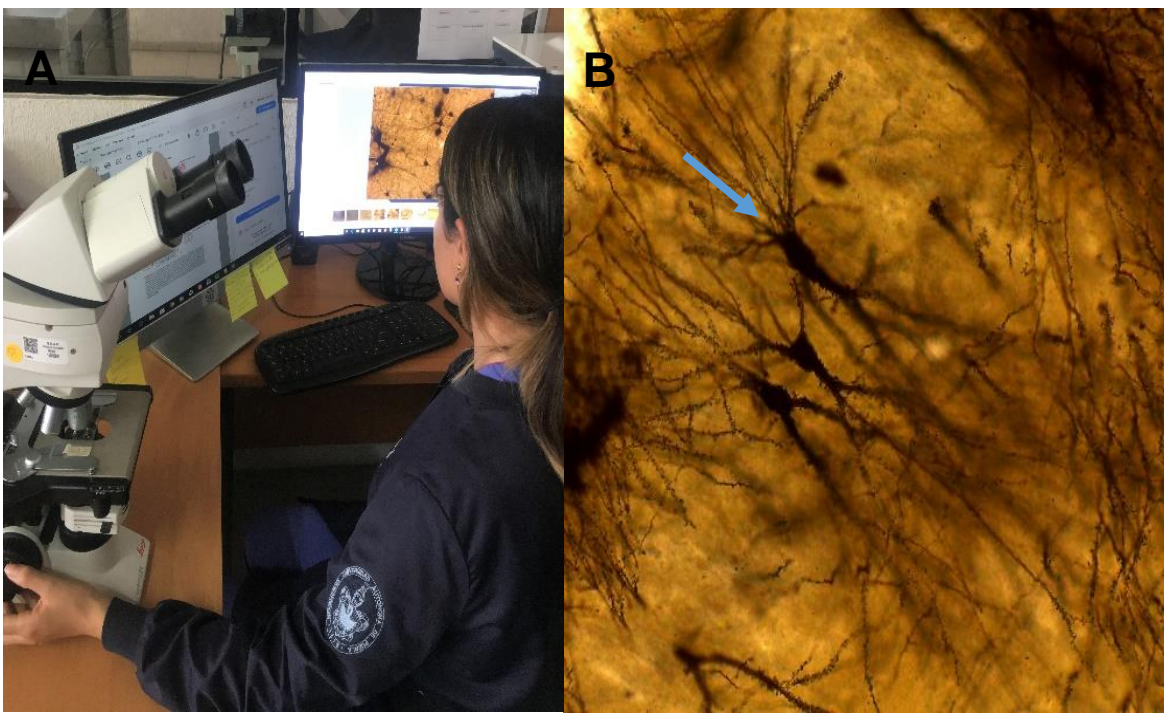


Figura 11.- A: Se observa el uso del microscopio óptico en sincronización con el software Leica application suite versión 3.0 utilizados con el fin de duplicar las neuronas en un monitor de PC. B: Flecha azul señalando neurona piramidal del complejo basolateral de la amígdala, correctamente teñida por el método Golgi-Cox y lo suficientemente aislada para ser analizada.



Diagrama 1. Selección de la muestra del estudio morfológico neuronal en la amígdala basolateral.

Los resultados de este estudio se obtuvieron por medio de la prueba estadística T de Student para grupos independientes, misma que se seleccionó una vez que se conoció la distribución Normal o Gaussiana de los datos por medio de la realización de la estadística descriptiva (tabla 3-4) y corroborándolo con la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Cabe mencionar que el margen de

Grupo	Media	Mediana	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad	Curtosis	Asimetría
Experimental	24832.5	24420.0	4062.1	16.3%	-.98	.33
Control	19808.6	19410.5	3386.4	17.09%	-.61	.43

confiabilidad fue del 95% por lo tanto, un valor de p inferior a 0.05 se consideró significativo para todos los análisis estadísticos. Finalmente, para facilitar la comprensión de los resultados, éstos, se colocaron en gráficas y tablas realizadas en Microsoft Excel y Graph Pad Prism versión 5.04 (California, EE. UU.)

Tabla 3.- **Medidas de tendencia central, dispersión, posición y de forma de la longitud total dendrítica neuronal** de la amígdala basolateral del grupo experimental (n=100) y del grupo control (n=100). La presente tabla nos permite comparar descriptivamente los dos grupos del estudio y al mismo tiempo, permite conocer distribución de los datos.

Grupo	Orden detritico.	Media	Mediana	Desviación estándar	Coefficiente de variabilidad	Curtosis	Asimetría
Experimental	Primero	1175	1260	±215	18.2%	-1.56	-.19
	Segundo	5042	5440	±809	16%	.91	-1.00
	Tercero	8600	8550	±989	11.5%	-.08	.40
	Cuarto	6483	5960	±1537	23.7%	2.16	1.36

	Quinto	2790	3310	±1396	50%	-2.09	-.15
	Sexto	609	400	±493	80.9%	-1.01	.68
Control	Primero	1092	1020	±286	26.1%	2.49	1.27
	Segundo	4685	4690	±1088	23.2%	1.03	-.08
	Tercero	6573	6260	±1142	17.3%	-2.06	.50
	Cuarto	3954	3855	±2124	53.7%	-.52	-.27
	Quinto	1268	1270	±665	52.4%	-.41	.06
	Sexto	458	515	±238	51.9%	1.73	-1.35

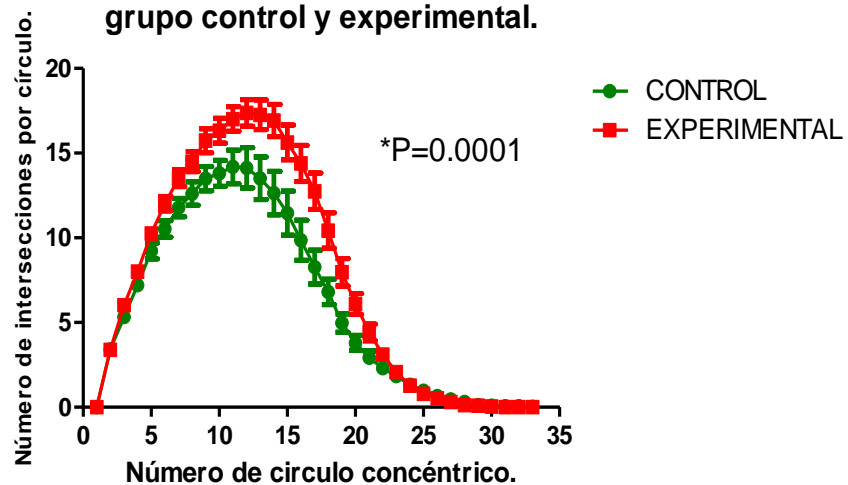
Tabla 3.- **Medidas de tendencia central, dispersión, posición y forma del grupo experimental y control de la longitud total dendrítica neuronal por número de orden** del grupo experimental (n=100) y del grupo control (n=100). Se puede observar que la asimetría y curtosis no sobrepasa el parámetro de +2 o -2, lo que nos sugiere que los datos presentan una distribución normal o Gaussiana.

- **Morfología neuronal.**

Arborización dendrítica.

Para la obtención de los resultados de esta variable, se cuantificó el número de intersecciones de dendritas por cada círculo concéntrico de la placa utilizada en el análisis de Sholl. En la gráfica 1, se puede observar que el grupo experimental presentó más arborización en las neuronas con respecto al grupo control con un valor de P de 0.0001 el cual, es estadísticamente significativo.

Arborización dendrítica de las neuronas colinérgicas de la amígdala basolateral: grupo control y experimental.

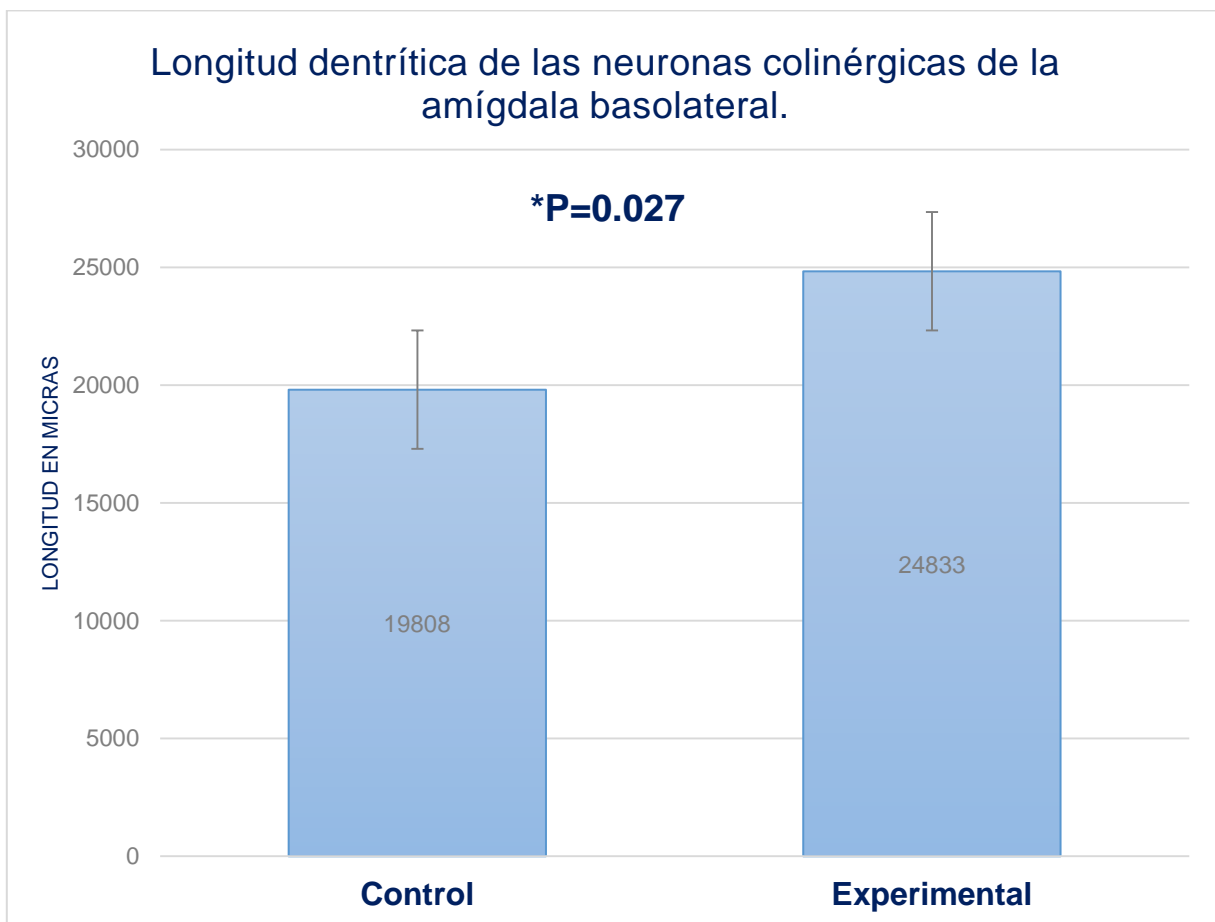


Gráfica 1. **Arborización dendrítica neuronal.** En color rojo se observa los valores alcanzados por el grupo experimental en la arborización dendrítica de las neuronas de la amígdala basolateral los

cuales, son mayores significativamente ($P=0.0001$) a comparación con el grupo control que se puede observar en color verde.

- **Longitud dendrítica neuronal de la amígdala basolateral.**

Los resultados obtenidos fueron los siguientes (gráfica 2):



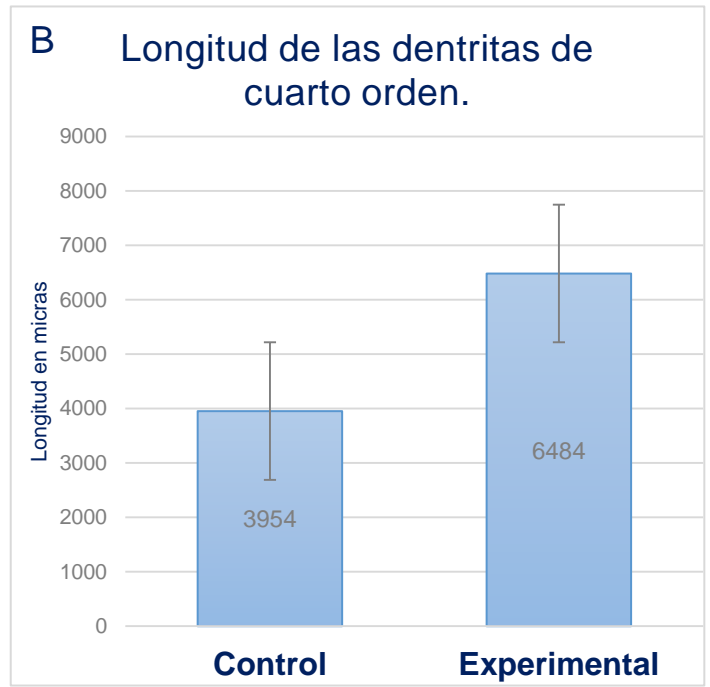
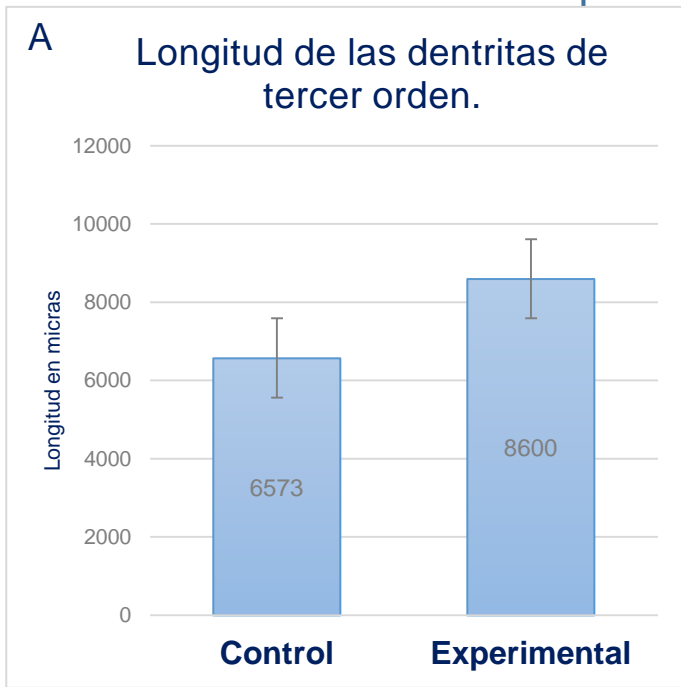
Gráfica 2.- **Longitud dendrítica neuronal total.** Muestra las medias de la longitud dendrítica neuronal de ambos grupos: experimental (n=100) y control (n=100). El análisis estadístico T de Student para grupos independientes muestra cambios significativos con una P de 0.027.

- **Longitud dendrítica por número de orden.**

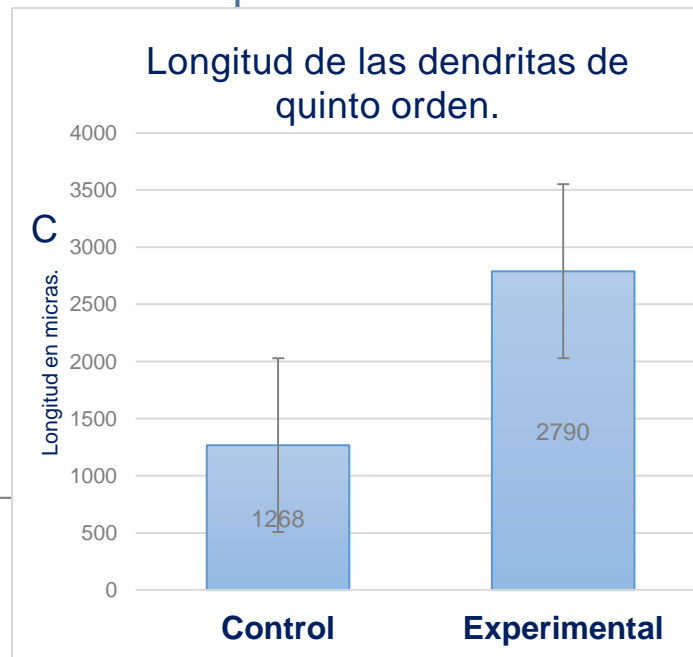
Se encontró tanto en el grupo experimental como en el control, neuronas que se ramificaron hasta el sexto orden dendrítico, sin embargo, solo se encontraron cambios estadísticamente significativos en el tercer, cuarto y quinto orden (gráfica y tabla 3).

Orden detritico.	Prueba de Levene de calidad de varianzas	Prueba T para igualdad de medias.
Primero	.895	Se asumen varianzas iguales .527 No se asumen varianzas iguales .527
Segundo	.663	Se asumen varianzas iguales .477 No se asumen varianzas iguales .510
Tercero	.397	Se asumen varianzas iguales .003 No se asumen varianzas iguales .006
Cuarto	.498	Se asumen varianzas iguales .019 No se asumen varianzas iguales .035
Quinto	.004	Se asumen varianzas iguales .028 No se asumen varianzas iguales .015
Sexto	.027	Se asumen varianzas iguales .503 No se asumen varianzas iguales .446

Tabla 3.- **Varianzas y resultados obtenidos de la prueba estadística T de Student.** Se compararon las medias del grupo experimental y grupo control con respecto a la longitud dendrítica por número de orden. Se puede observar que en el tercer, cuarto y quinto orden existen diferencias estadísticamente significativas.



*P=0.028

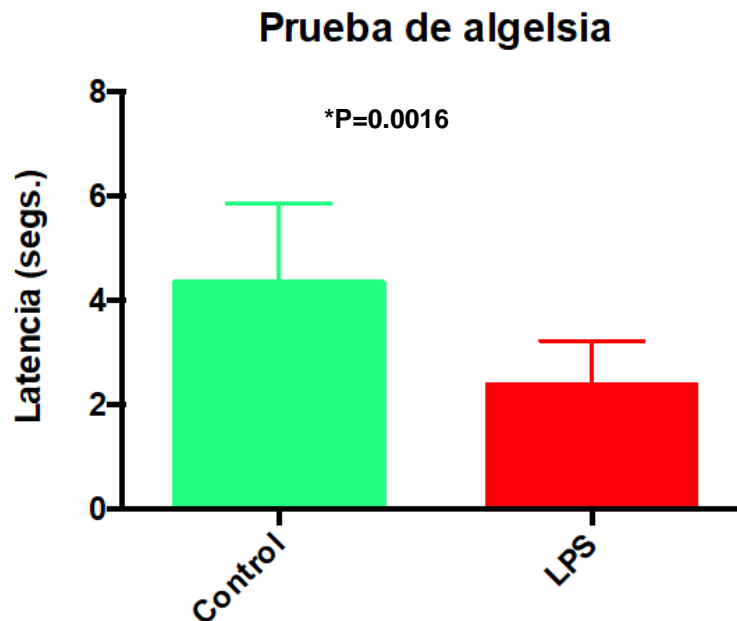


Gráfica número 3.- de

Longitud por orden. Muestra

los resultados obtenidos de la prueba estadística T de Student y U de Mann Withney para grupos independientes de la longitud dendrítica del A) tercer (P=0.003), B) cuarto (P=0.019) y C) quinto orden (P=0.028). De igual manera se observa el promedio de la longitud de ambos grupos dentro de las barras de las gráficas.

- **Algesia entre grupo control y experimental.**



Gráfica 4.- **Prueba de algesia medida por periodo de latencia en segundos.** Se puede observar que las ratas del grupo control en color verde, tardó más tiempo (segundos) en retirar la cola del estímulo térmico en comparación con el grupo experimental en color rojo. El análisis estadístico T de Student para grupos independientes, mostró cambios significativos con una P de 0.0016.

11. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio, fue investigar la posible neuroplasticidad de las neuronas colinérgicas del complejo basolateral de la amígdala cerebral en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, sometidas a una exposición pulpar e inducidas a un proceso de infección con la inoculación del LPS (*Escherichia coli*, Sigma, St. Louis, Missouri, EU).

Las evidencias obtenidas en esta investigación, se pueden considerar novedosas en el campo de la fisiología odontológica, debido a que hoy en día, no existe un estudio morfológico; de igual manera, se puede mencionar que, al contrastar resultados con otros estudios de investigación en la literatura, se encontraron muy semejantes. Por lo que se puede inferir que existe una relación entre el complejo basolateral de la amígdala y el complejo dentinopulpar condicionado a una respuesta de tipo nociceptiva.

Chen y col. en 2014 investigaron la participación de los receptores P2X en la sensibilización del ganglio del trigémino (GT), causada por la inflamación de la pulpa dental en sujetos experimentales (ratas Wistar). Sus resultados, reportan que la aplicación de LPS en la pulpa dental induce una mayor expresión de c-fos, un marcador de actividad neuronal, de igual manera, mayor activación en los receptores ionotrópicos purinérgicos (P2X) que contribuyen sustancialmente al desarrollo y mantenimiento de la hipersensibilidad neuronal a través de la modulación de la liberación de glutamato y ácido γ -aminobutírico (GABA); específicamente los tipos P2X2, P2X3 y P2X5 se expresaron en el proceso de sensibilización producida por la inflamación del tejido pulpar (Fig. 12). Es decir, que el estímulo doloroso provocado en el grupo experimental aumentó la actividad en las neuronas glutamatérgicas excitatorias del GT, induciendo una mayor actividad neuronal. Los resultados reportados por Chen y col. son congruentes con los encontrados en este estudio, en el sentido de que existen cambios en estructuras periféricas que inducen neuroplasticidad a nivel central, por ejemplo, el incremento de la arborización y longitud dendrítica de neuronas del complejo basolateral de la amígdala. A pesar de que no se estudiaron las mismas estructuras anatómicas en específico, es conocido que muchas de las vías de nocicepción de primer orden se ubican en el GT, por lo tanto, es el encargado de mandar información nociceptiva de tipo odontogénico hacia el asta dorsal, sitio estratégico para la proyección de los estímulos a las diferentes estructuras cerebrales como la amígdala cerebral; con sus resultados, se pudiera inferir teóricamente que a mayor cantidad de neurotransmisor inducidos por el LPS a

nivel pulpar, puede repercutir en el nivel de arborización neuronal del complejo basolateral de la amígdala.³⁹

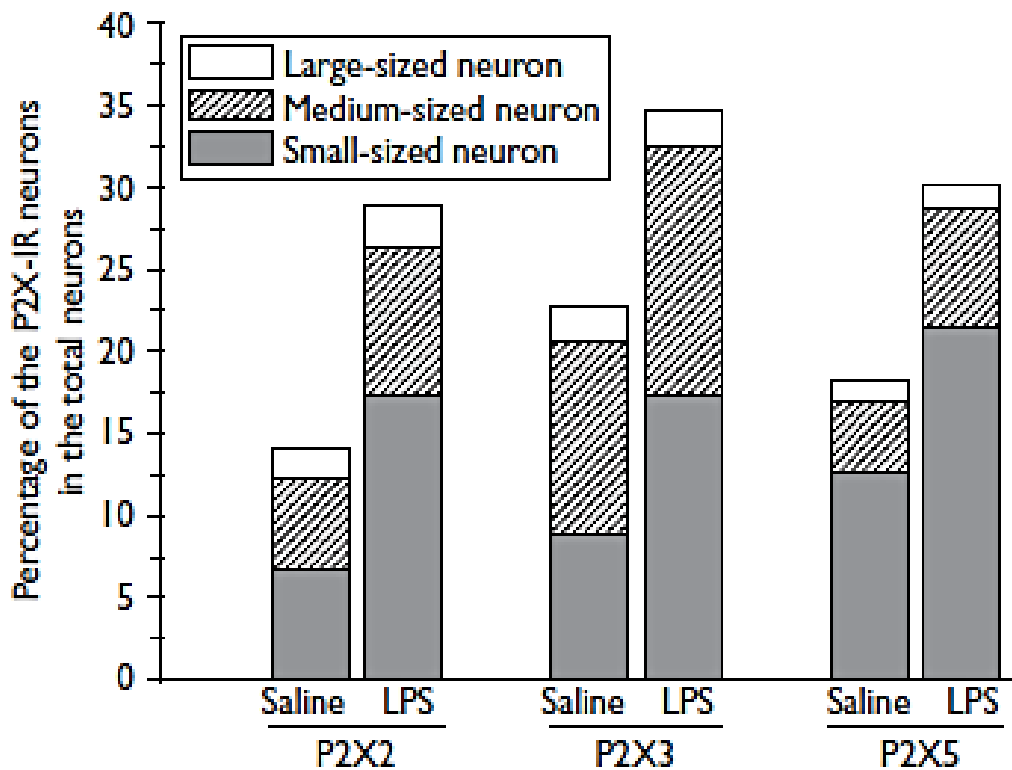


Figura12.- Porcentaje de las neuronas P2X-IR de tamaño pequeño, mediano y grande del grupo de solución salina (barra izquierda) y grupo LPS (barra derecha). IR, inmunoreactivo; LPS, lipopolisacáridos; P2X, ionotrópico purinérgico.³⁹

Otro estudio con resultados semejantes, es el realizado por Han y Neugebauer en 2004, donde se utilizó un modelo de dolor visceral por medio de inyecciones de zimozan en el colón, el objetivo fue analizar la plasticidad sináptica en el núcleo central (CeA) de la amígdala cerebral, considerado como el principal sitio de eferencia, al realizar extensas conexiones con las áreas del cerebro anterior y del tronco encefálico, generando respuestas motoras de protección o defensa con el

objeto de supervivencia; los resultados de esta investigación mostraron mayor actividad neuronal en el grupo donde fue inducida la colitis (Fig. 13).

El CeA mantiene conexiones intranucleares de la amígdala cerebral, una de ellas es con el núcleo Basolateral (BLA), sitio de aferencia y de principal interés en este estudio, estableciéndose una relación entre la respuesta motora y emocional ante el dolor. Han y Neugebauer utilizaron ratas machos de la sepa Sprague-Dawley, igual que este estudio debido a su alta tolerancia a situaciones de estrés.¹

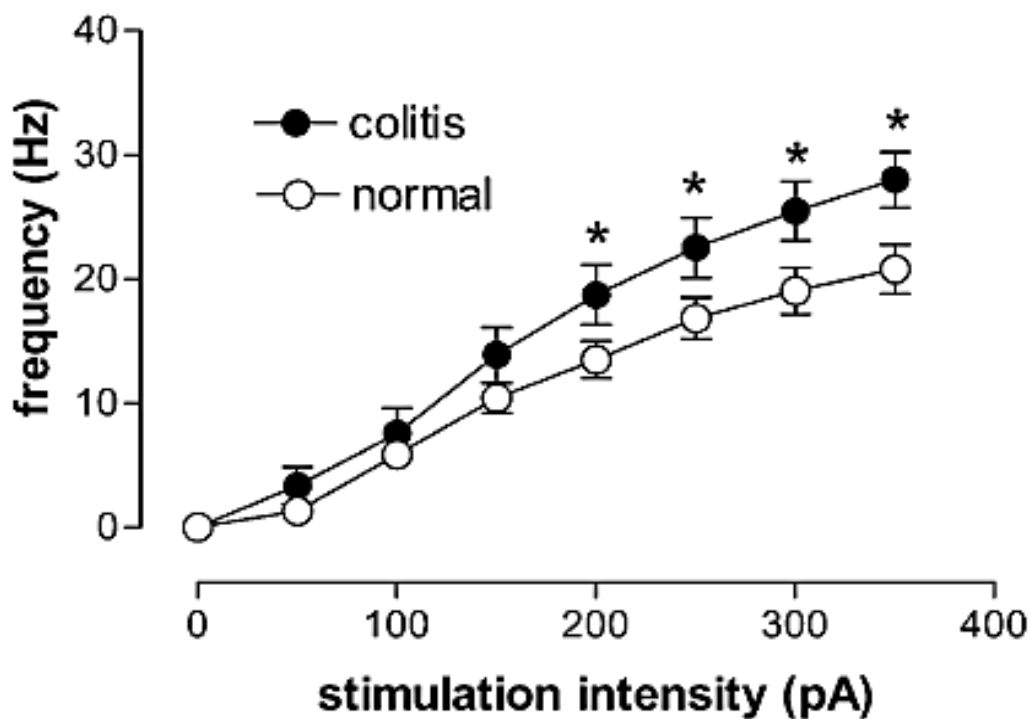


Figura 13.- El potencial de acción de la frecuencia de disparo en las neuronas del CeA (n=20) de ratas con colitis inducida por zymosan fue significativamente aumentado en comparación con neuronas del grupo control (n=41) ($P < 0.0001$, $F_{1,417} = 35.25$, ANOVA de dos vías). * $P < 0.05$, post-hoc t-test.

Por otro lado, Juárez y col. en 2019 se basaron en la metodología descrita por Tarsa y col.⁴¹ para inducir inflamación pulpar. En este estudio, se utilizó el análisis morfológico de Sholl para medir la arborización y la longitud dendrítica de las neuronas del núcleo posterolateral ventral del tálamo (VPL). En los resultados

reportados por Juárez y col., no hubo cambios estadísticamente significativos en la longitud dendrítica neuronal entre los 4 grupos: con lesión y control, en ratas macho (control = 10, lesionados = 9) o ratas hembras (control = 8, lesionados = 10). No obstante, entre sexos si hubo diferencias significativas; las ratas hembras experimentaron hipertrofia neuronal en comparación con las ratas macho ⁴², evidencia que coincide con la alta prevalencia de dolor oral en mujeres referido en la literatura. Como nueva perspectiva para esta misma línea de investigación, se desea trabajar con sujetos de experimentación de ambos sexos para poder contrastar los resultados descritos por Juárez y col. ⁴¹

Ciertamente se han realizado estudios de investigación donde se involucra la inflamación pulpar, como el trabajo de Tarsa y col. en 2010, que tuvo como objetivo evaluar los niveles de neurotrofina derivado del cerebro neurotrófico (BDNF), un modulador establecido de la señalización nociceptiva en la columna vertebral, encontrado en estudios anteriores en neuronas del ganglio del trigémino de ratas neonatales y adultas. Sus resultados reportaron una regulación positiva significativa de BDNF en el grupo experimental. A pesar de que no es un estudio de carácter morfológico, llama la atención que, de manera similar a los estudios mencionados anteriormente, el estímulo nociceptivo a nivel de pulpa dental desencadena una serie de respuestas tanto a nivel periférico como central. Otro punto importante a discutir es el tiempo transcurrido posterior a la lesión pulpar que esperaron Tarsa y Col. para verificar si en realidad existía un proceso inflamatorio como tal, para esto, ellos retiraron en bloque los maxilares y mandíbulas que contenían los molares lesionados para ser procesados y evaluados. Las pruebas histológicas mostraron que a los 28 días se identifica la presencia de infiltraciones de neutrófilos, una manifestación clásica de una inflamación purulenta aguda y los abscesos formados por neutrófilos y tejido necrótico, criterios que se toman para confirmar la inflamación pulpar (Fig.14). Estas evidencias coinciden con nuestros resultados, ya que se esperó el mismo periodo de tiempo para la evolución a un dolor crónico, lo que hizo posible la existencia de cambios significativos en la arborización y longitud dendrítica,

sugiriendo una mayor actividad neuronal en el complejo basolateral de la amígdala.⁴⁰

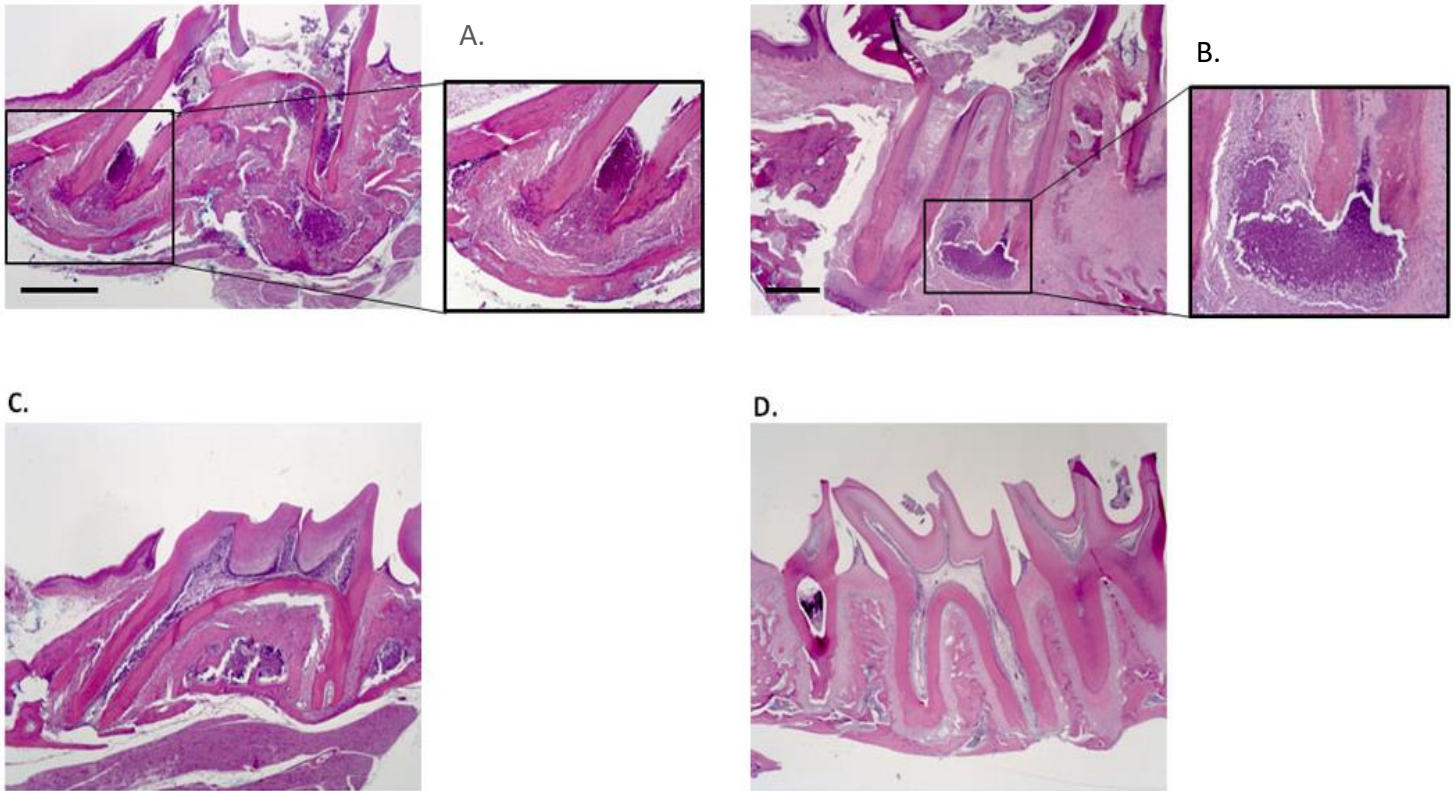


Figura 14.- Fotomicrografías de cortes sagitales del primer molar superior derecho (A – C) e izquierdo (D) de un ratón (A, C) y rata (B, D) teñidos con hematoxilina / eosina. Se preparó una cavidad en el lado derecho a las 4 semanas de edad y se dejó abierta a la microflora oral durante 7 días (A) y 28 días (B). La región periapical muestra infiltrados de neutrófilos y abscesos pulpares (A, B; inserciones), que están ausentes en un animal de operación simulada (C) y en el lado izquierdo intacto (D). Barras de escala, 500 μm .⁴¹

En el año 2018 Aguirre y col.⁴² (Resultados aún no publicados), realizaron un estudio morfológico neuronal, el cual forma parte de la presente línea de investigación junto con el realizado por Luna y col.⁴³ en el mismo año. Se tuvo como objetivo evaluar la morfología neuronal de la corteza del cíngulo provocada por una lesión pulpar e inoculación con LPS (*Escherichia coli*, Sigma, St. Louis,

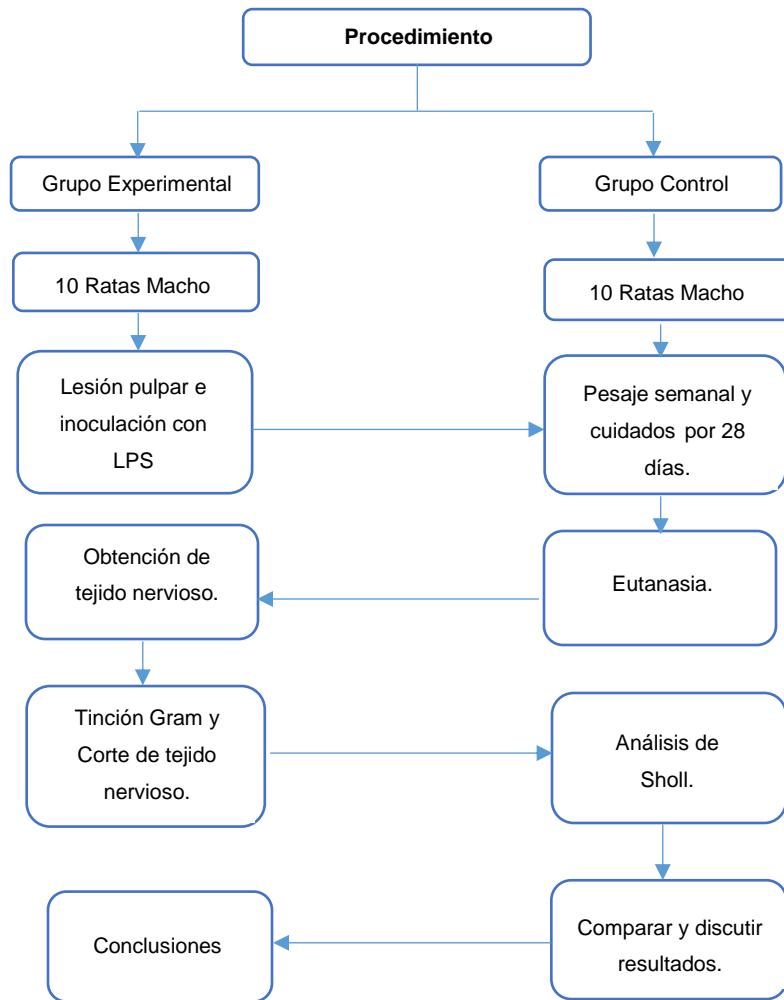
Missouri, EU) en ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. En cuanto a sus resultados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas comparando el grupo control con el grupo experimental, con respecto a la longitud y arborización total dendrítica, sin embargo, Aguirre y col ⁴², similar a nuestros resultados, reportaron diferencias significativas en la longitud del cuarto y quinto orden dendrítico, pudiendo sugerir de la existencia de una rápida neuroplasticidad.

12. CONCLUSIONES

1.- La comunicación pulpar más la inoculación del LPS, es capaz de inducir cambios en la morfología neuronal en el complejo basolateral de la amígdala cerebral de ratas macho en un periodo de 28 días.

2.- La amígdala está involucrada con la memoria-aprendizaje emocional, trastornos afectivos, y tiene un papel clave en la integración de las emociones negativas derivadas por un dolor intenso y de larga duración, por lo tanto, se puede inferir que el dolor de tipo odontogénico es capaz de generar actividad en la plasticidad neuronal, no solo periféricamente, sino que también a nivel cerebral.

13. DIAGRAMA DE FLUJO



14.BIBLIOGRAFÍA

1. Neugebauer V, Han JS. Synaptic plasticity in the amygdala in a visceral pain model in rats. *Neurosci Lett*. 2004;361(1-3):254-7.
2. Costafreda SG, Brammer M, David A, Fu C. Predictors of amygdala activation during the processing of emotional stimuli: A meta-analysis of 385 PET and fMRI studies. *Brain Res Rev*. 2008;58(1):57-70.
3. Müller F, O'Rahilly R. The amygdaloid complex and the medial and lateral ventricular eminences in staged human embryos. *J. Anat*. 2006;208(5):547-564.
4. Chareyron L, Lavenex P, Amaral D, Lavenex P. Postnatal Development of the Amygdala: A Stereological Study in Macaque Monkeys. *J Comp Neurol*. 2012;520(9):1965-1984.
5. Chareyron L, Lavenex P, Amaral D, Lavenex P. Postnatal Development of the Amygdala: A Stereological Study in Rats. *J Comp Neurol*. 2012;520(16):3745-63.
6. Webster MJ, Ungerleider LG, Bachevalier J. Connections of inferior temporal areas TE and TEO with medial temporal-lobe structures in infant and adult monkeys. *J Neuroscience*. 1991;11(4):1095-1116.
7. Amunts K, Kedo O, Kindler M, Pieperhoff P, Mohlberg H, Shah NJ, et al. Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps. *Anat Embryol*. 2005;210(5-6):343-52.
8. Alheid GF. Extended Amygdala and Basal Forebrain. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;985(1):185-205.
9. Schumann C, Bauman M, Amaral D. Abnormal structure or function of the amygdala is a common component of neurodevelopmental disorders. *Neuropsychologia*. 2011;49(4):745-59.
10. Solano E, Anwender A, Lohmann G, Weiss M, Docherty C, Geyer E. Diffusion tensor imaging segments the human amygdala in vivo. *Neuroimage*. 2010;49(4):2958-65.
11. LeDoux JE. The emotional brain, fear, and the amygdala. *Cell Mol Neurobiol*. 2003;23(4-5):727-38.
12. LeDoux JE. The amygdala. *Current Biology*. 2007;17(20):868-74.
13. Tosevski J, Malikovik A, Mojsilovic-Petrovic J. Types of neurons and some dendritic patterns of basolateral amygdala in humans - a Golgi study. *Ann Anat*. 2002;184(1):93-103.
14. McDonald AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol*. 1998;55(3):257-332

15. Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann NY Acad Sci.* 2000;911(1):369-391.
16. Stefanacci L, Amaral DG. Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol.* 2002;451(4):301-23.
17. Gauriau C, Bernard J. A comparative reappraisal of projections from the superficial laminae of the dorsal horn in the rat: the forebrain. *J Comp Neurol.* 2004;468(1):24-56.
18. Davis M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci.* 1992;15:353-75.
19. Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE. Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron.* 1997;(3):613-24.
20. Neugebauer V. Amygdala-Pain Processing and Pain Modulation. In: Zhuo M. (eds) *Molecular Pain.* Springer, NY;2007. p.265-79.
21. Lang PJ. The emotion probe. *Studies of motivation and attention.* *Am Psychol.* 1995;50(5):372-85.
22. Puebla D. Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico. *Oncología.* 2005;28(3):139-143.
23. Carr D, Goudas L. Acute pain. *Lancet.* 1999;353(9169):2051-58.
24. Merskey, H. and Bogduk, N. *Classification of Chronic Pain.* 1994. 2nd Edition, IASP Task Force on Taxonomy. IASP Press, Seattle.
25. Linl CP, Kupperl AE, Gammaitonil A. Frequency of chronic pain descriptors: Implications for assessment of pain quality. *Eur J Pain.* 2011;15(6):628-33.
26. Breivik H, Beverly C, Vittorio V. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact of daily life, and treatment. *EJP.* 2006;10(4):287-94.
27. Strobel C, Hunt S, Sullivan R, Sun JY, Pankaj S. Emotional regulation of pain: the role of noradrenaline in the amygdala. *Science China.* 2014;57(4):384-390.
28. Romero S, Iregui C. El lipopolisacárido. *Rev Med Vet Zoot.* 2010;19:37-95.
29. Haohao D, Xiaodi T, Zhengyu Z, Changjiang D. Structural insight into lipopolysaccharide transport from the Gram-negative bacterial inner membrane to the outer membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1862(11):1461-67.
30. Mandrell, RE, Apicella, MA. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: Molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiology.* 1993;187(3-5):382-402.

31. Brandtzaeg P. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:16-37.
32. Rietschel ET et al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996;216:39-81.
33. Backhed, F.; Normark, S.; Schweda, E.; Oscarson, S. & Richter-Dahlfors, A. Structural requirements for TLR4-mediated LPS signalling: a biological role for LPS modifications. *Microbes Infect.* 2003;5(12):1057-1063.
34. Heumann, D, Glauser, MP, Calandra, T. Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. *Curr Opin Microbiol.* 1998;1(1): 49-55.
35. Malhotra R, Priest, R, Foster MR, Bird MI. P-selectin binds to bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol.* 1998;28(3): 983-88.
36. Raetz, C. Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:635-700.
37. Corredor CA. Microbiología de las lesiones pulpares [Tesis Pregrado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
38. Tran L, Greenwood-Van Meerveld B. Lateralized amygdala activation: Importance in the regulation of anxiety and pain behavior. *Physiology & Behavior.* 2012;105(2):371-375.
39. Chen Y, Zhang L, Yang J. Lps-induced dental pulp inflammation increases expression of ionotropic purinergic receptors in rat trigeminal ganglion. *Neuroreport.* 2014;25(13):991-7.
40. Tarsa L et al. Tooth pulp inflammation increases bdnf expression in rodent trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience.* 2010;167(4): 1205–1215.
41. Juárez I, Morales JC, Flores J, Santiago G, Flores G, Chávez H. Tooth pulp injury induces sex-dependent neuronal reshaping in the ventral posterolateral nucleus of the rat thalamus. *J Chem Neuroanat.* 2019;96:16-21.
42. Guerrero L, Coronado L, Maulén M, Meeder W, Henríquez C, Lovera M. Prevalencia de trastornos temporomandibulares en la población adulta beneficiaria de atención primaria de salud del servicio de salud Valparaíso, San Antonio. *Av Odontoestomatol.* 2017;33(3):2340-3152.
43. Aguirre P. Cambios en la plasticidad neuronal en la corteza del cíngulo asociados con el dolor emocional inducido por un estímulo nocivo. [Tesis maestría]. México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018. 49p.
44. Luna A. Cambios en la densidad de espinas dendríticas en neuronas de la corteza del cíngulo asociada con el dolor emocional inducido por un estímulo nocivo. [Tesis maestría]. México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018. 49 p.

Formato 2 para la recolección de datos. (Fuente propia).