

Presentación

El dolor crónico es un problema sociosanitario de primer orden. Es la causa más frecuente de consulta médica en la gran mayoría de países desarrollados. Y su coste económico se sitúa entre el 2,2% y el 2,8% del PIB en los países industrializados, lo que supondría una cuantía de entre 13.000 y 16.000 millones de euros anuales en España (fuente: VI Reunión de Expertos sobre Aspectos Socioeconómicos del Dolor, Fundación Grünenthal, 2006). En Europa, dentro de todos los trastornos dolorosos crónicos, solo la migraña constituye la segunda patología neurológica o psiquiátrica en número de casos, y es la octava, entre los 18 grupos nosológicos que integran todas las patologías neurológicas y psiquiátricas, en el número de años de vida con incapacidad.

En el territorio facial, el cuadro doloroso crónico de tipo neuropático más importante lo constituye la neuralgia trigeminal. Se trata de una enfermedad afortunadamente no demasiado frecuente (incidencia de 5 casos por cada 100.000 habitantes), pero extraordinariamente incapacitante. Es característica de esta dolencia la respuesta al tratamiento con fármacos anticomociales, como la carbamacepina o la gabapentina. En ciertas condiciones están indicadas diversas manipulaciones quirúrgicas, ya sea a nivel periférico (las ramas nerviosas del trigémino), como a nivel del ganglio o la raíz trigeminal. Estas intervenciones producen alivio de la sintomatología, e incluso, en un pequeño porcentaje de casos, lo hacen de modo definitivo, eliminando la causa de la neuralgia. Más frecuentemente, no obstante, estas manipulaciones están sujetas a la recidiva de la enfermedad, que es más frecuente en los casos de manipulaciones periféricas o del ganglio trigeminal. A pesar de ser la neuropatía idiopática del territorio facial más frecuente en el ser humano, es muy limitado el conocimiento de su etiopatogenia y fisiopatología. Dilucidar los mecanismos neurales que subyacen a la neuralgia trigeminal y, en general de las neuropatías dolorosas, es una tarea necesaria para poder comprender, prevenir y tratar mejor esas importantes patologías.

A pesar de que no se conocen los cambios neuronales últimos responsables del dolor neuropático, se han ido descubriendo en las dos últimas décadas una serie de mecanismos potenciales, que implican a una gran variedad de genes, moléculas implicadas en la neurotransmisión y tipos celulares. Entre las primeras juegan un papel determinante una variedad de genes y moléculas relacionadas con la neurotransmisión, los canales iónicos y los receptores de membrana. Las principales alteraciones fisiopatológicas subyacentes al dolor neuropático consisten en alteraciones de la excitabilidad periférica y/o central, y desorganizaciones y reorganizaciones de las vías aferentes y circuitos implicados en el procesamiento de esa información.

Para poder investigar esos mecanismos es imprescindible disponer de modelos animales, que ya han contribuido avances notables en este campo. No obstante, y a diferencia de los modelos neuropáticos en nervios raquídeos, los modelos animales

de dolor neuropático trigeminal han sido escasamente abordados. El modelo más difundido a este respecto ha sido la lesión por constricción crónica (CCI) de la principal rama del nervio maxilar (el nervio infraorbitario) en la rata y, en mucha menor medida, en el ratón. Aunque la fisiopatología de la NT sea aún desconocida, por extensión del conocimiento acumulado sobre neuropatías de otros tipos se han adoptado tres teorías o hipótesis fundamentales: periféricas, según si el origen anatómico de la alteración fuera considerado periférico, por desencadenarse por estímulos táctiles faciales y una afectación primaria de nervios periféricos; centrales, cuando se basan en anomalías en las relaciones entre fibras o neuronas de los núcleos trigeminales centrales, o en niveles más superiores de la vía; o híbridas, por combinación de las anteriores.

A pesar de que puede inferirse de todos estos datos que el conocimiento anatómico acumulado sobre los componentes trigeminales que subyacen a estos mecanismos, periféricos o centrales, es muy completo, la realidad es otra. La primera descripción cuantitativa de la población total de neuronas, así como de las neuronas inhibitorias en los diversos núcleos trigeminales del tronco del encéfalo, fue publicada recientemente por nosotros (Avendaño et al., 2005). Y más recientemente aún, hemos demostrado que el número de neuronas sensoriales primarias se incrementa de modo notable a lo largo de la vida postnatal de la rata, a expensas mayoritariamente de las neuronas más directamente implicadas en la termo- y nocicepción (Lagares et al., 2007).

Por último, no podemos perder la perspectiva, fundamental aunque no única, de que el conocimiento fisiopatológico de la neuralgia nos debe orientar para diseñar y desarrollar nuevas terapias para la misma.

Objetivos

Se plantearon 7 Objetivos específicos, 3 de los cuales fueron modificados y/o extendidos a lo largo del desarrollo del proyecto.

1. Estudio morfométrico estereológico (óptico y/o electrónico) del ganglio trigémino en ratas de ambos sexos y a edades diferentes, con inicio de un estudio semejante paralelo en ratones.
2. Estudio estereológico del nervio infraorbitario, el ganglio y la raíz trigeminal en ratas adultas sometidas a transección permanente (T-IoN), o a lesión por constricción crónica (CCI) del nervio infraorbitario. Se incorporó aquí el trabajo que durante una estancia breve realizó un investigador mejicano para investigar mecanismos moleculares de dolor trigeminal (relativos a un receptor de serotonina) dentro del presente Proyecto.
3. Estudio de la dependencia de la ingesta precoz de soja de varios componentes fenotípicos intrínsecos a la neuropatía, como son la extravasación plasmática por inflamación neurogénica y la alodinia mecánica.
4. Estudio de las reducciones en la expresión de GABA y Glicina en los núcleos del trigémino y la corteza cerebral secundaria al tratamiento agudo con gabapentina (GP), en animales *naïve*, y en condiciones de CCI.

5. Desarrollo de un modelo de compresión percutánea del ganglio **trigeminal** en rata.
6. Estudio anatomofuncional de los cambios en circuitos y procesos inhibitorios en el núcleo caudal del trigémino en la neuropatía inducida por CCI.
7. Aplicación precoz de suplementos dietéticos de soja o derivados en cuadros clínicos seleccionados de dolor neuropático. Este objetivo fue suprimido por razones justificadas en el segundo semestre de desarrollo del proyecto. Entonces propusimos una alternativa a este Objetivo, para mantener en el Proyecto un componente traslacional. Planteamos así realizar una investigación con microscopía óptica y electrónica de nervios trigéminos en casos de pacientes que cumplieran las condiciones para ser intervenidos quirúrgicamente por neuralgia trigeminal incoercible y hubiera que realizar en ellos una extirpación parcial del nervio.

Resultados

A pesar de lo reducido del equipo investigador, se ha cumplido una gran parte de los objetivos inicialmente planteado, y se han abordado otros que surgieron durante el devenir del trabajo. Los hallazgos principales pueden agruparse por sus contenidos en los apartados siguientes:

1. *El ganglio trigémino en la rata. Estereología.*

Los ganglios trigeminales de las ratas están compuestos por dos tipos morfológicos básicos de neuronas: tipo A y tipo B, que son fácilmente identificables mediante la técnica de Nissl. En trabajos previos de nuestro grupo se describió un incremento del número de neuronas con la edad que aparecía en los machos entre los tres y los ocho meses. Existía una moderada variabilidad interindividual, pero sin asimetrías poblacionales de lado en el número de neuronas. Nuestros principales y más novedosos hallazgos aquí residen en haber observado un incremento en el número de neuronas ganglionares trigeminales entre las hembras de siete y veinte meses. Parece que este aumento afecta más a las neuronas tipo B. El incremento neuronal con la edad ya lo habíamos descrito previamente en machos entre los 3 y los 8 meses, y se relacionaba con el aumento de tamaño y peso. Aunque en las hembras no llega a duplicarse el número total de neuronas como en los machos, deben existir otros factores que regulen esta aparición de nuevas neuronas aparte del aumento de peso. El mecanismo por el que se produce este aumento neuronal se desconoce pero se piensa que podrían proceder de la diferenciación de precursores neuronales existentes en el ganglio trigeminal desde el nacimiento en forma de pool de células indiferenciadas. Además en este estudio hemos encontrado una disminución en el número total de neuronas ganglionares a partir de los dos años de vida en las ratas macho que parece afectar en mayor medida a las neuronas tipo B. Este fenómeno podría explicarse por una mayor vulnerabilidad de este tipo celular a los mecanismos fisiopatológicos típicos del envejecimiento.

2. *El ganglio trigémino en el ratón. Diseño de un método nuevo. Inmunocitoquímica y estereología.*

La identificación de tipos neuronales en el ganglio trigémino del ratón es bastante más difícil de realizar que en la rata. Por ello, como paso previo, diseñamos un procedimiento novedoso de realización sobre el mismo corte histológico de tinciones sucesivas con varios procedimientos inmunofluorescentes, seguidos por una tinción estándar de Nissl. Sobre las células reconocidas aplicamos recuentos y mediciones estereológicas apropiadas. Aunque aún no finalizado, este estudio nos ha convencido de la extrema dificultad de asignar a categorías discretas los tipos neuronales del ganglio trigémino (o los ganglios raquídeos) en ratones sobre la base de su tinción más estándar y generalizada con anilinas básicas (como las técnicas de Nissl). Existe un solapamiento mucho mayor del descrito por algunos autores en los tamaños celulares, contenido en neurofilamento, o expresión de ciertos péptidos relacionados con las neuronas implicadas en el procesamiento de la información dolorosa.

3. *Estudio estereológico del nervio injraorbitario en ratas adultas sometidas a lesión por constricción crónica (CCI) del nervio injraorbitario.*

Este estudio con microscopía óptica y electrónica nos permitió confirmar que la lesión más efectiva por CCI era aquella que ocasionaba un daño discreto del nervio, que no acarrearba pérdida detectable de fibras, y solo una alteración significativa en el grado promedio de mielinización (Fig 14). En los casos de mayor constricción, en cambio, se producía pérdida sustancial de fibras y notable desmielinización, pero el efecto conductual predominante fue de anestesia duradera de la zona, más que de alodinia o incremento de respuestas dolorosas.

4. *Dependencia de la ingesta precoz de soja de varios componentes fenotípicos intrínsecos a la neuropatía, como son la extravasación plasmática por inflamación neurogénica y la alodinia mecánica.*

En nuestro anterior Proyecto nos planteamos investigar en profundidad la propuesta, basada en unas observaciones entonces recientes, de que el consumo de una dieta que contuviera soja (como es la dieta habitual basada en el pienso estándar de los roedores) suprimía significativamente el desarrollo de alodinia e hiperalgesia en ratas tras una lesión en el nervio ciático, confirmándose así la existencia de una relación entre los procesos inflamatorios y la dieta. Pudimos confirmar lo que hasta ahora se había observado en estudios de nervio ciático respecto al descenso de los niveles de extravasación plasmática tras una CCI. Nuestros hallazgos, además de aportar datos sobre lo que ocurre en el sistema trigeminal a este respecto y confirmar también que la presencia de proteínas y grasa de soja en la dieta afecta a la expresión de alodinia mecánica tras una CCI, demostramos que la ausencia de soja en la dieta duplica los niveles de extravasación plasmática inducida por CAP en el modelo de CCI- IoN.

Sin embargo quedaban puntos aún no aclarados, relativos al equilibrio en el contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) omega-3 (como el ácido linolénico) y omega-6 (como el ácido linoleico) procedentes de la soja y el maíz. El problema es que los primeros se han asociado con una actividad antidolorosa y antiinflamatoria, pero los segundos se han demostrado estimulantes de genes y moléculas favorecedores de la inflamación. Por ello el papel de éstos en el control de la inflamación y el dolor prácticamente se había ignorado.

En nuestro estudio utilizamos una dieta comparativa en la que se aportaba un nivel muy reducido de PUFA omega-3, junto a una ausencia de omega-6. Nuestros hallazgos demostraron que la privación y desequilibrio de ingesta de PUFAs provocaba una alodinia en el territorio trigeminal más pronunciada y más precoz tras CCCI-IoN (contricción del nervio infraorbitario), con una más intensa extravasación plasmática (signo de inflamación en el territorio trigeminal) inducida por aplicación de capsaicina. Sin embargo, con el paso del tiempo (poco más de una semana adicional), los niveles de extravasación y alodinia se igualaban con ambos tipos de dieta.

5. *Mecanismos que pueden responder de la reducción en la expresión de GABA y Glicina en los núcleos del trigémino y la corteza cerebral secundaria al tratamiento agudo con gabapentina (GP), en animales naive, y en condiciones de CCI.*

Con este Objetivo, iniciado con el anterior Proyecto de la *FtmdAME* y motivo central de una Tesis Doctoral que finalizamos este mismo año, hemos completado un ambicioso estudio cuantitativo de los componentes neuronales de los núcleos sensitivos del trigémino, con particular énfasis en determinar las principales poblaciones destinadas a emitir conexiones a distancia (neuronas de proyección al tálamo y al cerebelo) y las interneuronas de circuito local (que expresan GABA y Glicina - ya publicadas por nosotros hace 4 años). Hemos demostrado además que ninguna de las primeras expresa los aminoácidos inhibidores GABA o Glicina. Asimismo demostramos que las interneuronas locales son particularmente afectadas cuando se tratan los animales con el fármaco antineuropático y neuromodulador gabapentina, cuando se introduce una compresión crónica moderada del nervio infraorbitario, o cuando se combinan ambas maniobras.

6. *Desarrollo de un modelo de compresión percutánea del ganglio trigeminal en la rata.*

En este Proyecto proseguimos el intento de reproducción en un modelo de rata del procedimiento de compresión del GT que se realiza en el tratamiento de la neuralgia del trigémino en algunos grupos de pacientes, y que iniciamos en las fases finales de ejecución del anterior Proyecto financiado por la *FundAME*. Los avances específicos actuales consistieron en provocar compresiones duraderas, pero reversibles (la sonda-balón solo consigue compresiones agudas, quirúrgicas), inyectando sustancias biocompatibles perdurables, como el hemostático *Surgiflo*, y el sellador pleural *Co-seal*. Además realizamos un más preciso seguimiento de la

inyección mediante fluoroscopia peroperatoria y resonancia magnética postquirúrgica.

7. *Estudio combinado anatomofuncional de los cambios en circuitos y procesos inhibitorios en el núcleo caudal del trigémino en la neuropatía inducida por CCI.*

A través de una colaboración estrecha con el laboratorio de neurofisiología celular dirigido por el Prof. Angel Núñez demostramos que, tras la constricción crónica del nervio infraorbitario (CCI-IoN), las neuronas del núcleo caudal del trigémino incrementaron considerablemente su actividad espontánea y aquella desencadenada por estímulos táctiles de la cara. Estudios detallados combinando pulsos de estimulación a diferentes intervalos de tiempo sugirieron que tal aumento de actividad se debía a una pérdida de mecanismos inhibitorios en el propio núcleo trigeminal. Esta conclusión se ratificó por la demostración mediante marcado inmunocitoquímico de GAD (descarboxilasa del ácido glutámico, la enzima que sintetiza GABA) y cuantificación densitométrica de ese marcado, que la CCI-IoN produce una disminución significativa de GAD particularmente en las regiones ventrolaterales del núcleo caudal, es decir, en la zona en que se representa el territorio facial de las vibrisas, inervado por el nervio comprimido (Fig 21).

8. *Análisis óptico y ultraestructural de la raíz trigeminal en casos clínicos de neuropatía trigeminal.*

La disponibilidad, en casos muy limitados y selectos, de material humano biopsico y/o necrópico de nervio trigémino en un Servicio de Neurocirugía (el del Dr. A. Lagares en el Hospital 12 de Octubre de Madrid), nos permitió plantear una investigación con microscopía óptica y electrónica de dichas muestras —si se obtuvieran— para probar hipótesis planteadas en la literatura sobre la génesis de la neuralgia trigeminal. Hasta el momento hemos estudiado dos casos, con etiologías distintas, uno por compresión tumoral benigna crónica, y el otro sin lesión aparente por imagen o perquirúrgica. En ambos se obtuvo una biopsia de la raíz, que mostró dis- y desmielinización e infiltración por colágeno o fibrosis.