

EXPRESIÓN DE CGRP EN LA ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR ¹

**Dr. Javier Caviedes Bucheli²
Dra. Diana Marcela Medina Buitrago³**

Agradecimientos a COLCIENCIAS, por su apoyo institucional para el desarrollo y la financiación de esta investigación

¹ Trabajo de investigación avalado por COLCIENCIAS “Evaluación de la expresión de CGRP en el tejido retrodiscal hiperplásico de la Articulación Temporomandibular”.

² Odontólogo, Cirujano Oral y Maxilofacial Pontificia Universidad Javeriana, Magíster en Bioquímica, Profesor Asociado de la Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia. Investigador principal.

³ Odontóloga, Cirujana Oral y Maxilofacial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia. Coinvestigadora.

RESUMEN

ANTECEDENTES: Los *Neuropéptidos* como el *péptido relacionado con el gen de la calcitonina*, se relacionan con el desarrollo y la progresión de la *enfermedad degenerativa articular*. Estudios previos mostraron su rol en la respuesta vascular y nociceptiva en *artritis*, y su papel modulador en la hiperalgesia y *dolor* de tipo artrítico. Su presencia se comprueba en el líquido sinovial de *articulación temporomandibular*.

OBJETIVO: Evaluar la presencia y el contenido del *péptido relacionado con el gen de la calcitonina* en el tejido retrodiscal hiperplásico de la *articulación temporomandibular* en pacientes con *enfermedad degenerativa articular* mediante radio-inmunoensayo.

MÉTODOS: 8 pacientes de sexo femenino (15 articulaciones), premenopáusicas, no embarazadas ni lactando por un año, fueron diagnosticadas con *enfermedad articular degenerativa (osteoartrosis)*. Se registraron niveles de *dolor* con escala visual análoga, donde 0 es ausencia de *dolor* y 16 *dolor* agudo; se clasificó una *degeneración ósea* entre leve, moderada y severa, de acuerdo con hallazgos de resonancia nuclear magnética. Las pacientes fueron sometidas a cirugía abierta de *articulación temporomandibular*, donde se tomaron muestras. Los especímenes se colocaron en bloques plásticos con medio congelante y se almacenaron a -70°C hasta la extracción del *neuropéptido* por *radioinmunoensayo* con el estuche para el *péptido relacionado con el gen de la calcitonina*.

RESULTADOS: Se estableció una relación directamente proporcional entre el grado de *degeneración ósea* y expresión del *neuropéptido* y entre la clasificación de *osteoartrosis* con la escala visual análoga. Los hallazgos mostraron correlación definitiva entre niveles de *dolor* y expresión del *neuropéptido*.

CONCLUSIONES: El *péptido relacionado con el gen de la calcitonina* se expresa en el tejido retrodiscal de *articulación temporomandibular* en humanos con *enfermedad degenerativa articular* se relaciona directamente con niveles de *osteoartrosis* y *dolor*.

PALABRAS CLAVE: *Neuropéptidos, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, artritis, articulación temporomandibular, osteoartrosis, dolor, radioinmunoensayo.*

ÁREA TEMÁTICA: Enfermedad articular degenerativa, degeneración ósea

ABSTRACT

BACKGROUND: *Neuropeptides* such as *calcitonin gene-related peptide*, are considered mediators and modulators of *degenerative joint disease*. Previous studies have demonstrated the role of *calcitonin gene-related peptide* in the vascular and nociceptive response in the *arthritic process*, as well as a modulatory role for arthritic *pain* and hyperalgesia, verifying its presence in *temporomandibular joint* synovial fluid.

PURPOSE: Evaluate the expression of *calcitonin gene-related peptide* in hyperplastic retrodiscal *temporomandibular joint* tissue from patients with *degenerative joint* disease by radioimmunoassay.

METHODS: 8 female pre-menopausal patients (15 joints), non pregnant or lactating for a year, were diagnosed with *degenerative temporomandibular disease (osteoarthritis)*. Visual analog scale measures for *pain* were registered, where 0 was the absence of *pain* and 16 was acute *pain*. Magnetic resonance imaging classifications for the *degenerative temporomandibular disease* were also registered as mild, moderate or severe. The patients underwent *temporomandibular joint* open surgery, at which time the specimens of hyperplastic retrodiscal tissue were harvested. The specimens were placed on mounting blocks with freezing solution and stored at -70°C until *neuropeptide* extraction by radioimmunoassay with a *calcitonin gene-related peptide* kit was performed.

RESULTS: *Degenerative disease* classification was found to be directly proportional both to *calcitonin gene-related peptide* expression and visual analog scale. Findings of this study demonstrate a strong relation between *pain* reports and *calcitonin gene-related peptide* concentration.

CONCLUSIONS: *Calcitonin gene-related peptide* is detectable from the hyperplastic retrodiscal tissue of human *temporomandibular joints* with degenerative joint disease and its presence is directly related to *osteoarthritis* levels and particularly with high levels of *pain*.

KEY WORDS: *Neuropeptides, calcitonin gene-related peptide, arthritis, temporomandibular joint, osteoarthritis, pain, radioimmunoassay.*

THEMATIC FIELD: Degenerative articular disease, osseous degeneration.

INTRODUCCIÓN

En el sistema nervioso se encuentran sustancias implicadas en la regulación de la transmisión nerviosa, denominadas neurotransmisores.^{1,2} Los **neurotransmisores** son sustancias químicas que se encuentran en el sistema nervioso y están implicadas en la transmisión de estímulos. Las principales categorías de neurotransmisores incluyen acetilcolina, aminas biogénicas, unos pocos aminoácidos y un gran número de péptidos. Todos los neurotransmisores tienen bajo peso molecular y son compuestos hidrosolubles sintetizados a partir de moléculas precursoras. Los aminoácidos y péptidos se forman finalmente a partir de glucosa circulante. Se sintetizan en el cuerpo celular y son transportadas a través de los axones. La neurotransmisión se lleva a cabo entre células adyacentes, mediante la liberación de éstas sustancias, por las terminaciones nerviosas luego del estímulo neuronal. Estas sustancias son básicamente polipéptidos que actúan como moduladores del impulso nervioso.³

En relación con su biosíntesis y transporte, en el soma de la neurona hay un gen que es transcrito en una preproteína precursora del neuropéptido. Esta preproteína es procesada en el aparato de Golgi de la neurona, donde hay ciertas enzimas proteolíticas (peptidasas), que la cortan produciendo el polipéptido. Una vez que el neuropéptido se ha producido en el interior del soma de la célula, es transportado a través de las fibras de tubulina del axón de la neurona (transporte axónico) a la sinapsis de la terminación nerviosa, donde es almacenado o liberado por exocitosis y va a ejercer sus funciones uniéndose a receptores de alta afinidad, en ciertas células inflamatorias o puede ser inactivado y degradado por peptidasas endógenas.⁴

La lista de estos péptidos ha ido creciendo y ahora incluye más de 20 moléculas diferentes; entre ellas, se encuentra el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, (CGRP), que tiene su origen en el ganglio trigémino.

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina, es un neuropéptido que participa en la transmisión del sistema nervioso central y periférico. Está constituido por 37 aminoácidos constituidos como una sola

cadena, y fue producto de un procesamiento alternativo de la transcripción del núcleo del RNA por splicing alternativo primario del gen de la calcitonina en ratas.³ Su síntesis es diferente a como lo hacen los transmisores de molécula pequeña. No se forma en el citosol de las terminales presinápticas, sino que es sintetizado por los ribosomas del soma neural y forma parte de grandes moléculas de proteínas. Posteriormente, las moléculas de proteínas entran al retículo endoplasmático donde se ensamblan y después al aparato de Golgi, donde se producen dos cambios: la proteína se acorta por acción enzimática, liberando al neuropéptido, y luego es introducido en diminutas vesículas de transmisión por el aparato de Golgi que son trasladadas por corriente axonal y liberan su transmisor. Responden a potenciales de acción dependientes de calcio.⁵

Su importancia en el ser humano es controvertida. En su mayoría, no está distribuido al azar por el sistema nervioso, sino que se localiza específicamente en grupos separados de neuronas y se libera en vías nerviosas determinadas. Las vías nerviosas conducen información a lo largo de series complejas de neuronas unidas por sinapsis.⁵

CGRP se distribuye de manera extensa a lo largo del cerebro y la médula espinal. A menudo coexiste en la misma población de neuronas con otros neurotransmisores. En el sistema nervioso periférico, está presente en los ganglios sensoriales, almacenado frecuentemente junto con SP.⁵

Las células del ganglio trigémino son conocidas por su liberación de CGRP, la cual aumenta con una alta concentración de potasio en el medio. La administración intracerebroventricular de CGRP estimula el flujo simpático in vivo, aumentando los niveles de noradrenalina circulante y produce taquicardia y aumento de la presión sanguínea. Por esto es clasificado como un *"neuropéptido"*.⁶

El CGRP circula en el plasma humano y es liberado por axones nerviosos perivasculares. Es un potente agente vasodilatador, por lo cual tiene efectos cardíacos notables. También actúa como modulador de algunas funciones de los macrófagos, incluyendo la presentación antigénica in vitro, lo cual indica que tiene efectos sobre el proceso inflamatorio.⁶

La respuesta del péptido relacionado con el gen de la calcitonina está involucrada en la liberación de histamina, lo cual aumenta la permeabilidad vascular.⁶ El CGRP provee un componente neurogénico que actúa sinérgicamente con otros mediadores en la producción de hiperemia inflamatoria, caracterizada por edema local y aumento en la permeabilidad microvascular.⁶

Con el descubrimiento de los neuropéptidos involucrados en la inflamación, se encontró una estrecha relación entre el sistema vascular y el nervioso por lo cual se dio origen al término **inflamación neurogénica**, el cual describe los cambios patológicos en la relación neurovascular como resultado de la inflamación.⁷

Las enfermedades articulares degenerativas de la articulación temporomandibular son entidades que actualmente predominan en su mayoría en la población femenina. Son causantes del dolor crónico de la articulación temporomandibular, que constituye un frecuente motivo de consulta para los profesionales en el área de odontología, neurología, otorrinolaringología y cirugía maxilofacial. El profesional de la salud puede verse en situaciones comprometedoras ante este tipo de patologías, ya que ningún tratamiento parece resolver la causa del dolor. Las superficies articulares sanas no pueden producir ningún estímulo doloroso, lo cual nos lleva a investigar el origen del dolor persistente en esta área, aún después del alivio mecánico de las fuerzas inadecuadas en la articulación, ya sea de manera quirúrgica o mediante el uso de otra terapéutica. Generalmente, el dolor en la articulación temporomandibular se manifiesta secundario a diversos procesos patológicos como desórdenes de la relación cóndilo-disco, sinovitis, capsulitis, retrodisquitis y osteoartritis.⁸

La **osteoartritis** (OA), es una enfermedad degenerativa de las articulaciones sinoviales, asociada a menudo con cambios inflamatorios menores, debida a una alteración primaria del cartílago. El término *osteartritis* es el nombre clásico de la enfermedad. El término **osteoartrosis** enfatiza la naturaleza degenerativa de la enfermedad. La enfermedad puede afectar articulaciones de la línea media así como periféricas. Es la forma más común de artritis, y la enfermedad afecta a alrededor de un 20 % de la población, con una proporción mujer-hombre de 2:1.⁹

El dolor es el síntoma común de presentación. Normalmente es más un dolor moderado que un dolor agudo, a menudo de carácter profundo, molesto. En la osteoartritis, los ruidos articulares constituyen una queja común. Estos ruidos, referidos como crepitaciones, usualmente se originan por contacto entre sí de articulaciones desgastadas. Los signos principales incluyen limitación del movimiento, tumefacción, deformidad y crepitación.⁹

La osteoartritis es lentamente progresiva. Una vez afectadas por el proceso degenerativo, las articulaciones no vuelven a una situación normal, aunque puede haber una mejoría sustancial con el

tratamiento o una mejora espontánea. La mayor molestia clínica para el paciente se debe a la afectación de las articulaciones que soportan peso. Los cambios radiológicos se explican en forma de los efectos del adelgazamiento y eventual desaparición del cartílago articular además de los cambios de compensación en el hueso subarticular. También es factible observar pérdida del espacio articular, irregularidad de la superficie articular, esclerosis del hueso adyacente, osteofitos y quistes subarticulares.⁹

Cuando los receptores nerviosos son sometidos a fuerzas de compresión mayores a las fisiológicas, hay liberación de sustancias químicas que van a producir un aumento en la percepción dolorosa. En los casos de osteoartritis, se observa que hay cambios adaptativos por remodelación en el tejido fibroso, al igual que en el óseo, por un cambio en las fuerzas mecánicas a este nivel, al igual que cambios a nivel inmunológico y de lubricación que exponen al tejido óseo, altamente vascularizado e innervado, a la acción de sustancias analgésicas y desencadenando con ello un aumento del dolor.

El tejido retrodiscal hiperplásico de la articulación temporomandibular, ha llamado la atención de clínicos e investigadores por su posible rol en los síntomas dolorosos asociados con desplazamientos del disco.^{10,11,12} Es una de las variantes artroscópicas más comúnmente encontradas en ATMs con procesos degenerativos de osteoartrosis, ya que ocasiona redundancia del tejido debido a su proliferación excesiva, adhesiones, limitación del movimiento y en general, disminución del espacio articular posterior. La contribución del sistema nervioso a la fisiopatología de entidades como la artritis reumatoidea ha sido atribuida a la intervención de ciertos neuropéptidos. Entre ellos, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina, es considerado modulador de la enfermedad articular inflamatoria.¹³

Las primeras evidencias de la presencia del neuropéptido CGRP y de otros como la neurokinina A (NKA), la sustancia P (SP), el neuropéptido Y (NPY) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), en el fluido sinovial de la articulación temporomandibular en humanos, fueron publicadas en un estudio realizado en 1991.¹⁴ Por medio de técnicas de radio-inmuno-ensayo sobre artroscopias previamente realizadas, se comprobó la presencia de todos los péptidos, en diferentes concentraciones en las diversas articulaciones (19 en total).

Se han encontrado también altas concentraciones de CGRP en el fluido articular asociado con dolor, limitación del movimiento mandibular y signos oclusales de destrucción de la ATM en pacientes con artritis reumatoidea.¹³

Existe evidencia clara sobre el rol de los neuropéptidos en el desarrollo de la artritis. El líquido sinovial de articulaciones temporomandibulares artríticas en pacientes con artritis reumatoidea, fue estudiado en 1991, estableciendo bases de comparación con las concentraciones de estos neuropéptidos en plasma sanguíneo. Los neuropéptidos CGRP, SP, NKA y NPY, fueron encontrados en el líquido sinovial en concentraciones significativamente más altas que las registradas en el plasma. Las concentraciones de CGRP demostraron ser las más altas y las de SP las más bajas.¹⁵

La presencia de inmunoreactividad a neuropéptidos en el líquido sinovial se ha correlacionado con la temperatura intra-articular (IAT) y con los niveles de dolor de la ATM. Se ha comprobado que en el fluido articular de articulaciones temporomandibulares artríticas, los niveles de CGRP y otros neuropéptidos exceden aquellos en plasma.¹⁶ Esto es una clara indicación de una liberación local de neuropéptidos.

Considerando que la concentración de neuropéptidos en la sangre es muy baja, la contribución de éstos en la circulación sanguínea al líquido sinovial es despreciable. La mayor parte de los neuropéptidos en el líquido sinovial es de origen neuronal.¹⁷ Es posible encontrar una conexión entre la actividad del sistema nervioso, la liberación de neuropéptidos y la patofisiología de la artritis por lo cual se sugiere a los neuropéptidos como los mediadores neurogénicos en los mecanismos neurales locales involucrados en el proceso inflamatorio.

La presencia de CGRP en el líquido sinovial de la articulación temporomandibular en humanos ha sido comprobada.¹⁸ No existen actualmente estudios que confirmen su existencia a nivel del tejido hiperplásico retrodiscal de la ATM en humanos con patologías articulares degenerativas. De comprobarse una relación significativa entre las concentraciones de neuropéptidos y la severidad de la enfermedad inflamatoria de la ATM, esta correlación podría ser de gran valor en el diagnóstico y evaluación del tratamiento de los síntomas y enfermedades de la ATM.

El propósito de este estudio fue evaluar la expresión de CGRP por medio de radioinmunoensayo en el tejido retrodiscal hiperplásico de la ATM de pacientes con enfermedades articulares degenerativas,

observando la correlación de la presencia de CGRP con niveles de dolor y clasificación de osteoartritis con respecto a los hallazgos en la resonancia nuclear magnética (RNM).

MATERIALES Y MÉTODOS

La población del estudio comprendió 8 pacientes de género femenino en estado de premenopausia, entre los 20 y los 45 años de edad, quienes no se encontraban en estado de embarazo ni habían estado lactando por un intervalo de 1 año. El criterio de inclusión primario para este estudio fue que las pacientes sufrieran de enfermedades articulares degenerativas de la ATM. Estas pacientes asistían a consulta particular por dolor crónico de la articulación temporomandibular.

La muestra comprendió 15 especímenes de tejido retrodiscal hiperplásico tomados de la ATM de estos pacientes durante cirugía abierta de la ATM.

Las variables del estudio incluían:

- Niveles de dolor: Registrados en una escala visual análoga.
- Niveles de degeneración: Mediante clasificación OA según RNM.
- Evaluación de la expresión de CGRP en el espécimen.

Se procedió a clasificar el nivel de osteoartritis (OA) para cada paciente, de acuerdo con Larheim y Westesson, según lo observado en la resonancia nuclear magnética, de la siguiente manera:

- Nivel 1: OA leve. Señal brillante con densidad homogénea.
- Nivel 2: OA moderada. Disminución en la densidad de la señal, patrón edematoso.
- Nivel 3: OA severa. Disminución en la densidad de la señal, patrón de esclerosis, edema o combinado.

Esta clasificación se basó en observar las anomalías en la médula ósea del cóndilo mandibular, con base en estudios previos de resonancia magnética, que indican que la mayoría de articulaciones temporomandibulares con anomalías en la médula condílea presentan osteoartritis.¹⁹

Se utilizó una escala visual análoga de 0 a 16, de acuerdo con los reportes de Wahlund, List y Dworkin, que estaban basados en estudios previos de Seymour y Simpson, donde 0 en la escala significa la ausencia de dolor y 16 significa la presencia de dolor agudo.²⁰

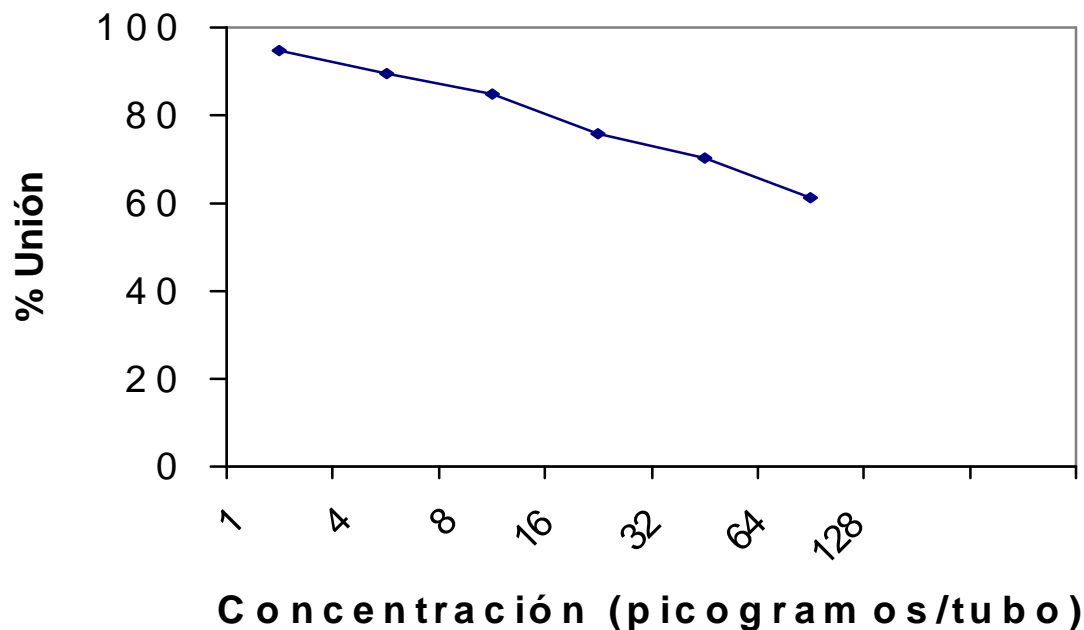
Los especímenes de tejido retrodiscal hiperplásico, fueron disecados intraoperatoriamente durante el procedimiento al que fueron sometidos los pacientes, que consistió en cirugía abierta de ATM; luego de la cual fueron lavados con solución salina estéril y congelados inmediatamente en hielo seco. Se colocaron en bloques plásticos con medio congelante del tipo OCT y se mantuvieron a -70°C en el congelador del Centro de Investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia, hasta la extracción del neuropéptido.

Para la extracción del neuropéptido se descongelaron los tejidos y se registró el peso de cada muestra por medio de una balanza analítica. Previo a la realización de la prueba de radio-inmunoensayo, se realizó la preparación de los tubos, recubriéndolos de albúmina con leche entera al 3 % por 1 hora a 37°C , para evitar la adhesión de los péptidos a las paredes del tubo. Los tubos fueron luego marcados y colocados en gradillas para la realización del ensayo. También se procedió a realizar la dilución de ácido acético 0,5 molar para reconstituir las muestras.

La expresión de CGRP se determinó con el estuche de radioinmunoensayo (RIA), (Phoenix Pharmaceuticals para CGRP Ref RK-015-02, Phoenix, Estados Unidos) realizando el radioinmunoensayo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se registraron los resultados y se calcularon las concentraciones finales de las muestras de la curva estándar en picogramos (pg), que corresponden a 10^{-12} gr (gráfica 1).

Gráfica 1 Radioinmunoanálisis CGRP Curva Estándar



Esta investigación fue regida por las disposiciones legales de acuerdo con el Ministerio de Salud en su Resolución No. 008430 de 1993, donde estipula en el TÍTULO II, Numeral 1, “ De La Investigación en Seres Humanos”, Capítulo I, De Los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos. Se obtuvo consentimiento informado de cada uno de ellos, luego de explicar las condiciones del estudio y de su aceptación voluntaria.

Análisis primario de las variables

- Con la escala visual análoga se evaluaron de modo subjetivo los niveles de dolor para determinar si existía relación entre estos niveles y la expresión de CGRP. El estudio esperaba verificar que los mayores valores de VAS coincidieran con mayor expresión de CGRP.
- La evaluación de la resonancia magnética nuclear pretendió clasificar la enfermedad articular degenerativa y establecer posibles asociaciones a CGRP, esperando que pacientes con mayores niveles de OA tuvieran mayor expresión de CGRP.

- La cuantificación de la expresión de CGRP en cada espécimen, pretendió comprobar la presencia de CGRP en el tejido retrodiscal hiperplásico de la ATM.

La información se recolectó en una tabla que incluía el número de la muestra, el peso del espécimen, la clasificación de OA para cada paciente, los registros de escala visual análoga para dolor y el análisis cuantitativo de la expresión de CGRP en cada muestra (tabla 1).

Tabla 1. Resultados finales

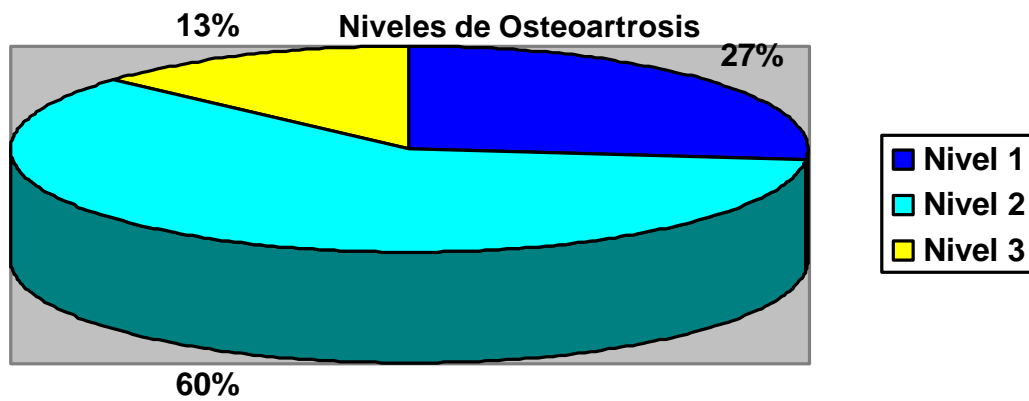
No	Peso Esp (gm)	Clasificación OA según RNM (1-3)	VAS (0-16)	CGRP (pg)
1	0.038	2	11	5.501
2	0.033	1	2	-
3	0.030	3	13	8.375
4	0.036	2	8	3.727
5	0.037	2	7	3.166
6	0.038	2	9	2.588
7	0.040	1	5	1.933
8	0.040	2	7	2.726
9	0.038	2	11	6.952
10	0.038	1	6	3.464
11	0.038	1	3	-
12	0.036	2	10	6.594
13	0.040	2	8	2.926
14	0.038	3	15	4.822
15	0.040	2	9	4.105

El análisis de la información se hizo mediante un análisis univariado donde se observaron cálculos de frecuencia, medidas de posición o tendencia central y medidas de variabilidad o dispersión y un análisis bivariado, en que se establecieron relaciones entre las variables por medio de pruebas de hipótesis con estadística no paramétrica (Chi cuadrado y Kruskal-Wallis).

RESULTADOS

En el análisis univariado de la variable osteoartrosis, se observa que predomina el nivel 2 de degeneración ósea, con un 60 % (9) de las muestras, lo cual establece una **moda** para esta variable en particular (gráfica 2).

Gráfica 2

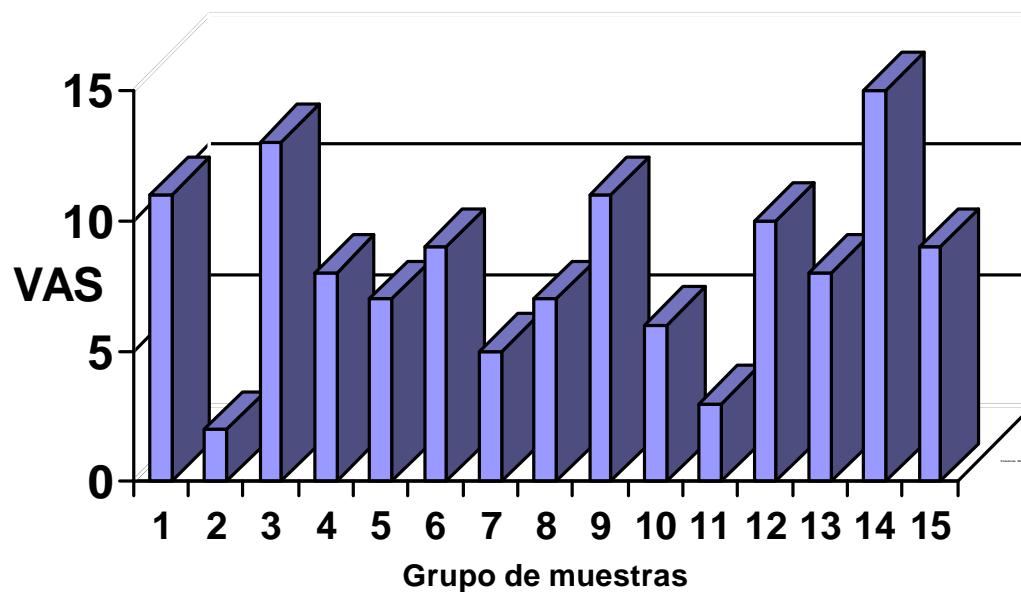


Al analizar la variable escala visual análoga, no se observa prevalencia de un valor sobre los demás. Sin embargo, un 73% de las muestras presentan valores iguales o superiores a 7. Esto es consistente con

estudios previos que comprueban una relación entre niveles de dolor y enfermedad articular degenerativa ²¹ (gráfica 3).

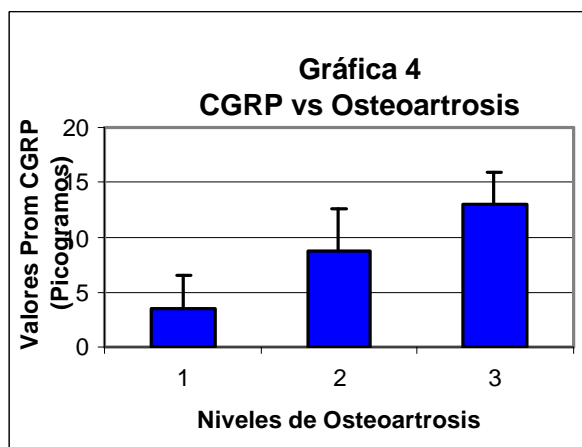
Gráfica 3

Valores de VAS



El análisis bivariado entre dos variables de tipo cualitativo, osteoartritis y escala visual análoga, se llevó a cabo mediante una prueba de Chi cuadrado. En esta prueba, $p < 0.05$, con un valor de 0.0028, lo cual permite establecer una asociación estadística entre estas dos variables.

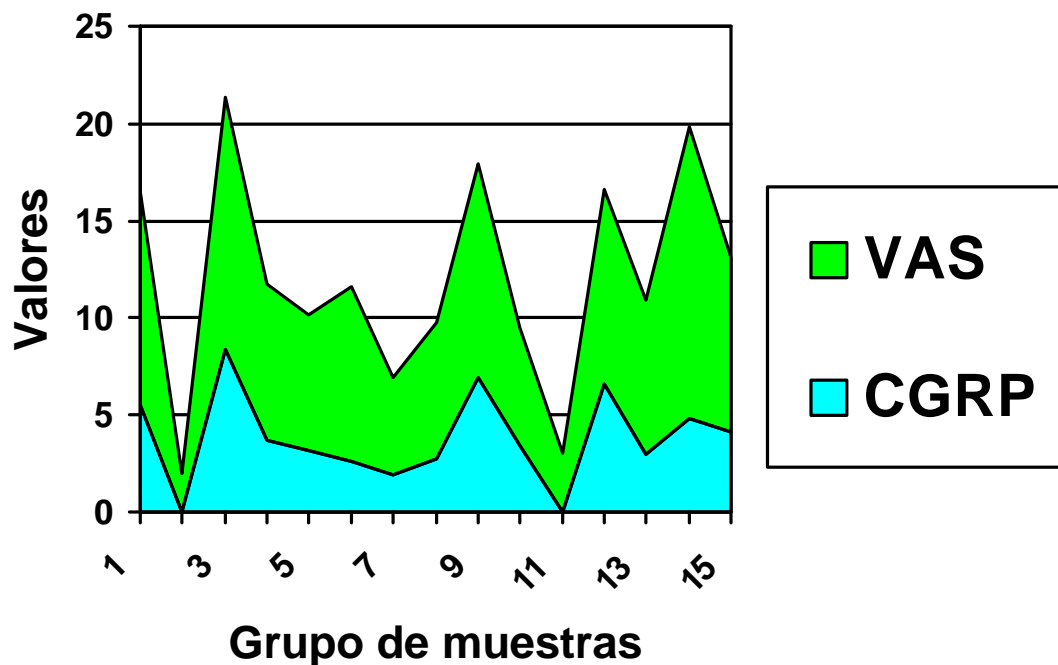
Las asociaciones estadísticas de osteoartritis (variable cualitativa) con los valores registrados por el RIA para CGRP (variable cuantitativa) se hicieron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, según la cual el nivel de significancia para un porcentaje de error del 5 % con dos grados de libertad (según el tamaño de la muestra) es de 5.991 (X^2), tomando como referencia la tabla de Chi cuadrado. El valor obtenido para H fue de 6.905. De acuerdo con esta prueba estadística, H debe ser $> X^2$ para rechazar la hipótesis nula. Esta condición se cumple para CGRP, por lo cual es factible afirmar que existe una relación entre niveles de OA y CGRP (gráfica 4).



La prueba de Kruskal-Wallis también se utilizó para realizar el análisis estadístico de la expresión del neuropéptido CGRP reportado por RIA, con los valores de escala visual análoga establecidos por los pacientes. Para la realización de la prueba de Kruskal-Wallis, se establecieron tres escalones en la escala visual análoga de 1 a 5 dolor leve, de 6 a 10 dolor moderado y de 11 a 16 dolor severo. De acuerdo con el número de grupos (3), se establecen 2 grados de libertad en los que X^2 para $p < 0.05$ es de 5.991, tomando como referencia la tabla de Chi cuadrado. H debe ser $> X^2$ para rechazar la hipótesis nula. El valor obtenido para H fue de 10.425. Nuevamente, $H > X^2$ para CGRP lo cual permite establecer una relación entre valores de escala visual análoga y CGRP (gráfica 5).

Gráfica 5

Gráfico de Area de Valores de CGRP Comparados con valores de Escala Visual Analoga



DISCUSIÓN

Neuropéptidos como CGRP, SP, NKA, VIP y NPY están directamente involucrados en la inflamación neurogénica de la articulación temporomandibular, lo cual ha sido comprobado por estudios previos realizados en la ATM de pacientes con procesos artríticos degenerativos.^{14,18}

Los estudios realizados se han enfocado en la cuantificación de estos péptidos a nivel del líquido sinovial y se ha comprobado que los niveles en el fluido articular de ATMs artríticas, exceden aquellos en plasma.¹⁵

En la revisión de la literatura, no se encontraron estudios realizados sobre el tejido retrodiscal hiperplásico. Esto podría deberse tanto a la dificultad en la extracción del neuropéptido de tejidos fibro-óseos, como a dificultades en la disección y diferenciación de los componentes de la cápsula articular.²²

Se tomó como objeto de estudio el tejido retrodiscal hiperplásico por su clara asociación con procesos inflamatorios en la articulación temporomandibular. Estudios previos han comprobado alteraciones vasculares y de lubricación a este nivel, que dan inicio a un ciclo de deterioro del tejido seguido de intentos de reparación que causan deformación permanente del disco y el cartílago.^{10,11,12}

El tejido retrodiscal es una de las variables artroscópicas más comunes en ATM con procesos degenerativos de osteoartritis. Ocasiona disminución del espacio articular posterior y limitación del movimiento debido a la presencia de adhesiones y a su proliferación excesiva.

Las alteraciones de la intensidad de la señal en este tejido según imagenología con resonancia magnética nuclear, también han sido evaluadas y confirman una asociación directa entre el dolor y el aumento de la intensidad de la señal del tejido retrodiscal hiperplásico.^{23,24}

El objetivo de este estudio fue establecer la presencia y el contenido neuropeptídico en el tejido retrodiscal hiperplásico de pacientes con patologías articulares degenerativas pre-existentes de la ATM, con el fin de conocer su posible relación con osteoartritis y con niveles de dolor.

La asociación entre OA y neuropéptidos, se documentó en estudios anteriores donde se relacionó OA con expresión neuropeptídica y se comprobó un aumento de la expresión en pacientes con enfermedad inflamatoria articular de tipo OA, gota y artritis reumatoidea.²⁵

Investigaciones previas, comprobaron que los neuropéptidos están ampliamente relacionados con la transmisión del estímulo doloroso en las vías de la articulación temporomandibular.²⁶

La evaluación de las resonancias para clasificar el grado de OA, se hizo por un solo operador, lo cual disminuyó la variación inter-observador.¹⁹

La clasificación del dolor, se hizo mediante una escala visual análoga con valores tangibles para los pacientes, para evitar variaciones muy amplias debido al tamaño de la muestra. Aunque el registro de estos valores es completamente subjetivo, la escala visual análoga es una medición de aceptación universal, con ciertas limitaciones pero no por ello menos válida.²⁰

En cuanto al modelo experimental utilizado, se optó por seguir un protocolo en el cual se obtuvo una mayor extracción de neuropéptidos luego de hervir la muestra en ácido acético.²⁷ Este procedimiento inactiva la acción enzimática que podría ocasionar la degradación del neuropéptido.²⁷

No se usaron inhibidores de proteasa ya que estudios previos han comprobado que su uso no aumenta la recuperación de neuropéptidos inmunoreactivos.²⁷ La degradación neuropeptídica es dependiente de la temperatura, ocurre a velocidad mayor a 37°C que a 0°C. Por otra parte, los neuropéptidos endógenos son estables en plasma, a diferencia de los neuropéptidos sintéticos, que tienen una alta tasa de destrucción.⁴

Para cuantificar los neuropéptidos, se utilizó la prueba del radioinmunoanálisis, la cual es una de las técnicas más utilizadas para la cuantificación de sustancias de bajo peso molecular que estén en muy bajas concentraciones en los diferentes tejidos. Debido al tamaño reducido de estos péptidos, deben conjugarse a una proteína de mayor tamaño para producir una respuesta inmune. Por este motivo, los neuropéptidos sintéticos se pueden unir a proteínas como albúmina de suero bovino.⁴

La sensibilidad de detección de esta prueba es muy elevada. Tiene la capacidad de detectar neuropéptidos en concentraciones de fentomoles. Como los resultados del RIA producidos por el contador de radiación Gama son en cuentas por minuto, se utilizó el programa RIAPC que convierte las cpm en unidades como los picogramos (10^{-12} gr). Para la cuantificación de los valores en cada neuropéptido luego de la realización del RIA, se tomaron como referencia las curvas estándar de cada péptido.

Por medio de pruebas estadísticas como Chi cuadrado y Kruskal-Wallis se establecieron asociaciones entre las diferentes variables. Los resultados obtenidos mostraron una prevalencia de un nivel moderado de degeneración ósea en los pacientes así como de valores en la escala visual análoga por encima de 7. Mediante la realización de un prueba de Chi cuadrado, se verificó la asociación entre OA y niveles de VAS donde $p < 0.05$ con un valor de 0.0028. Esto confirma una relación directa entre estas dos variables, donde los pacientes con mayores niveles de degeneración ósea registraron niveles más altos de dolor. Esto es consistente con estudios anteriores donde se comprueba la asociación entre el dolor y los hallazgos de la resonancia magnética nuclear.²¹

Algunos de los valores reportados para CGRP fueron inferiores a 1. Es posible atribuir esto a la degradación neuropeptídica luego de la toma o durante el manejo y procesamiento de las muestras, cuando se encontraban a temperatura ambiente. Sin embargo, se comprobó la presencia del neuropéptido en diferentes concentraciones en la ATM, por lo cual el radioinmunoanálisis probó ser un método adecuado para calcular la concentración de neuropéptidos en tejido articular.

La prueba de Kruskal Wallis se utilizó para establecer asociaciones de OA y VAS con las concentraciones obtenidas de los diferentes neuropéptidos. Los resultados de este análisis comprueban una relación de niveles de OA con CGRP. Esto concuerda con reportes anteriores donde las concentraciones plasmáticas de CGRP, se encuentran aumentadas en pacientes con enfermedad articular degenerativa.¹³

La inmunoreactividad de CGRP prueba ser significativa según los resultados obtenidos en este estudio. Esto es consistente con estudios anteriores, donde la distribución de CGRP es extensa y se encuentra en mayor concentración.¹⁵ Probablemente se atribuya a que debido al gran tamaño de este neuropéptido, es más fácil su detección en la articulación temporomandibular.

CGRP parece necesitarse en grandes cantidades para potenciar los efectos de otros péptidos como SP que a su vez ejerce muchas de sus acciones en conjunto con la NKA. Vemos que existe un sinergismo entre estos péptidos, donde la presencia y función de uno de ellos modifica la actividad de los demás.

En cuanto a los reportes de VAS y su relación con la concentración neuropeptídica, el análisis de Kruskal Wallis estableció una correlación definitiva entre valores de VAS y CGRP. Estos resultados concuerdan con reportes previos donde la correlación de CGRP con VAS es positiva.¹³

Considerando su función vasodilatadora y los efectos directos de CGRP sobre el proceso inflamatorio, es factible relacionar la hiperemia y el edema local que caracterizan al tejido retrodiscal hiperplásico, con la presencia de CGRP confirmada con esta investigación. El aumento en la permeabilidad vascular posterior a la liberación de histamina inducida por CGRP da inicio a la inflamación neurogénica que ocasiona dolor y limitación del movimiento secundario a la proliferación celular en el espacio articular. El desarrollo de un proceso inflamatorio genera a su vez, la activación crónica de los mecanismos sensoriales, estimulando la síntesis de CGRP. La presencia de receptores inmunoreactivos a CGRP en

el tejido retrodiscal hiperplásico es, entonces, un factor decisivo en la cronicidad de los procesos inflamatorios que conducen a enfermedad articular degenerativa de la ATM.

Este trabajo confirma la presencia del péptido relacionado con el gen de la calcitonina en el tejido retrodiscal de la ATM en humanos con patología articular degenerativa. Se establecen asociaciones directas entre OA y VAS y se correlaciona la actividad de CGRP con mecanismos de dolor y degeneración. Los hallazgos obtenidos mediante esta investigación, son un paso importante en el conocimiento de la neurofisiología del dolor en la articulación temporomandibular.

CONCLUSIONES

Por medio de este trabajo, se comprueba la expresión del péptido relacionado con el gen de la calcitonina en el tejido retrodiscal hiperplásico de la ATM en humanos con patologías articulares degenerativas.

Las concentraciones de CGRP se correlacionaron de manera directa con niveles de osteoartritis.

La escala visual análoga fue consistente con las concentraciones de CGRP obtenidas con esta investigación.

Los resultados de esta investigación verifican la asociación de niveles de dolor en la articulación temporomandibular con grados de degeneración ósea.

BIBLIOGRAFIA

1. Barr M, Kiernan J. *El Sistema Nervioso Humano*. 5ª ed. México: Harla, 1994; 25-29
2. Waxman S, deGroot J. *Neuroanatomía correlativa*. 10ª ed. México: El Manual Moderno, 1997; 31-39
3. West J. *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica*. 12ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1997; 1257-60
4. Pernow B. *Substance P*. *Pharmacological Reviews*, Apr 1983; 35(2):85-141

5. Bell D, McDermott B, *Calcitonin gene-related peptide in the cardiovascular system: Characterization of receptor populations and their (Patho) physiological significance*. Pharmacological Reviews, 1996; 48(2):253-288
6. Lundberg J. *Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide*. Pharmacological Reviews, 1996; 48(1):113-178
7. Rojas W. *Inmunología*. 11^a ed., Medellín: CIB, 1999; 64-65
8. Insignares S. *Dolores craneofaciales secundarios a desórdenes temporomandibulares*. Trib Odontol, 1992; 1(9): 41-3
9. Norman J, Bramley P. *Libro de texto y atlas en color de la Articulación Temporomandibular*. 1^a ed. Madrid: Mosby, 1993; 69-76
10. Kurita K, Westesson PL, Sternby N, Eriksson L, Carlsson LE, Lundh H, Toremalm NG. *Histologic features of the temporomandibular joint disk and posterior disk attachment: Comparison of symptom-free persons with normally positioned disks and patients with internal derangement*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1989; 67(6): 635-43
11. Hall M, Brown R, Baughman R. *Histologic appearance of the bilaminar zone in internal derangement of the temporomandibular joint*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1984; 58(4): 375-81
12. Isberg A, Isacson G, Johansson AS, Larson O. *Hyperplastic soft-tissue formation in the temporomandibular joint associated with internal derangement*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1986; 61(1): 32-38
13. Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. *Neuropeptides in the arthritic TMJ and symptoms and signs from the stomatognathic system with special consideration to rheumatoid arthritis*. J Orofacial Pain, 1995; 9(3): 215-25
14. Holmund A, Ekblom A, Hansson P, Lind J, Lundeberg T, Theodorsson E. *Concentrations of neuropeptides substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid of the human temporomandibular joint*. Int J Oral Maxillofac Surg, Apr 1991; 20(4): 228-31

15. Appelgren A, Appelgren B, Eriksson S, Kopp S, Lundeberg T, et al. *Neuropeptides in temporomandibular joints with rheumatoid arthritis: a clinical study.* Scand J Dent Res, Feb 1991; 99: 519-21
16. Appelgren A, Appelgren B, Kopp S, Lundeberg T, Theodorsson E. *Substance P- Associated increase of intra-articular temperature and pain threshold in the arthritic TMJ.* J Orofacial Pain, 1998; 12(2): 101-7
17. Carleson J, Bileviciute I, Theodorsson E, Appelgren B, Appelgren A, Yousef N, Kopp S, Lundeberg T. *Effects of adjuvant on neuropeptide-like immunoreactivity in the temporomandibular joint and trigeminal ganglia.* J Orofacial Pain, 1997;11(3): 195-9
18. Silva da Pereira JA, Carmo-Fonseca M, *Peptide containing nerves in human synovia: Immunohistochemical evidence for decreased innervation in rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 1990; 17:1592-9
19. Larheim TA, Westesson P-L, Hicks DG, Eriksson L, Brown DA. *Osteonecrosis of the temporomandibular joint: Correlation of magnetic resonance imaging and histology.* J Oral Maxillofac Surg, 1999; 57: 888-98
20. Wahlund K, List T, Dworkin SF. *Temporomandibular disorders in children and adolescents: Reliability of a questionnaire, clinical examination, and diagnosis.* J Orofacial Pain, 1998; 12(1): 42-51
21. Emshoff R, Innerhofer K, Rudisch A, Bertram S. *Relationship between temporomandibular joint pain and magnetic resonance imaging findings of internal derangement.* Int J Maxillofac Surg, 2001;30:118-22
22. Ahmed M, Bjurholm A, Srinivasan GR, Theodorsson E, Kreicbergs A. *Extraction of neuropeptides from joint tissue for quantitation by radioimmunoassay. A study in the rat.* Peptides, Jun 1993; 15(2): 317-22
23. Sano T, Westesson PL. *Magnetic resonance imaging of the temporomandibular joint.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1995;79:511-6
24. Westesson PL, Paesani D. *MR imaging of the TMJ.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1993;76:631-5

25. Hernanz A, De Miguel E, Romera N, Perez-Ayala C, Gijon J, Arnalich F. *Calcitonin gene-related peptide II, substance P and vasoactive intestinal peptide in plasma and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease*. Br J Rheumatol, 1993; 32(1): 31-5
26. Schiemann P, Platín JP. *Vías del dolor de la articulación temporomandibular*. Trib Odontol, 1992; 1(9):47-57
27. Awawdeh L, Lundy FT, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ, Kennedy JG. *A comparison of four extraction methods for substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide from human dental pulp tissue*. Archs Oral Biol., 1999; 44: 999-1004