



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud

INFLUENCIA DE LOS DESORDENES OCLUSALES EN LOS CAMBIOS DEGENERATIVOS DE LA ARTICULACION TEMPOROMANDIBULAR

Silvia del Cueto Blanco

Oviedo 2021

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud

INFLUENCIA DE LOS DESORDENES OCLUSALES
EN LOS CAMBIOS DEGENERATIVOS DE LA
ARTICULACION TEMPOROMANDIBULAR

Silvia del Cueto Blanco

Directores

José A. Vega Álvarez

Ángel Álvarez Arenal

Oviedo 2021



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: INFLUENCIA DE LOS DESORDENES OCLUSALES EN LOS CAMBIOS DEGENERATIVOS DE LA ARTICULACION TEMPOROMANDIBULAR	Inglés: INFLUENCE OF OCCLUSAL DISORDERS ON DEGENERATIVE CHANGES IN TEMPOROMANDIBULAR JOINT

2.- Autor	
Nombre: DEL CUETO BLANCO	DNº: [REDACTED]
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

Introducción: Los trastornos de la articulación temporomandibular (ATM; TATM) son un conjunto de afecciones musculoesqueléticas degenerativas asociadas con deformidades morfológicas y funcionales que clínicamente se manifiestan con dolor y disfunciones de la ATM (deterioro en la masticación, el habla y la expresión facial). Tienen prevalencia elevada y se estima que más del 40-50% de la población sufre diferentes patologías la ATM que requiere intervenciones terapéuticas por parte de diferentes especialistas médicos y paramédicos, y representa un deterioro social y psicosocial creciente. La etiología de los TATM es muy variable siendo las principales enfermedades inflamatorias o no inflamatorias degenerativas, es decir, osteoartritis o artrosis, respectivamente, y en su etiopatogenia interviene sobrecarga de las estructuras articulares debida a estrés fisiológico, ausencias dentarias interferencias dentarias o diferentes **tipos de maloclusiones**.

En la base de la osteoartritis se encuentran cambios degenerativos debidos a una pérdida gradual de la matriz extracelular (MEC) del cartílago, debido a disbalance entre los mecanismos que favorecen y la degradan. La degradación de la MEC, y por tanto del cartílago, participa una familia de enzimas, **metaloproteasas** de MEC (MMPs: matrix metalloproteinases) que son responsables de la destrucción del colágeno del cartílago.

En el presente trabajo de tesis doctoral se ha desarrollado un modelo de maloclusión en ratas para valorar la posible implicación de 3 MMPs en el desarrollo de la osteoartritis de ATM.

Hipótesis y objetivos: La **hipótesis de trabajo** de la presente tesis doctoral es: Los desórdenes oclusales que aumentan ligeramente la dimensión vertical unilateralmente inducen la aparición de alteraciones degenerativas/artrosis en la articulación temporomandibular. El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de la etiopatogenia de la osteoartritis de la articulación temporomandibular. Y los **objetivos específicos** son: 1) Evaluar si los desórdenes oclusales, como el aumento de la dimensión vertical unilateral que se puede generar de forma iatrogénica al realizar una rehabilitación protésica, una obturación o reconstrucción podrían inducir cambios de tipo degenerativo en el cartílago articular de la ATM; 2) Analizar y comparar los cambios en el cartílago articular y tejido subcondral del cóndilo mandibular provocados por los cambios oclusales, mediante resonancia magnética y estudio estructural; 3) Mostrar, cuantificar y comparar los posibles cambios en la expresión de las matriz metaloproteasas MMP-2, MMP-3, MMP-9 en el cartílago articular del cóndilo mandibular ocasionadas por los trastornos oclusales.

Material y técnicas. A. Material. El trabajo se realizó sobre 24 ratas hembra, de 8 semanas de

vida al comienzo de la experimentación. Todos los experimentos se realizaron en cumplimiento de la normativa vigente Ley del Principado de Asturias 13/2002, de 23 de diciembre (BOPA de 31-XII-2002) y del Consejo de Gobierno de la Universidad de Oviedo, acuerdo de 25 de junio de 2019 (BOPA de 23-VII-2019). Bajo anestesia con isofluorano por vía inhalatoria a un grupo de animales se les produjo una maloclusión unilateral (8 semanas de vida) añadiendo composite fotocurable a los tres molares superiores derechos de las ratas del grupo experimental. Este trastorno oclusal se mantuvo durante 16 semanas. **B. Técnicas.** Para valorar el efecto de la maloclusión derecha sobre la ATM del mismo lado y la contralateral se realizó a) **resonancia magnética nuclear** (Área de Imagen Preclínica, de los Servicios Comunes de Investigación de la Universidad de Oviedo); el equipo utilizado fue ARGUS PET-CT (SEDECAL, Algete, Madrid, España). b) **estudio histológico** estructural para determinar los cambios en los diferentes componentes de la ATM inducidos por la maloclusión. c) **estudio inmunohistoquímico** mediante la técnica de la peroxidasa indirecta para determinar la presencia de MMP2, MMP3 y MMP9; d) **estudios histométrico y densitométrico** para establecer el área ocupada por la inmunorreacción y la intensidad de la misma. e) análisis estadístico de los resultados.

Resultados y conclusiones. El estudio mediante resonancia magnética nuclear (RMN) realizado demostró que en los animales del grupo experimental, a las 16 semanas de vida, se produce un estrechamiento de espacio articular en ambas ATMs. Por otro lado, se apreciaron evidencias de derrame articular en ambas ATM. Además, en el grupo experimental se encontraron aplanamiento de la cabeza del cóndilo en la ATM derecha, 1/4 otras alteraciones en ambas ATMs y 1/4 una alteración de tipo bulboso, así como aplanamiento del disco articular. En cuanto al estudio estructural, se objetivó, en el grupo experimental, en la ATM del lado del resalte, se encontró engrosamiento de los cartílagos articulares y del disco articular. Ello se acompañó de una reducción en el número de células y aumento del área ocupada por las tres enzimas analizadas (MMP2.MMP-3 y MMP-9) y en la intensidad de inmunorreacción de las mismas. En conjunto los datos sugieren que la creación de resalte y maloclusión creada lleva a una situación de osteoartritis en la ATM homolateral y en menor medida en la contralateral.

RESUMEN (en Inglés)

Introduction: Disorders of the temporomandibular joint (TMJ; TMJD) are a set of degenerative musculoskeletal conditions associated with morphological and functional deformities that clinically manifest with pain and dysfunctions of the TMJ (impairment in chewing, speech and facial expression). They have a high prevalence, and it is estimated that more than 40-50% of the population suffers from different TMN pathologies that require therapeutic interventions by different medical and paramedical specialists. Consistently, TMJD represent a growing social and psychosocial deterioration. The etiology of TMJDs is highly variable, being the main inflammatory or non-inflammatory degenerative diseases, that is, osteoarthritis or osteoarthritis, respectively, and in their etiopathogenesis involves overload of joint structures due to physiological stress, dental absences, dental interferences or different types of **malocclusions**.

At the base of osteoarthritis are degenerative changes caused by gradual loss of the extracellular matrix (ECM) of the cartilage, due to imbalance between the mechanisms that favor and degrade it. The degradation of MEC, and therefore of cartilage, involves a family of enzymes, MEC **metalloproteases** (MMPs: matrix metalloproteinases) that are responsible for the destruction of cartilage collagen.

In the present doctoral thesis work, a model of malocclusion in rats has been developed to assess the possible involvement of 3 MMPs in the development of TMJ osteoarthritis.

Hypotheses and objectives: The working **hypothesis** of this doctoral thesis is: Occlusal disorders that slightly increase the vertical dimension unilaterally induce the appearance of degenerative alterations / osteoarthritis in the temporomandibular joint. The **general objective** of the study is to contribute to the knowledge of the etiopathogenesis of osteoarthritis of the temporomandibular joint. And the **specific objectives** are: 1) To evaluate whether occlusal disorders, such as the increase in the unilateral vertical dimension that can be generated iatrogenically when performing a prosthetic rehabilitation, a filling or reconstruction could induce degenerative changes in the articular cartilage of the TMN; 2) Analyze and compare changes in articular cartilage and subchondral tissue of the mandibular condyle caused by occlusal changes, by magnetic resonance imaging and structural study; 3) To show, quantify and compare the possible changes in the expression of the matrix metalloproteases MMP-2, MMP-3, MMP-9 in the articular cartilage of the mandibular condyle caused by occlusal disorders.

Material and Methods. A. Materials. The work was carried out on 24 female rats, 8 weeks old at the beginning of the experimentation. All experiments were carried out in compliance with the current regulations Law of the Principality of Asturias 13/2002, of December 23 (BOPA of 31-XII-2002) and the Governing Council of the University of Oviedo, agreement of June 25, 2019 (BOPA of 23-VII-2019). Under anesthesia with isoflurane by inhalation a group of animals had a unilateral malocclusion (8 weeks of life) adding photocurable composite to the three right upper molars of the rats of the experimental group. This occlusal disorder was maintained for 16 weeks. **B. Techniques.** To assess the effect of the right malocclusion on the TMN on the same side and the contralateral one, a) nuclear magnetic resonance (Preclinical Imaging Area, of the Common Research Services of the University of Oviedo) was performed; the equipment used was ARGUS PET-CT (SEDECAL, Algete, Madrid, Spain). b) structural histological study to determine the changes in the different components of the TMN induced by malocclusion. (c) immunohistochemical study using the indirect peroxidase technique to determine the presence of MMP2, MMP3 and MMP9; d) histometric and densitometric studies to establish the area occupied by the immunoreaction and its intensity. e) statistical analysis of the results.

Results and concluding remarks. The study of magnetic nuclear resonance imaging (MRI) carried out showed that in the animals of the experimental group, at 16 weeks of age, a narrowing of joint space occurs in both ATMs. On the other hand, there was evidence of joint effusion in both TMJs. In addition, in the experimental group, flattening of the head of the condyle in the right TMJ, 1/4 other alterations in both TMJs and 1/4 a bulbous type alteration, as well as flattening of the articular disc, were found. As for the structural study, it was objectivated, in the experimental group, in the TMJ on the side of the highlight, thickening of the articular cartilages and the articular disc was found. This was accompanied by a reduction in the number of cells and an increase in the area occupied by the three enzymes analyzed (MMP2, MMP-3 and MMP-9) and their immunoreaction intensity. Taken together, the data suggest that the creation of highlight and malocclusion created leads to a situation of osteoarthritis in the homolateral TMJ and to a lesser extent in the contralateral one.

DEDICATORIA

A mi hijo Alfonso:
Eres lo mejor de mi vida

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, el Prof. José Antonio Vega Álvarez y el Prof. Ángel Álvarez Arenal por darme esta oportunidad y confiar en mí.

Al Dr. Manuel González y la Dra. Isabel Álvarez por animarme a emprender este proyecto.

Al Prof. Serafín Costilla por su ayuda en la interpretación de las imágenes de radiodiagnóstico, así como a las técnicas Eva y Vanessa.

A Teresa Sánchez, Agustín Brea y al resto de personal del bioterio.

A Marta Sánchez Pitiot y sus compañeras por su trabajo en el procesado de las piezas, y los estudios de estructura e inmunohistoquímica.

A mi familia quiero agradecerle profundamente la educación que me ha dado.

A mi padre por responder a todas mis dudas, por su ejemplo, dedicación y por tener siempre su apoyo incondicional.

A mi madre por anteponerme a todo, por su disposición a ayudarnos de forma incansable.

A mis abuelos, Carlos y Ángela por transmitirme sus valores.

A mi abuela Teresa por enseñarme a luchar, superarme y mirar siempre hacia delante.

A mi abuelo Alfonso por el amor infinito que me transmitió. Sin sus arrestos, nada de esto hubiera podido ser.

Índice

1. INTRODUCCIÓN, **21**
2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA, **25**
 - 2.1. Anatomía e histología de la articulación temporomandibular, **27**
 - 2.1.1. Superficies articulares, **27**
 - 2.1.2. Anexos de las superficies articulares: disco articular, **29**
 - 2.1.3. Manguito cápsulo-ligamentoso y ligamentos extrínsecos, **29**
 - 2.1.4. Estructura de la composición de los cartílagos articulares y disco articular, **30**
 - 2.2. Patologías de la articulación temporomandibular: maloclusión, **32**
 - 2.2.1. Artrosis de la ATM, **33**
 - 2.2.1.1. Concepto Epidemiología, **33**
 - 2.2.1.3. Etiopatogenia, **33**
 - 2.2.1.4. Fisiopatología, **34**
 - 2.2.1.5. Estadios evolutivos de la artrosis de la ATM, **39**
 - 2.2.1.6. Clínica de la artrosis de la ATM, **39**
 - 2.2.1.7 Signos radiológicos de la OA de ATM, **40**
 - 2.2.1.8 Cambios histológicos de la artrosis, **43**
 - 2.2.2. Alteraciones oclusales y repercusión en la ATM, **43**
 - 2.2.3. Alteraciones oclusales y artritis de ATM. **45**
 - 2.2.3.1. Modelo animal de OA por alteración del plano oclusal
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS, **47**
 - 3.1. Hipótesis, **49**
 - 3.2. Objetivos, **49**
4. MATERIAL Y TÉCNICAS, **51**
 - 4.1. Animal de experimentación y diseño experimental, **53**
 - 4.1.1. Creación de la alteración oclusal, **53**
 - 4.1.2. Monitorización y seguimiento, **54**

4.1.3. Sacrificio,	55
4.2. Técnicas,	55
4.2.1. Estudios de imagen,	55
4.2.2. Estudios histológicos,	57
4.2.2.1. Estudios estructurales: hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson,	57
4.2.2.2. Estudios inmunohistoquímicos,	58
4.2.2.3. Estudio histométrico y de análisis de imágenes,	59
4.2.2.4. Análisis estadístico,	60
5. RESULTADOS,	61
5.1. Estudio de resonancia magnética,	63
5.2. Análisis estructural,	66
5.2.1. Controles de 4 y 24 semanas,	66
5.2.2. Experimentales de 24 semanas,	67
5.2.2.1. Lado con resalte,	68
5.2.2.2. Contralateral,	
5.3. Grosor del cartílago articular y del disco articular,	69
5.4. Expresión de las metaloproteasas de matriz extracelular 2 (MMP-2), 3 (MMP-3) y 9 (MMP-9),	70
5.5. Histometría,	71
5.6. Densitometría,	72
6. DISCUSIÓN,	75
6.1. Consideraciones generales,	77
6.2. Discusión de los resultados,	79
6.3. Limitaciones del estudio,	84
6.4. Futuras investigaciones,	84
7. CONCLUSIONES,	85
8. BIBLIOGRAFÍA,	87

ANEXOS

Anexo 1, **111**

Anexo 2, **113**

Anexo 3, **115**

1

Introducción

1 Introducción

Las disfunciones de la articulación temporomandibular (ATM) son una patología de prevalencia elevada que incluyen desde el dolor a la alteración funcional de la misma y de los músculos masticadores con gran detrimento de la calidad de vida. Se estima que más del 40-50% de la población sufre diferentes patologías la ATM (Manfredini et al., 2011; Gopal et al., 2014) que requiere intervenciones terapéuticas por parte de diferentes especialistas médicos y paramédicos, y representa un deterioro social y psicosocial creciente (De La Torre Canales et al., 2018).

Los trastornos de la ATM (TATM) son una clase de afecciones musculoesqueléticas degenerativas asociadas con deformidades morfológicas y funcionales que clínicamente se manifiestan con dolor y disfunciones de la ATM (deterioro en la masticación, el habla y la expresión facial) (ver para una revisión Murphy et al., 2013). El dolor es de tipo musculoesquelético y afecta la región orofacial, como los músculos masticatorios, la articulación temporomandibular y otras estructuras circundantes (Fernandes et al., 2018). Es persistente y surge en los huesos, las articulaciones y los tejidos (Booth et al., 2017). Los síntomas incluyen dolor de cabeza, neuralgia, dolor y malestar, sonidos de chasquido y espasmos musculares (Manfredini et al., 2011; Sims y Demerjian, 2018), que afectan la calidad de vida de los pacientes y las funciones diarias/laborales (Armijo-Olivo y Gadotti, 2015).

Además, cuando afecta a sujetos jóvenes durante el crecimiento puede causar asimetría del esqueleto facial (Roberts y Stocum, 2018). De acuerdo con la definición anterior, los TATM comprenden un grupo heterogéneo de patologías que involucran a la propia ATM, los músculos de la mandíbula asociados, o a ambos (Tanaka et al., 2008). Hasta el 40-50% de la población sufre disfunción témporo-mandibular (Gopal et al., 2014) y hasta el 70% padecen disfunción témporo-mandibular relacionada directamente con el disco articular (Manfredini et al., 2011).

La etiología de los TATM puede ser traumática, inflamatoria y congénita; sin embargo, los TAMT primarios son enfermedades inflamatorias o no inflamatorias degenerativas, es decir, osteoartritis o artrosis, respectivamente (Tanaka et al., 2008). Los cambios

osteoartríticos típicos incluyen alteraciones en la forma y el tamaño de los componentes de la ATM (fosa aplanada, eminencia articular reducida, disminución del volumen cónico y disco engrosado), abrasión del cartílago articular, y engrosamiento y remodelación del hueso subcondral que conduce a la deformidad y disfunción morfológica (Echevarría y Pumarola, 2008; Murphy et al., 2013).

Aunque la etiopatogenia de la artrosis de la ATM no es aún bien conocida, algunos estudios sugieren que la sobrecarga de las estructuras articulares puede desempeñar un papel clave en la misma (Levorová et al., 2016; Betti et al., 2018). Esta sobrecarga puede ser debida a estrés fisiológico (que induce hábitos parafuncionales orales conscientes o inconscientes que causan microtraumatismos de la articulación; Li et al., 2017), ausencias dentarias (Levorová et al., 2016), interferencias dentarias (Henderson et al., 2015) o diferentes tipos de maloclusiones (Jiao et al., 2009; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2016; Zheng et al., 2018; Wang et al., 2019).

Partiendo del hecho de que ciertos desórdenes oclusales inducen la aparición de alteraciones degenerativas/artrosis de la ATM, cabe pensar si el aumento de la dimensión vertical unilateral podría inducir cambios degenerativos en el disco articular, cartílago articular y hueso subcondral de la ATM. Este tipo de alteración oclusal produce una sobrecarga de las superficies articulares durante los movimientos mandibulares (Levorová et al., 2016) y una alteración en la cinemática normal de la articulación (Henderson et al., 2015) que puede producirse de forma iatrogénica durante la práctica clínica odontológica al realizar una rehabilitación protésica, una obturación o reconstrucción si no se realiza un buen ajuste oclusal.

Contrastada esta hipótesis, podrían implementarse los procedimientos clínicos, que eliminen la disarmonía oclusal. Esto podría aplicarse a los campos odontológicos que modifican las relaciones interdentarias: prostodoncia, operatoria u ortodoncia.

El presente trabajo de tesis doctoral estudia la morfología de la ATM, así como su estructura y el comportamiento de algunas proteasas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular, en un modelo animal de maloclusión producida por el aumento de la dimensión vertical unilateral.

2

Estado actual del
problema

2 Estado actual del problema

2.1. Anatomía e histología de la articulación temporomandibular

La articulación temporomandibular (ATM) es una diartrosis bilateral que une la mandíbula a la base del cráneo. Funcionalmente se considera como ginglimoartrodial que permite el movimiento en bisagra en un plano (ginglimoide) y al mismo tiempo movimientos de deslizamiento (Okeson, 2008); pero para otros autores se trata de un diartrosis de tipo condíleo, con dos ejes de movimiento, a los que se añade un plano de deslizamiento (Pérez-Casas y Bengoechea, 1987).

2.1.1. Superficies articulares

Las superficies articulares del complejo articular temporomandibular (CATM) son la fosa glenoidea o mandibular, y el cóndilo del temporal o eminencia articular del hueso temporal en la parte superior, y el cóndilo de la mandíbula en la parte inferior; entre ambas superficies articulares se dispone un menisco o disco articular (Echevarría y Pumarola, 2008).

La fosa glenoidea o mandibular (*fossa mandibularis*) es una depresión larga y profunda, prolongada transversalmente y con el eje mayor dirigido hacia dentro y atrás. Está situada por delante del conducto auditivo externo, por detrás de la eminencia articular anterior, por fuera de la espina del esfenoides y por dentro de la raíz longitudinal del cigoma (Echevarría y Pumarola, 2008). Está dividida en dos zonas por la cisura de Glasser (*fissura petrotympanica*): la parte anterior más pequeña, está labrada en la base de la escama y constituye la cavidad/fosa glenoidea propiamente dicha; la parte posterior, más amplia, está formada en gran parte por la pared anterior del conducto auditivo y embriológicamente pertenece al hueso timpánico. La primera forma parte de la articulación; la segunda, situada detrás de la *fissura petrotympanica*, es extraarticular y está en unión con tejido celuloadiposo (Testut y Latarjet, 1973). La zona preglasseriana, intracapsular pero no articular, está destinada a recibir la porción más gruesa del disco en oclusión céntrica. Solamente la parte más anterior de esta zona está recubierta por fibrocartílago (Echevarría y Pumarola, 2008).

El cóndilo de temporal, eminencia articular anterior o tubérculo articular (*tuberculum articulare*) es una eminencia transversal formada por la raíz transversa de la apófisis cigomática. Es convexa de delante atrás y ligeramente cóncava de fuera a dentro. Tiene su eje mayor dirigido, como la fosa mandibular en sentido posteromedial. Por delante se continúa con la superficie subtemporal y por detrás con la fosa mandibular. La morfología de la vertiente anterior varía según los caracteres somáticos del paciente, sus hábitos masticatorios, su grado de desdentación y su esquema oclusal (Echevarría y Pumarola, 2008).

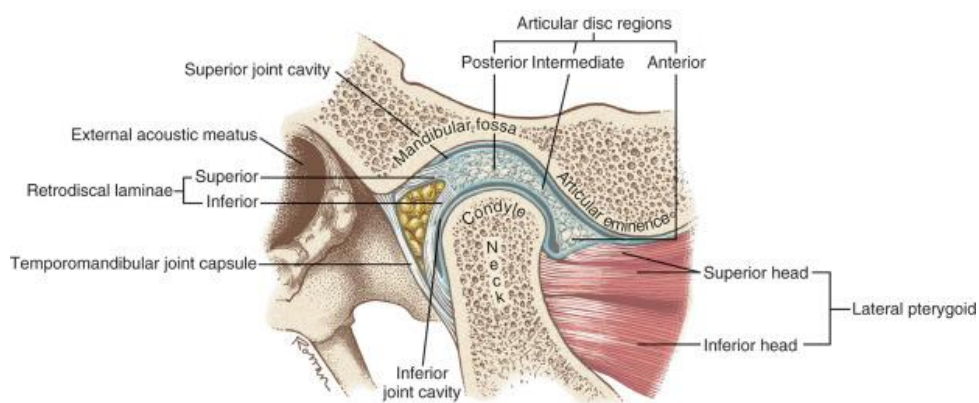


Figura 2.1.- Esquema de la ATM del lado derecho. Tomada de A. Tuncer. Kinesiology of the temporomandibular joint. En: *Comparative kinesiology of the human body*. Academic Press, pp. 285-302. 2020

El cóndilo mandibular (*processus condylaris*) es una eminencia alargada de fuera adentro y de delante a atrás e inclinada un poco hacia dentro. Tiene una forma más o menos elíptica; el eje mayor (mediolateral) se orienta posteriormente según un ángulo de 15-33° con referencia al plano frontal. La dimensión mediolateral varía de 13-25mm y la longitud anteroposterior de 5,5-16mm. La vertiente anterior del cóndilo mandibular es convexa y la posterior plana, se continúa con el borde posterior de la rama ascendente de la mandíbula. Los ejes mayores de ambos cóndilos prolongados posteriormente se cruzarían en el centro del agujero occipital. Ambas vertientes se encuentran separadas por una cresta paralela al eje mayor del cóndilo (Echevarría y Pumarola, 2008).

Todas las superficies articulares están recubiertas por un fibrocartílago que tiene unas propiedades únicas para la curación, la adaptación y el mantenimiento de las funciones

de soporte bajo condiciones adversas (Stocum y Roberts, 2018). En el apartado biología del cartílago articular haremos una mención más detallada.

2.1.2. Anexos a las superficies articulares: disco articular

De la anterior descripción resulta que la ATM, está formada por 2 superficies que salvo la fosa glenoidea, son convexas; por ello, se interpone entre ellas un disco fibroso que se amolda exactamente, por abajo, sobre la parte correspondiente del cóndilo y por arriba, sobre la cara articular del temporal (Testut y Latarjet, 1973).

El disco de la ATM es una estructura bicóncava, alargada transversalmente, ovalada, con la extremidad más gruesa hacia dentro. Su espesor disminuye desde la periferia hacia el centro. En el plano horizontal, se puede dividir en tres partes de distinto grosor. La más caudal, de unos 3-4mm de grueso, constituye la banda posterior; la banda anterior solo tiene unos 2 mm de grueso y entre ambas se encuentra la zona intermedia, la más delgada. También presenta engrosamientos en sus bordes medial y lateral (Echevarría y Pumarola, 2008). Estos bordes externo e interno se doblan ligeramente hacia abajo y se fijan por medio de delgados fascículos fibrosos, en el cóndilo mandibular; de este modo, el menisco fibroso acompaña siempre a la mandíbula en sus excursiones (Testut y Latarjet, 1973).

2.1.3. Manguito cápsulo-ligamentoso y ligamentos extrínsecos

El principal medio de unión de las superficies articulares es un manguito troncocónico fibroso, delgado y bastante laxo, que se origina en el contorno de la superficie articular del temporal: por detrás, por el labio anterior de la cisura de Glasser; por delante, por el borde anterior del cóndilo mandibular; por fuera, por la raíz longitudinal del arco y el tubérculo cigomático, y por dentro, por la espina del esfenoides. Caudalmente, la cápsula se inserta en el contorno del cóndilo de la mandíbula. En la parte posterior desciende notablemente. Está formado por fibras superficiales largas que se extienden directamente del temporal a la mandíbula y por fibras profundas cortas que van de cada hueso al disco articular. Además, en la parte posterior hay un haz especial que va de la cisura de Glasser al borde posterior del disco, que recibe el nombre de freno discal

posterior, si bien el papel que desempeña en los movimientos de la ATM no parece determinante (Echevarría y Pumarola, 2008).

Desde el punto de vista estructural, la cápsula posee dos capas, una externa fibrosa y una interna muy delgada o membrana sinovial. La primera de ellas, en las zonas de mayor requerimiento funcional está engrosada, formando diferentes ligamentos intrínsecos, constituidos por densos haces de fibras colágenas que se disponen direccionadas en paralelo para soportar mejor las cargas (Gómez y Campos, 2002). El **ligamento lateral externo** refuerza por fuera la cápsula articular, constituye el principal medio de unión de la ATM. Se inserta en el tubérculo cigomático y en la raíz longitudinal del cigoma, desde donde se dirige oblicuamente hacia abajo y hacia atrás y se fija en la parte posteroexterna del cuello del cóndilo mandibular (Testut y Latarjet, 1973). El **ligamento lateral interno** ocupa el lado interno de la cápsula. Es muchos más delgado y menos resistente que el externo. Comienza en el borde interno de la cavidad glenoidea, desde donde se dirige oblicuamente hacia abajo y atrás para insertarse en la parte posterointerna del cóndilo mandibular (Testut y Latarjet, 1973). Además de estos, en el mantenimiento de la ATM hay otros ligamentos que no forman parte del manguito cápsulo-ligamentoso y que en conjunto se denominan **ligamentos extrínsecos**; son el ligamento esfenomandibular, el ligamento estilomandibular y el ligamento pterigomandibular.

Por su lado, el estrato sinovial de la cápsula es el responsable de la producción del líquido sinovial. Este fluido desempeña un papel importante en la lubricación de las articulaciones y actúa como medio para el intercambio de nutrientes y desechos. El disco al ser una estructura avascular depende en gran medida de los nutrientes y el oxígeno del líquido sinovial para sobrevivir (Willard et al., 2011).

2.1.4. Estructura y composición de los cartílagos articulares y disco articular

El cartílago que recubre las superficies óseas del cóndilo mandibular y la fosa glenoidea es fibrocartílago, y es único ya que en el resto de las diartrosis es de tipo hialino (Robinson, 1993; Benjamin y Ralphs, 2004). Se lo puede considerar como un periostio fibroso modificado con una zona proliferativa subyacente que se diferencia en fibrocartílago (Stocum y Roberts, 2018).

Tanto el cartílago articular como el disco articular contienen diferentes tipos de células (fibroblastos-like, fibroblastos, fibrocitos, condroblastos y condrocitos) y la matriz extracelular varía de unas zonas del cartílago a otras. En general, La MEC es rica en hialuronano, colágenos y proteoglicanos, que generan un armazón que almacena factores de crecimiento y diferentes ligandos de señalización (Gao et al., 2014).

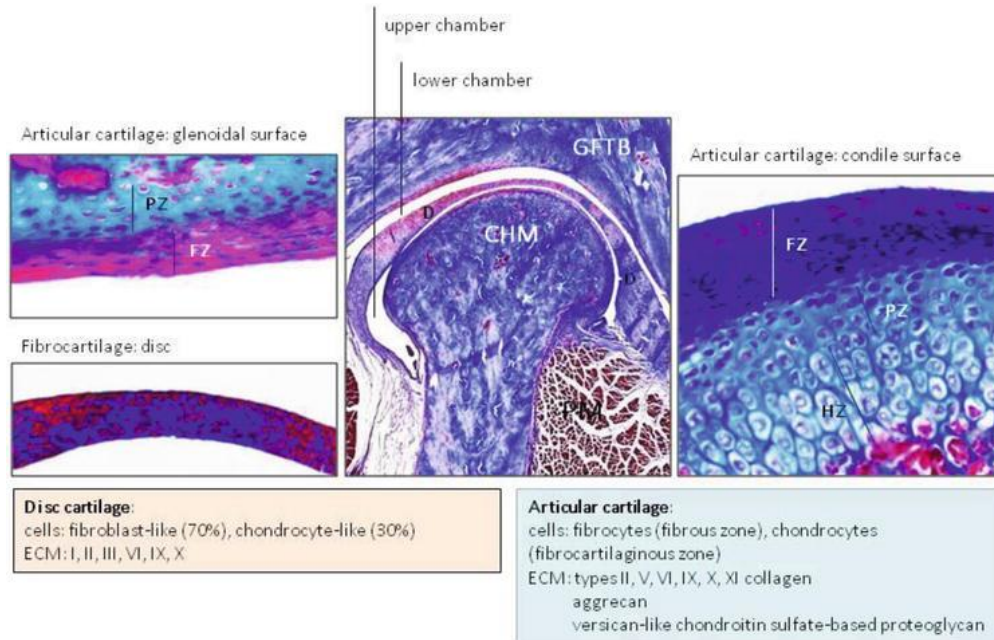


Figura 2.2.- Estructura, tipos celulares y principales componentes de la matriz extracelular del cartílago articular y disco articular de la ATM. Tomado de Cobo et al. (2019) DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85186> CHM: cabeza del cóndilo de la mandíbula, GFTB: fosa glenoidea del temporal. FZ: zona fibrosa, HZ: zona hipertrófica, y PZ: zona proliferativa.

En el cartílago articular de la ATM, desde la superficie hasta el hueso, se consideran dos zonas diferentes: la zona fibrosa y la zona de fibrocartílago, que se pueden subdividir en zonas proliferativas e hipertróficas. La **zona fibrosa** contiene fibroblastos, y la matriz extracelular (MEC) está formada por colágeno tipo I, colágeno tipo II a niveles residuales y proteoglicano a base de sulfato de condroitina similar a versicano. Las células de la **zona de fibrocartílago** son fibroblastos y condrocitos, y la MEC es rica en colágeno tipo II, pero también contiene colágeno tipo I y tipo X y agregano. En realidad, las células están organizadas en zonas y dispuestas en filas axiales. Cada zona representa una etapa de maduración diferente designada como superficial, polimórfica, condrocítica e hipertrófica (Chen et al., 2012). Las fuerzas generadas por el uso de la articulación inician cascadas de señalización, que promueven la maduración de los condrocitos

(Rabie et al., 2004; Sobue et al., 2011). Aunque se conoce la organización zonal básica del fibrocartílago, los mecanismos moleculares involucrados siguen siendo poco conocidos. El cartílago articular es avascular, requiriendo que las células de cada zona se comuniquen y sobrevivan en su MEC única y compleja subdividida en interterritorial y pericelular. Esta última es una región especializada que rodea directamente a los condroprogenitores y condrocitos, e influye en la identidad celular, el comportamiento y la homeostasis a través de la mecanotransducción de señales de maduración apropiadas (Wilusz et al., 2014; Chu et al., 2017).

Por lo que respecta al disco articular, es también un tejido avascular y no innervado compuesto por fibrocartílago con consistencia viscoelástica. Tiene una forma cóncava hacia abajo, más delgado en la región central y más grueso en la periferia, aproximadamente 1-2 mm. El disco de la ATM se puede dividir en tres regiones: anterior, intermedia y posterior. La zona intermedia también se puede subdividir en 3 regiones: lateral, central y medial (Palla, 2016; Karadede et al., 2018). Sus células son una mezcla de condrocitos y fibroblastos (30% y 70%, respectivamente; Detamore et al., 2006). Está constituido principalmente por colágeno tipo I, pero también están presentes otros colágenos (tipos II, III, VI, IX y XII). Presenta aproximadamente un 74,5% de contenido de agua en peso húmedo y se compone además de proteoglicanos, glicosaminoglicanos y fibras elásticas (Minarelli et al., 1997; Kalpakci et al., 2011; Willard et al., 2011; Palla, 2016; Stocum y Roberts, 2018).

2.2. Patologías de la articulación temporomandibular: maloclusión

Las afectaciones de la ATM son una de las mayores causas de dolor orofacial (Aryaci et al., 2016) y representan un grupo heterogéneo de situaciones músculo-esqueléticas y neuromusculares que afectan a la ATM, los músculos masticatorios y/o las estructuras circundantes. El tipo más común comprende los desplazamientos del disco articular que preceden los cambios degenerativos progresivos de la articulación y conducen a la osteoartritis (Zhang et al., 2016). Las disfunciones de la ATM causan alteraciones en las funciones en las que está implicada como hablar, masticar, tragar, comer, bostezar, sonreír, reír, gritar y besar (Riera-Punet et al., 2017).

Los párrafos que siguen describen en detalle la artrosis u osteoartritis de la ATM puesto que se supone que puede ser desencadenada por el tipo de trastorno oclusal generado experimentalmente y en el que se basa esta Tesis Doctoral.

2.2.1. Artrosis de la ATM

2.2.1.1. Concepto

Es una enfermedad degenerativa progresiva que afecta gradualmente al cartílago articular, la membrana sinovial y las estructuras óseas (Levorová et al., 2016) y limita la calidad de vida de los pacientes (Zheng et al., 2018). Según Echevarría y Pumarola (2008) la artrosis u osteoartrosis (OA) se define como un *“desorden degenerativo, que se caracteriza por tres fenómenos: destrucción del cartílago de la superficie articular con pinzamiento de la interlínea articular, remodelación ósea con fenómenos de neoformación (osteofitos) y de rarefacción ósea (geodas o quistes de detritos), y sinovitis secundaria”*.

2.2.1.2. Epidemiología

Se trata de una patología relativamente frecuente en la que la prevalencia de los cambios óseos degenerativos tiende a incrementarse con la edad (dos Anjos et al., 2012; Rando y Waldron, 2012) y puede afectar hasta a un 70% de la población de entre 73 y 75 años (Schmitter et al., 2010). También se ha descrito una tendencia a una mayor afectación en las mujeres que en los hombres (Massilla Mani y Sivasubramanian, 2016; Alkhubaizi et al., 2017); de hecho, las perforaciones discales son más frecuentes en mujeres (Tanaka et al., 2000).

2.2.1.3. Etiopatogenia

Los factores etiopatogénicos relacionados con la OA de la ATM son muy variados. Uno de los principales es la sobrecarga de las superficies articulares debidos a macro y microtrauma crónico por bruxismo o sobrecarga funcional, oclusión inestable con incremento de la actividad de los músculos masticatorios, malformaciones esqueléticas (hipoplásica mandibular), alteraciones vertebrales, o pacientes con pérdida de dientes posteriores (Okeson, 2008; Levorová et al., 2016).

También se han señalado otros factores etiológicos como una importante carga de estrés que se acompaña de una actividad parafuncional, consciente o inconsciente, que causa microtrauma de la articulación (Levorová et al., 2016; Li et al., 2017).

Así pues, aunque la etiopatogenia de la OA de la ATM, no es completamente conocida, la sobrecarga de las estructuras articulares parece ser el factor etiológico más importante (Martínez-Blanco et al., 2004; Okeson, 2008; Levorová et al., 2016; Betti et al., 2018). Esta sobrecarga articular se produce por maloclusiones (Zheng et al., 2018; Wang et al., 2019) y hábitos parafuncionales (Li et al., 2017) como el apretamiento dentario (Henderson et al., 2015), ausencias dentarias e interferencias oclusales (Levorová et al., 2016).

2.2.1.4. Fisiopatología

El elemento clave del mantenimiento de la homeostasis de la MEC del cartílago es el condrocito, sometido permanentemente un doble programa anabólico vs. catabólico. En el primero tiene como objetivo la formación de MEC y la proliferación celular y en él participan los inhibidores de las proteasas y las citoquinas antiinflamatorias. Por el contrario, tiene como resultado la destrucción de la MEC y la disminución de la proliferación celular, y en él intervienen citoquinas proinflamatorias y las proteasas. En condiciones de normalidad los componentes de la MEC del cartílago se van renovando lentamente; cuando este proceso se altera, se producen una serie de cambios de las características morfológicas y biomecánicas del cartílago que lo hacen fracasar en su función (ver Peng et al., 2021).

La composición de la MEC es principalmente colágenos, proteoglicanos y agua. En la homeostasis, los condrocitos dentro de la MEC mantienen un equilibrio entre la síntesis y la degradación con un bajo recambio resultante de proteínas de la matriz (Goldring et al., 2011). La interrupción de este equilibrio debido a la enfermedad da lugar a una respuesta bifásica, con una etapa temprana marcada por cambios en la cantidad y distribución de la MEC en la que los condrocitos intentan reparar la MEC dañada. La etapa tardía está marcada por un aumento gradual del proceso degradativo que resulta en una pérdida neta de ECM (Sandell et al., 2001).

La OA es la enfermedad articular más frecuente en humanos y se caracteriza por cambios degenerativos debidos a una pérdida gradual de la MEC del cartílago, debido a desbalance entre los mecanismos que favorecen y l degradan. La degradación de la MEC, y por tanto del cartílago, está mediada por dos familias de enzimas: las **metaloproteasas** de MEC (MMPs: matrix metalloproteinases) que son responsables de la destrucción del colágeno del cartílago, y que las enzimas de la **familia ADAMTS** (desintegrin and metalloproteinase domain with trombospondin motifs; Kelwick et al., 2015) que están implicadas en la degradación del agrecano. Por otro lado, los **inhibidores tisuares de las proteasas** (TIMPs: tissue inhibitors of metalloproteinases) regulan la actividad de estas dos familias de enzimas (Davidson et al., 2007; ver Grässel et al., 2021).

Cualquier aproximación a la etiopatogenia del proceso artrósico debe contemplar el estudio de los diversos tejidos implicados en la artrosis, es decir, el cartílago articular, el hueso subcondral y la sinovial articular, así como el sistema de citoquinas, proteasas, y sus inhibidores. Pero también debe tenerse en consideración la influencia de las cargas mecánicas en la aparición del desarrollo del proceso artrósico (Alonso et al., 2001).

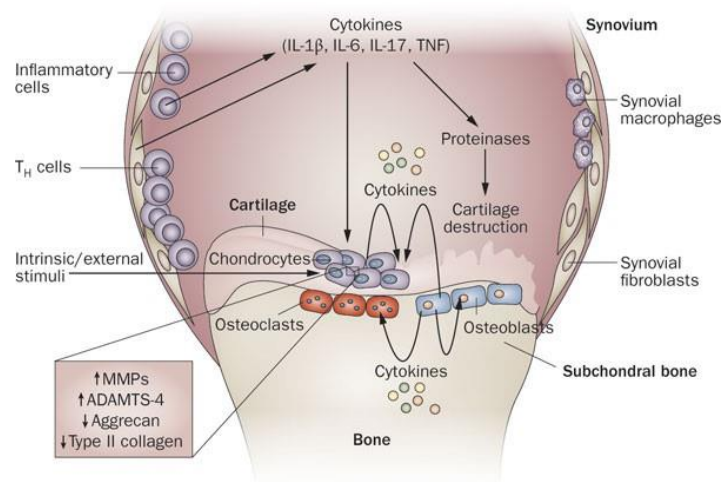


Figura 2.3.- Papel de las citoquinas proinflamatorias en la fisiopatología de la osteoartritis. Tomado de Kapoor et al. (2011).

Aunque clásicamente la artrosis no ha sido considerada como una artropatía inflamatoria, gracias a los avances de la biología molecular y celular, se ha demostrado

que diversos mediadores proinflamatorios, como las citocinas interleuquina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), pueden ser importantes en el desarrollo de esta enfermedad (López-Armada et al., 2007). Así, se ha observado un aumento de IL-1 β y TNF α en el cartílago de la ATM de ratones con cambios degenerativos (Zhang et al., 2015) y de IL-1 β , y TNF- α (Liu et al., 2016; Li et al., 2017) e IL-6 (Li et al., 2017) en el cartílago condilar de ratas con artrosis, también se ha encontrado un aumento de IL-6. Con carácter general, la estimulación del condrocito por estas citosinas proinflamatorias incrementa la producción de MMPs, inhibe la síntesis de proteoglicanos y colágenos, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno, como el óxido nítrico, y de prostaglandina E₂ (López-Armada et al., 2007). También se ha encontrado en modelos animales que el TGF- β puede ser considerado un factor patogénico en el inicio de la artrosis de la ATM, ya que la inhibición de su señal atenúa el daño del cartílago y mejora la masa ósea en el hueso subcondral (Zheng et al., 2018). Por otro lado, el papel de las citoquinas en la patogenia de la artrosis está condicionado por la influencia de las cargas mecánicas sobre el cartílago, por lo que las cargas de elevada frecuencia e intensidad puede ser responsables de la artrosis (Alonso et al., 2001).

La artritis crónica de la ATM puede conducir a la pérdida permanente de tejido con el tiempo. La patología de la OA de la ATM es un proceso dinámico e implica, igual que en otras articulaciones, un recambio anómalo de MEC que resulta de un desequilibrio en la biosíntesis y degradación de la misma. Las actividades biosintéticas a menudo se interpretan como el intento del condrocitos de reparar la matriz dañada (Sandell y Aigner, 2001; Goldring, 2006). En las primeras etapas de la enfermedad, los condrocitos pueden aumentar la proliferación (Silbermann y Livne, 1979) y un aumento de la síntesis de la MEC (Axelsson et al., 1994; Meng et al., 2005; Paegle et al., 2005). Alternativamente, la actividad de los condrocitos puede ser destructiva y puede incluir un aumento de la apoptosis celular (Spears et al., 2003) y la producción de citoquinas destructivas como TNF-alfa e interleucinas (Suzuki et al., 2002). Además, la regulación al alza de la actividad de MMP, debido a un aumento en la síntesis de MMP, un aumento de la activación de la pro-enzima o una disminución de la actividad los MIT, puede contribuir a la descomposición de la ECM del cartílago (Puzas et al., 2001; Gepstein et al., 2002; Tiilikainen et al., 2005). En última instancia, las actividades biosintéticas de los

condrocitos son incapaces de sostener las demandas funcionales del tejido lo que da lugar a una pérdida neta de los componentes de la matriz del cartílago y su destrucción con la pérdida de sus propiedades estructurales y funcionales.

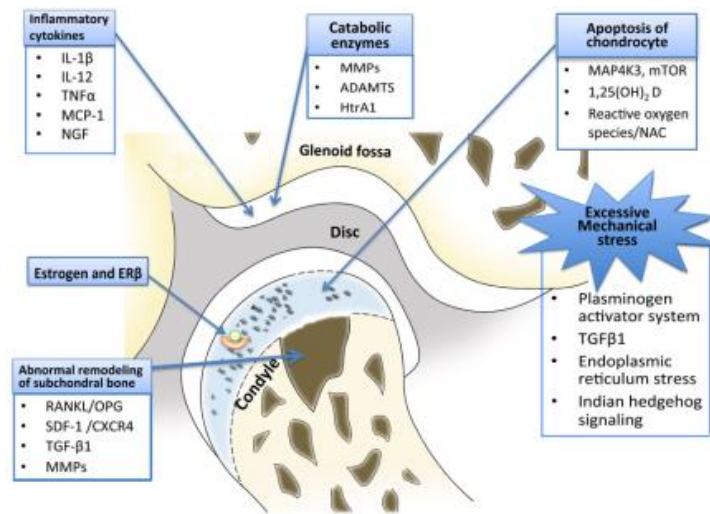


Figura 2.4.- Esquema de los mecanismos etiopatogénicos de la osteoartritis en la articulación temporomandibular. Tomado de Wang et al. (2015)

Pero en última instancia la destrucción del cartílago articular depende de las proteasas (Loreto et al., 2010; Matsumoto et al., 2010; Niga et al., 2011; Okamoto et al., 2015). Como ya se comentó previamente las MMP, son endopeptidasas dependientes de zinc, responsables de la degradación de los componente fibrilares de la MEC por escisión de enlaces peptídicos internos (Hopps y Caimi, 2015; Ferreira et al., 2016) y están involucrados en la remodelación fisiológica de los tejidos, pero en algunas condiciones la sobreexpresión de MMPs resulta en la destrucción (Srinivas et al., 2011). De hecho, la regulación al alza de algunas MMP se ha observado en las condiciones patológicas del líquido sinovial de la ATM, lo que resulta en las enzimas primarias involucradas en el recambio de la matriz (Kubota et al., 1997, 1998a,b; Ishimaru et al., 2000; Leonardi et al., 2008, 2011; Loreto et al., 2013). En la osteoartritis, los macrófagos sinoviales, los fibroblastos sinoviales y los condrocitos pueden inducir la liberación de MMP que destruyen el cartílago articular (Leonardi et al., 2011; Musumeci et al., 2016). En particular, se ha informado que las células sinoviales humanas de la ATM sintetizan MMP-1, MMP-3 y MMP-9 *in vitro* (Kubota et al., 1988; Akamine et al., 2012).

En el líquido sinovial de pacientes con osteoartritis también se ha demostrado una relación entre la sobreexpresión de MMPs y la degeneración del cartílago de la ATM, lo que indica un posible marcador para estas patologías (Ishimaru et al., 2000; Mizui et al., 2001; Srinivas et al., 2001; Leonardi et al., 2008; Jiang et al., 2013; Loreto et al., 2013; Cevidanes et al., 2014). En particular se han encontrado niveles aumentados de MMP-2 y MMP-9 (Mizui et al., 2001; Srinivas et al., 2001; Nozawa-Inoue et al., 2003) y se ha visto que los niveles de MMP-3 y MMP-7 se correlacionan con la aposición ósea (Cevidanes et al., 2014). Igualmente se ha observado un aumento de MMP-9 en el suero y líquido sinovial de pacientes artríticos (Ishimaru et al., 2000) y MMP-9 se encontró elevada en pacientes con desplazamiento de disco anterior sin reducción y osteoartritis avanzada (Yoshida et al., 2006). Y mediante estudios inmunohistoquímicos en se ha detectado mayor expresión de MMP-7 y MMP-9 en la cápsula articular (Rogers et al., 2018).

La expresión de estas MMP está regulada por varios factores, incluida una variedad de citoquinas y su actividad se regula por sus inhibidores y activadores fisiológicos. Se conocen 4 tipos de inhibidores de las metaloproteasas (TIMPs). El TIMP y el PAI (inhibidor del activador de plasminógeno) pueden actuar estabilizando todo el sistema, al menos temporalmente, mientras que los factores de crecimiento como IGF-1 (Wang et al., 2019) y TGF- β intervienen en procesos de reparación tratando de curar la lesión o, al menos, de estabilizar el proceso (Fauci y Langford, 2007). IL-1 β en circunstancias de inflamación induce la secreción de MMP1, MMP9 e IL-8 y de este modo contribuye al desarrollo de la artrosis de la ATM (Xu et al., 2016) y se ha observado un incremento de la expresión de MMP1, MMP3 y MMP9 en condrocitos de cóndilo mandibular de conejo estimulados por IL-1 β (Zhang et al., 2016). Por su lado, el óxido nítrico participa en la lesión del cartílago de las artrosis puesto que estimula síntesis de MMPs en los condrocitos (Fauci y Langford, 2007).

Además de las MMPs se han descrito otras moléculas bioactivas que intervienen en la degradación del cartílago como la plasmina, las catepsinas o las agrecanasas (Fauci y Langford, 2007), y RAGE (receptor para productos finales de la glicación avanzada) tiene un importante papel en el desencadenamiento y progresión de la OA de la ATM en ratones (Matías et al., 2016). De todas ellas, las más importantes son las desintegrinas-

metaloproteinasas con motivos de trombospondina (ADAMTSs; Fosang et al. 2010a,b), en especial ADAMTS5 (Glasson et al., 2005; Stanton et al. 2005). Algunos miembros de esta familia se ha encontrado elevados en la osteoartritis de la ATM (Pratta et al. 2003; Embree et al. 2010).

En otro orden de cosas, Zhang et al. (2016) encontraron que la expresión de *long non-coding RNAs* como HOTAIR está aumentada en el fluido sinovial de la ATM con OA tanto en humanos como en conejos. El aumento de HOTAIR contribuye al aumento de las MMPs inducidas a su vez por la IL-1 β y a la apoptosis de condrocitos condilares, sugiriendo un importante papel pro-apoptosis de HOTAIR en los condrocitos de la ATM con artrosis. Y se ha observado que algunos MicroRNAs, como MicroRNA221-3p, actúa como factor protector de la articulación hasta el punto de que podría incluso valorarse en el tratamiento de la artrosis de la ATM (Xu et al., 2016).

2.2.1.5. Estadios evolutivos de la artrosis de ATM

Bermejo (2000) propuso tres estadios evolutivos para la osteoartrosis temporomandibular:

- 1.- Estadio inicial con cambios morfológicos mínimos, probablemente restringidos a áreas localizadas de las superficies articulares: cambios en la composición del cartílago, resiliencia ósea subcondral alterada y modificaciones del líquido sinovial;
- 2.- Estadio intermedio con degeneración del cartílago articular, depleción de proteoglicanos y desintegración de las mallas de colágeno; y
- 3.- Estadio terminal con exposición de hueso, quistes osteolíticos, lesión ósea abrasiva y picos osteofíticos.

No obstante, los cambios degenerativos óseos son significativamente más frecuentes en el cóndilo que en la eminencia articular (Dos Anjos et al., 2012; Ottersen et al., 2019).

2.2.1.6. Clínica de la artrosis de ATM

La clínica de la osteoartrosis temporomandibular está en función del estadio evolutivo de esta patología (Bermejo, 2000). En el estadio inicial, de cambios morfológicos mínimos, la situación es subclínica, y no aparecen signos o síntomas característicos. En

el estadio intermedio de degeneración de las superficies articulares, clínicamente el enfermo presenta rigidez articular, sobre todo después de períodos de inactividad, ruidos articulares y limitación de movimientos; puede existir dolor. Y en el estadio terminal con exposición de hueso y cambios morfológicos importantes, suele existir limitación de movimientos, crépitus y alteraciones radiológicas evidentes.

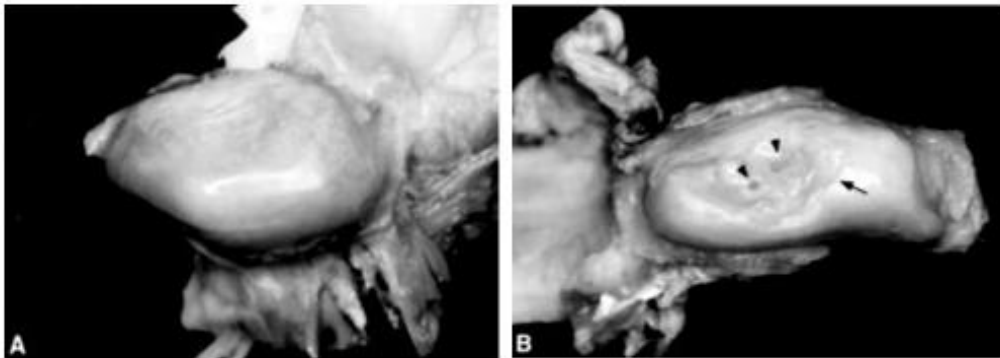


Figura 3. Aspecto macroscópico de cóndilos humanos. A) Cóndilo normal. B) Cóndilo con osteoartritis avanzada mostrando la depresión de la superficie y el hueso subcondral parcialmente expuesto. Tomando de Tanaka et al. (2000)

En los últimos estados aparece un daño severo en la ATM con, incluso, desarrollo de anquilosis (Levorová et al., 2016) aunque también puede presentarse sin apenas signos clínicos, aunque se trate de casos que radiológicamente puedan ser clasificados como moderados o severos (Bagge et al., 1992). Sin embargo, algunos estudios no encontraron correlación entre la presencia de cambios óseos degenerativos y la movilidad condilar (Dos Anjos et al., 2012) aunque ciertos cambios en la movilidad condilar (como una disminución del 20% en el desplazamiento anteroposterior del cóndilo de trabajo) pueden ser indicativos de degeneración condilar en los estadios tempranos de la enfermedad (Henderson et al., 2015).

Pero independientemente de la sintomatología, los signos clínicos más comunes de los pacientes con OA de la ATM son la crepitación a la auscultación y la disminución en el rango de movimientos mandibulares (Martínez-Blanco et al., 2004).

2.2.1.7. Signos radiológicos de la OA de ATM

Para el diagnóstico de la artralgia de la ATM, Schnabl et al. (2018), recomienda la combinación de los métodos de imagen MRT y CBCT. El CBCT superaba a la MRT en la visualización de las alteraciones óseas (erosión, aplanamiento, esclerosis y osteofitos), mientras que la MRT es la herramienta óptima para la visualización de los cambios estructurales o de desplazamiento del disco, frecuentemente asociado con cambios óseos.

Se han descrito los siguientes signos radiográficos relacionados con la artrosis de la ATM: aplanamiento, erosión, concavidad, cavitaciones, aplanamiento, formación de osteofitos, osteoesclerosis, pseudoquistes y quistes subcondrales, deformación, eburnación o alteración del contorno (Bermejo, 2002; Kurita et al., 2004; Monje, 2009; Dos Anjos et al., 2012; Rando y Waldron, 2012; Wang et al., 2012; Schnabl et al. 2018; Sun et al., 2018; Ottersen et al., 2019). Brevemente,

- 1.- **Aplanamiento:** se caracteriza por contorno óseo aplanado, desviándose de la forma convexa, en el caso del cóndilo;
- 2.- **Erosión:** área de disminución de la densidad ósea del hueso cortical y del hueso subcortical adyacente;
- 3.- **Osteofito:** excrecencia de hueso marginal que típicamente, se desarrolla en el margen anterior de las superficies articulares del cóndilo;
- 4.- **Esclerosis:** es un área de densidad incrementada del hueso cortical, que se extiende hacia el hueso medular, es típica de las fases más tardías de la osteoartritis;
- 5.- **Pseudoquistes:** área osteolítica adyacente al hueso bien circunscrita sin destrucción cortical;
- 6.- **Eburnación:** Es un área lisa, pulida en la superficie articular del hueso, ocurre cuando el cartílago de la articulación ha sido completamente destruido causando un contacto hueso con hueso. En el caso de la ATM, la eburnación es poco frecuente, dada la presencia del menisco articular, solo se da en los casos más avanzados de desplazamiento discal o en casos de perforación del disco, en las que las superficies articulares se ponen en contacto; y

7.- **Alteración del contorno articular:** teniendo en cuenta los cambios morfológicos por la remodelación normal durante la vida, solo se pueden considerar indicativos de osteoartrosis los cambios más claros en la alteración del contorno como: mushrooming, alargamiento/reducción, o extremo alisado.

Por otro lado, Shigeno et al. (2018) señalaron que en la médula ósea de pacientes con OA por RM pueden encontrarse anomalías como edema y osteonecrosis del cóndilo mandibular. También observaron que las erosiones óseas y los osteofitos se correlacionaban con los cambios en la médula ósea del cóndilo mandibular.

Las alteraciones artrósicas aparecen con mucha mayor frecuencia en el cóndilo de la mandíbula que en la eminencia articular y la fosa condilar (Massilla Mani y Sivasubramanian, 2016). El rasgo más destacado radiológicamente que encontraron Martínez-Blanco et al. (2004) en pacientes con artrosis de la ATM fue la alteración de la morfología articular y la presencia de una luxación anterior del menisco articular sin reducción. Los cambios óseos degenerativos más frecuentes en los estudios de Dos Anjos et al. (2012) fueron el aplanamiento y los osteofitos, mientras que en los estudios de Rando y Waldron (2012) fueron la porosidad y los osteofitos. Por su lado, Ottersen et al. (2019) señalan que los cambios óseos en el cóndilo son aplanamiento, osteofitos y esclerosis subcortical, y en la fosa/eminentia articular son aplanamiento, erosión y esclerosis subcortical.

Rando y Waldron (2012) recomendaron los siguientes criterios para el diagnóstico de OA de la ATM:

- 1.- La eburnación no puede ser utilizada como criterio único de la OA de la ATM ya que se da en pocos casos, pero cuando está presente es un indicador obvio de la OA.
- 2.- Los osteofitos y la porosidad deberían ser los principales criterios de definición de OA de la ATM. Cada componente óseo podría presentar OA independientemente del otro, por ejemplo, podría presentarse OA en el cóndilo y que la eminencia articular fuera normal.
- 3.- La porosidad y los hoyos por sí mismos no son indicativas de la OA, otros criterios deberían estar presentes para diagnosticar la OA.

4.- La alteración del contorno articular solo debería ser considerada presente si ocurrieran cambios marcados en la eminencia articular o en el cóndilo que deberían incluir alisado, deformación, reducción o incremento del tamaño, mushrooming.

2.2.1.8. Cambios histológicos de la artrosis

La artrosis, desde un punto de vista anatomopatológico, se describe como un deterioro progresivo de las superficies articulares y modificaciones reactivas de los bordes articulares y del hueso subyacente (Bermejo, 2000). El rasgo anatomopatológico primordial de la artrosis es la pérdida progresiva de cartílago, pero también aparecen lesionados el hueso subcondral, la sinovial, los meniscos, los ligamentos y el dispositivo de apoyo neuromuscular.

Las lesiones más llamativas de la artrosis suelen verse en las áreas del cartílago articular que soportan más cargas. En las primeras fases el cartílago es más grueso de lo normal, pero al avanzar el proceso, la superficie articular se adelgaza, el cartílago se reblandece, la superficie se agrieta y aparecen hendiduras verticales (fibrilación). En el cartílago profundo aparecen úlceras que se extienden al hueso. Todo el cartílago mantiene activamente su recambio metabólico, y los condrocitos se multiplican formando grupos apiñados o racimos (clones); sin embargo, cuando la enfermedad evoluciona, el cartílago pierde células.

Otros datos característicos de la artrosis son la remodelación y la hipertrofia óseas. En la región subcondral, hay crecimiento de hueso por aposición, lo que produce una imagen radiográfica de esclerosis ósea. El hueso situado por debajo del cartílago ulcerado se erosiona y puede adquirir un aspecto marfileño o ebúrneo. El crecimiento del hueso y el cartílago en los bordes de la articulación da lugar a la formación de osteofitos (rebabas), que alteran el contorno articular y pueden causar limitación de los movimientos (Fauci y Langford, 2007).

2.2.2 Alteraciones oclusales y repercusión en la ATM

Aunque la implicación del factor oclusal en la etiopatogenia de las patologías de la ATM está condicionada por la presencia de otros factores coadyuvantes, el restablecimiento de la oclusión fisiológica puede ser primordial para restablecer la homeostasis articular

e implicaría conocer la biomecánica particular de cada paciente y su correlación con los parámetros biológicos (García-Fajardo et al., 2007).

Los estudios de Wang y colaboradores sobre cadáveres y en sujetos vivos aportaron importantes datos al respecto. El estudio en cadáveres indicó que en una oclusión no balanceada los discos articulares eran más gruesos que en una oclusión balanceada fisiológicamente apoyando la teoría de que el disco podría adaptarse a determinadas alteraciones oclusales (Wang et al., 2008). Por su lado, el trabajo en sujetos vivos (considerando las variables género, edad, número de dientes posteriores perdidos y número de cuadrantes afectados) demostró que los individuos que habían perdido pocos dientes posteriores, pero en más cuadrantes, tenían mayor prevalencia de desórdenes temporomandibulares, especialmente mujeres jóvenes (Wang et al., 2009).

En un estudio realizado por Tanaka et al. (2000) sobre cadáveres, observaron los siguientes hallazgos a nivel histológico en cóndilos con OA: en cóndilos con cambios osteoarthríticos tempranos la zona transicional estaba ausente, con áreas agrietadas y fisuradas en la zona radial; si los cambios osteoarthríticos eran moderados, las zonas superficial y transicional frecuentemente se habían perdido y la zona radial expuesta mostraba una superficie áspera, desigual, debida a la fibrilación del colágeno; y ya en los cóndilos con cambios osteoarthríticos severos la zona del cartílago estaba casi completamente perdida y había hueso subcondral expuesto. En el fibrocartílago que quedaba se observaba tejido de reparación vascular granulofibroso que había invadido desde la médula ósea.

En la matriz extracelular de los cartílagos de ATM con OA se ha encontrado una reducción de los proteoglicanos, desorganización y disminución de los haces de fibras colágenas, hialinización del cartílago con o sin perforación del disco articular y degeneración grasa. El hueso subyacente se vuelve frágil (microfracturas), por lo que se identifica radiográficamente (Gómez y Campos, 2002).

Por su parte, distintos estudios en modelos animales sugieren que las modificaciones estructurales están relacionadas con el tipo de alteración oclusal. Así, en ratas, usando una corona que cubría los dos incisivos superiores y que tenía hacia lingual una especie resalte para interceptar los incisivos inferiores y producir 3.5 mm de retrusión a la

dimensión de oclusión vertical original, en la evaluación histológica solo detectaron una respuesta de infiltrado monocítico (Johnson et al., 1995). También en rata, realizando levante de mordida unilateral, se apreció una notable hiperplasia condrocitos en la zonas proliferativa y fibrocartilaginosa del cóndilo mandibular, así como un incremento de la expresión de agreganos en el cartílago condilar y un proteoglicano relacionado con versicano en el disco y en la superficie articular del cóndilo (Mao et al., 1998). Y la maloclusión mediante bandas elásticas para conseguir la mesialización del primer molar superior izquierdo y del primer molar inferior derecho conlleva un incremento significativo del grosor de la zona intermedia del disco (Sun et al., 2009).

Chaves et al. (2002) crearon maloclusión en conejos neozelandeses mediante la colocación de coronas de 0.3mm de espesor en los molares posteriores derechos y observaron hemorragia intraarticular en los compartimentos supra e infradisciales y en la zona retrodiscal, disminución progresiva del grosor del cartílago a medida que se incrementaban los días; en la ATM contralateral a la de la interferencia, no encontraron modificaciones.

En monos (*Macaca mulatta*) jóvenes, utilizando un aparato intraoral de apertura de mordida, instalado en el maxilar, para conseguir apertura interincisal se encontró que el grosor del tejido articular estaba disminuido en la región superior, por la reposición anterior del cóndilo, y la capa precondroblastica se distinguía bien y la capa condroblastica sufría un incremento del 62% (Sim et al., 1995).

2.2.3 Alteraciones oclusales y artrosis de la ATM

Como ya se ha señalado, las interferencias dentarias son factores etiológicos de la artrosis de la ATM (Martínez-Blanco et al., 2004). Algunos estudios en animales, en los que se les creaban distintos tipos de alteraciones oclusales, han encontrado cambios histológicos que se pueden corresponder con OA.

2.2.3.1. Modelo animal de OA por alteración del plano oclusal

Yoshikawa et al. (2008) evaluaron los efectos de una masticación no balanceada en conejos a diferentes tiempos de evolución mediante técnicas histológicas y de inmunohistoquímica. A los 3 días tras el procedimiento encontraron adelgazamiento del

cartílago de la eminencia articular y algunos agregados celulares, con aumento leve del número de células TUNEL positivas y reducción del área colágeno tipo II positiva. En el cóndilo, la capa de cartílago se había adelgazado con completa desaparición de la zona intermedia, ausencia de agregados celulares, aumento el número de células TUNEL positivas reducción del área colágeno tipo II positiva. A los 7 días la eminencia articular el cartílago se había adelgazado, el número de condrocitos había disminuido y se observaban algunos agregados celulares en una porción pequeña de la eminencia articular, el número de células TUNEL positivas aumento en ambos lados y el área colágeno tipo II positivo había decrecido. En el cóndilo, el grosor de las capas del cartílago se había adelgazado, la zona intermedias seguía desaparecida, no se encontraron agregados celulares, y el número de células TUNEL positivas en el lado izquierdo estaba aumentado con respecto al grupo control y el área colágeno tipo II positivo había decrecido con respecto al grupo control. Estos cambios, tanto en la eminencia articular como en el cóndilo fueron más evidentes al cabo de dos y cuatro semanas. No obstante, en el cóndilo la capa de cartílago era algo más delgada que en el control, pero presentaba una estructura normal. Con estos resultados, similares a los de la OA, los autores concluyeron que la carga funcional masticatoria continua de este experimento podría ser un inductor de osteoartritis.

En conjunto, todos los datos anteriores ponen en evidencia que las maloclusiones pueden producir alteraciones en la ATM en la que podrían estar implicadas algunas metaloprotesis relacionadas con la degradación de la MEC.

3

Hipótesis y objetivos

3 Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

La **hipótesis de trabajo** de la presente tesis doctoral es: Los desórdenes oclusales que aumentan ligeramente la dimensión vertical unilateralmente inducen la aparición de alteraciones degenerativas/artrosis en la articulación temporomandibular.

3.2. Objetivos

El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de la etiopatogenia de la osteoartritis de la articulación temporomandibular. Y los **objetivos específicos** son

- 1.- Evaluar si los desórdenes oclusales, como el aumento de la dimensión vertical unilateral que se puede generar de forma iatrogénica al realizar una rehabilitación protésica, una obturación o reconstrucción podrían inducir cambios de tipo degenerativo en el cartílago articular de la ATM.
- 2.- Analizar y comparar los cambios en el cartílago articular y tejido subcondral del cóndilo mandibular provocados por los cambios oclusales, mediante resonancia magnética y estudio estructural.
- 3.- Mostrar, cuantificar y comparar los posibles cambios en la expresión de las matriz metaloproteasas MMP-2, MMP-3, MMP-9 en el cartílago articular del cóndilo mandibular ocasionadas por los trastornos oclusales.

4

Material y técnicas

4 Material y técnicas

4.1. Animales de experimentación y diseño experimental

Para la realización del presente trabajo se utilizaron 25 ratas hembra, cepa Wistar, de 8 semanas de edad y 250 g de peso, aproximadamente, procedentes del Bioterio de la Universidad de Oviedo. El Bioterio de la Universidad de Oviedo e Instituciones Sanitarias Concertadas, (O.M. de 28 de febrero de 1990; B.O.E. del 09-03-1990) es un Centro de apoyo a la investigación científica que proporciona animales controlados y mantenidos en condiciones medioambientales constantes, registrado con el nº:33443591 en la Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado de Asturias como centro de cría y usuario de animales de experimentación, en cumplimiento del R.D.53/2013.

Las ratas fueron suministradas por el laboratorio Charles River a las 6 semanas de vida y se aclimataron durante dos semanas hasta el inicio de los trabajos de experimentación. Los animales se mantuvieron en idénticas condiciones de iluminación, y alimentación y agua *ad libitum*, y se asignaron aleatoriamente a un grupo experimental (n = 12), un grupo control 1 (n = 4) y un grupo control 2 (n = 9).

Las condiciones de estabulación de los animales cumplieron la Ley del Principado de Asturias 13/2002, de 23 de diciembre (BOPA de 31-XII-2002) sobre bienestar animal y el acuerdo de 25 de junio de 2019, del Consejo de Gobierno de la Universidad de Oviedo sobre el Reglamento del Comité de Ética en la Investigación. Acuerdo de 25 de junio de 2019 del Consejo de Gobierno de la Universidad de Oviedo (BOPA de 23-VII-2019).

4.1.1. Creación de la alteración oclusal

Los animales fueron sometidos a anestesia/sedación con isoflurano al 4% vía inhalatoria en la fase inducción y al 2% para el mantenimiento durante la exploración (Fig. 4.1).

La alteración oclusal se creó añadiendo composite fotocurable a los tres molares superiores derechos de las ratas del grupo experimental (n = 12) de 8 semanas de vida. Para ello se grabó la superficie oclusal con ácido ortofosforico al 37% (Octacid®), se lavó, se secó, y después se aplicó adhesivo fotopolimerizable (Prime-Bond de

Dentsply®), y composite fotopolimerizable de sectores posteriores (Grandio de Voco®). Con un espátulín de composite se rellenaron las fosas dejando una superficie plana (Fig. 4.2). Este trastorno oclusal se mantuvo durante 16 semanas (Fig. 4.3).

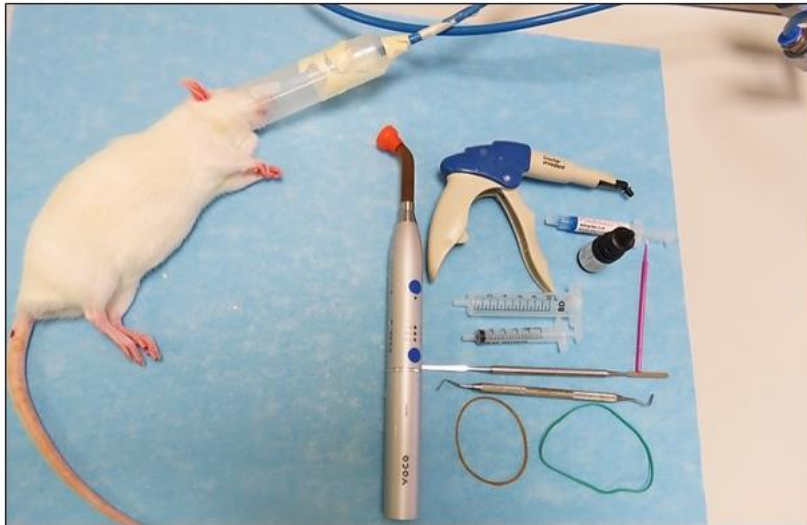


Figura 4.1.- Anestesia de los animales y material utilizado para la creación de la alteración oclusal.

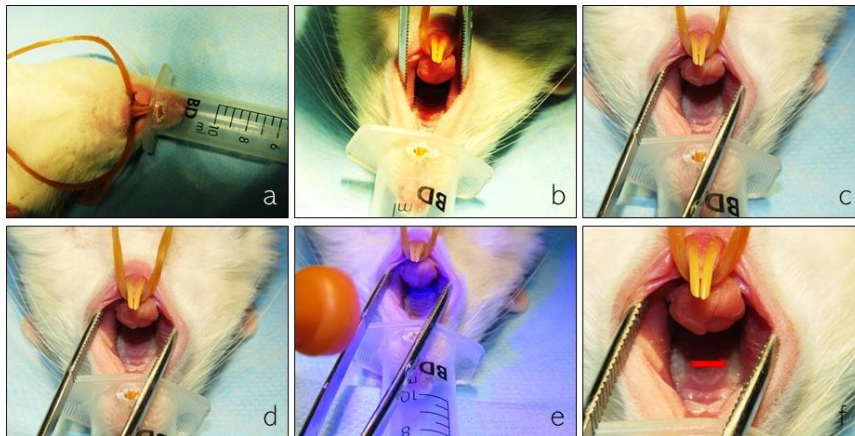


Figura 4.2.- Fases de la creación de la maloclusión.

4.1.2. Monitorización y seguimiento

Durante las 16 semanas de duración de las condiciones experimentales los animales se monitorizaron semanalmente para controlar el peso, el mantenimiento del composite en correcto estado y el crecimiento de los incisivos. Los composites que se iban desgastando o estaban fracturados se reponían, y en las ocasiones que algún animal presentaba sobrecrecimiento de los incisivos se limaron. En general, todos los animales fueron aumentando y manteniendo su peso correctamente.

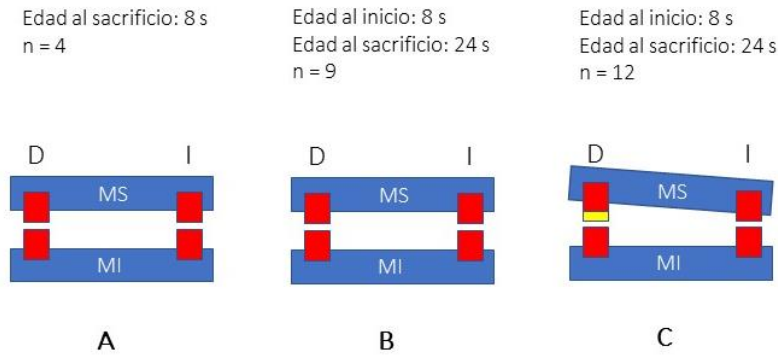


Figura 4.3.- Edades de los animales, numero de los animales y esquema de los grupos de animales estudiados: controles de edades al principio y final de la experimentación (A. B) y con maloclusión (C). D: derecha, I: izquierda, MI: maxilar inferior, MS: maxilar superior

4.1.4. Sacrificio

Las ratas del grupo control 1 se sacrificaron a las 8 semanas de vida, tras la realización de la resonancia magnética. Las ratas de grupo control 2 y las del grupo experimental se sacrificaron a las 24 semanas de vida, tras la realización de las últimas técnicas de imagen. Todas ellas se eutanasiaron mediante la inhalación de CO₂.

4.2. Técnicas

4.2.1. Estudios de imagen

El estudio se llevó a cabo en el Área de Imagen Preclínica, de los Servicios Comunes de Investigación de la Universidad de Oviedo. Se realizaron resonancias magnéticas a las 8 semanas de vida a las 25 ratas de todos los grupos y resonancias magnéticas y tomografía computarizada a las 16 y 24 semanas de vida a las ratas del grupo experimental y control 2. En todos los casos los animales fueron anestesiados con isofluorano al 4% en oxígeno en la fase de inducción y al 2% para el mantenimiento durante la exploración. Las ratas se colocaron en posición de cúbito prono en la camilla de exploración de CT o RM. Para el estudio de CT, se empleó el CT de un equipo ARGUS PET-CT (SEDECAL, Algete, Madrid, España) dotado de un sistema de panel plano con tecnología de reconstrucción CMOS. El campo de visión utilizado es de 68 x 68 mm. El área activa de detectores de 120 x 120 mm. Tamaño del Pixel de 50, 100, 200 µm. La fuente de Rayos X tiene un foco de 35 µm. El pico de Energía de Rayos X es de 0-50 kv

(Variable) Máxima Corriente de 1 mA y máxima potencia de 50 Watios. El equipo está autoapantallado. Las adquisiciones pueden realizarse con resolución de 50 μm , 100 μm o 200 μm . El tiempo mínimo de adquisición es de 90 segundos. Dispone del Sistema de postprocesado de la imagen con algoritmos 2DOSEM (**Fig. 4.4**).

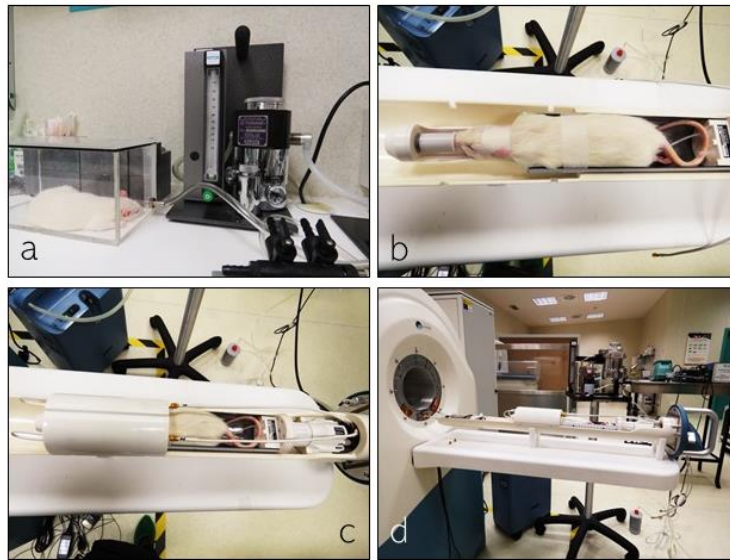


Figura 4.2.- Secuencia de la realización del estudio de imagen.

La adquisición de las imágenes de las cabezas de las ratas, empleadas en este estudio se realizó utilizando los siguientes parámetros: Corriente: 150 MicroA, Voltaje: 45 KV, Número proyecciones: 360, Número de disparos: 8, Resolución: estándar (200 micras), Tiempo de adquisición: 9 minutos 45 segundos. La reconstrucción se realizó con el algoritmo 2DOSEM. Tamaño de la imagen: 518x518; matriz: 1305x662.

Las imágenes de resonancia magnética fueron adquiridas en un equipo de 3 Teslas, Modelo Benchtop (MR Solution, Guildford UK). Se exploraron ambas ATMs de las ratas empleando una antena específica de cabeza de rata con un diámetro decms . En cada ATM se obtuvieron 8 *slices* con un grosor de 07 mm, gap de 0.1mm, en el plano axial (de hocico a cola), en secuencias potenciadas en T1 y en T2. Para las secuencias T1 se utilizaron los parámetros: TR: 720; TE: 11; Averages: 8; Echo Train: 4; Echo spacing: 11; Views: 248; Tiempo: 6 minutos 3 segundos. Para las secuencias T2 se utilizaron los parámetros: TR: 3800; TE: 68; Averages: 3; Echo Train: 8; Echo spacing: 17; Views: 240; Tiempo: 5 minutos 53 segundos.

4.2.2. Estudios histológicos

Todos los experimentos y técnicas de los estudios de estructura e inmunohistoquímica se desarrollaron en las dependencias y laboratorios del Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo (Laboratorio 9.11) y Sección de Patología Animal del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias.

Tras la realización de la eutanasia se aislaron las cabezas, se lavaron con agua corriente y solución salina fría durante 15 min, y a continuación se eliminaron los tejidos blandos, parte de los huesos de cráneo y el encéfalo. Las piezas objeto de estudio se introdujeron en una solución de formol al 10%, ácido nítrico 15,4 M y agua destilada (10:5:85 v/v/v) hasta la descalcificación completa (entre 7 y 10 días). Después se lavaron en agua durante 12 h y se procesaron para su inclusión en parafina.

La inclusión en parafina se efectuó de manera automatizada como sigue: las piezas se deshidrataron en una batería de etanoles de gradación creciente (70%: 24 horas; 80%: 1 hora; 90%: 1 hora; 96%: 1 hora; 100%: 1 hora x 3), se diafanizaron en xilol (100%: 30 min x 3) y se pasaron por parafinas blanda (30 min a 55° C) y dura (2 horas a 60° C). Tras la confección de los bloques, las muestras se orientaron para realizar cortes de forma seriada a un grosor de 10 µm con un micrótopo convencional (Microm®). Las secciones obtenidas fueron recogidas sobre portaobjetos gelatinizados y secadas en estufa a 45° C durante 24h antes de su utilización.

Previamente a la realización de las técnicas estructurales y de inmunohistoquímica, se procedió a la desparafinización mediante baños en xilol 100% (20 min x2) y la rehidratación se realizó pasando los cortes por una batería de alcoholes de gradación decreciente (de 10 min cada uno) hasta agua corriente (20 min).

4.2.2.1. Estudios estructurales: Hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson

La técnica de la hematoxilina-eosina se realizó de manera rutinaria en un procesador automático. Para la realización de la técnica del tricrómico de Masson las secciones hidratadas se pasan por hematoxilina de Weigert (5 min), después se lavan con agua corriente (10 min), seguido de tinción en fucsina de Ponceau (5 min), ácido fosfomolibdico (5 min) y verde luz (5-7 min). Mediante esta técnica el tejido conectivo

aparece de color verde, el tejido epitelial del color rojo y el muscular pardo. Las secciones teñidas con el tricrómico de Masson, y ocasionalmente las de H&E se utilizaron para detectar los posibles cambios morfológicos, valorar el grosor del cartílago articular y del disco articular, así como para valorar la presencia o no de sinovitis.

4.2.2.2. Estudio inmunohistoquímico

Las secciones desparafinizadas y rehidratadas, 5 por cada animal, separadas 100 µm entre ellas, se lavaron en una solución de TBS (solución tris buffer pH 7.4) y a continuación se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena durante 10 minutos con una solución en tampón de H₂O₂ al 3%; después las secciones se lavaron en el mismo tampón durante 10 minutos. Tras bloquear las uniones inespecíficas con albúmina sérica bovina al 10% durante 20 minutos, las secciones, sin lavar, se incubaron durante la noche a 4°C en una cámara húmeda, con los anticuerpos primarios: anti-MMP2 (clone MMP2/2C1) LS-C2814-100 desarrollado en ratón, a una dilución de 1:100 (LifeSpan Biosciences, Seattle, WA, USA); anti-MMP3 (EP1196Y, Ab52915) a una dilución de 1:200 (Abcam, Santa Cruz, CA, USA); anti-MMP9 (ab38898) desarrollado en conejo, a una dilución de 1:200 (Abcam, Santa Cruz, CA, USA). Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron en TBS (15 min) y después se incubaron durante 30 minutos, a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario (Dako EnVision labelled polymer-HR anti-conejo IgG o anti-ratón IgG). Finalmente, tras un lavado en TBS, se reveló la inmunorreacción con una solución de 3-3' diaminobencidina (DAB, kit de revelado de Dako). Tras un breve lavado en agua corriente las secciones se contrastaron con hematoxilina, se lavaron en agua, se deshidrataron en una batería de alcohol etílico en concentración creciente, se diafanizaron en xilol y se montaron con Entellan®.

La especificidad de la inmunorreacción desarrollada se comprobó sustituyendo el anticuerpo primario por un suero específicamente preabsorbido, a por un suero de conejo preinmune. En ambos casos no se detectó inmunorreacción específica. Para establecer los detalles estructurales los cortes fueron contrastados con hematoxilina de Harris.

4.2.2.3. Estudio histométrico y de análisis de imágenes

La densidad celular (número de células/mm²) se determinó en diferentes zonas del cóndilo mediante recuento manual de los núcleos utilizando una herramienta de área para seleccionar la región delimitada y calcular el área. Para las mediciones del disco de la ATM se utilizaron secciones de H&E y tricómico y dos observadores independientes valoraron el grosor del disco para la zona medial, central y lateral del disco. Todas las mediciones se cuantificaron utilizando el software de imágenes Olympus cellSens Dimension y la diferencia entre los grupos se analizó estadísticamente utilizando el software Prism 6 Graphpad como se describe a continuación.

Las secciones procesadas para la detección MMP-2 y MMP-9 se escanearon con un escáner SCN400F (Leica Biosystems™, Newcastle, Reino Unido) y archivadas con el software SlidePath Gateway LAN (Leica Biosystems™). Sobre ellas, en los mismos campos del cartílago y del disco articular se llevó a cabo un análisis morfométrico y densitométrico. En el primero se determinó el porcentaje de área inmunomarcada con anticuerpos MMP-7 y MMP-9; los resultados se expresan como % de píxeles positivos, de color marrón oscuro, de los campos analizados. En cuanto al análisis densitométrico, la intensidad de inmunotinción para cada anticuerpo investigado se evaluó en cinco secciones por animal separadas por 100 µm. Cada sección se escaneó con un escáner SCN400F (Leica Biosystems™, Newcastle, Reino Unido) y se anotó utilizando el software LAN SlidePath Gateway (Leica Biosystems™). Luego se aplicó aleatoriamente una cuadrícula de 1 mm² sobre 2 imágenes ampliadas de 500 µm de x en 4 campos no superpuestos (4 mm² por sección; 20 mm² por sujeto), y las terminaciones nerviosas libres y los corpúsculos sensoriales dentro de la cuadrícula fueron contados por dos observadores independientes. Los resultados se expresan como números absolutos para las densidades de los corpúsculos sensoriales y las terminaciones nerviosas libres por cm². La intensidad de la inmunotinción desarrollada con las diferentes capas retinianas se evaluó en unidades arbitrarias de niveles de grises que van desde 1 (negro) hasta 256 (blanco) utilizando un sistema de análisis de imágenes (Sistema MIP, Servicio de Análisis de Imágenes, Universidad de Oviedo, España). Por lo tanto, las intensidades se dividieron en cuatro grupos (64 unidades de nivel de gris cada uno) referidos en el texto y las tablas como fuertes (1-64, ++++), altos (65-128, +++), intermedios (129-192)

y bajos (nivel 193 del fondo en las secciones de control, +). Las intensidades de gris superiores a las de fondo de las secciones de control correspondientes se consideraron no reactivas. Aunque intentamos procesar las muestras de forma idéntica, puede haber variaciones en la intensidad de la inmunorreacción final debido a aspectos técnicos, es decir, diferencias en la penetración del fijador.

4.2.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Los datos se probaron para determinar la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Todas las variables se distribuyeron normalmente. La prueba *t* de Student se utilizó para las comparaciones entre dos medias. Los valores de *P* inferiores a 0,05 ($P < 0,05$) y 0,001 ($P < 0,001$) se consideraron estadísticamente significativos y muy significativos, respectivamente.

5

Resultados

5 Resultados

5.1. Estudio de resonancia magnética

El estudio mediante resonancia magnética nuclear (RMN) llevado a cabo tuvo como objetivo estudiar los cambios que se producen en la ATM debidos a las alteraciones oclusales que aumentan la dimensión vertical unilateralmente. Se realizaron RMN a todos los animales a las 8 semanas de vida (en el momento de realizar el trastorno oclusal) y a las 16 y 24 semanas de vida evaluando las variables estrechamiento del espacio articular (EEA) y derrame articular.

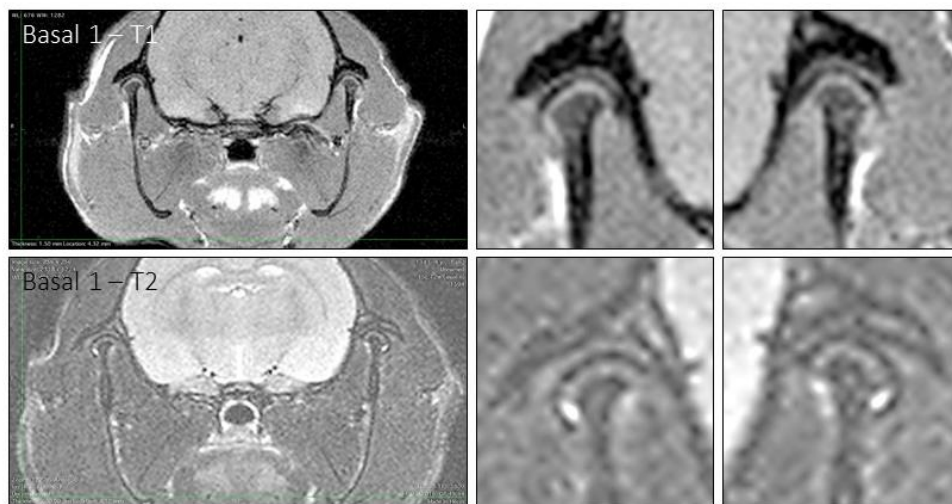


Figura 5.1.- Imágenes en secuencias T1 y T2 en un animal correspondiente al grupo basal 1

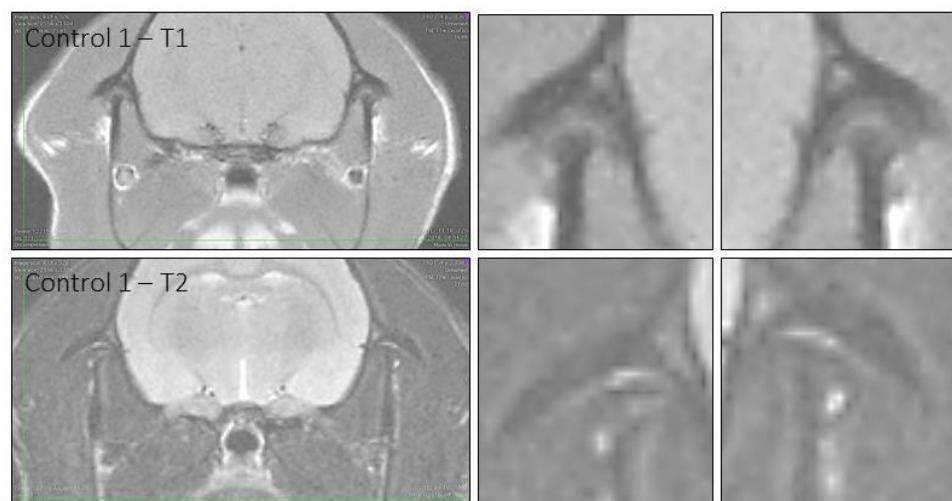


Figura 5.2.- Imágenes en secuencias T1 y T2 en un animal correspondiente al grupo control 1

En los animales del grupo experimental, a las 16 semanas de vida, se encontró EEA en ambas ATMs en el 66%, aproximadamente (9/12) de los animales del grupo experimental, mientras que no se encontró EEA en ningún control. Sin embargo, a las 24 semanas de vida, el EEA se observó en ambas ATM en todos los animales del grupo experimental, mientras que en el grupo control sólo se encontró en una ATM. Por otro lado, se apreciaron evidencias de derrame articular en ambas ATM en 4/12 animales del grupo experimental sin signos del mismo en los animales de los grupos controles (Figs. 5.1, 5.2, y 5.3).



Figura 5.3.- Imágenes en secuencias T1 y T2 en un animal correspondiente al grupo control 2

Los resultados de los parámetros analizados se resumen en la **tabla 5.1**.

Tabla 5.- Variables analizadas en los animales de 8 meses vs 24 meses

Variable	Control	Experimental	Total
Estrechamiento articular derecho	ns	0.00009	0.0003
Estrechamiento articular izquierdo	-	0.0009	0.0003
Alteración contorno articular derecho	-	0.0016	0.0016
Alteración contorno articular izquierdo	-	0.0027	0.0027
Tipo alteración contorno condilar derecho	-	0.0016	0.0016
Tipo alteración contorno condilar izquierdo	-	0.0027	0.0027
Cambios en morfología derecha	ns	0.0005	0.0001
Cambios en morfología izquierda	ns	0.0005	0.0001

Para el análisis estadístico se ha aplicado el Test de McNemar para variables cualitativas y emparejadas. En todas las variables analizadas se han recodificado los valores como normal o patológico, sin entrar en este último a considerar si tal circunstancia

pertenece a una categoría “patológica” determinada. Así a título de ejemplo se puede decir que en la variable CM/TM lo que se codificó fue si se había cambios en el tamaño del menisco, sin entrar a considerar si se había producido un aumento, disminución o estaba arrugado. Los valores de t de la tabla se refieren a los cambios en el grupo control o experimental comparando a los 8 meses y a los 24 meses. En el Total se recoge el valor estadístico entre los 8 y 24 meses globalmente incluyendo al grupo control y experimental.

Los datos que muestran **la tabla 5.1.** muestran alteraciones del espacio e interlínea articular y presencia de edema de médula ósea y derrame analizados con las resonancias evidencian que 2 de los parámetros a estudiar no eran valorables ni a las 16 ni a las 24 semanas: irregularidad interlínea articular y la presencia de edema en la médula ósea.

Respecto al estrechamiento del espacio articular a las 16 semanas (8 semanas después de introducir la interferencia oclusal) se pudo observar que 2/3 de los individuos estudiados del grupo experimental presentaban la alteración en ambas articulaciones por igual, mientras que la mayoría del grupo control no presentaban ninguna alteración en la ATM izquierda y ninguno la presentaba en la ATM derecha.

A las 24 semanas (16 semanas después de introducir la alteración) observamos que prácticamente la totalidad del grupo experimental presenta un aumento del espacio articular, observando un incremento de casi 1/3 respecto a las 16. Por otro lado, del grupo control tan sólo 1/3 de las ratas van a presentar la alteración.

En el grupo control no se observó presencia de derrame articular ni a las 16 ni a las 24 semanas en ninguna de las articulaciones. Mientras que en el grupo experimental lo presentaba menos de 1/3 de las ratas tanto a las 16 como a las 24 semanas y con la misma prevalencia en las 2 ATMs.

Los datos relativos a la alteración del contorno articular se muestran relativo a las variaciones que sufre el contorno articular, la totalidad de las ratas del grupo control se encontraron sin alteración tanto a las 16 como a las 24 semanas, mientras que en el grupo experimental a las 16, aproximadamente la mitad de los individuos se encontraban sin alteración en ambas articulaciones, 1/5 presentaba aplanamiento de la

cabeza del cóndilo en la ATM derecha, 1/4 otras alteraciones en ambas ATMs y 1/4 una alteración de tipo bulboso. En cambio, a las 24 semanas, el número de ratas que se encontraba sin alteración descendió a menos de 1/4, la gran mayoría presentaba aplanamiento y alteraciones bulbosas.

Por último, en el análisis de cambios morfológicos/tamaño menisco se constata que a las 16 semanas se pudo observar que en el grupo control no aparecían alteraciones en ningún individuo en la ATM derecha y en una mínima parte en la ATM izquierda. En cambio, casi la mitad del grupo experimental se encontraba sin alteración, la otra mitad con el tamaño del menisco disminuido y un pequeño porcentaje presentaba otro tipo de alteración. A las 24 semanas las ratas del grupo control 2/3 no presentaba ninguna alteración y un 1/3 disminución del tamaño del menisco, mientras que la totalidad de las ratas del grupo experimental presentaba en ambas articulaciones una disminución.

5.2. Análisis estructural

5.2.1. Controles de 4 y 24 semanas

En los grupos control, de 4 (Fig. 5.4) y 24 (Figs 5.5 y 5.6) semanas, el cartílago articular glenoideo y del cóndilo mandibular, presento una estructura normal en 5 capas: fibrosa o superficial, proliferativas, intermedias, hipertróficas y calcificadas. La capa superficial contenía condrocitos orientados en paralelo y con estructura normal. Como era de esperar no se apreciaron diferencias entre los cóndilos de ambos lados.

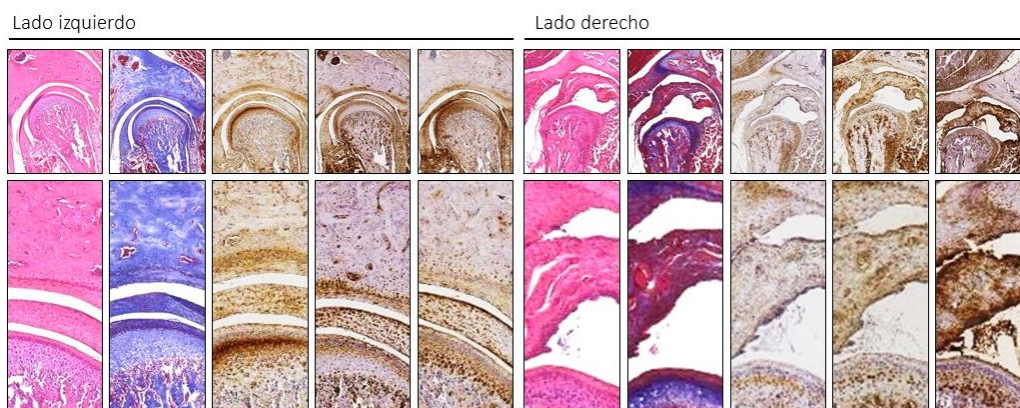


Figura 5.4.- Secuencia de microfotografías de la ATM, en cortes coronales, de un animal control de 4 semanas. De izquierda a derecha: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, detección inmunohistoquímica de MMP2, MMP3 y MMP9. Las imágenes de las filas inferiores son detalles magnificados de las superiores.

Por su lado, el disco articular en el grupo control mostró una composición normal de tejido conectivo regular y fibrocartílago. También la morfología de los condrocitos fue normal, con núcleos redondeados y grandes, y estaban orientados con el eje mayor paralelo a la superficie.

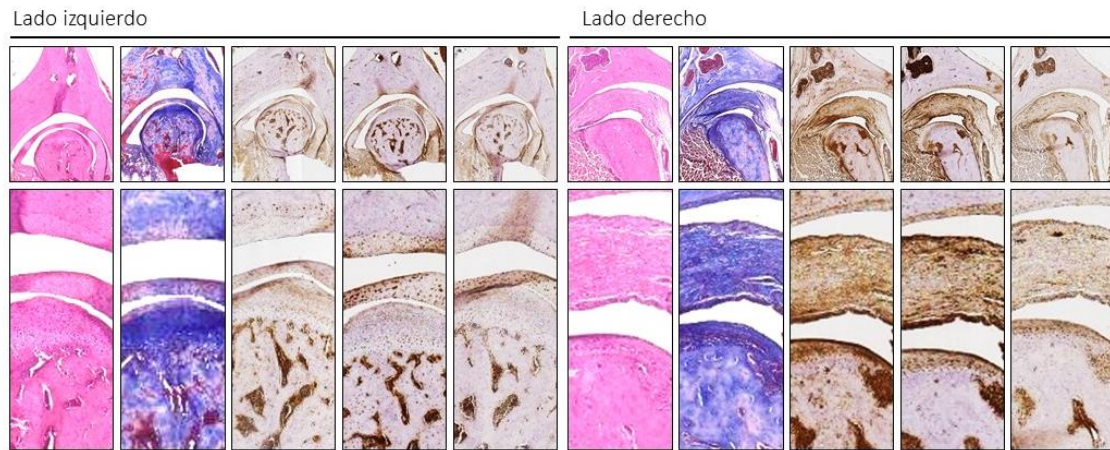


Figura 5.5.- Secuencia de microfotografías de la ATM, en cortes coronales, de un animal control de 24 semanas. De izquierda a derecha: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, detección inmunohistoquímica de MMP2, MMP3 y MMP9. Las imágenes de las filas inferiores son detalles magnificados de las superiores.

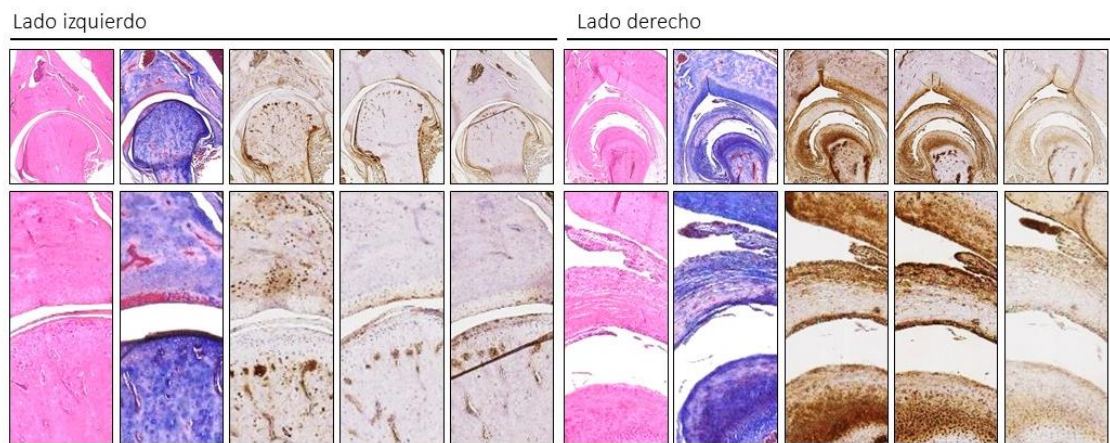


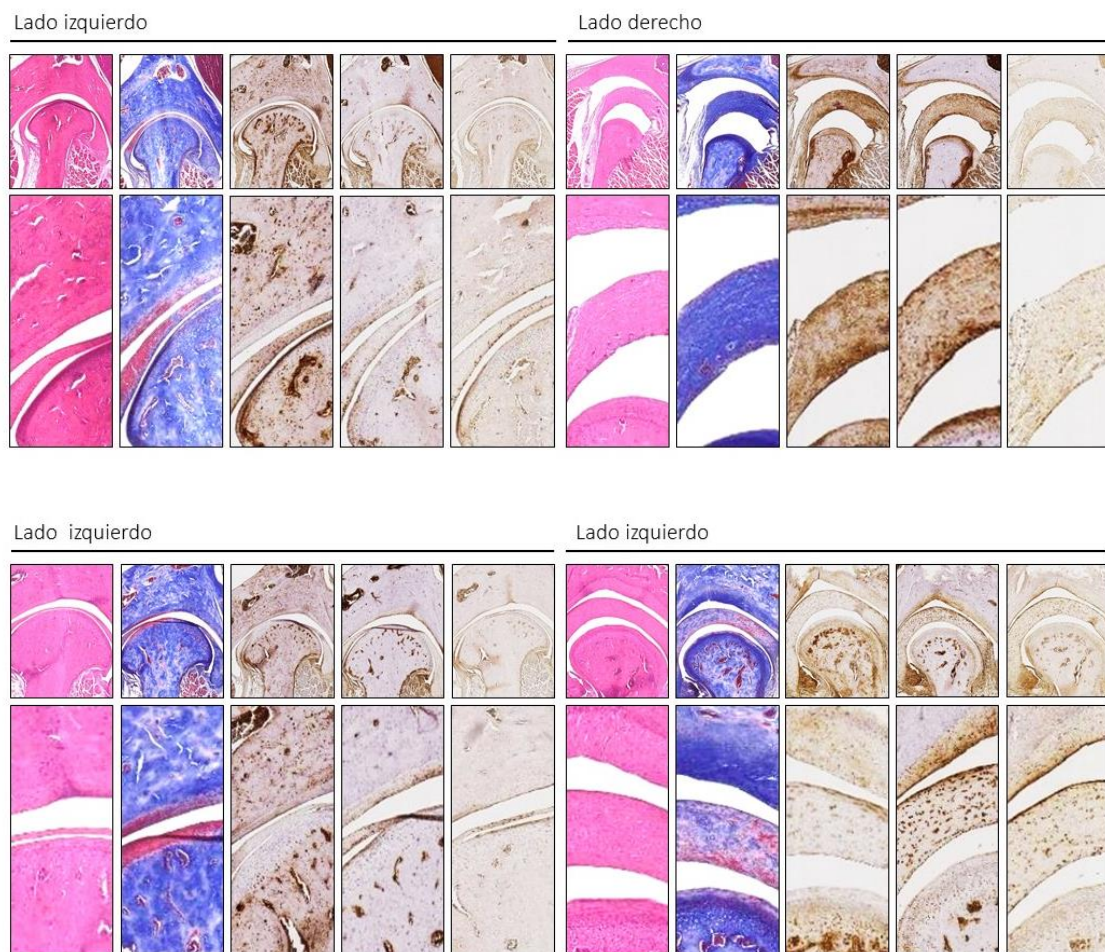
Figura 5.6.- Secuencia de microfotografías de la ATM, en cortes coronales, de un animal control de 24 semanas. De izquierda a derecha: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, detección inmunohistoquímica de MMP2, MMP3 y MMP9. Las imágenes de las filas inferiores son detalles magnificados de las superiores.

5.2.2. Experimental de 24 semanas

La situación experimental creada en este estudio hace que en la ATM de lado con resalte se origine compresión permanente en la articulación homolateral, mientras que en el lado contrario la ATM debe tener una compresión normal o incluso disminuida por el balanceo de la mandíbula.

5.2.2.1. Lado con resalte

En los grupos experimentales, en la ATM del lado del resalte, se observó que cartílago articular estaba engrosado y la matriz extracelular ha perdido la coloración mixta magenta-azul típica en la mayoría de los animales. Además, no se pudo diferenciar la estratificación característica. Los condrocitos eran aplanados, con núcleos grandes, y su disposición irregular. En cuanto al disco articular, también se apreció un engrosamiento, anomalías en la orientación de los núcleos y mantenimiento de la laminación (Figs. 5.7 y 5.8).



Figuras 5.7 y 5.8.- Secuencia de microfotografías de la ATM, en cortes coronales, de dos animales experimentales de 24 semanas, con resalte en el lado derecho. De izquierda a derecha: hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson, detección inmunohistoquímica de MMP2, MMP3 y MMP9. Las imágenes de las filas inferiores son detalles magnificados de las superiores.

5.2.2.2. Contralateral

No se observaron cambios estructurales en el cartílago articular ni en el disco articular respecto a los animales del grupo control de la misma edad (Figs. 5.7 y 5.8).

5.3. Grosor del cartílago articular y del disco articular

Como se expuso en el apartado de Material y Técnicas, se evaluaron tanto en disco como en los cartílagos articulares 5 segmentos de la porción central, ya que es la zona de mayor carga (Zhang et al., 2019). La cuantificación de las células se realizó en el disco articular y para la zona superficial del cartílago articular, que están compuestas por fibrocartílago. La zona superficial se definió por la frontera entre las zonas superficiales y proliferativas en función de la morfología celular y la composición de la matriz.

El espesor del cartílago articular condilar fue significativamente superior de los animales de 4 semanas respecto a los de 24 (Tablas 5.2), y con menores diferencias también en el glenoideo (Tablas 5.3).

Tabla 5.2.- Valores de la altura del cartílago condilar (expresado en μm)

4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P Iz vs. Dc
Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
182	188	161	169	< 0.05	318	186	< 0.01	< 0.01

Tabla 5.3.- Valores de la altura del cartílago glenoideo (expresado en μm)

4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P Iz vs. Dc
Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
166	171	160	151	n.s.	203	181	< 0.05	< 0.05

Pero las mayores diferencias en el espesor de los elementos articulares, se observaron en el disco articular, y eran objetivables en la observación microscópica. En el disco articular se observe un aumento estadísticamente significativo en el lado del resalte, comparado con el del lado contrario y con el control, pero también está aumentado el espesor del fibrocartílago en el lado contralateral (Tablas 5.4).

Tabla 5.4.- Valores de la altura del disco articular (expresado en μm)

4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P Iz vs. Dc
Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
215	221	189	201	n.s.	406	302	< 0.01	< 0.05

Otro de los parámetros analizados ha sido la densidad celular. El número de células, expresado en densidad por mm², también se vieron influenciada por la edad y por el estado experimental creado. En los animales de más jóvenes fue donde se observó la mayor densidad celular, sin variaciones entre los lados derecho e izquierdo. A las 24 semanas, en condiciones de normalidad, se apreció una reducción en la densidad celular en los cartílagos articulares, pero no en el disco articular. Y en el grupo experimental se observó una reducción significativa en el número de células en el lado del resalte, y en menor medida en el lado contralateral (**Tabla 5.5**).

Tabla 5.5.- Densidad celular

	4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P Iz vs. Dc
CG	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	215	221	189	201	n.s.	138	174	< 0.05	< 0.05
CC	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	228	217	182	189	< 0.05	122	194	< 0.01	< 0.05
DA	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	204	214	187	194	n.s.	134	167	< 0.01	< 0.05

De acuerdo con los resultados en el conteo de los condrocitos parece evidente que la presión mantenida sobre el cartílago articular determina la muerte de condrocitos, característica de la OA.

5.4. Expresión de metaloproteasas de matriz extracelular 2 (MMP-2), 3 (MMP-3) y 9 (MMP-9)

Las tres MMPs analizadas intervienen en la degradación de la matriz extracelular, especialmente del colágeno, y de algunos agreganos. La inmunorreactividad se manifiesta por una coloración marrón intensa, que se distribuyó por todos los componentes de la ATM, aunque nuestro análisis se ha centrado, exclusivamente en el cartílago articular y en el disco fibroso.

Para valorar la actividad de estas proteasas, se han utilizado dos criterios: el área ocupada por la inmunorreacción y la intensidad de la misma. Aunque es bien conocido que no existe relación estequiométrica entre la cantidad de antígeno y la intensidad de la inmunorreacción, el elevado número de campos histológicos analizado permite valorar de una forma adecuada al problema. En principio, cabe esperar que en los animales experimentales la actividad de estas enzimas se encuentre aumentada (**Figs. 5.4 a 5.8**).

5.5. Histometría

Los valores de las áreas ocupadas por la inmunorreacción para las tres proteasas analizadas, en las diferentes zonas de la articulación, se recogen en las **tablas 5.6 a 5.8**. En base a estos resultados, en los animales controles, la que más se expresa es MMP-2 y existen variaciones considerables sobre la preponderancia de localización en el cartílago y en el disco articular.

Tabla 5.6.- Área ocupada por la actividad MMP-2 (expresado en %)

	4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P lz vs. Dc
CG	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	21	18	9	12	< 0.05	22	19	< 0.05	< 0.05
CC	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	11	13	8	7	< 0.05	36	18	< 0.01	< 0.05
DA	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	4	4	6	5	n.s.	16	16	< 0.01	< 0.01

Tabla 5.7.- Área ocupada por la actividad MMP-3 (expresado en %)

	4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P lz vs. Dc
CG	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	6	8	5	5	n.s.	11	12	< 0.05	< 0.05
CC	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	4	4	3	2	n.s.	10	12	< 0.05	< 0.05
DA	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	7	8	5	5	n.s.	8	9	n.s.	n.s.

Tabla 5.8.- Área ocupada por la actividad MMP-9 (expresado en %)

	4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P lz vs. Dc
CG	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	7	8	6	5	n.s.	13	10	< 0.05	< 0.05
CC	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	4	4	4	2	n.s.	14	6	< 0.05	< 0.01
DA	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	4	5	5	5	n.s.	17	14	< 0.05	< 0.05

La situación experimental creada produce elevaciones significativas en el área ocupada por la inmunorreacción para MMP-2 y MMP-9 en todas las estructuras articulares, pero no para MMP-3 en el disco articular. Además, MMP-2 también está influenciada por la edad, siendo menor a las 24 que a las 4 semanas.

5.6. Densitometría

Los valores de la densitometría han de interpretarse siempre en sentido contrario al valor numérico; es decir: cuanto mayor sea el valor menor es la intensidad del inmunomarcaje y viceversa.

La intensidad de la inmunorreacción desarrollada para MMP-2 muestra un reducción significativa en los cartílagos articulares en los animales de 24 semanas respecto a los de 4, pero no es el disco articular. La situación de maloclusión aumenta la intensidad del inmunomarcaje en los dos lados, pero con mayor intensidad en el homolateral al resalte (Tabla 5.9).

Tabla 5.9.- Intensidad de inmunorreacción de MMP-2 (expresado unidades arbitrarias de gris)

	4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P lz vs. Dc
CG	Dcha	lzq	Dcha	lzq		Dcha	lzq		
	71	69	102	100	< 0.05	23	52	< 0.01	< 0.05
CC	Dcha	lzq	Dcha	lzq		Dcha	lzq		
	63	68	74	77	n.s.	18	35	< 0.01	< 0.01
DA	Dcha	lzq	Dcha	lzq		Dcha	lzq		
	61	71	74	69	n.s.	16	42	< 0.01	< 0.05

Por su lado MMP-3 no mostró cambios edad-dependientes en la intensidad de la inmunorreacción en ninguna de las estructuras articulares. Por el contrario, la situación experimental de maloclusión lleva a incrementos muy significativos en ambas ATM, si bien el mayor aumento en la intensidad del marcaje se observó en la articulación homolateral (Tabla 5.10).

Tabla 5.10.- Intensidad de inmunorreacción de MMP-3 (expresado unidades arbitrarias de gris)

	4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P lz vs. Dc
CG	Dcha	lzq	Dcha	lzq		Dcha	lzq		
	82	77	93	96	n.s.	41	81	< 0.01	< 0.05
CC	Dcha	lzq	Dcha	lzq		Dcha	lzq		
	104	82	97	102	n.s.	28	82	< 0.01	< 0.01
DA	Dcha	lzq	Dcha	lzq		Dcha	lzq		
	112	96	91	74	n.s.	33	72	< 0.01	< 0.01

Finalmente, el comportamiento de la intensidad del inmunomarcaje para MMP-9 experimento disminución significativa edad-dependiente en ambos cartílagos articulares sin afectar al disco articular. Y en cuanto a la situación de maloclusión creada, tanto en los cartílagos articulares

como en el disco se produjo un marcado aumento en la intensidad de inmunotinción que fue más evidente en el lado del resalte que en la ATM contralateral (**Tabla 5.10**).

Tabla 5.10.- Intensidad de inmunorreacción de MMP-9 (expresado unidades arbitrarias de gris)

	4 semanas CONTROL		24 semanas CONTROL		Valor P vs. 4s	24 semanas MALOCCLUSION		Valor P vs. control	Valor P lz vs. Dc
CG	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	41	56	88	101	< 0.05	23	52	< 0.01	< 0.05
CC	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	62	62	102	99	< 0.05	18	35	< 0.01	< 0.01
DA	Dcha	Izq	Dcha	Izq		Dcha	Izq		
	68	72	81	77	n.s.	18	62	< 0.01	< 0.05

6

Discusión

6 Discusión

6.1. Consideraciones generales

La osteoartritis (OA) es una enfermedad compleja que afecta a cualquier articulación sinovial. La información actual sobre la OA proviene de estudios clínicos y preclínicos, que han demostrado ser herramientas imprescindibles para caracterizarla. Sin modelos preclínicos, no podrían existir los avances médicos actuales en el conocimiento y tratamiento de la enfermedad. Ahora bien, aunque existen similitudes entre animales y humanos, en el proceso de la enfermedad, un solo modelo animal no es suficiente para estudiar todas las características de la OA (Pelletier et al., 2010; Wendler et al., 2010; Malfait y Little, 2015).

La compresión permanente de la ATM también induce cambios en los filamentos intermedios del citoesqueleto de los condrocitos (Magara et al., 2012). Los modelos de inducción química por colágeno de OA redujeron significativamente el crecimiento mandibular y causaron cambios degenerativos en el cartílago condilar. Esta información ayuda a validar este modelo animal para estudiar el efecto de la artritis en las ATM en ratas en crecimiento. Este modelo tiene el potencial de ser utilizado en estudios futuros para evaluar posibles terapias para la artritis de la ATM (Crossman et al., 2021).

Cualquier alteración maxilomandibular no compensada que provoque una sobrecarga articular ya que la interferencia oclusal y el bruxismo provocan alteración de la ATM; Ambos tipos de estrés biomecánico modelo in vivo utilizado aquí estimularon estas dos condiciones frecuentes en la práctica dental (Manfredini et al., 2010). El modelo de interferencia unilateral oclusal se realizó porque generalmente la interferencia oclusal clínica es unilateral.

Olvera-Farias et al. (2016) realizaron tratamientos: interferencia oclusal de resina y desgaste dental unilateral. Para ambos tratamientos se realizó un grupo control de 5 animales respectivamente. Se realizaron dos veces de evaluación a la una y 15 días después de cada tratamiento. Se eligió un punto de tiempo de un día porque los síntomas tempranos se presentan después de una interferencia oclusal y se sospecha que aparecen cambios histológicos tempranos. En este estudio los tiempos de

evaluación fueron de 1 o 15 días después del tratamiento, debido a que nos interesaba estimar los cambios presentados en poco tiempo. En nuestro caso fue de xxx semanas por lo que es esperable que el daño articular sea mayor.

Investigar los efectos patológicos sobre el cartílago de la articulación temporomandibular de una prótesis de mordida cruzada anterior unilateral creada experimentalmente. La presente prótesis de mordida cruzada anterior unilateral condujo a la degradación del cartílago condilar mandibular (Wang et al., 2014). También modelos de desplazamiento anterior del disco (Togni et al., 2018).

El la disminución de la celularidad y el grosor del cartílago con la edad esta descrito por Chen et al. (2020) en la ATP del raton

La carga mecánica es un factor de riesgo importante para la OA y se han desarrollado varios modelos de ratón para estudiar el papel y los efectos de la mecánica en ella. Sin embargo, la mayoría de los modelos disponibles se centran en diartrosis de los miembros y no en la ATM (ver Poulet, 2016; Ghassemi et al., 2017). Por otro lado, La falta de un modelo animal que represente todos los tipos de OA, requiere conocimiento exacto sobre lo que se puede esperar de los resultados en cada especie y sus limitaciones (McCoy et al., 2015; Serra y Soler, 2019).

Por lo que se refiere a los modelos animales de OA de la ATM, los estudios son mucho menos numerosas. En la revisión bibliográfica efectuada hemos encontrado 3 modelos, no genéticos, en ratón.

En uno de ellos, Chen et al. (2009) encontraron cambios en la expresión génica del cartílago articular en el grupo de carga mecánica alterada en comparación con la carga normal, con disminución del grosor del cartílago articular y del inmunomarcaje para colágeno tipo II. Sin embargo, no observaron cambios degenerativos. Por su lado, Liu et al. (2014) utilizaron una prótesis de mordida cruzada anterior unilateral para aumentar la demanda de la ATM durante la masticación. A las 3 semanas encontraron adelgazamiento del cartílago, pérdida de proteoglicanos y colágeno tipo II, y disminución de la celularidad. Y el tercer modelo, se basa en la apertura continua y forzada de la boca utilizando un resorte mientras está bajo anestesia durante 1 h/día

durante 5 días. En este caso se apreció proliferación de condrocitos, aumento en la expresión génica de los marcadores anabólicos del cartílago Sox9 y colágeno tipo II, y engrosamiento óseo subcondral (Sobue et al., 2011). Aunque estos modelos se han utilizado con éxito para determinar los efectos de las cargas mecánicas alteradas en la ATM, aún no se han probado para la degeneración de la ATM, y es posible que se necesiten más experimentos de mayor duración y con ratones más viejos para probar su relevancia para la enfermedad.

En un modelo experimental de OA de la ATM inducido químicamente, Lemos et al. (2018) analizaron los cambios tanto en la articulación afectada como en la contralateral. En la ATM contralateral a la artrítica observaron hiperplasia de la sinovial, infiltrado inflamatorio crónico, desorganización del colágeno del disco, reducción de los proteoglicanos del cartílago, así como disminución en altura cartílago y el disco. A nivel molecular encontraron MMP-9 activa.

Originalmente se pensó que la OA debida al desgaste de las superficies articulares. Sin embargo, en la actualidad se conoce que la OA implica degeneración del cartílago, remodelación ósea anómala, la formación de osteofitos y la inflamación de la articulación (Kraus et al., 2015). No obstante, la abrasión mecánica en la articulación puede conducir a los cambios degenerativos progresivos. De forma resumida, en respuesta a una lesión causada por la estimulación mecánica de la articulación se inicia un mecanismo inflamatorio en las etapas iniciales de la enfermedad. En ellas, los condrocitos, osteoblastos y sinoviocitos liberan citoquinas, enzimas degradantes de la MEC (ADAMTS y MMP) que desencadenan el proceso (Sulzbacher, 2013; Man et al., 2014; Glyn-Jones et al, 2015).

6.2. Discusión de los resultados

El modelo creado por nosotros corresponde a una OA secundaria no invasiva (ver Kuyinu et al., 2016). Estos modelos tienen la ventaja de que son altamente reproducibles y los convierte en opciones adecuadas para estudiar la patogénesis de la artrosis y el posible papel de la inflamación sistémica en el proceso de la enfermedad. Se eligió un modelo de rata Wistar porque sus dientes no erupcionaban continuamente, y nuestros resultados pudieron compararse con otros obtenidos en estudios

relacionados previos que utilizaron el mismo modelo. Las alteraciones en el plano en ratas de la cepa Sprague-Dawley, Zhang et al. (2019) observaron cambios degenerativos en la ATM, con distribución irregular de la matriz extracelular y de los condrocitos, áreas del cartílago libres de células, aumento de la expresión de MMPs, disminución de la proliferación de condrocitos y pérdida ósea subcondral. Otros estudios de modificación de la oclusión dental, sin embargo, no mostraron modificaciones del cartílago articular cuando se realizaron extracciones unilaterales o altura oclusal (Kikuta et al., 2018; Toyoshima et al., 2003).

La histopatología es en la actualidad el *gold standard* para la evaluación de la OA en modelos animales (Rutgers et al., 2010). Las muestras histológicas, junto con la tinción inmunohistoquímica, se pueden utilizar para clasificar y medir el grado de degeneración en la articulación. El método de Mankin o HHGS (Sistema de Clasificación Histológica/Histoquímica) es el que mejor permite valorar la evolución de la OA en modelos animales (Mankin et al., 1971; van der Sluijs et al., 1992; Buckwalter y Mankin, 1998; Ostergaard et al., 1999) aunque presenta limitaciones investigar las etapas tempranas o intermitentes de la OA.

El disco articular de la ATP puede asimilarse a un menisco en otras articulaciones y también desempeña un papel de primer orden en la distribución de la carga en los compartimentos articulares y en la función de absorción mecánica de impactos. El desgarramiento meniscal, la degeneración no traumática, el daño meniscal o la disfunción causan OA (Englund et al., 2009; Pauli et al., 2011; Badlani et al., 2013). Del mismo modo, nuestros hallazgos en el lado homolateral al resalte con impacto unilateral del plano oclusal aparecen cambios degenerativos como condrocitos aplanados de morfología. Los cambios degenerativos observados con el desgaste dental unilateral son similares a los cambios encontrados con las extracciones unilaterales (Kikuta, 1980).

El componente más abundante de la MEC en el disco articular es el colágeno. Su cantidad se puede estimar de forma aproximada mediante la tinción del tricrómico de Masson. En el lado homolateral del grupo experimental, y en menor medida en el contralateral se ha apreciado una reducción del espesor que puede interpretarse como una reducción del colágeno. En estrecha relación con ello, están las MMPs, ya que se ha

observado un aumento de la inmunotinción, interpretable como un aumento de su cantidad, y las tres MMPs analizadas degradan estas proteínas (Wang et al., 2010; Zhang et al., 2013).

Es bien conocido que cuando el equilibrio entre la síntesis y degradación de la MEC fracasa el contenido de agua aumenta, el proteoglicano y el colágeno tipo II disminuyen y, finalmente, la red de colágeno se debilita (Heijink et al., 2012).

Aunque nosotros no hemos analizado los cambios progresivos, un plano oclusal unilateral modificado puede provocar cambios en la cantidad de colágeno incluso en tiempos cortos (Olvera-Farias et al., 2016).

Existen múltiples vías reguladoras en los condrocitos que reaccionan a los estímulos mecánicos, incluidas las vías y mecanismos de señalización que pueden conducir directamente a la transcripción, la traducción y los cambios posteriores a la transcripción, la organización extracelular mediada por células y la degradación de la ECM. Las articulaciones sinoviales pueden mantener la carga intacta durante las actividades normales de la vida sin desarrollar OA. Sin embargo, cuando la carga mecánica excede la tolerancia del cartílago para repararse y mantenerse; el daño del cartílago juega un papel importante en el desarrollo y la progresión de la degeneración articular de diferentes maneras. Un estrés excesivo de contacto superficial puede causar daño directo al cartílago articular y al hueso subcondral, y alterar negativamente la función del condrocitos (Heijink et al., 2012). En nuestro estudio, el número de condrocitos en el disco articular fue xxxxxx que el grupo control, pero claramente la etapa metabólica de los mismos no fue suficiente para producir colágeno, ya que se mostró una menor cantidad de colágeno, basado en el tono azul de la tinción tricrómica de Masson, que podría provocar una disminución de la producción de esta proteína.

El estrés mecánico en la ATM produjo algunas áreas dispersas libres de células en el cartílago articular, similares a los cambios degenerativos o lesiones tempranas similares a la OA a las 12 semanas después de la alteración del plano oclusal (Sun et al., 2009; Wang et al., 2012; Zhang et al., 2013). Los grupos celulares pueden adoptar una distribución diferente de las acumulaciones típicas de OA. Nuestros resultados sugieren que el disco articular de la ATM tensionado mecánicamente presenta el mismo

fenómeno, mostrando la distribución celular en una disposición de células del cordón umbilical a lo largo del disco articular.

En el disco articular también se observó marcado aumento en el grosor XXXX en el grosor en comparación con el grupo control, en cambio los otros grupos que mostraron alguna diferencia. El desgaste dental unilateral es un estrés mecánico intenso en comparación con la interferencia oclusal porque se produjo un desequilibrio del plano oclusal, y esa es la razón de este cambio a los 15 días después del tratamiento. Cuando se analizó el grosor del cartílago articular en el grupo de interferencia oclusal de resina a los 1 y 15 días se observaron cambios, a excepción del grupo 15R-CL, cuyo grosor aumentó significativamente respecto al control, esto parece estar relacionado con el aumento significativo de colágeno que también presenta este grupo, como observaron Wang et al., relacionaron estos cambios con una respuesta hipertrófica al estrés mecánico (2012). Yoshikawa et al. observaron con experimento de alteración del plano oclusal en cartílago articular a los 3 días después del tratamiento una estructura de adelgazamiento, también observaron formación de grupos celulares, como se muestra en nuestros resultados, encontraron que después de 1 semana este adelgazamiento desaparece, luego después de 2 semanas de tratamiento observaron un aumento de espesor (Yoshikawa et al., 2008).

En base a la gravedad de la OA, el grupo de trabajo OARSI clasificó la OA en siete grados, siendo de grado 0 cuando el cartílago no involucrado o intacto y de grado 6 cuando ya existe deformación del contorno articular. Esta técnica se basaba específicamente en la profundidad de la progresión en el cartílago para clasificar la OA. El grupo de trabajo de OARSI proporciona esta información a través de un conjunto publicado de pautas para cada animal utilizado en modelos animales (Custers et al., 2007; Aigner et al., 2010; Gerwin et al., 2010; Glasson et al., 2010; McIlwraith et al., 2010).

Centrándonos en las MMPs, objetivo de nuestro estudio, una vez que se liberan causan la degradación de la matriz de colágeno, lo que lleva a la degradación del cartílago articular (Xia et al., 2014). En estas condiciones, los condrocitos se hipertrofian, perdiendo la capacidad de formar una nueva matriz de cartílago (Sulzbacher, 2103). El

hueso subcondral sufre una remodelación anormal e invade más allá de la interfaz entre el hueso y el cartílago calcificado que conduce a la formación de quistes subcondrales y osteofitos (Glyn-Jones et al., 2015). Además, la liberación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por los condrocitos puede conducir a la vascularización de la membrana sinovial y a la invasión vascular de la articulación (Sulzbacher, 2103). La liberación de VEGF se debe a la carga mecánica prolongada en el cartílago articular (Pufe et al., 2003; Beckmann et al., 2014).

Las modalidades de imágenes que se utilizan con frecuencia para investigar la OA en humanos incluyen radiografías, resonancias magnéticas, microtomografías computarizadas (μ CT) y ultrasonidos. En ratas la radiografía se ha utilizado para estudiar la remodelación ósea subcondral y el estrechamiento del espacio articular. Desafortunadamente, la radiografía, que es idónea para la OA carece de sensibilidad para visualizar muchas variaciones en los modelos de animales pequeños (Roemer et al., 2014). Además, la radiografía solo permite la visualización en etapa tardía de la OA y no permite la visualización directa del cartílago en sí. La resonancia magnética (RM), a diferencia de la radiografía, es capaz de visualizar no solo el cartílago sino también los meniscos, ligamentos, sinovial y marcadores bioquímicos pertenecientes a la OA (Roemer et al., 2011). En virtud de su capacidad para contrastar en fase los tejidos, puede distinguir y estudiar tejidos individuales. A pesar de su alto costo, debido a su potencial y capacidades, la resonancia magnética es una herramienta de rápido avance que reemplaza a la radiografía en la caracterización y detección de las primeras etapas de la OA (Borthakur y Reddy, 2010; Conaghan et al., 2011; Glyn-Jones, et al., 2015). Hasta la fecha, la resonancia magnética se ha utilizado para estudiar varios modelos animales, pequeños y grandes, incluyendo ratas, conejos, conejillos de indias, perros y primates no humanos (macaco rhesus) (ver Kuyinu et al., 2016). Por ejemplo, T1 permite medir indirectamente la degeneración del cartílago, la disminución del grosor del cartílago, la pérdida de proteoglicanos y los cambios en la membrana sinovial. Por otro lado, en el mapeo T2, permite valorar sinovitis, macrófagos, orden de colágeno, esclerosis y pérdida de proteoglicanos (Bittersohl et al., 2009). El OARSI actualmente recomienda la resonancia magnética para la evaluación morfológica en humanos y también para su uso en ensayos preclínicos.

6.3. Limitaciones del estudio

Aunque en el presente trabajo de investigación se ha logrado el desarrollo de los objetivos propuestos, somos conscientes de que el estudio tiene una serie de limitaciones. La primera, que los estudios de imágenes realizados no han aportado todos los datos que se pretendía y que, por tanto, no ha permitido dirigir de la manera más adecuada los estudios estructurales. Y en segundo lugar, se debería haber utilizado una batería más amplia de anticuerpos para analizar más encimas degradantes, especialmente de la familia ADAMTS, así como de los inhibidores de las proteasas.

6.4. Futuras investigaciones

Las alteraciones oclusales iatrogénicas que aumentan la dimensión vertical pueden provocar cambios degenerativos articulares que podrían evitarse con un mínimo tratamiento oclusal. Por ello, deberían implementarse los procedimientos clínicos que eliminen la disarmonía oclusal. Esto podría aplicarse a los campos odontológicos que modifican las relaciones interdentarias: prostodoncia, operatoria u ortodoncia.

Es importante que el dentista identifique los trastornos oclusales en sus pacientes con el fin de establecer un tratamiento inmediato que va desde el tratamiento conservador de autocuidado hasta el tratamiento quirúrgico cuando sea necesario. En este estudio se observaron cambios degenerativos a corto plazo, por lo que el tratamiento a tiempo puede prevenir patologías degenerativas (Zang et al., 2013). Existen numerosos estudios que evalúan la zona superficial del daño condrocitos del cartílago articular en el TMD que han demostrado tener un papel principal en el desarrollo de la OA (Saarakkala et al., 2010; Zhang et al., 2013).

En un futuro próximo, se tratará de ampliar el estudio experimental a otras encimas degradantes de la matriz extracelular y realizar estudios detallados de la ATM en pacientes con maloclusiones.

7

Conclusiones

7 Conclusiones

Tras un análisis detallado de los resultados y de la oportuna discusión de los mismos se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- La alteración oclusal induce estrechamiento del espacio articular en ambas ATM en los individuos del grupo experimental, mientras que el derrame articular se observó solo en algunos animales del grupo experimental.
- 2.- El plano oclusal unilateral modificado puede inducir cambios morfológicos y estructurales tanto en el cartílago articular como en el disco articular que actúan como inductores iniciales del desarrollo de la patología degenerativa articular.
- 3.- La alteración oclusal unilateral creada reproduce un proceso patológico equiparable a la osteoartritis en la articulación temporomandibular, y afecta tanto a la articulación homolateral como, en menor medida, a la del lado contrario.
- 4.- El modelo de degeneración de la articulación tempormandibular creado cursa con aumento del espesor del cartílago articular y el disco articular que se acompaña por una reducción significativa en la densidad celular.
- 5.- Las metaloproteasas de matriz extracelular del cartílago MMP-2, MMP-3 y MMP-9 se detectan en condiciones de normalidad en los diferentes componente de la articulación temporomandibular y su expresión (valorada mediante histometría y densitometría) está elevada en la situación de maloclusión creada, y afecta a ambas articulaciones, con mayor incidencia a la homolateral.

8

Bibliografía

1 Bibliografía

- Aigner T, Cook JL, Gerwin N, Glasson SS, Laverty S, Little CB, et al. Histopathology atlas of animal model systems—overview of guiding principles. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18, Supplement 3:S2-6.
- Akamine Y, Kakudo K, Kondo M, Ota K, Muroi Y, Yoshikawa H, et al. Prolonged matrix metalloproteinase-3 high expression after cyclic compressive load on human synovial cells in three dimensional cultured tissue. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 41:874-81.
- Alonso A, Álvaro-Gracia JM, Andreu JL, Collantes E, Cruz J, Gratacos J, Laffón A, Martín E, Martínez V, Rodríguez C, Tornero J. *Manual S.E.R de las enfermedades reumáticas*. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 3ª ed: 461-75. 2001.
- Alkhubaizi Q, Sorkin JD, Hochberg MC, Gordon SM. Risk Factors for Facial Pain: Data from the Osteoarthritis Initiative Study. *J Dent Oral Biol*. 2017; 2(3): 1033.
- Armijo-Olivo SL, Gadotti IC. *Pathology and Intervention in Musculoskeletal Rehabilitation*. Editorial Elsevier Health Sciences. Amsterdam, The Netherlands. 2015: 119-56.
- Aryaei A, Vapniarsky N, Hu JC, Athanasiou KA. Recent tissue engineering advances for the treatment of temporomandibular joint disorders. *Curr Osteoporos Rep*. 2016; 14:269-79.
- Axelsson S, Bjornsson S, Holmlund A, Hjerpe A. Metabolic turnover of sulfated glycosaminoglycans and proteoglycans in rabbit temporomandibular joint cartilages with experimentally induced osteoarthrosis. *Acta Odontol Scand*. 1994; 52:65-71.
- Badlani JT, Borrero C, Golla S, Harner CD, Irrgang JJ. The effects of meniscus injury on the development of knee osteoarthritis: data from the osteoarthritis initiative. *Am J Sports Med*. 2013; 41: 1238-44.
- Bagge E, Bjelle A, Svanborg A. Radiographic osteoarthritis in the elderly. A cohort comparison and a longitudinal study of the “70-year old people in Goteborg”. *Clin Rheumatol*. 1992; 11:486-91.
- Beckmann R, Houben A, Tohidnezhad M, Kweider N, Fragoulis A, Wruck CJ, et al. Mechanical forces induce changes in VEGF and VEGFR-1/sFlt-1 expression in human chondrocytes. *Int J Mol Sci*. 2014; 15:15456-74.
- Benjamin M, Ralphs JR. Biology of fibrocartilage cells. *Int Rev Cytol*. 2004; 233:1-45.

- Bermejo A. 2000. *Medicina Bucal*. Tomo 2. Ed.Sintesis. Madrid. 1ª ed: 180-2.
- Betti BF, Everts V, Ket JCF, Tabeian H, Bakker AD, Langenbach GE, Lobbezoo F. Effect of mechanical loading on the metabolic activity of cells in the temporomandibular joint: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2018; 22: 57-67.
- Bittersohl B, Hosalkar HS, Haamberg T, Kim Y, Werlen S, Siebenrock KA, et al. Reproducibility of dGEMRIC in assessment of hip joint cartilage: a prospective study. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30:224-8.
- Booth J, Moseley GL, Schiltenswolf M, Cashin A, Davies M, Hübscher M. Exercise for chronic musculoskeletal pain: A biopsychosocial approach. *Musculoskeletal Care*. 2017; 15: 413-21.
- Borthakur A, Reddy R. Imaging cartilage physiology. *Top Magn Reson Imaging*. 2010;21:291-6.
- Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*. 1998; 47:487-504.
- Cevitanes LH, Walker D, Schilling J, Sugai J, Giannobile W, Paniagua B, et al. 3D osteoarthritic changes in TMJ condylar morphology correlates with specific systemic and local biomarkers of disease. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014; 22:1657-67.
- Chaves K, Munerato MC, Ligocki A, Lauxen I, de Quadros OF. Microscopic analysis of the temporomandibular joint in rabbits (*Oryctolagus cuniculus* L.) using an occlusal interference. *Cranio*. 2002; 20: 116-24.
- Chen PJ, Dutra EH, Mehta S, O'Brien MH, Yadav S. Age-related changes in the cartilage of the temporomandibular joint. *Geroscience*. 2020; 42: 995-1004.
- Chen J, Sorensen KP, Gupta T, Kilts T, Young M, Wadhwa S. Altered functional loading causes differential effects in the subchondral bone and condylar cartilage in the temporomandibular joint from young mice. *Osteoarthr Cartil*. 2009;17:354-61.
- Chen J, Utreja A, Kalajzic Z, Sobue T, Rowe D, Wadhwa S. Isolation and characterization of murine mandibular condylar cartilage cell populations. *Cells Tissues Organs*. 2012; 195: 232-43.
- Chu WC, Zhang S, Sng TJ, Ong YJ, Tan WL, Ang VY, Foldager CB, Toh WS. Distribution of pericellular matrix molecules in the temporomandibular joint and their chondroprotective effects against inflammation. *Int J Oral Sci*. 2017; 9: 43-52.
- Cobo JL, Cabrera-Freitag M, Cobo T, Muriel JD, Junquera LM, Cobo J, Vega JA. Nonsurgical strategies for the treatment of tempormandibular joint disorders. En:

Cartilage Tissue Engineering and Regeneration Techniques, D.D. Nikolopoulos, G.K. Safos, K. Dimitros, Eds. InTech Open, London.

Conaghan PG, Hunter DJ, Maillefert JF, Reichmann WM, Losina E. Summary and recommendations of the OARSI FDA osteoarthritis assessment of structural change working group. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011;19:606-10.

Crossman J, Lai H, Kulka M, Jomha N, Flood P, El-Bialy T. Collagen-Induced Temporomandibular Joint Arthritis Juvenile Rat Animal Model. *Tissue Eng Part C Methods*. 2021; 27:115-23.

Custers RJH, Creemers LB, Verbout AJ, van Rijen MHP, Dhert WJA, Saris DBF. Reliability, reproducibility and variability of the traditional Histologic/Histochemical Grading System vs the new OARSI Osteoarthritis Cartilage Histopathology Assessment System. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007; 15:1241-8.

Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell ST, Clark IM. Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R124.

De La Torre Canales G, Câmara-Souza MB, Muñoz Lora VRM, Guarda-Nardini L, Conti PCR, Rodrigues Garcia RM, Del Bel Cury AA, Manfredini D. Prevalence of psychosocial impairment in temporomandibular disorder patients: A systematic review. *J Oral Rehabil*. 2018; 45: 881-9.

Detamore MS, Athanasiou KA. Structure and function of the temporomandibular joint disc: implications for tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61:494-506.

Dos AnjosPontual ML, Freire JS, Barbosa JM, Frazao MA, dos AnjosPontual A, Fonseca MM. Evaluation of bone changes in the temporomandibular joint using cone beam CT. *Dentomaxillofac Radiol*. 2012; 41: 24-9.

Echevarría JJ, Pumarola J. *El manual de Odontología*. Editorial Elsevier Masson. Barcelona. 2ª ed: 599-603, 2008.

Embree MC, Kilts TM, Ono M, Inkson CA, Syed-Picard F, Karsdal MA, Oldberg A, Bi Y, Young MF. Biglycan and fibromodulin have essential roles in regulating chondrogenesis and extracellular matrix turnover in temporomandibular joint osteoarthritis. *Am J Pathol*. 2010; 176: 812-26.

Englund M, Guermazi A, Lohmander LS. The meniscus in knee osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2009; 35: 579-90.

Fauci AS, Langford CA. *Harrison Reumatología*. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. Madrid. 1ªed: 241-57. 2007.

- Fernandes G, Gonçalves D, Conti P. Musculoskeletal Disorders. *Dent Clin North Am.* 2018; 62: 553-64.
- Ferreira LM, Moura ÁF, Barbosa GA, Pereira HS, Calderon PS. Do matrix metalloproteinases play a role in degenerative disease of temporomandibular joint? A systematic review. *Cranio.* 2016; 34:112-7.
- Fosang AJ, Last K, Stanton H, Golub SB, Little CB, Brown L, Jackson DC. Neopeptide antibodies against MMP-cleaved and aggrecanase-cleaved aggrecan. In: Clark IM, editor. *Matrix metalloproteinase protocols.* Totowa (NJ): Humana Press; 2010, pp. 305-340.
- Fosang AJ, Last K, Stanton H, Golub SB, Little CB, Brown L, Jackson DC. 2010. Neopeptide antibodies against MMP-cleaved and aggrecanase-cleaved aggrecan. *Methods Mol Biol.* 2010; 622: 312-47.
- Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang L, Zhao B, Peng J, Wang A, Wang Y, et al. 2014. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Res Int.* 2014:648459.
- García-Fajardo C, Cacho A, Fonte A, Perez-Varela JC. La oclusión como factor etiopatológico en los trastornos mandibulares. *RCOE.* 2007; 12: 37-47.
- Ghassemi Nejad S, Kobezda T, Tar I, Szekanecz Z. Development of temporomandibular joint arthritis: The use of animal models. *Joint Bone Spine.* 2017; 84:145-51.
- Gepstein A, Shapiro S, Arbel G, Lahat N, Livne E. Expression of matrix metalloproteinases in articular cartilage of temporomandibular and knee joints of mice during growth, maturation, and aging. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 3240-50.
- Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative—recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18, Supplement 3:S24-34.
- Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma HL, Flannery CR, Peluso D, Kanki K, Yang Z, Majumdar MK, Morris EA. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature.* 2005; 434: 644-8.
- Glasson SS, Chambers MG, Van Den Berg WB, Little CB. The OARSI histopathology initiative—recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18, Supplement 3:S17-23.
- Glyn-Jones S, Palmer AJR, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. *Lancet.* 2015; 386:376-87.

- Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006; 20: 1003-25.
- Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hachem K. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *European cells & materials*. 2011; 21: 202.
- Gómez ME, Campos A. *Histología y embriología bucodental*. Editorial Medica Panamericana. Madrid. 2ª ed: 191-208. 2002.
- Gopal SK, Shankar R, Vardhan BH. Prevalence of temporo-mandibular disorders in symptomatic and asymptomatic patients: A cross-sectional study. *Int J Adv Health Sci*. 2014; 1:14-20.
- Grässel S, Zaucke F, Madry H. Osteoarthritis: Novel Molecular Mechanisms Increase Our Understanding of the Disease Pathology. *J Clin Med*. 2021; 10:1938.
- Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobnič M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, Van Dijk CN. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012; 20: 423-35.
- Henderson SE, Tudares MA, Tashman S, Almarza AJ. Decreased Temporomandibular Joint Range of Motion in a Model of Early Osteoarthritis in the Rabbit. *J Oral Maxillofac Surg*. 2015; 73:1695-705.
- Hopps E, Caimi G. Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19: 2583-89.
- Hunter DJ. Pharmacologic therapy for osteoarthritis--the era of disease modification. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 7: 13-22.
- Ishimaru JI, Oguma Y, Goss AN. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in serum and lavage synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 38: 354-59.
- Jiang Q, Qiu YT, Chen MJ, Zhang ZY, Yang C. Synovial TGFbeta1 and MMP-3 levels and their correlation with the progression of temporomandibular joint osteoarthritis combined with disc displacement: A preliminary study. *Biomed Rep*. 2013; 1: 218-22.
- Jiao K, Wang MQ, Niu LN, Dai J, Yu SB, Liu XD, Wang GW. Death and proliferation of chondrocytes in the degraded mandibular condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Apoptosis*. 2009; 14: 22-30.

- Johnson DL, Brand JW, Young SK, Duncanson MG. Adaptation of the temporomandibular joint to altered mandibular function. *Int J Prosthodont* 1995; 8: 445-55.
- Kalpakci KN, Willard VP, Wong ME, Athanasiou KA. An interspecies comparison of the temporomandibular joint disc. *J Dent Res*. 2011; 90:193-8.
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2011; 7: 33-42.
- Karadede, B.; Karadede, B.; Karadede, M.I. Growth, Development, and Ossification of Mandible and Temporomandibular Joint. In *Imaging of the Temporomandibular Joint*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2018; pp. 43-57.
- Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, Edwards DR. The ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family. *Genome Biol*. 2015; 16:113.
- Kikuta T. A Histopathological Study of the Temporomandibular Joint Following Unilateral Loss of Occlusion in the Rhesus Monkey. *J Kyusyu Dental Society*. 1980; 34: 254-74.
- Kintakas C, McCulloch DR. Emerging roles for ADAMTS5 during development and disease. *Matrix Biol*. 2011; 30: 311-7.
- Kraus VB, Blanco FJ, Englund M, Karsdal MA, Lohmander LS. Call for standardized definitions of osteoarthritis and risk stratification for clinical trials and clinical use. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015; 23:1233-41.
- Kubota T, Kubota E, Matsumoto A, Kawai Y, Saito H, Mikuni-Takagaki Y, et al. Identification of matrix metalloproteinases (MMPs) in synovial fluid from patients with temporomandibular disorder. *Eur J Oral Sci* .1998a; 106: 992-8.
- Kubota E, Kubota T, Matsumoto J, Shibata T, Murakami KI. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. *J Oral Maxillofac Surg*. 1998b; 56: 192-8.
- Kubota E, Imamura H, Kubota T, Shibata T, Murakami K. Interleukin 1b and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997; 55:20-7.
- Kurita H, Kojima Y, Nakatsuka A, Koike T, Kobayashi H, Kurashina K. Relationship between temporomandibular joint (TMJ)-related pain and morphological changes of the TMJ condyle in patients with temporomandibular disorders. *Dentomaxillofac Radiol*. 2004; 33: 329-33.

- Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, Laurencin CT. Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res.* 2016; 11:19.
- Lemos GA, da Silva PLP, Batista AUD, Palomari ET. Experimental model of temporomandibular joint arthritis: Evaluation of contralateral joint and masticatory muscles. *Arch Oral Biol.* 2018; 95:79-88.
- Leonardi R, Almeida LE, Loreto C. Lubricin immunohistochemical expression in human temporomandibular joint disc with internal derangement. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40:587-92.
- Leonardi R, Loreto C, Barbato E, Caltabiano R, Lombardo C, Musumeci G, et al. MMP-13 (collagenase 3) localization in human temporomandibular joint discs with internal derangement. *Acta Histochem.* 2008; 110:314-18.
- Levorová J, Machon V, Guha A, Foltán R. Osteoarthrosis of temporomandibular joint related to the defects of posterior dentition: a retrospective study. *Prague Medical Report.* 2016; 117: 176-84.
- Li Q, Huang F, Liu J, Zhao YH, Zhang M, Chen YJ. Psychological Stress Alters Extracellular Matrix Metabolism in Mandibular Condylar Cartilage. *Chin J Dent Res.* 2017; 20:125-35.
- Liu YD, Liao LF, Zhang HY, et al. Reducing dietary loading decreases mouse temporomandibular joint degradation induced by anterior crossbite prosthesis. *Osteoarthr Cartil.* 2014; 22:302-12.
- Liu YD, Yang HX, Liao LF, Jiao K, Zhang HY, Lu L, Zhang M, Zhang J, He JJ, Wu YP, Chen D, Wang MQ. Systemic administration of strontium or NBD peptide ameliorates early stage cartilage degradation of mouse mandibular condyles. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016; 24:178-87.
- López-Armada MJ, Vaamonde García C, Caramés B, Lires-Dean M. Evidencia de mecanismos inflamatorios en la osteoarthritis. *Reumatol Clin.* 2007; 3 (Supl 3): S23-7.
- Loreto C, Almeida LE, Migliore MR, Caltabiano M, Leonardi R. TRAIL, DR5 and caspase 3-dependent apoptosis in vessels of diseased human temporomandibular joint disc. An immunohistochemical study. *Eur J Histochem.* 2010; 54:e40.
- Loreto C, Leonardi R, Musumeci G, Pannone G, Castorina S. An ex vivo study on immunohistochemical localization of MMP-7 and MMP-9 in temporomandibular joint discs with internal derangement. *Eur J Histochem.* 2013; 57:e12.

- Magara J, Nozawa-Inoue K, Suzuki A, Kawano Y, Ono K, Nomura S, Maeda T. Alterations in intermediate filaments expression in disc cells from the rat temporomandibular joint following exposure to continuous compressive force. *J Anat.* 2012; 220: 612-21.
- Malfait AM, Little CB. On the predictive utility of animal models of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015; 17: 225-015-0747-6.
- Man GS, Mologhianu G. Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J Med Life.* 2014; 7: 37-41.
- Manfredini D, Guarda-Nardini L, Winocur E, Piccotti F, Ahlberg J, Lobbezoo F. Research diagnostic criteria for temporomandibular disorders: A systematic review of axis I epidemiologic findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2011; 112: 453-62.
- Manfredini D, Peretta R, Guarda-Nardini L, Ferronato G. Predictive value of combined clinically diagnosed bruxism and occlusal features for TMJ pain. *Cranio.* 2010 Apr;28:105-13.
- Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am.* 1971;53: 523-37.
- Mao JJ, Rahemtulla F, Scott PG. Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. *J Dent Res.* 1998; 77: 1520-8.
- Martinez-Blanco M, Bagán JV, Fons A, Poveda-Roda R. Osteoartrosis de la articulación temporomandibular: estudioclínico y radiológico de 16 pacientes. *Med Oral.* 2004; 9: 106-15.
- Massilla Mani F, Sivasubramanian SS. A study of temporomandibular joint osteoarthritis using computed tomographic imaging. *Biomed J.* 2016; 39: 201-6.
- Matías EM, Mecham DK, Black CS, Graf JW, Steel SD, Wilhelm SK, Andersen KM, Mitchell JA, Macdonald JR, Hollis WR, Eggett DL, Reynolds PR, Kooyman DL. Malocclusion model of temporomandibular joint osteoarthritis in mice with and without receptor for advanced glycation end products. *Arch Oral Biol.* 2016; 69: 47-62.
- Matsumoto T, Inayama M, Tojyo I, Kiga N, Fujita S. Expression of hyaluronan synthase 3 in deformed human temporomandibular joint discs: in vivo and in vitro studies. *Eur J Histochem.* 2010; 54:e50.
- McCoy AM. Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Vet Pathol.* 2015; 52: 803-18.

- McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE, Fuller CJ, Hurtig M, Cruz A. The OARSI histopathology initiative—recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the horse. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18, Supplement 3:S93-105.
- Meng J, Ma X, Ma D, Xu C. Microarray analysis of differential gene expression in temporomandibular joint condylar cartilage after experimentally induced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005; 13: 1115-25.
- Minarelli AM, Liberti EA. A microscopic survey of the human temporomandibular joint disc. *J Oral Rehabil*. 1997; 24: 835-40.
- Minarelli AM, Del Santo Júnior M, Liberti EA. The structure of the human temporomandibular joint disc: a scanning electron microscopy study. *J Orofac Pain*. 1997; 11: 95-100.
- Mizui T, Ishimaru J, Miyamoto K, Kurita K. Matrix metalloproteinase- 2 in synovial lavage fluid of patients with disorders of the temporomandibular joint. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 39: 310-4.
- Monje F. Diagnóstico y tratamiento de la patología de la articulación temporomandibular. Editorial Ripano. Madrid. 1ª ed: 41-55. 2009.
- Murphy MK, MacBarb RF, Wong ME, Athanasiou KA. Temporomandibular Joint Disorders: A Review of Etiology, Clinical Management, and Tissue Engineering Strategies. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013; 28: e393.
- Musumeci G, Loreto C, Giunta S, Rapisarda V, Szychlinska MA, Imbesi R, et al. Angiogenesis correlates with macrophage and mast cell infiltration in lung tissue of animals exposed to fluoro-edenite fibers. *Exp Cell Res*. 2016;346: 91-8.
- Nozawa-Inoue K, Amizuka N, Ikeda N, Suzuki A, Kawano Y, Maeda T. Synovial membrane in the temporomandibular joint- -its morphology, function and development. *Arch Histol Cytol*. 2003; 66:289-306.
- Okamoto K, Kiga N, Shinohara Y, Tojyo I, Fujita S. Effect of interleukin-1beta and dehydroepiandrosterone on the expression of lumican and fibromodulin in fibroblast-like synovial cells of the human temporomandibular joint. *Eur J Histochem* 2015; 59:2440.
- Okeson JP. Tratamiento de oclusión y afecciones temporomandibulares. Editorial Elsevier. Barcelona. 6ª ed: 7-23, 434-35. 2008.
- Olvera-Farias R, Cruz-Perez J, Salinas-Gutierrez R, Leon J, Kouri-Flores J, Rosales-Ibañez R, Ito D, Barrera A. Unilateral Impact of Altered Loading by Changing Teeth Height

on the TMJ Fibrocartilage: Disc and Condyle of Wistar Rats. *Microsc Res Tech.* 2016; 4: 20-31.

Ostergaard K, Andersen CB, Petersen J, Bendtzen K, Salter DM. Validity of histopathological grading of articular cartilage from osteoarthritic knee joints. *Ann Rheum Dis.* 1999; 58:208-13.

Ottersen MK, Abrahamsson AK, Larheim TA, Arvidsson LZ. CBCT characteristics and interpretation challenges of temporomandibular joint osteoarthritis in a hand osteoarthritis cohort. *Dentomaxillofac Radiol.* 2019; 48: 20180245.

Paegle DI, Holmlund A, Hjerpe A. Expression of proteoglycan mRNA in patients with painful clicking and chronic closed lock of the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34: 656-8.

Palla, S. Anatomy and Pathophysiology of the Temporomandibular Joint. In *Functional Occlusion in Restorative Dentistry and Prosthodontics*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2016; pp. 67-85.

Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, Lotz MK, D'Lima DD. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011; 19:1132-41.

Peng Z, Sun H, Bunpetch V, Koh Y, Wen Y, Wu D, Ouyang H. The regulation of cartilage extracellular matrix homeostasis in joint cartilage degeneration and regeneration. *Biomaterials.* 2021; 268:120555.

Pelletier J, Boileau C, Altman RD, Martel-Pelletier J. Experimental models of osteoarthritis: usefulness in the development of disease-modifying osteoarthritis drugs/agents. *Therapy.* 2010; 7: 621-34.

Pérez-Casas A, Bengoechea Gonzalez ME. Anatomía funcional del aparato locomotor. Bases anatómicas y biomecánicas de la traumatología y ortopedia. Graficas Summa, Oviedo, 1987. ISBN: 84-404-0573-1

Poulet B. Non-invasive Loading Model of Murine Osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2016; 18: 40.

Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC. Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. *J Biol Chem.* 2003; 278: 45539-45.

Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, et al. Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor. *Am J Pathol.* 2003; 164:185-92.

- Puzas JE, Landeau JM, Tallents R, Albright J, Schwarz EM, Landesberg R. Degradative pathways in tissues of the temporomandibular joint. Use of in vitro and in vivo models to characterize matrix metalloproteinase and cytokine activity. *Cells Tissues Organs*. 2001; 169: 248-56.
- Rabie AB, Xiong H, Hägg U. Forward mandibular positioning enhances condylar adaptation in adult rats. *Eur J Orthod*. 2004; 26: 353-8.
- Rando C, Waldron T. TMJ osteoarthritis: a new approach to diagnosis. *Am J Phys Anthropol*. 2012; 148: 45-53.
- Riera-Punet N, Martinez-Gomis J, Willaert E, Povedano M, Peraire M. Functional limitation of the masticatory system in patients with bulbar involvement in amyotrophic lateral sclerosis. *J Oral Rehabil*. 2017; 45: 204-10.
- Roberts WE, Stocum DL. Part II: Temporomandibular Joint (TMJ)-Regeneration, Degeneration, and Adaptation. *Curr Osteoporos Rep*. 2018; 16: 369-79.
- Roemer FW, Crema MD, Trattng S, Guermazi A. Advances in imaging of osteoarthritis and cartilage. *Radiology*. 2011; 260:332-54.
- Roemer FW, Eckstein F, Hayashi D, Guermazi A. The role of imaging in osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2014;28:31-60.
- Rogers AW, Cisewski SE, Kern CB. The Zonal Architecture of the Mandibular Condyle Requires ADAMTS5. *J Dent Res*. 2018; 97: 1383-90.
- Rutgers M, van Pelt MJP, Dhert WJA, Creemers LB, Saris DBF. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18:12-23.
- Saarakkala S, Julkunen P, Kiviranta P, Mäkitalo J, Jurvelin JS, Korhonen RK. Depth-wise progression of osteoarthritis in human articular cartilage: investigation of composition, structure and biomechanics. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010; 18:73-81.
- Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res*. 2001; 3: 107-13.
- SchmitterM, Essig M, Seneadza V, Balke Z, Schroder J, Rammelsberg P. Prevalence of clinical and radiographic signs of osteoarthrosis of the temporomandibular joint in an older persons community. *Dentomaxillofac Radiol*. 2010; 39: 231-4.
- Schnabl D, Rottler AK, Schupp W, Boisserée W, Grunert I. CBCT and MRT imaging in patients clinically diagnosed with temporomandibular joint arthralgia. *Heliyon*. 2018; 4: e00641.

- Serra CI, Soler C. Animal Models of Osteoarthritis in Small Mammals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2019; 22: 211-21.
- Shigeno K, Sasaki Y, Otonari-Yamamoto M, Ohata H, Shibahara T. Evaluating the mandibular condyles of patients with osteoarthritis for bone marrow abnormalities using magnetic resonance T2 mapping. *Oral Radiol.* 2019; 35: 272-9.
- Silbermann M, Livne E. Age-related degenerative changes in the mouse mandibular joint. *J Anat.* 1979; 129: 507-20.
- Sim Y, Carlson DS, McNamara JA Jr. Condylar adaptation after alteration of vertical dimension in adult rhesus monkeys, *Macaca mulatta*. *Cranio.* 1995; 13: 182-7.
- Sims AB, Demerjian GG. Temporomandibular joint dysfunction, trigeminal nerve inflammation and biomechanical dental treatments for the suppression of neurological and neuropsychiatric symptoms. *Temporomandibular Joint and Airway Disorders.* 2018: 95-123.
- Sobue T, Yeh WC, Chhibber A, Utreja A, Diaz-Doran V, Adams D, Kalajzic Z, Chen J, Wadhwa S. Murine TMJ loading causes increased proliferation and chondrocyte maturation. *J Dent Res.* 2011; 90: 512-6.
- Spears R, Oakes R, Bellinger LL, Hutchins B. Tumour necrosis factor-alpha and apoptosis in the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol.* 2003; 48: 825-34.
- Srinivas R, Sorsa T, Tjaderhane L, Niemi E, Raustia A, Pernu H, et al. Matrix metalloproteinases in mild and severe temporomandibular joint internal derangement synovial fluid. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 91: 517-25.
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005; 434: 648-52.
- Stocum DL, Roberts WE. Part I: Development and Physiology of the Temporomandibular Joint. *Curr Osteoporos Rep.* 2018; 16: 360-8.
- Sulzbacher I. Osteoarthritis: histology and pathogenesis. *Wien Med Wochenschr.* 2013;163: 212-9.
- Sun H, Su Y, Song N, Li C, Shi Z, Li L. Clinical Outcome of Sodium Hyaluronate Injection into the Superior and Inferior Joint Space for Osteoarthritis of the Temporomandibular Joint Evaluated by Cone-Beam Computed Tomography: A Retrospective Study of 51 Patients and 56 Joints. *Med Sci Monit.* 2018; 24:5793-5801.

- Sun L, Wang M, He J, Liu L, Chen S, Widmalm SE. Experimentally created non balanced occlusion effects on the thickness of the temporomandibular joint disc in rats. *Angle Orthod.* 2009; 79: 51-3.
- Suzuki T, Segami N, Nishimura M, Nojima T. Co-expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and synovial fluids of temporomandibular joint with internal derangement: comparison with histological grading of synovial inflammation. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31: 549-57.
- Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res.* 2008; 87: 296-307.
- Tanaka A, Kawashiri S, Kumagai S, Takatsuka S, Narinobou M, Nakagawa K, Tanaka S. Expression of matrix metalloproteinase-2 in osteoarthritic fibrocartilage from human mandibular condyle. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29: 314-20.
- Testut L, Latarjet A. *Anatomía humana. Tomo 1. Editorial Salvat. Barcelona. 9ª ed: 525-36. 1973.*
- Tiilikainen P, Pirttiniemi P, Kainulainen T, Pernu H, Raustia A. MMP-3 and -8 expression is found in the condylar surface of temporomandibular joints with internal derangement. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34: 39-45.
- Togni L, de Abreu MC, Augustin AH, da Silva RBM, Campos MM. Characterization of a rat model with temporomandibular joint osteoarthritis following a surgical anterior disc displacement. *Am J Transl Res.* 2018; 10: 3806-17.
- Toyoshima Y, Iizuka T, Aita H, Ohata N. Effect of Experimental Traumatic Occlusion on Temporomandibular Joint. *J Oral Biol.* 2003; 45: 407-17.
- van der Sluijs JA, Geesink RG, van der Linden AJ, Bulstra SK, Kuyper R, Drukker J. The reliability of the Mankin score for osteoarthritis. *J Orthop Res.* 1992;10: 58-61.
- Wang MQ, He JJ, Li G, Widmalm SE. The effect of physiological nonbalanced occlusion on the thickness of the temporomandibular joint disc: a pilot autopsy study. *J Prosthet Dent.* 2008; 99: 148-52.
- Wang XD, Kou XX, Mao JJ, Gan YH, Zhou YH. Sustained inflammation induces degeneration of the temporomandibular joint. *J Dent Res.* 2012; 9: 499-505.
- Wang M, Sun L, Yu SB, Liu X, Jiao K, Wang GW, Liu L, He JJ. Degenerative changes in rat condylar cartilage induced by non-matching occlusion created by scattered orthodontic teeth-moving. *Cranio.* 2012; 30: 286-92.

- Wang GW, Wang MQ, Wang XJ, Yu SB, Liu XD, Jiao K. Changes in the expression of MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and aggrecan in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Arch Oral Biol.* 2010; 55: 887-95.
- Wang D, Yang H, Zhang M, Zhang H, Lu L, Zhang J, Wan X, Wang M. Insulin-like growth factor-1 engaged in the mandibular condylar cartilage degeneration induced by experimental unilateral anterior crossbite. *Arch Oral Biol.* 2019; 98 :17-25.
- Wang MQ, Xue F, He JJ, Chen JH, Chen CS, Raustia A. Missing posterior teeth and risk of temporomandibular disorders. *J Dent Res.* 2009; 88: 942-5.
- Wang XD, Zhang JN, Gan YH, Zhou YH. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ osteoarthritis. *J Dent Res.* 2015; 94: 666-73.
- Wang YL, Zhang J, Zhang M, Lu L, Wang X, Guo M, Zhang X, Wang MQ. Cartilage degradation in temporomandibular joint induced by unilateral anterior crossbite prosthesis. *Oral Dis.* 2014; 20:301-6.
- Wendler A, Wehling M. The translatability of animal models for clinical development: biomarkers and disease models. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10:601-6.
- Willard VP, Zhang LG, Athanasiou KA. Tissue Engineering of the Temporomandibular Joint. In *Comprehensive Biomaterials*. Ducheyne P. Editorial Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 221-235. 2011.
- Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix Biol.* 2014; 39:25-32.
- Xia B, Di C, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int.* 2014; 95: 495-505.
- Xu J, Liu Y, Deng M, Li J, Cai H, Meng Q, Fang W, Long X, Ke J. MicroRNA221 -3p modulates Ets-1 expression in synovial fibroblasts from patients with osteoarthritis of temporomandibular joint. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016; 24: 2003-11.
- Yoshida K, Takatsuka S, Hatada E, Nakamura H, Tanaka A, Ueki K, et al. Expression of matrix metalloproteinases and aggrecanase in the synovial fluids of patients with symptomatic temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 22-7.
- Yoshikawa S, Nodai E, Habu M, Furuta N, Fukuda J, Yamaguchi K. Influence of altered occlusal plane on rabbit temporomandibular joint cartilage. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37: 30-7.

Zhang C, Wang P, Jiang P, Lv Y, Dong C, Dai X, Tan L, Wang Z. Upregulation of lncRNA HOTAIR contributes to IL-1 β -induced MMP overexpression and chondrocytes apoptosis in temporomandibular joint osteoarthritis. *Gene*. 2016; 586: 248-53.

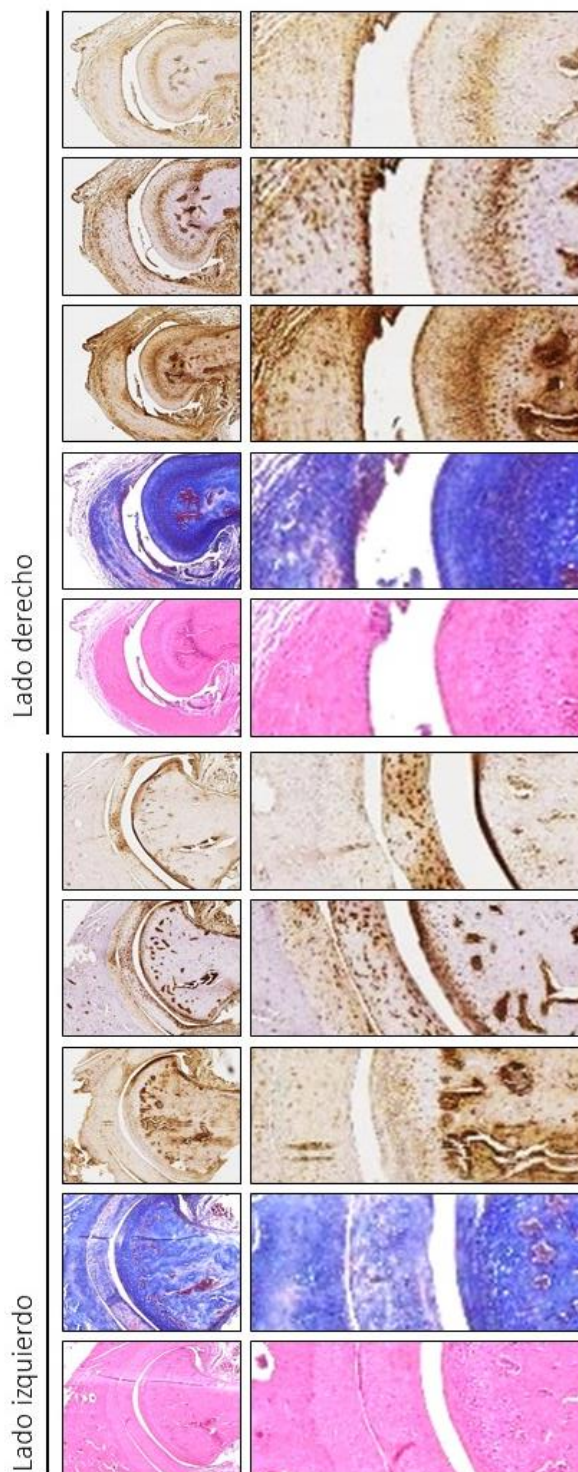
Zhang M, Zhang J, Lu L, Qiu ZY, Zhang X, Yu SB, Wu YP, Wang MQ. Enhancement of Chondrocyte Autophagy Is an Early Response in the Degenerative Cartilage of the Temporomandibular Joint to Biomechanical Dental Stimulation. *Apoptosis*. 2013; 18: 423-34.

Zheng L, Pi C, Zhang J, Fan Y, Cui C, Zhou Y, Sun J, Yuan Q, Xu X, Ye L, Cao X, Zhou X. Aberrant activation of latent transforming growth factor- β initiates the onset of temporomandibular joint osteoarthritis. *Bone Res*. 2018; 6:26.

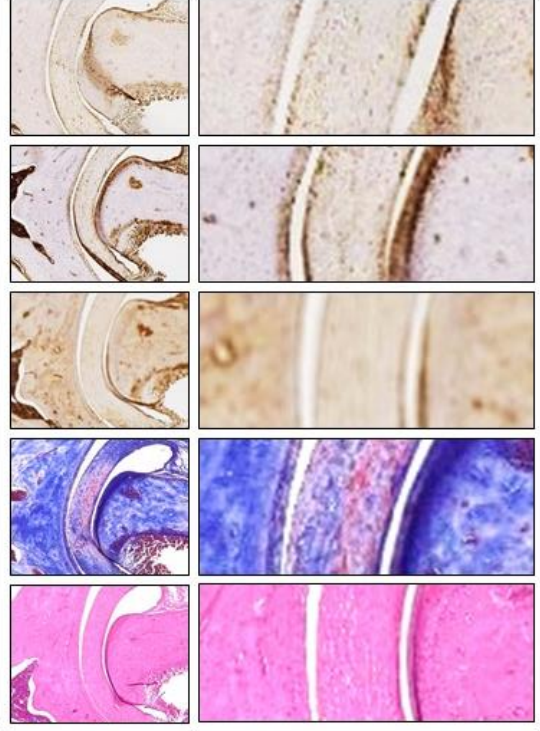
8

Anexos

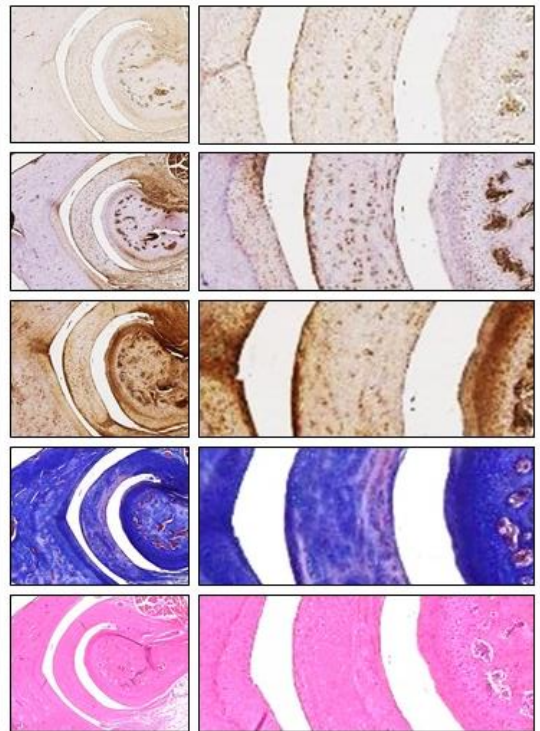
Anexo 1



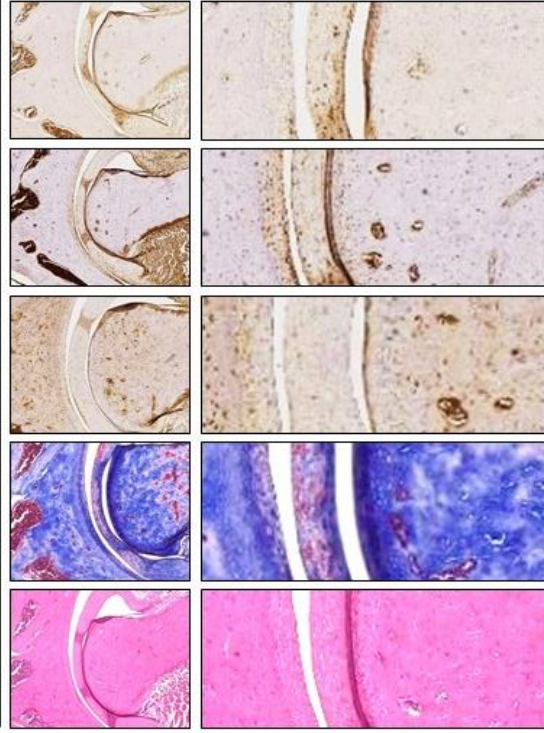
Lado derecho



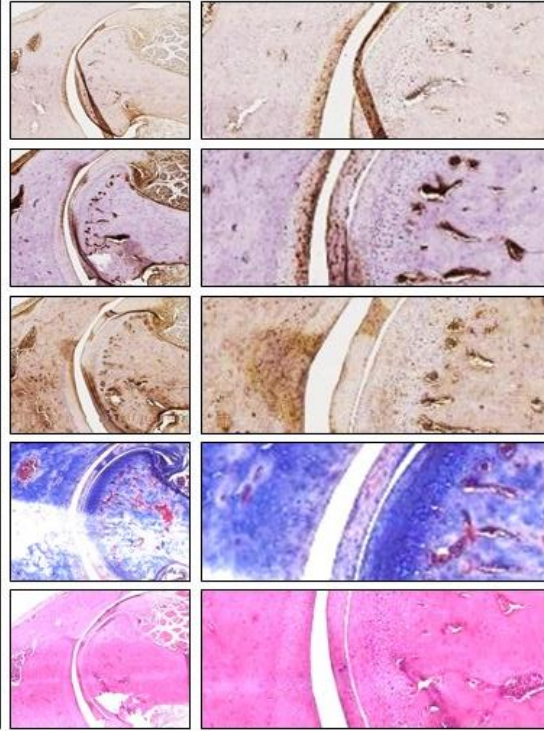
Lado izquierdo



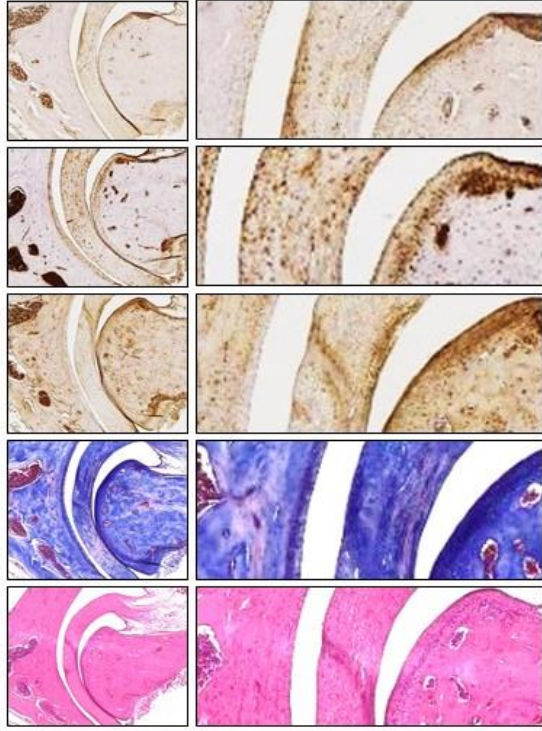
Lado derecho



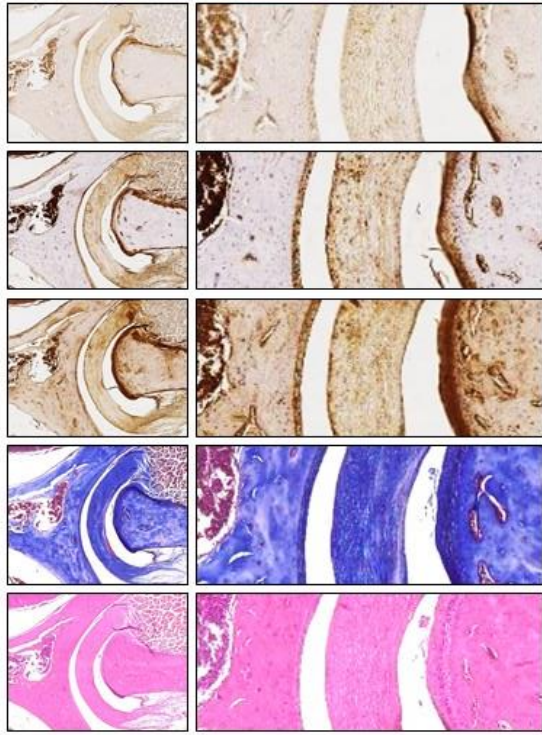
Lado izquierdo



Lado derecho



Lado izquierdo



Anexo 2

Curriculum vitae

DATOS PERSONALES

- Nombre y Apellidos: Silvia del Cueto Blanco
- DNI: 53554699G
- Fecha de Nacimiento: 17/11/1984
- Dirección: El Otero SN, Villanueva de Pría. CP: 33591. Llanes. Asturias
- Teléfono: 659108527
- Correo electrónico: silviacuetoblanco@hotmail.com

FORMACIÓN ACADÉMICA

- Licenciada en Odontología por la Universidad de Oviedo (17/07/27).
- Especialista Universitaria en Ortodoncia (25/06/10).
- Máster Universitario en Ortodoncia y Ortopedia Dentofacial (26/07/11).
- Cursos de Doctorado y Suficiencia Investigadora en el Programa Actualización e investigación en Odontología del Departamento Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas (22/09/09).

ACTIVIDAD DOCENTE

- Colaboradora de Honor adscrita al Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas desde el curso 2009/10 hasta el curso 2014/15.

PUBLICACIONES COMO PRIMER AUTOR

- Cueto S, Pipa A, González M, Pipa C, Álvarez I. Prevalencia de los dientes supernumerarios en la población infantil asturiana. Avances en Odontostomatología. 2013; 29:131-37.
- Asimetrías faciales y maloclusiones en pacientes con tortícolis muscular congénita. Una revisión sistemática. Avances en Periodoncia e Implantología. 2015; 27(1): 11-18.

COMUNICACIONES Y PONENCIAS

- Presentación de la Comunicación Científica “Alteraciones oclusales iatrogénicas y cambios degenerativos de la ATM (Articulación Temporo-mandibular)” en el 18 congreso nacional y 7 internacional de la Sociedad Española de Gerodontología celebrado en Soria en Junio de 2018.
- Segunda autora de la Comunicación Oral “Desórdenes oclusales y artrosis de las ATMs” presentada en la 47 reunión de SEPES celebrada en Madrid en Octubre de 2017.
- Colaboradora en el Poster “Mantenedor de espacio óseo en agenesias dentales: a propósito de 2 casos” en la 56 reunión de la Sociedad Española de Ortodoncia celebrada en Murcia en Junio de 2010.

CURSOS RECIBIDOS Y ASISTENCIA CONGRESOS

- Curso intensivo multimedia de cirugía oral (11/11/2006). CODES.
- Curso de radiodiagnóstico general para personas que van a dirigir instalaciones de rayos x con fines diagnósticos (20/01/2008). PRYMA.
- Curso: Salvacorazones. Primeros auxilios con RCP y DEA (05/04/2008). CODES.
- Taller práctico de estratificación con composites en dientes anteriores (12/04/2008). CODES.
- Curso: Temas actuales en farmacología odontológica (19/04/2008). CODES.
- Curso: El tercer molar incluido. Diagnóstico y tratamiento en la práctica clínica. Edición 02 (31/05/2008). CODES.
- Curso: Como prevenir la reabsorción radicular después de traumatismos dentarios (31/05/2009). RCOE.
- Curso: Rugosidad de los arcos ortodóncicos mediante microscopia confocal (31/05/2009). RCOE.
- Curso: Urgencias Médicas en una Clínica Dental (26/02/2010). Colegio Médicos de Cantabria.
- Curso: Actualización diagnóstica y terapéutica en Medicina Oral (07/05/2010). CODES.
- Curso: Factores asociados a la caries dental en adultos mayores de 60 años: análisis de la caries coronaria (08/05/2010). RCOE.
- Curso: Fumar o no Fumar ¿influye en la enfermedad periodontal? (08/05/2010). RCOE.
- Complicaciones de las sobredentaduras sobre implantes y como evitarlas (08/05/2010). RCOE.
- Curso: El Síndrome de Sjögren en Odontología (15/06/2010). RCOE.
- Curso: Sistema de blanqueamiento basado en ultrasonidos (15/06/2010). RCOE.
- Curso: Efectos del barniz de clorhexidina-timol al 1% en las reducciones de estreptococo mutans en saliva (15/06/2010). RCOE.
- Curso: Nuevas propuestas de diagnóstico y tratamiento de los problemas funcionales. Control etiopatogénico (22/10/2011). Colegio Odontólogos Cantabria.
- Curso de Periodoncia e Implantología (18/12/2011). Salud Digital.
- Curso: Ortodoncia lingual/Ortodoncia digital: Sistema Lingualjet (20/01/2012).
- Curso: Manejo del paciente con Xerostomía (30/09/2012). Consejo general dentistas.
- Curso: Biomecánica en Ortodoncia (13/04/2013). Instituto Asturiano de Odontología.
- Curso: Tratamiento quirúrgico de deformidades faciales en edad infantil (19/04/2013). Instituto Asturiano de Odontología.
- Curso: Consideraciones sobre el tratamiento de maloclusiones verticales y transversales (17/05/2013). Instituto Asturiano de Odontología.
- Curso: Estética de la sonrisa, ortodoncia multidisciplinar (14/03/2014). Instituto Asturiano de Odontología.
- Curso: Aparato Pul para el tratamiento de las Clases II (29/03/2014). Instituto Asturiano de Odontología.
- Certificado acreditativo de competencia personal que lleva a cabo procedimientos con animales: Categoría B (30/03/2014). Dirección General de Medio Ambiente.
- Curso: Orthocaps. TwinAligner system certification course (12/04/2014).
- Curso Habilidades para la difusión y comunicación de la Investigación (24/04/2014). Universidad de Oviedo.
- Curso: Presente y futuro de la ortodoncia desde la perspectiva del clínico (10/05/2014). Instituto Asturiano de Odontología.

- Curso: Mecánica de tratamiento de la mordida abierta (17/05/2014). Instituto Asturiano de Odontología.
- Curso online de Medicina y Patología Oral (30/09/2015). Universidad de Valencia.
- Manejo clínico en ortodoncia: discrepancia de espacio, tratamiento de la clase II y clase III (09/04/2016).
- Curso: Analgesia y Sedación en Urgencias en Pediatría (13/10/2016). Salud Digital.
- Curso: Semiología básica y procedimientos comunes en urgencias de pediatría (27/10/2016). Salud Digital.
- Curso: Coaching Sanitario (31/10/2016). Neomed Technologies SL
- Curso quirúrgico de Implantología Oral (24/11/2016). Salud Digital.
- Curso: Cirugía periapical (27/11/2016). Salud digital.
- Curso: Cirugía Bucal y Ortodoncia (30/11/2016). Salud digital.
- Curso: Hipertensión arterial para médicos de Atención Primaria (31/12/2016). Salud digital.
- Curso: Los componentes de la saliva y sus funciones en la correcta salud bucal (31/12/2016).
- Curso: Manejo clínico de la caries dental (15/06/2018). Colgate Formación.
- Taller de Soporte Vital Básico (26.11.21). Sespa.
- Asistencia a las 55 Reunión de la Sociedad Española de Ortodoncia (06/06/09).
- Asistencia 56 Reunión de la Sociedad Española de Ortodoncia (02/06/2010).
- Asistencia al curso Precongreso: Excelencia en Ortodoncia y Ortodoncia Clínica en el marco del 62 congreso de la Sociedad Española de Ortodoncia (04/06/2016).
- Asistencia a XVIII Congreso Nacional y VII Internacional de la Sociedad Española de Gerodontología (09/06/2018).
- Asistencia a IV JORNADAS DOCTORALES (11/12/2014). Universidad de Oviedo
- Asistencia a V JORNADAS DOCTORALES (18/12/2015). Universidad de Oviedo

EXPERIENCIA PROFESIONAL:

- 1 año de práctica privada como odontóloga general.
- 9 años de práctica privada como odontóloga ortodoncista.
- 6 años como odontóloga Servicio Público de Salud.

Anexo 3

Difusión de los resultados

Ms. Ref. No.: **AANAT3717R1**

Title: Unilateral occlusal disorders cause degradation of extracellular matrix mediated by metalloproteases 2, 3 and 9 in rat the temporomandibular joint

Annals of Anatomy

Dear Dr. Vega,

I am pleased to inform you that your paper " Unilateral occlusal disorders cause degradation of extracellular matrix mediated by metalloproteases 2, 3 and 9 in rat the temporomandibular joint" has been accepted for publication in Annals of Anatomy.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to Annals of Anatomy.

Yours sincerely,

Friedrich Paulsen
Editor-in-Chief
Annals of Anatomy

Comments from the editors and reviewers:

Editor : Overall the revised manuscript looks fine, no major comment.
Some minor corrections of typographical errors will be made by the editorial department.

José A. Vega, como autor senior del artículo de investigación arriba mencionado, INFORMO que el mismo está aceptado para publicación en la Revista Annals od Anatomy, incluido en la sección Q1 en la sección de Anatomy & Morfology JCR.

Oviedo, 16 de diciembre de 2021

VEGA
ALVAREZ JOSE
ANTONIO -
09713621P

Firmado digitalmente
por VEGA ALVAREZ
JOSE ANTONIO -
09713621P
Fecha: 2021.12.16
08:32:08 +01'00'