



Universidad de Chile
Facultad de Odontología
Departamento de Odontología Conservadora
Laboratorio de Biología Periodontal

“Análisis *in vitro* de la resorción ósea
inducida en articulaciones
temporomandibulares afectadas de
osteoartritis o desplazamiento discal
con reducción: Estudio piloto.”

Gustavo Monasterio O.

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA
Adscrito a Proyecto de Investigación
PRI ODO 012/016 y FONDECYT 1140904**

Tutor Principal:
Dr. Rolando Vernal A.

Tutores Asociados:
Dr. Walter Díaz
Dr. Cristián Núñez

Asesor Experto:
Dr. Guillermo Flores

Santiago-Chile
2017

INDICE

ÍNDICE	2
1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
Introducción	3
Mediadores pro-inflamatorios y osteo-destructivos	4
Quimioquinas y migración celular	5
Osteoblastos, osteoclastos y RANKL	6
Artrocentesis y su papel terapéutico y diagnóstico	9
Planteamiento del problema	11
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVO GENERAL	13
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. METODOLOGÍA	14
Selección de los pacientes	14
Examen imagenológico	14
Muestra de líquido sinovial	14
Expresión de citoquinas, CCLs, CCRs y RANKL mediante qPCR	15
Diferenciación y activación de osteoclastos TRAP ⁺	18
Ensayo de resorción ósea	19
Análisis estadístico	19
6. RESULTADOS	21
Expresión de citoquinas y RANKL	21
Expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas	22
Análisis de correlación	24
Formación y activación de osteoclastos	24
Producción de áreas de resorción ósea	26
7. DISCUSIÓN	28
8. CONCLUSIÓN	34
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
10. ANEXOS	44

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Introducción

La osteoartritis de la articulación temporomandibular (OA-ATM) es un trastorno artrítico degenerativo que se manifiesta en el paciente con diversos signos y síntomas, entre ellos dolor crónico, sinovitis, degradación progresiva del cartílago y remodelación anormal del hueso sub-condral (Zarb & Carlsson, 1999). Si bien se ha considerado que el principal factor etiológico de la OA-ATM es la sobrecarga funcional, incluyendo la mal oclusión severa, asimetría esquelética mandibular y sobre-exigencia muscular (Krisjane, Urtane, Krumina, Neimane, & Ragovska, 2012; Matsumoto et al., 2010; E. Tanaka, Detamore, & Mercuri, 2008), se clasifica como una “trastorno artrítico de inflamación baja”, a diferencia de la artritis reumatoide (AR) que se clasifica como un trastorno artrítico inflamatorio alto (de Souza, Lovato da Silva, Nasser, Fedorowicz, & Al-Muharraqi, 2012).

Varias citoquinas pro-inflamatorias, metalo-proteinasas de matriz (MMPs) y mediadores asociados a destrucción ósea presentes en el líquido sinovial se han considerado como posibles marcadores de OA-ATM activa. Entre ellos se incluyen: interleuquina (IL)-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1, factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interferón (INF)- γ , prostaglandina E₂ (PGE₂), aggrecanasa-1, aggrecanasa-2, metaloproteinasa de matriz (MMP)-2, MMP-3, MMP-9 y ligando del receptor activador del factor nuclear-*kappa* B (RANKL) (Jiang, Qiu, Chen, Zhang, & Yang, 2013; Kaneyama, Segami, Nishimura, Suzuki, & Sato, 2002; Kaneyama, Segami, Sun, Sato, & Fujimura, 2005; Nishimura, Segami, Kaneyama, Sato, & Fujimura, 2004; Sandler, Buckley, Cillo, & Braun, 1998; Shafer, Assael, White, & Rossomando, 1994; Takahashi et al., 1998; A. Tanaka et al., 2001; Wakita, Mogi, Kurita, Kuzushima, & Togari, 2006; Yoshida et al., 2005).

Mediadores pro-inflamatorios y osteo-destructivos

Si bien el estrés mecánico es uno de los principales factores de iniciación de la osteoartritis, la progresión de la enfermedad se debe principalmente al desequilibrio local entre la expresión de determinadas citoquinas y sus receptores específicos (Kaneyama et al., 2005). Al respecto, un incremento en la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en el líquido sinovial se ha asociado con artralgia y sinovitis de la ATM (Takahashi et al., 1998), mientras que el incremento en la expresión de RANKL se ha asociado con resorción ósea en diversas enfermedades osteo-destructivas (Vernal et al., 2008). En este contexto, se ha reportado la sobre-expresión de IL-1 β en pacientes afectados de trastornos temporomandibulares (TTM) en comparación a sujetos sanos (Tominaga et al., 2004) y se ha demostrado que la terapia de artrocentesis reduce hasta en un 90% los niveles de expresión de IL-1 β en el líquido sinovial de los pacientes tratados (Gulen, Ataoglu, Haliloglu, & Isik, 2009).

Otra citoquina que se ha relacionado con la patogenia de los TTM es IL-17 (Fossiez et al., 1998). IL-17 se ha descrito como inductora de sinovitis y degradación del cartílago, inhibidora de la proliferación de los condrocitos y promotora de la producción de citoquinas osteoclastogénicas, tal como IL-1 β e IL-6 (Fossiez et al., 1998). Además, IL-17 ejerce su actividad osteoclastogénica estimulando directamente la expresión de RANKL en sinoviocitos y osteoblastos (Takayanagi, 2009). Por otro lado, el aumento en la secreción de IL-1 β e IL-6 incrementa la producción de RANKL por parte de sinoviocitos y osteoblastos junto con facilitar la transducción de señal de RANKL en células precursoras de osteoclastos, promoviendo sinérgicamente la osteoclastogénesis en la membrana sinovial inflamada (Takayanagi, 2009). Sin embargo, es importante considerar que IL-6, así como otras citoquinas, tendrán actividad dependiente del contexto en el que se encuentren.

Al respecto, los linfocitos T-helper (Th) productores de IL-1 β , IL-17 o IL-22 serían responsables centrales de la destrucción ósea presente en la AR, siendo el

incremento en la expresión de estas citoquinas en el líquido sinovial de articulaciones con AR lo que se asociaría con el aumento en la expresión de RANKL y subsecuente resorción ósea (Kotake et al., 1999). Por su parte, IL-22, citoquina propia del fenotipo Th22 y linfocitos innatos (células inductoras de tejido linfoide, linfocitos T γ/δ y linfocitos NK), se ha detectado con niveles incrementados en sangre periférica y tejido sinovial en pacientes con AR (X. Wang et al., 2015).

Quimioquinas y migración celular

Las quimioquinas son pequeñas proteínas quimiotácticas que tienen un papel central en el reclutamiento de leucocitos hacia los tejidos inflamados (Baggiolini, 2001; Luster, 1998; Szekanecz & Koch, 2004). Junto con la actividad de migración y reclutamiento celular a través de gradientes quimiotácticas, las quimioquinas también pueden activar integrinas, estimular la liberación de mediadores moleculares y modular la vascularización. Así, las quimioquinas desempeñan un papel central en el proceso inflamatorio (Mackay, 2001).

Los receptores de quimioquinas CCR1 y CCR5 regulan el reclutamiento de monocitos y linfocitos Th1 durante el proceso inflamatorio (Weber et al., 2001). En particular, CCR1 y CCR5 son considerados potenciales blancos terapéuticos de AR, debido a que están fuertemente involucrados en el reclutamiento de monocitos y linfocitos T hacia las articulaciones afectadas (Haringman, Ludikhuizen, & Tak, 2004).

Existen diversas quimioquinas que interactúan con CCR1 y CCR5, las que han sido identificadas en el tejido sinovial de articulaciones afectadas de AR. Entre ellas, CCL2 y CCL5, las que se detectan en niveles incrementados en pacientes con AR, la primera de manera difusa en el tejido sinovial y la segunda principalmente en la capa más superficial de la membrana sinovial (Haringman,

Smeets, Reinders-Blankert, & Tak, 2006; Katrib et al., 2003; Konig, Krenn, Toksoy, Gerhard, & Gillitzer, 2000).

Desde un punto de vista de la respuesta linfocitaria T, CCR5 se expresa preferentemente en linfocitos Th1, CCR4 y su ligando específico CCL17 están preponderantemente ligados a la quimiotaxis de linfocitos Th2, y CCR6 junto a su ligando específico CCL20 se asocian principalmente a la función Th17 y Th22 (Ai & Liao, 2002; Baba et al., 1997; Nanki & Lipsky, 2000; Trifari, Kaplan, Tran, Crellin, & Spits, 2009; C. Wang, Kang, Lee, Sun, & Kim, 2009). Por su parte, CCR7 es un receptor relacionado principalmente con la quimiotaxis de células dendríticas y la formación de estructuras linfoides ectópicas (Forster, Davalos-Miszlitz, & Rot, 2008).

Osteoblastos, osteoclastos y RANKL

La triada molecular compuesta por RANKL/RANK/osteoprotegerina (OPG), miembros de la superfamilia de TNF, juega un papel central en la regulación de la remodelación ósea; en particular, determinan la diferenciación de los osteoclastos y la función resortiva de los osteoclastos maduros (Kearns, Khosla, & Kostenuik, 2008).

RANKL se produce en dos formas, una unida a membrana de 40 a 45 kDa en osteoblastos, y otra soluble de 31 kDa, liberada a partir de la primera por la acción de la enzima convertidora de TNF- α (TACE), secretada por sinoviocitos y linfocitos T (Kearns et al., 2008; Lacey et al., 1998; Lum et al., 1999).

RANKL estimula la osteoclastogénesis y actividad osteoclástica mediante su unión al receptor de superficie celular RANK, localizado en los precursores de osteoclastos y osteoclastos maduros (Khosla, 2001; Kwan Tat, Padrines, Theoleyre, Heymann, & Fortun, 2004). Además, la unión de RANKL a RANK activa la señalización anti-apoptótica, implicada en la supervivencia de los osteoclastos (Armstrong et al., 2002; Darnay, Haridas, Ni, Moore, & Aggarwal,

1998). Por su parte, OPG es secretado por células estromales y osteoblastos, y actúa como un receptor señuelo soluble para RANKL. Así, al interactuar con RANKL, inhibe la unión de RANKL con RANK, bloqueando de este modo la osteoclastogénesis y la resorción ósea (Gravallese & Goldring, 2000).

En AR, RANKL es producido por sinoviocitos y linfocitos T en la membrana sinovial inflamada (Gravallese et al., 2000; Kong et al., 1999; Takayanagi, Iizuka, et al., 2000). IL-1 β , IL-6 y TNF- α , las cuales se expresan abundantemente en el líquido sinovial y membrana sinovial de pacientes con AR, son potentes inductores de la expresión de RANKL, lo cual contribuye directamente al proceso de resorción ósea (Takayanagi, 2007).

Desde un punto de vista inmunológico, la infiltración de linfocitos T hacia el líquido sinovial es un hallazgo patológico distintivo de la AR (Takayanagi, 2009). Es por esto que se hace vital la comprensión del vínculo existente entre la presencia de linfocitos T en el líquido sinovial y el aumento en la expresión de RANKL y la consecuente resorción ósea. En este contexto, se ha reportado que RANKL expresado por linfocitos T actúa directamente en las células precursoras osteoclasticas, induciendo la osteoclastogénesis (Horwood et al., 1999; Kong et al., 1999). Sin embargo, es importante mencionar que los linfocitos T secretan diversas citoquinas dependiendo de su fenotipo (Th1, Th2, Th17, Th22 o T regulador), incluyendo IL-4 e IL-10, las cuales tienen un potente efecto inhibitorio en la diferenciación osteoclastica (Tabla 1) (Takayanagi, 2007; Takayanagi, Ogasawara, et al., 2000). Esto último es clave a la hora de analizar la producción de citoquinas pro-inflamatorias en el líquido sinovial, dado que el patrón de citoquinas expresado dependerá directamente del fenotipo linfocitario predominante en los tejidos afectados.

Tabla 1. Citoquinas asociadas a linfocitos T y osteoclastogénesis

Fenotipo linfocitario	Citoquinas asociadas*	Efecto en la osteoclastogénesis
Th1	INF- γ	Inhibición
	IL-1 β	Estimulación
	IL-12	Estimulación
	IL-18	Estimulación
	TNF- α	Estimulación
Th2	IL-4	Inhibición
	IL-5	ND
	IL-10	Inhibición
	IL-13	Inhibición
Th17	IL-17	Estimulación
	RANKL	Estimulación
	IL-23	Estimulación
	IL-6	Estimulación
Treg	IL-10	Inhibición
	TGF- β 1	Estimulación
Th22	IL-22	Estimulación
	TNF- α	Estimulación
	IL-13	Inhibición

*Citoquinas fenotipo-específicas asociadas a linfocitos T (se incluye a las citoquinas producidas por el fenotipo como aquellas determinantes de su diferenciación selectiva.

INF- γ , interferón γ ; IL, interleuquina; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear κ B; TGF- β 1, factor de crecimiento transformante β 1; Th, linfocito T-helper (tipo 1, tipo 2 y tipo 17); TNF, factor de necrosis tumoral; Treg, linfocito T regulador; ND, no determinado.

Artrocentesis y su papel terapéutico y diagnóstico

La artrocentesis como procedimiento terapéutico de la articulación de la rodilla data desde el año 1592 (Aceves-Avila, Delgadillo-Ruano, Ramos-Remus, Gomez-Vargas, & Gutierrez-Urena, 2003). A su vez, la artrocentesis de la ATM fue por primera vez descrita por Nitzan en 1991 como la forma más simple de terapia, con el objetivo de eliminar mediadores pro-inflamatorios, liberar el disco articular y desprender adherencias entre la superficie del disco y la fosa glenoidea gracias a la presión hidráulica de la solución del lavado (Nitzan, Dolwick, & Martinez, 1991; Tvrdy, Heinz, & Pink, 2015).

El procedimiento consiste en la introducción de 2 agujas en el espacio articular superior y el subsecuente lavado sinovial usando una solución fisiológica salina o Ringer Lactato (Guarda-Nardini, Manfredini, & Ferronato, 2008). Una aguja es utilizada para introducir la solución en la articulación y la otra para drenar la mezcla líquido sinovial/solución salina, que contiene sinoviocitos descamados, linfocitos T y mediadores pro-inflamatorios y osteo-destructivos (Guarda-Nardini et al., 2008). El procedimiento es usualmente realizado bajo anestesia local usando el bloqueo del nervio aurículo-temporal; sin embargo, también hay antecedentes de uso con anestesia general (Monje-Gil, Nitzan, & Gonzalez-Garcia, 2012).

En la actualidad, la artrocentesis de la ATM no es sólo utilizada en patologías agudas tal como el bloqueo discal, sino que además se indica para el tratamiento de otros TTMs. En este contexto, la indicación más frecuente es el desplazamiento anterior agudo del disco articular sin reducción o hipomovilidad articular con episodios de adhesión discal (disco adherido) (Emshoff, Puffer, Rudisch, & Gassner, 2000; Nitzan & Price, 2001; Tvrdy et al., 2015). Es posible elegir la artrocentesis como un procedimiento paliativo para pacientes con episodios agudos de AR u osteoartritis y también para los pacientes con un desplazamiento discal con reducción (DDCR) dolorosa, que rara vez responde al tratamiento conservador (Emshoff et al., 2000; Nitzan & Price, 2001; Tvrdy et al., 2015). Muchos casos de desplazamiento discal con y sin reducción se presentan

con sinovitis y cambios degenerativos incipientes en la superficie del cartílago. En este contexto, está ampliamente descrito que algunas citoquinas, receptores de citoquinas y antagonistas de receptores de citoquinas se expresan en la membrana sinovial y el líquido sinovial de estos pacientes, desempeñando un papel relevante en la progresión de estas patologías hacia trastornos de carácter degenerativo (Barkin & Weinberg, 2000; Fu, Ma, Zhang, & Chen, 1995; Kaneyama et al., 2005; Kopp, 1998; Kubota, Kubota, Matsumoto, Shibata, & Murakami, 1998; Suzuki, Segami, Kaneyama, Nishimura, & Nojima, 1999; Takahashi et al., 1998).

En particular, TTMs en etapas tempranas (desplazamiento discal con reducción) son tratados con 3 sesiones de artrocentesis, seguidas de inyecciones de ácido hialurónico intra-articular, mostrando disminución significativa del dolor y el ruido articular en todos los pacientes (Tuncel, 2012).

La tasa de éxito de la artrocentesis oscila entre el 70-90% (Hosaka, Murakami, Goto, & Iizuka, 1996; Nitzan, Samson, & Better, 1997). A pesar de ello, se ha asociado con algunas complicaciones las cuales dependen de la anatomía de la articulación, su relación con estructuras que la rodean y el método usado para introducir las agujas. La frecuencia de estas complicaciones es de un 2 a 10% (Tuncel, 2012), e incluyen daño al nervio facial, hematoma pre-auricular, disrupción de la arteria superficial temporal, desarrollo de fístula arterio-venosa, sangrado intra-articular, perforación intra-craneal, hematoma extra-dural, ruptura de parte de la aguja al interior de la articulación, introducción insuficiente de la aguja, fuga de solución salina de lavado fuera del espacio articular, daño a las superficies de la ATM y reacción alérgica a la anestesia o drogas administradas posterior al procedimiento (Tozoglu, Al-Belasy, & Dolwick, 2011). Además puede ocurrir inflamación aguda de la articulación, la cual puede estar acompañada de edema preauricular, enrojecimiento, dolor y restricción en la apertura bucal (Tozoglu et al., 2011).

Si bien las posibles complicaciones derivadas de esta técnica son múltiples, también son poco frecuentes y de rápida resolución. En DDCR, a dos semanas de

realizada la artrocentesis los niveles de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-11 y TNF- α disminuyen considerablemente, junto con la sintomatología asociada (Gulen et al., 2009). En este contexto, la disminución de citoquinas pro-inflamatorias en el líquido sinovial luego de la terapia prueban la eficiencia de la artrocentesis, en particular en la disminución de la artralgia y la hiper-sensibilidad (Shafer et al., 1994; Takahashi et al., 1998).

Planteamiento del problema

Existe una clara asociación entre la expresión de mediadores pro-inflamatorios y osteo-destructivos en el líquido sinovial y el diagnóstico de osteoartritis de la ATM; sin embargo, no se ha probado experimentalmente que dicha asociación tenga vinculación directa con los procesos inflamatorios y destructivos óseos característicos de la OA-ATM. Asimismo, existe poca evidencia que estudie el papel que pueden tener las quimioquinas presentes en el líquido sinovial de articulaciones con TMs en el reclutamiento de las células inmuno-inflamatorias.

En este contexto, al comparar la patogenia de las enfermedades netamente inflamatorias de la ATM (tal como DDCR) y los trastornos caracterizados tanto por inflamación como por resorción del hueso articular sub-condral (tal como la OA-ATM), existirían diferencias en los niveles de expresión de las citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, receptores de quimioquinas y mediadores osteo-destructivos, por ejemplo RANKL.

En este trabajo de investigación se compararon los niveles de las citoquinas asociadas a los fenotipos linfocitarios Th1, Th2, Th17 y T regulador, expresadas en células presentes en el líquido sinovial de articulaciones afectadas de OA-ATM y DDCR. Además, se analizaron los niveles de expresión de las quimioquinas y los receptores de quimioquinas característicos de la quimiotaxis selectiva de cada uno de los linfocitos T infiltrantes articulares. Finalmente, se analizaron los niveles de RANKL en ambas patologías y se evaluó su actividad resortiva ósea *in vitro*.

2. HIPÓTESIS

En el líquido sinovial de las articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis (OA-ATM) se detectan mayores niveles de las citoquinas IL-1 β , IL-17, IL-22, el factor de resorción ósea RANKL, las quimioquinas CCL5, CCL17 y CCL20, y los receptores de quimioquinas CCR4, CCR5, CCR6 y CCR7 comparado con el líquido sinovial de articulaciones afectadas de desplazamiento discal con reducción (DDCR).

Además, mayores niveles de diferenciación de osteoclastos y actividad resortiva ósea se observan en células estimuladas con líquido sinovial de articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis (OA-ATM) en comparación a las mismas células estimuladas con líquido sinovial de articulaciones afectadas de desplazamiento discal con reducción (DDCR).

3. OBJETIVO GENERAL

Analizar los niveles de expresión de citoquinas, quimioquinas y receptores de quimioquinas asociados a fenotipos linfocitarios Th1, Th2, Th17 o Th22 en líquido sinovial de ATMs afectadas de osteoartritis de la articulación temporomandibular (OA-ATM) o desplazamiento discal con reducción (DDCR). Además, analizar la activación de osteoclastos y resorción ósea inducida por el líquido sinovial de ATMs con OA-ATM o DDCR.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cuantificar los niveles de expresión de las citoquinas IL-1 β , IL-4, IL-9, IL-17, IL-22 y TGF- β 1, el factor de resorción ósea RANKL, las quimioquinas CCL5, CCL17 y CCL20, y los receptores de quimioquinas CCR4, CCR5, CCR6 y CCR7 en articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis (OA-ATM) o desplazamiento discal con reducción (DDCR).
2. Cuantificar el número de osteoclastos activos diferenciados a partir precursores celulares estimulados *in vitro* con líquido sinovial obtenido de articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis (OA-ATM) o desplazamiento discal con reducción (DDCR).
3. Cuantificar los niveles de actividad resortiva mediada por osteoclastos estimulados *in vitro* con líquido sinovial de articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis (OA-ATM) o desplazamiento discal con reducción (DDCR).

5. METODOLOGÍA

Selección de los pacientes

Utilizando el método no probabilístico de casos consecutivos, entre los sujetos que consultaron por TTMs a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, se seleccionaron tres pacientes afectados de OA-ATM y dos de DDCR, utilizando como criterio diagnóstico la guía DC-TMD (Schiffman et al., 2014). A los sujetos participantes en el estudio se les explicó el protocolo de investigación y voluntariamente aceptaron participar, firmando un consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se excluyeron del estudio sujetos que relataron antecedentes de enfermedad articular sistémica (artritis reumatoide), enfermedad degenerativa articular a la ATM no dolorosa (osteoartrosis) y pacientes con diagnóstico de OA o DDCR que hayan sido sometidos a algún tratamiento quirúrgico previo.

Examen imagenológico

Tal y como indica el “Diagnostic Decision Tree” de los DC-TMD, luego de la anamnesis y el examen clínico, los diagnósticos presuntivos de DDCR y OA-ATM fueron confirmados mediante imagenología (Schiffman et al., 2014). En el caso de diagnóstico presuntivo de DDCR se realizó resonancia magnética, mientras que en los desórdenes degenerativos OA-ATM se realizó estudio mediante Cone-Beam.

Muestra de líquido sinovial

Para la obtención de muestras de líquido sinovial, la artrocentesis recomendada fue realizada por un cirujano maxilofacial especialista (CN). Previa anestesia local extra-capsular de la ATM, se realizó una primera punción con una aguja nº 21 en

el espacio supradiscal y con dirección ínfero-lateral. Luego, mediante otra punción en dicho espacio, se inyectaron 2 mL de suero salino estéril, al tiempo que se le solicitó al paciente que durante un minuto realice movimientos de apertura y cierre de su boca. A continuación, se aspiraron desde la primera aguja 2 mL de la mezcla de suero/líquido sinovial desprovista de contaminación con sangre, la que fue almacenada en tubos de 1,5 mL mantenidos a 4°C durante su transporte al Laboratorio de Biología Periodontal.

Las muestras fueron centrifugadas a 2.000 xg por 10 minutos, para separar las células totales del líquido sinovial. El líquido sinovial libre de células se congeló a -80°C para su posterior análisis en los ensayos de resorción ósea. Las células por su parte fueron resuspendidas en 300 µL de RNAsafer (Omega Biotek Inc., GA, USA) y congeladas a 4°C.

Expresión de citoquinas, CCLs, CCRs y RANKL mediante qPCR

A partir de las células articulares obtenidas, se extrajo el RNA citoplasmático total usando 400 µL de buffer de lisis, compuesto de Igepal® CA-630 0,5% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM y VRC-40 10 mM, como inhibidor de RNAasas (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para ello, las células se centrifugaron a 2.000 xg durante 5 minutos a 20°C, luego se les hizo un lavado con 1 mL de PBS y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Luego de eliminar el sobrenadante, las células se lisaron realizando movimientos vigorosos con la pipeta hasta formar espuma. El lisado celular se centrifugó a 8.000 xg durante 10 segundos y el sobrenadante libre de fragmentos celulares no lisados se depositó en tubos nuevos, para ser incubados con SDS 20%, EDTA 0,5 M y proteinasa K 10mg/ml durante 2 horas a 37°C. Luego de agregar 400 uL de un mix de fenol:alcohol isoamílico:cloroformo, se recuperó el RNA total mediante centrifugación a 8.000 xg durante 10 minutos. El RNA total se precipitó en presencia de acetato de sodio 3M, glicógeno y alcohol etílico al 100% a -80°C durante 24 horas y se cuantificó usando un

espectrofotómetro (Synergy HT; Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, VT, USA). Las primeras cadenas de cDNA se sintetizaron a partir de 5 µg del RNA total usando un kit de transcripción reversa siguiendo las instrucciones del fabricante (SuperScrip™; Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Finalmente, 50 ng de cDNA fueron amplificados usando los partidores específicos (Tabla 2) y el reactivo de qPCR KAPA™ SYBR® (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA) para cuantificar los niveles de expresión de las citoquinas IL-1β, IL-4, IL-9, IL-17, IL-22 y TGF-β1, el factor de resorción ósea RANKL, las quimioquinas CCL5, CCL17 y CCL20, y los receptores de quimioquinas CCR4, CCR5, CCR6 y CCR7. Para ello se utilizó en un equipo de qPCR StepOnePlus® (Applied Biosystems, Singapore) usando el siguiente protocolo: 95°C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C durante 3 segundos, y 60°C durante 30 segundos, y finalmente una curva de fusión de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, y 95°C durante 15 segundos, para detectar la formación de productos no específicos y amplificación de falsos positivos. Los niveles de rRNA 18S fueron cuantificados como referencia para la cuantificación relativa.

Tabla 2. Partidores usados para la amplificación mediante qPCR de las citoquinas, quimioquinas, receptores de quimioquinas, RANKL y 18S RNA.

	Partidor 5'-3'	Partidor 3'-5'
IL-1 β	ctgtcctgcgtgttgaaaga	ttgggtaatmttgggatctaca
IL-4	caccgagttgaccgtaacag	gccctgcagaaggttcc
IL-9	catcctgcctctgttttct	gggagagacacaagcagctgg
IL-17	tgggaagacctcattggtgt	ggatttcgtgggattgtgat
IL-22	accttccttgaccaaactca	agcttctctcgctcagacg
TGF- β 1	cacgtggagctgtaccagaa	cagccggttgctgaggta
CCL5	gggtgtgtgtccgaggaata	cctcattgctactgccctct
CCL17	ggcttctctgcagcacatc	ggaatggctccctgaagta
CCL20	gctgctttgatgtcagtgt	gcagtcaaagttgcttgctg
CCR4	accgctgcacaattgc	tttacagtggcatattctttgtcatg
CCR5	gaccagccccaagatgacta	cttgggtgggtggctgtgt
CCR6	tcagccccttcagctcac	actgtggctgttggtttg
CCR7	ttggttaggggacaatagcc	ggctgataagctaacaccagaca
RANKL	tgattcatgtaggagaattaaacagg	gatgtgctgtgatccaacga
18S rRNA	ctcaacacgggaaacctcac	cgctccaccaactaagaacg

Diferenciación y activación de osteoclastos TRAP⁺

Con el objeto de analizar la activación y diferenciación de los osteoclastos en respuesta a muestras de líquido sinovial obtenidas de pacientes con OA-ATM o DDCR, se realizaron ensayos de osteoclastogénesis mediante la determinación del número de células que expresen el marcador específico de osteoclastos fosfatasa ácida resistente al Tartrato (TRAP).

El sobrenadante obtenido del proceso de centrifugación se utilizó para estimular células de la línea macrófago-monocito RAW 264.7 (ATCC[®] TIB-71[™]). Para analizar la actividad dosis-dependiente, previo a los experimentos en células precursoras de osteoclastos, se realizaron diluciones seriadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) en relación muestra/DMEM 1:1; 1:2; 1:4; 1:8. Las células fueron cultivadas en placas de cultivo de 24 pocillos a 5×10^3 células/pocillo en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, 50 U/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomina (Gibco Invitrogen Corp.) y 35 ng/mL de rhRANKL (R&D Systems Inc.) por 3 días. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con DMEM libre de rhRANKL y cultivadas en la presencia de diluciones seriadas de muestras de líquido sinovial por 7 días. Para efectos de comparación, los controles negativos fueron pocillos con DMEM y los controles positivos fueron pocillos que recibieron DMEM con rhRANKL. La tinción TRAP se determinó usando un kit de fosfatasa ácida leucocitaria siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich), con una fijación previa en formaldehído-citrato-acetona al 37%. Las células TRAP⁺ con tres o más núcleos fueron consideradas osteoclastos y se cuantificaron usando un microscopio de luz visible (AxiostarPlus; Carl Zeiss Co., Germany).

Ensayo de resorción ósea

Con el fin de evaluar la actividad osteoclástica de precursores de osteoclastos expuestos a diluciones seriadas de muestras de líquido sinovial obtenidas de pacientes con OA-ATM o DDCR, se realizaron ensayos de resorción ósea. Estos consisten en la cuantificación de los puntos de resorción ósea producidos por osteoclastos TRAP⁺ en respuesta a las diluciones seriadas de líquido sinovial obtenido de pacientes con OA-ATM o DDCR. Para esto, células RAW 264.7 fueron cultivadas a 1×10^3 células/pocillo en las mismas condiciones descritas en el experimento de diferenciación y activación de osteoclastos TRAP⁺, pero esta vez usando placas de “ensayo-óseo” de 96 pocillos (Corning[®] Osteo Assay Surface; Tewksbury, MA, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. Luego de 14 días, el medio fue aspirado, las células fueron retiradas y los pocillos fueron lavados una vez con 100 μ l de solución de cloro al 5% por 5 minutos y dos veces con 200 μ l de agua destilada, se dejaron secar a temperatura ambiente por 4 horas y finalmente se tiñeron con azul de toluidina al 0,5%. Los puntos individuales o clústeres de múltiples puntos de resorción fueron observados usando microscopía de luz visible y las áreas de resorción fueron medidas usando un sistema de análisis de imágenes (AxioStarPlus; Carl Zeiss Co., Germany).

Análisis estadístico

Los datos de qPCR fueron analizados utilizando el software StepOne v2.2.2 (Applied Biosystems) y la cuantificación relativa, expresada como expresión relativa promedio \pm desviación estándar, se obtuvo normalizando la expresión del mRNA de cada citoquina, quimioquina, receptor de quimioquina, o RANKL a la expresión de mRNA 18S usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La diferenciación de osteoclastos se expresó como el promedio de células TRAP⁺ por pocillo \pm desviación estándar y la resorción ósea fue expresada como el promedio de puntos de resorción $\mu\text{m}^2/\text{pocillo}$ \pm desviación estándar. La normalidad de la

distribución de los datos fue determinada usando el test de Kolmogorov-Smirnov y las diferencias fueron determinadas usando el t-test de Student o los test de ANOVA y Tukey post-hoc. Los coeficientes de correlación fueron obtenidos usando el test de Pearson. La significancia estadística se asumió cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Expresión de citoquinas y RANKL

La expresión de los niveles de mRNA de IL-1 β , IL-4, IL-17, IL-22, y RANKL se detectó en todas las muestras de ATMs con DDCR y OA-ATM. Por otro lado, se detectó expresión de IL-9 y TGF- β 1 en todas las muestras obtenidas de ATMs afectadas de DDCR; sin embargo, en un 60% y 80% de aquellas muestras se detectó expresión de mRNA de IL-9 y TGF- β 1, respectivamente. IL-17 fue la citoquina para la cual se detectó mayor sobre-expresión en muestras de OA-ATM, con un aumento en la expresión relativa de 13.8 ($P < 0.001$) (Figura 1). De forma similar, IL-1 β (8.3 veces, $P < 0.001$), IL-22 (3.6 veces, $P = 0.006$) y RANKL (5.6 veces, $P = 0.004$) se detectaron significativamente sobre-expresadas en muestras de OA-ATM en comparación con DDCR. Por el contrario, IL-4, IL-9 y TGF- β 1 se detectaron sub-expresadas en muestras de OA-ATM. Cuando la expresión relativa fue recalculada considerando un ajuste en la expresión de IL-4, IL-9 y TGF- β 1 tomando los niveles detectados en OA-ATM como valor de referencia 1 para la expresión relativa, los niveles detectados de IL-4 y TGF- β 1 en DDCR fueron 6.4 veces ($P = 0.012$) y 3.4 veces ($P = 0.041$) más, respectivamente, que los niveles detectados en OA-ATM (Figura 1). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre OA-ATM y DDCR para la expresión de IL-9.

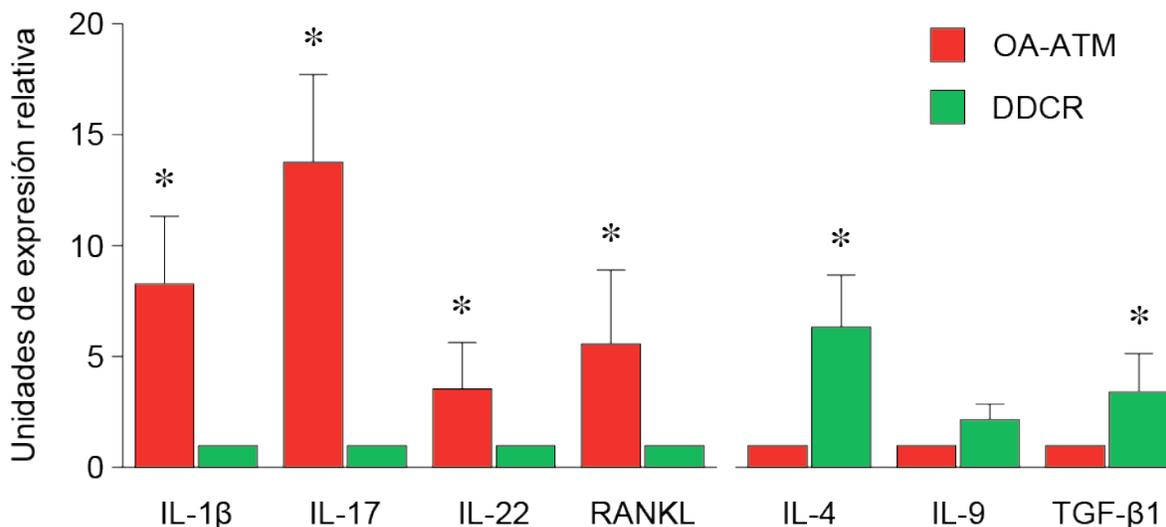


Figura 1. Expresión de citoquinas y RANKL. Cuantificación de IL-1 β , IL-4, IL-9, IL-17, IL-22, TGF- β 1 y RANKL representada como unidades de expresión relativa de mRNA en células totales obtenidas de articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis (OA-ATM) o desplazamiento discal con reducción (DDCR). Para las cuantificaciones de IL-1 β , IL-17, IL-22 y RANKL, los niveles de expresión de mRNA en células obtenidas de ATMs con DDCR se consideraron como 1 para referencia del número de unidades de expresión relativa. Para las cuantificaciones de IL-4, IL-9 y TGF- β 1, los niveles de expresión de mRNA en células obtenidas de ATMs con OA-ATM se consideraron como 1 para referencia del número de unidades de expresión relativa. Los datos de 5 experimentos independientes se muestran como promedio \pm desviación estándar. Cada experimento fue realizado en duplicado. * $P < 0.05$. IL, interleuquina; TGF, factor de crecimiento transformante; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear- κ B. (n=5)

Expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas

La expresión de los niveles de mRNA de CCL5, CCL17, CCL20, CCR4, CCR5, CCR6 y CCR7 se detectó en todas las muestras obtenidas de ATMs con OA-ATM y DDCR. En OA-ATM, CCL5 (5.4 veces, $P = 0.001$), CCL20 (2.8 veces, $P = 0.018$), CCR5 (3.2 veces, $P = 0.001$) y CCR7 (2.1 veces, $P = 0.026$) se encontraron significativamente sobre-expresados comparados con las muestras obtenidas de DDCR (Figura 2). Contrariamente, CCR4 se encontró sub-expresado en OA-ATM comparado con DDCR. Cuando la expresión relativa de mRNA se recalculó considerando los niveles de expresión de CCR4 detectados en OA-ATM

como valor de referencia 1 para la expresión relativa, la expresión de CCR4 en DDCR fue de 2.1 veces ($P = 0.011$) más que los niveles detectados en OA-ATM (Figura 2). No se detectaron diferencias significativas en la expresión de CCR6 y CCL17 entre OA-ATM y DDCR.

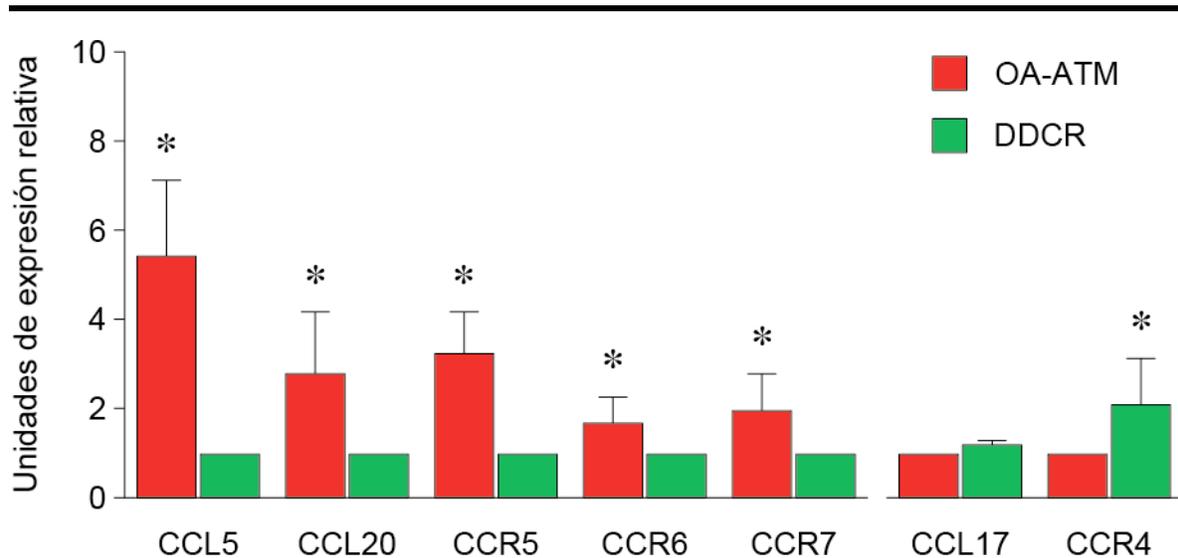


Figura 2. Expresión de quimioquinas y receptores de quimioquinas. Cuantificación de CCL5, CCL17, CCL20, CCR4, CCR5, CCR6 y CCR7 representada como unidades de expresión relativa de mRNA en células totales obtenidas de articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis (OA-ATM) o desplazamiento discal con reducción (DDCR). Para las cuantificaciones de CCL5, CCL20, CCR5, CCR6 y CCR7 los niveles de expresión de mRNA en células obtenidas de ATMs con DDCR se consideraron como 1 para referencia del número de unidades de expresión relativa. Para las cuantificaciones de CCL17 y CCR4 los niveles de expresión de mRNA en células obtenidas de ATMs con OA-ATM se consideraron como 1 para referencia del número de unidades de expresión relativa. Los datos de 5 experimentos independientes se muestran como promedio \pm desviación estándar. Cada experimento fue realizado en duplicado. * $P < 0.05$. CCL, CC-quimioquina; CCR, CC- receptor de quimioquina. (n=5)

Análisis de correlación

La Tabla 3 muestra el análisis de correlación entre la expresión de mRNA de RANKL y las citoquinas IL-1 β , IL-17 e IL-22 en muestras obtenidas de ATMs con OA-ATM. Se encontró correlación positiva estadísticamente significativa entre RANKL e IL-1 β ($r = 0.795$, $P = 0.018$), IL-17 ($r = 0.774$, $P = 0.024$) e IL-22 ($r = 0.923$, $P = 0.001$). Contrariamente, no se encontró correlación entre RANKL y las citoquinas IL-4 e IL-9, las quimioquinas CCL5, CCL17 y CCL20 y los receptores de quimioquinas CCR4, CCR5, CCR6 y CCR7 (datos no mostrados).

Tabla 3. Análisis de correlación entre RANKL y citoquinas en ATMs con OA-ATM

	IL-1 β	IL-17	IL-22	
RANKL	0.795	0.774	0.923	<i>r</i>-Pearson
	$P = 0.018$	$P = 0.024$	$P = 0.001$	<i>P</i>-value

El coeficiente de correlación de Pearson (*r*-Pearson) entre la expresión de mRNA de RANKL y las citoquinas IL-1 β , IL-17 o IL-22 fue calculado en ATMs con OA-ATM. IL, interleuquina; RANKL, ligando del receptor activador del factor nuclear κ B. (**n=5**)

Formación y activación de osteoclastos

El número de osteoclastos TRAP⁺ fue significativamente alto en respuesta a muestras de fluido sinovial obtenidas de ATMs con OA-ATM al compararlas con aquellas con DDCR (Figura 3a-3b), siendo 60.0 versus 21.2 células TRAP⁺/pocillo en las muestras sin diluir ($P < 0.001$) y 31.4 versus 10.2 células TRAP⁺/pocillo en aquellas diluidas 1:2 ($P = 0.008$). Interesantemente, cuando las células RAW 264.7 fueron inducidas en presencia de fluido sinovial obtenido de articulaciones con OA-ATM, se observó un mayor número de osteoclastos TRAP⁺ al compararlo con las mismas células cultivadas en presencia de rhRANKL ($P > 0.05$), usado como control positivo.

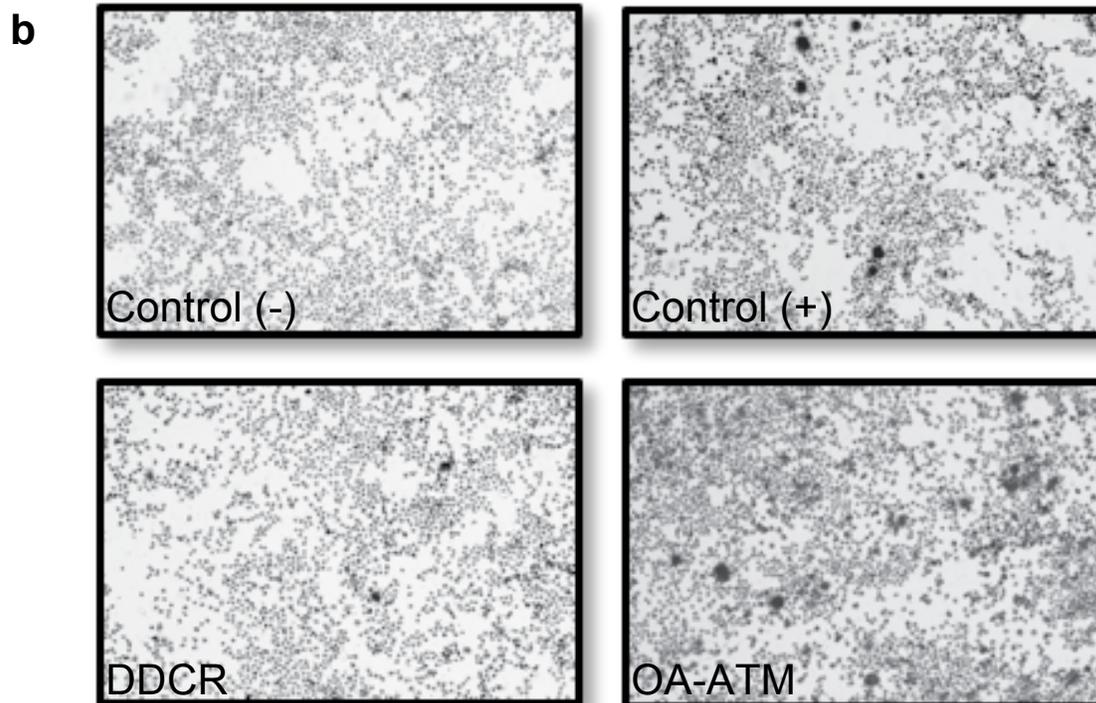
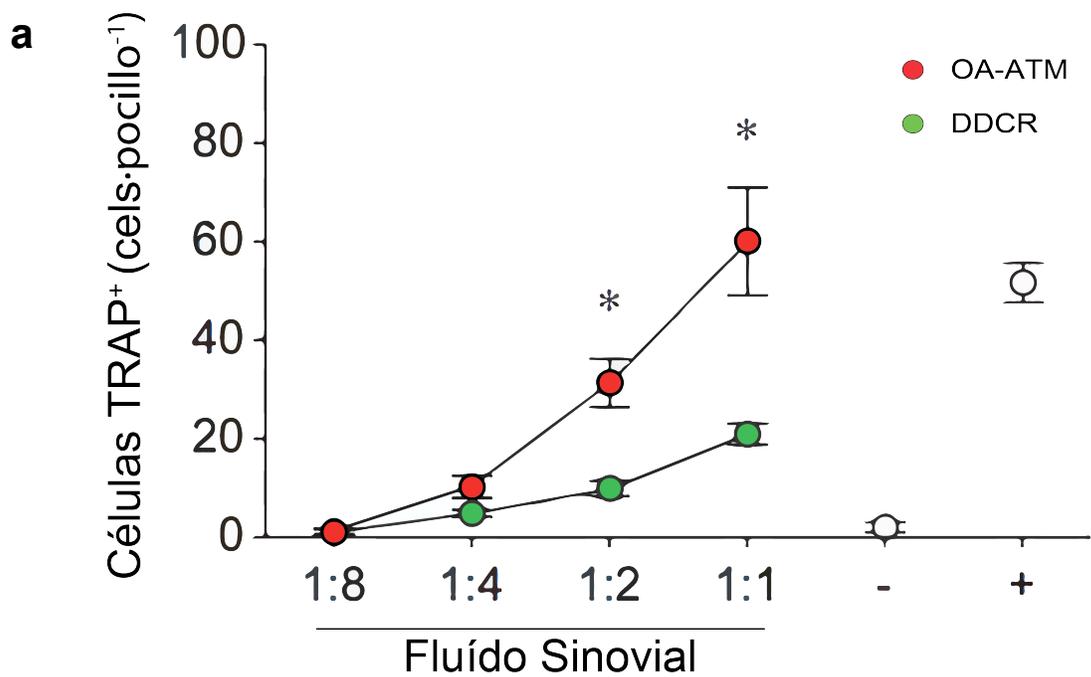


Figura 3. Activación de osteoclastos. (a) Osteoclastos TRAP⁺ inducidos en respuesta a fluido sinovial obtenido de ATMs afectadas de OA-ATM o DDCR. Células RAW 264.7 no inducidas fueron usadas como control negativo (-) y células RAW 264.7 mantenidas en DMEM suplementado con rhRANKL por 7 días se usaron como control (+). La cuantificación de osteoclastos TRAP⁺ es representada como células-pocillo⁻¹. Los datos de 5 experimentos independientes se muestran como promedio \pm desviación estándar. Cada experimento fue realizado en duplicado. (b) Experimento representativo cuantificado en Figura 3a (magnificación x200). * $P < 0.05$. TRAP; Fosfatasa ácida resistente a tartrato. (n=5)

Producción de áreas de resorción ósea

Al igual que lo visto en los experimentos de formación y activación de osteoclastos TRAP⁺, la actividad resortiva fue significativamente alta en aquellos osteoclastos expuestos a fluido sinovial de articulaciones con OA-ATM al compararlos con muestras de DDCR (Figuras 4a-4b), siendo 118.6 versus 41.0 $\mu\text{m}^2/\text{pocillo}$ en muestras sin diluir ($P < 0.001$) y 56.0 versus 23.2 $\mu\text{m}^2/\text{pocillo}$ en muestras diluidas a razón de 1:2 ($P = 0.016$). Además, se encontraron niveles superiores de resorción ósea que en aquellos osteoclastos inducidos en presencia de rhRANKL ($P > 0.05$), usado como control positivo.

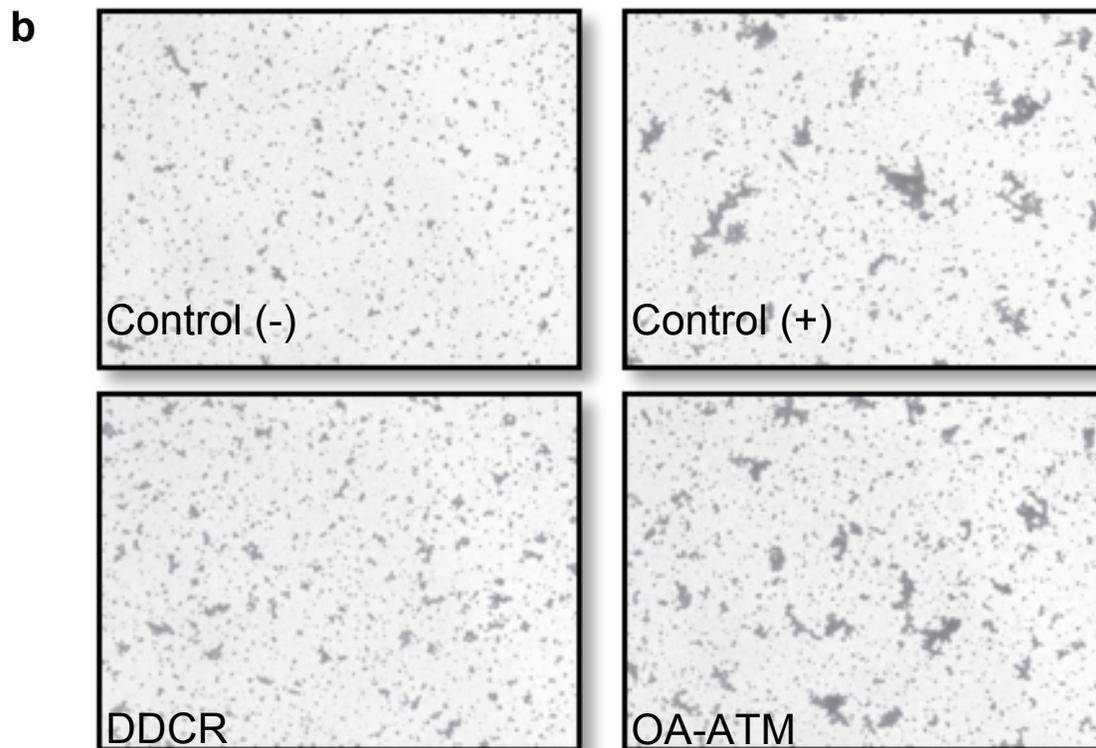
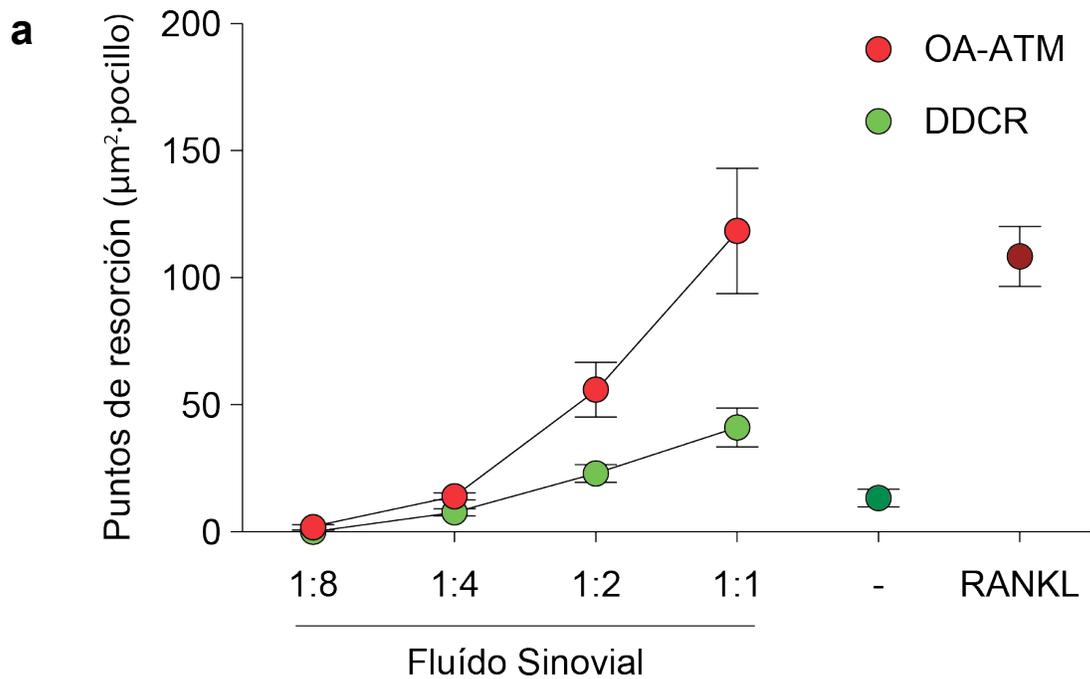


Figura 4. Ensayo de resorción ósea. (a) Puntos de resorción ósea inducidos en respuesta a fluido sinovial obtenido de ATMs afectadas de OA-ATM o DDCR. Diluciones de fluido sinovial de 1:1 a 1:8 fueron usadas para las comparaciones. Células RAW 264.7 no inducidas fueron usadas como control negativo (-) y células RAW 264.7 mantenidas en DMEM suplementado con rhRANKL por 2 semanas se usaron como control (+). La cuantificación de los puntos o áreas de resorción es representada como $\mu\text{m}^2 \cdot \text{pocillo}^{-1}$. Los datos de 5 experimentos independientes se muestran como promedio \pm desviación estándar. Cada experimento fue realizado en duplicado. (b) Experimento representativo cuantificado en Figura 4a (magnificación x200). * $P < 0.05$. (n=5)

7. DISCUSIÓN

La OA-ATM es un TTM degenerativo caracterizado por la inflamación y resorción anormal del cartílago articular y hueso sub-condral. Afecta más frecuentemente a mujeres y su prevalencia aumenta en relación a la edad. Una serie de factores tales como sobrecarga funcional, bruxismo, masticación unilateral, factores genéticos y desórdenes internos se han descrito como posibles responsables del desarrollo de esta patología (Comert Kilic, Kilic, & Sumbullu, 2015; Liu & Steinkeler, 2013). Desde un punto de vista patológico, existe un consenso universal que establece que los trastornos degenerativos y los desplazamientos discales están asociados y pueden ocurrir concomitantemente (Stegenga, 2001). Así, el DDCR precede y eventualmente progresa a OA-ATM, dado que su desarrollo y recuperación están íntimamente relacionados y se asocian a la capacidad adaptativa de los tejidos que componen el órgano articular (Milam, 2005; Moncada, Cortes, Millas, & Marholz, 2014; Stegenga, 2001). Las citoquinas pro-inflamatorias desempeñan un papel central en el proceso de inflamación de la OA-ATM y un incremento en el reclutamiento de células inmuno-inflamatorias productoras de citoquinas en el tejido sinovial articular se ha asociado con desórdenes internos y procesos degenerativos tanto del disco como las superficies articulares (Kellesarian et al., 2016; Long et al., 2016; Lu et al., 2015; Vernal et al., 2008). Los resultados del presente trabajo revelaron un incremento en los niveles de IL-1 β , IL-17 e IL-22, asociadas con los patrones de respuesta inmuno-inflamatoria Th1, Th17 y Th22, en el fluido sinovial de ATMs con OA-ATM comparado con DDCR, y estos niveles aumentados de citoquinas se correlacionaron significativamente con la sobre-expresión de RANKL.

Las quimioquinas y los receptores de quimioquinas son importantes mediadores de la migración y tráfico leucocitario en desórdenes inflamatorios y muchos de ellos pueden ser potenciales blancos terapéuticos para intervenciones biológicas en una variedad de enfermedades (Carter, 2002). Se ha descrito que

CCR5 y su ligando CCL5 desempeñan un papel especializado en el reclutamiento de monocitos y linfocitos Th1 bajo condiciones de inflamación, y en artritis reumatoide han sido descritos como potenciales blancos terapéuticos debido a su potente actividad quimiotáctica sobre monocitos, macrófagos y linfocitos T hacia tejido articular (Gerlag et al., 2004; Haringman et al., 2004; Haringman et al., 2006; Katschke et al., 2001; Kinne, Brauer, Stuhlmuller, Palombo-Kinne, & Burmester, 2000; Weber et al., 2001). Asimismo, se ha descrito que fibroblastos tipo sinoviocitos (FLS) expresan constitutivamente los receptores de quimioquinas CCR2, CCR5, CXCR3 y CXCR4, y se ha demostrado que la estimulación de los mismos con los correspondientes ligandos aumenta su capacidad de migración y actividad colagenasa y gelatinasa, así como también la producción de IL-6 e IL-8 en artritis reumatoide (Garcia-Vicuna et al., 2004; Nanki, Nagasaka, Hayashida, Saita, & Miyasaka, 2001). Igualmente se ha descrito la expresión funcional de CCR7 en FLS de pacientes con artritis reumatoide y osteoartritis, la cual al interactuar con sus ligandos CCL19 y CCL20 incrementa la actividad migratoria y la secreción del factor asociado a la angiogénesis VEGF, marcador clave de la inflamación sinovial (Bruhl et al., 2008). En el presente estudio encontramos incrementados los niveles de las quimioquinas CCL5 y CCL20 y los receptores de quimioquinas CCR5 y CCR7 en muestras obtenidas de OA-ATM comparadas con DDCR, las cuales son responsables del reclutamiento y migración de múltiples tipos celulares entre los que se encuentran células inmunes de respuestas tipo Th1, Th17 y Th22 y fibroblastos tipos sinoviocitos (Bruhl et al., 2008; Garcia-Vicuna et al., 2004; H. W. Lim, Lee, Hillsamer, & Kim, 2008; Loetscher et al., 1998). Esta expresión incrementada de las quimioquinas y sus receptores recién descritos en fluido sinovial de articulaciones con OA-ATM nos sugiere que el ambiente rico en citoquinas pro-inflamatorias puede estar involucrado en el aumento en la expresión de CCL5, CCL20, CCR5 y CCR7, y que a su vez esta sobre-expresión puede tener un papel fundamental en la progresión de la enfermedad, en la medida que promueve tanto la migración de células inmunes al tejido articular, como la actividad pro-inflamatoria y destructiva de la matriz extracelular por parte de células presentes en la articulación.

Diversos estudios han asociado e identificado diferentes citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1 β , IL-17 y TNF- α , con inflamación sinovial, destrucción de tejido conectivo, deterioro de cartílago articular y resorción ósea del hueso sub-condral (Kaneyama et al., 2002; Kaneyama, Segami, Sato, Nishimura, & Yoshimura, 2004; Kaneyama et al., 2005; Kellesarian et al., 2016; Kubota et al., 1998; Li et al., 2016; W. H. Lim et al., 2009; Long et al., 2016; Vernal et al., 2008). Al respecto, se ha descrito que las citoquinas IL-1 β , IL-17 y TNF- α pueden inducir la actividad osteoclastogénica y osteo-resortiva mediante la inducción de la producción de RANKL por osteoblastos y linfocitos Th17 (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003; Sato et al., 2006). Junto con lo anterior, IL-17 puede promover la inflamación local mediante el reclutamiento y activación de células inmuno-inflamatorias, lo cual resulta en un ambiente rico en citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 β y TNF- α , promoviendo subsecuentemente la producción de RANKL por osteoblastos, sinoviocitos y linfocitos Th17 (Dong, 2006; Hashizume, Hayakawa, & Mihara, 2008; Takayanagi, Iizuka, et al., 2000; Weaver, Harrington, Mangan, Gavrieli, & Murphy, 2006). Por su parte, los linfocitos Th17 tienen la capacidad de inducir y activar osteoclastos por acción directa célula a célula en sus precursores y osteoclastos maduros a través de la expresión de RANKL en membrana, al igual que sinoviocitos en artritis reumatoide (Hashizume et al., 2008; Takayanagi, Iizuka, et al., 2000; Vernal & Garcia-Sanz, 2008; Yasuda et al., 1998). En el presente trabajo, cuando se indujeron células precursoras de osteoclastos RAW 264.7 con fluido sinovial obtenido de OA-ATM, se detectaron mayores cantidades de osteoclastos maduros y áreas de resorción ósea al compararlas con las mismas células cultivadas en presencia de fluido sinovial obtenido de articulaciones con DDCR. Llama la atención que, de manera similar, se detectó un incremento en el número de osteoclastos maduros y áreas de resorción ósea cuando las células fueron inducidas en presencia de fluido sinovial de articulaciones con OA-ATM al compararlas con células estimuladas con rhRANKL, usado como control positivo. Esto último nos permite sugerir que las diferencias encontradas entre RANKL solo y fluido sinovial de OA-ATM pueden deberse a la presencia de otros mediadores pro-resorción ósea en este último, como IL-1 β , IL-17 e IL-22, los cuales en

conjunto desempeñan un papel sinérgico en la diferenciación y activación osteoclástica.

Interesantemente, el presente trabajo es el primero que propone el papel de IL-22 en la patogénesis de OA-ATM. Nuestros hallazgos demostraron una sobre-expresión de IL-22 en fluido sinovial proveniente de OA-ATM y revelaron por primera vez que estos niveles incrementados de IL-22 detectados se asocian con un incremento en la expresión del factor inductor de la resorción ósea RANKL. Esta hipótesis se ve sostenida en la evidencia que otorga un papel pro-inflamatorio y pro-osteoresortivo a IL-22 a través de la actividad sinérgica con IL-1 β y TNF- α , en linfocitos Th17 y fibroblastos sinoviales (Elyaman et al., 2009; Kim et al., 2012; Marijnissen et al., 2011), de forma indirecta a través de la inducción de linfocitos Th17 y consecuente producción de IL-17 o de forma directa induciendo la expresión de RANKL en fibroblastos sinoviales (Kim et al., 2012; Zhang et al., 2011). Asimismo, estudios previos han detectado niveles de IL-22 sobre-expresados en fibroblastos sinoviales de artritis reumatoide, demostrando el papel patogénico de esta citoquina en la inflamación y destrucción articular reumática a través de la modulación de la expresión de IL-1 β e IL-17R (Carrion et al., 2013; Pinto et al., 2015). Recientemente, además, se ha descrito la sobre-expresión significativa de IL-17 e IL-22 en tejido sinovial inflamado de articulaciones con osteoartritis, que a su vez presentaban altos niveles de infiltración de macrófagos, linfocitos T y B y neutrófilos, sugiriendo a IL-22 como un posible blanco terapéutico para la tratar la inflamación y sintomatología asociada durante la patogénesis de la osteoartritis (Deligne et al., 2015).

En el presente estudio, examinamos el papel de las vías celulares inmuno-inflamatorias tipo Th1/Th17/Th22, asociadas con la producción de IL-1 β , IL-17 e IL-22, respectivamente, en la patogénesis de la OA-ATM. Sin embargo, también analizamos el papel de las vías celulares regulatorias tipo Th2/Th9/Treg, responsables de la producción de IL-4, IL-9 y TGF- β 1, respectivamente. Nuestros

resultados demostraron que la expresión de IL-4 y TGF- β 1 se encontraba disminuida en muestras de fluido sinovial de OA-ATM. Más aún, en muestras obtenidas de DDCR detectamos un incremento en los niveles de IL-4 y TGF- β 1 al compararlas con aquellas obtenidas de OA-ATM. Estos hallazgos pueden estar relacionados con el papel de IL-4 y TGF- β 1 en la inhibición de citoquinas pro-inflamatorias, minimizando la inflamación y destrucción de las ATMs. Al respecto, mientras el eje Th1/Th17/Th22 se ha asociado con el inicio, progresión y severidad de la inflamación y destrucción articular en artritis reumatoide, el eje Th2/Th9/Treg se ha asociado con la salud articular (Kim et al., 2012).

Finalmente, de las evidencias expuestas es relevante poner atención a los hallazgos respecto al DDCR, el cual se define como un desorden biomecánico intra-capsular que involucra al complejo disco-condilar (Schiffman et al., 2014), pues en base a nuestros resultados existe una predominancia significativa del eje Th2/Th9/Treg, asociado a salud, al compararlo con OA-ATM, en circunstancias que tratándose de un desorden intra-capsular sería esperable que los niveles de citoquinas asociadas a salud se vieran de igual manera disminuidas o al menos similares a los niveles de una patología inflamatoria como la OA-ATM. Kaneyama et al. describió diferencias en los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α y sus respectivos receptores, entre pacientes sanos, con desórdenes internos (como DDCR) y OA-ATM, siendo particularmente interesante las diferencias significativas en los niveles de estas citoquinas pro-inflamatorias entre pacientes sanos y aquellos con desórdenes internos, más no así entre estos últimos y aquellos con OA-ATM (Kaneyama et al., 2005). Esto último permite sugerir que ya en desórdenes internos como el DDCR podemos encontrar un desbalance en los niveles de citoquinas, desplazándose hacia un perfil más pro-inflamatorio, y pudiendo ser esto un estadio previo a la patología articular degenerativa. Sin embargo, nuestros hallazgos no nos permiten concluir lo mismo, debido principalmente a que en este estudio, por las implicancias éticas y por tratarse, además, de un estudio piloto, no se incluyó un grupo de pacientes sanos, lo cual no nos permite evidenciar diferencias entre estos y nuestro grupo con DDCR. Atendiendo a estas

consideraciones es que se hace necesario que estudios futuros incluyan dentro de su análisis un grupo de control que presente un estado de salud articular que permita cotejar con metodologías similares el posible vínculo en la progresión entre estas dos entidades patológicas de las ATMs.

8. CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestros datos proveen evidencia que demuestra que en el fluido sinovial de articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis (OA-ATM) existen niveles de expresión incrementados de las citoquinas IL-1 β , IL-17 e IL-22, el factor de resorción ósea RANKL, las quimioquinas CCL5 y CCL20 y los receptores de quimioquinas CCR5 y CCR7, al compararlos con el fluido sinovial proveniente de articulaciones temporomandibulares (ATMs) con desplazamiento discal con reducción (DDCR). Junto con lo anterior, los niveles incrementados de IL-1 β , IL-17 e IL-22 se correlacionan positivamente con el incremento en los niveles de expresión de RANKL.

Además, el fluido sinovial de articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis induce mayor diferenciación osteoclástica y actividad osteoresortiva *in-vitro* en precursores celulares estimulados con el mismo, al compararlo con aquel obtenido de articulaciones con DDCR.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aceves-Avila, F. J., Delgadillo-Ruano, M. A., Ramos-Remus, C., Gomez-Vargas, A., & Gutierrez-Urena, S. (2003). The first descriptions of therapeutic arthrocentesis: a historical note. *Rheumatology (Oxford)*, *42*(1), 180-183.
- Ai, L. S., & Liao, F. (2002). Mutating the four extracellular cysteines in the chemokine receptor CCR6 reveals their differing roles in receptor trafficking, ligand binding, and signaling. *Biochemistry*, *41*(26), 8332-8341.
- Armstrong, A. P., Tometsko, M. E., Glaccum, M., Sutherland, C. L., Cosman, D., & Dougall, W. C. (2002). A RANK/TRAF6-dependent signal transduction pathway is essential for osteoclast cytoskeletal organization and resorptive function. *J Biol Chem*, *277*(46), 44347-44356. doi:10.1074/jbc.M202009200
- Baba, M., Imai, T., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Hieshima, K., . . . Yoshie, O. (1997). Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J Biol Chem*, *272*(23), 14893-14898.
- Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*, *250*(2), 91-104.
- Barkin, S., & Weinberg, S. (2000). Internal derangements of the temporomandibular joint: the role of arthroscopic surgery and arthrocentesis. *J Can Dent Assoc*, *66*(4), 199-203.
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, *423*(6937), 337-342. doi:10.1038/nature01658
- Bruhl, H., Mack, M., Niedermeier, M., Lochbaum, D., Scholmerich, J., & Straub, R. H. (2008). Functional expression of the chemokine receptor CCR7 on fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)*, *47*(12), 1771-1774. doi:10.1093/rheumatology/ken383
- Carrion, M., Juarranz, Y., Martinez, C., Gonzalez-Alvaro, I., Pablos, J. L., Gutierrez-Canas, I., & Gomariz, R. P. (2013). IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)*, *52*(12), 2177-2186. doi:10.1093/rheumatology/ket315
- Carter, P. H. (2002). Chemokine receptor antagonism as an approach to anti-inflammatory therapy: 'just right' or plain wrong? *Curr Opin Chem Biol*, *6*(4), 510-525.
- Comert Kilic, S., Kilic, N., & Sumbullu, M. A. (2015). Temporomandibular joint osteoarthritis: cone beam computed tomography findings, clinical features, and correlations. *Int J Oral Maxillofac Surg*, *44*(10), 1268-1274. doi:10.1016/j.ijom.2015.06.023
- Darnay, B. G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A., & Aggarwal, B. B. (1998). Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, *273*(32), 20551-20555.

- de Souza, R. F., Lovato da Silva, C. H., Nasser, M., Fedorowicz, Z., & Al-Muharraqi, M. A. (2012). Interventions for the management of temporomandibular joint osteoarthritis. *The Cochrane Library*.
- Deligne, C., Casulli, S., Pigenet, A., Bougault, C., Campillo-Gimenez, L., Nourissat, G., . . . Houard, X. (2015). Differential expression of interleukin-17 and interleukin-22 in inflamed and non-inflamed synovium from osteoarthritis patients. *Osteoarthritis Cartilage*, *23*(11), 1843-1852. doi:10.1016/j.joca.2014.12.007
- Dong, C. (2006). Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat Rev Immunol*, *6*(4), 329-333. doi:10.1038/nri1807
- Elyaman, W., Bradshaw, E. M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., . . . Khoury, S. J. (2009). IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(31), 12885-12890. doi:10.1073/pnas.0812530106
- Emshoff, R., Puffer, P., Rudisch, A., & Gassner, R. (2000). Temporomandibular joint pain: relationship to internal derangement type, osteoarthrosis, and synovial fluid mediator level of tumor necrosis factor-alpha. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *90*(4), 442-449. doi:10.1067/moe.2000.108801
- Forster, R., Davalos-Misslitz, A. C., & Rot, A. (2008). CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*, *8*(5), 362-371. doi:10.1038/nri2297
- Fossiez, F., Banchereau, J., Murray, R., Van Kooten, C., Garrone, P., & Lebecque, S. (1998). Interleukin-17. *Int Rev Immunol*, *16*(5-6), 541-551.
- Fu, K., Ma, X., Zhang, Z., & Chen, W. (1995). Tumor necrosis factor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *J Oral Maxillofac Surg*, *53*(4), 424-426.
- Garcia-Vicuna, R., Gomez-Gaviro, M. V., Dominguez-Luis, M. J., Pec, M. K., Gonzalez-Alvaro, I., Alvaro-Gracia, J. M., & Diaz-Gonzalez, F. (2004). CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, *50*(12), 3866-3877. doi:10.1002/art.20615
- Gerlag, D. M., Haringman, J. J., Smeets, T. J., Zwinderman, A. H., Kraan, M. C., Laud, P. J., . . . Tak, P. P. (2004). Effects of oral prednisolone on biomarkers in synovial tissue and clinical improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, *50*(12), 3783-3791. doi:10.1002/art.20664
- Gravallese, E. M., & Goldring, S. R. (2000). Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, *43*(10), 2143-2151. doi:10.1002/1529-0131(200010)43:10<2143::AID-ANR1>3.0.CO;2-S
- Gravallese, E. M., Manning, C., Tsay, A., Naito, A., Pan, C., Amento, E., & Goldring, S. R. (2000). Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*, *43*(2), 250-258. doi:10.1002/1529-0131(200002)43:2<250::AID-ANR3>3.0.CO;2-P
- Guarda-Nardini, L., Manfredini, D., & Ferronato, G. (2008). Arthrocentesis of the temporomandibular joint: a proposal for a single-needle technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *106*(4), 483-486. doi:10.1016/j.tripleo.2007.12.006

- Gulen, H., Ataoglu, H., Haliloglu, S., & Isik, K. (2009). Proinflammatory cytokines in temporomandibular joint synovial fluid before and after arthrocentesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *107*(5), e1-4.
doi:10.1016/j.tripleo.2009.02.006
- Haringman, J. J., Ludikhuizen, J., & Tak, P. P. (2004). Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Ann Rheum Dis*, *63*(10), 1186-1194.
doi:10.1136/ard.2004.020529
- Haringman, J. J., Smeets, T. J., Reinders-Blankert, P., & Tak, P. P. (2006). Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis. *Ann Rheum Dis*, *65*(3), 294-300.
doi:10.1136/ard.2005.037176
- Hashizume, M., Hayakawa, N., & Mihara, M. (2008). IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology (Oxford)*, *47*(11), 1635-1640.
doi:10.1093/rheumatology/ken363
- Horwood, N. J., Kartsogiannis, V., Quinn, J. M., Romas, E., Martin, T. J., & Gillespie, M. T. (1999). Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, *265*(1), 144-150. doi:10.1006/bbrc.1999.1623
- Hosaka, H., Murakami, K., Goto, K., & Iizuka, T. (1996). Outcome of arthrocentesis for temporomandibular joint with closed lock at 3 years follow-up. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *82*(5), 501-504.
- Jiang, Q., Qiu, Y.-T., Chen, M.-J., Zhang, Z.-Y., & Yang, C. (2013). Synovial TGF-β1 and MMP-3 levels and their correlation with the progression of temporomandibular joint osteoarthritis combined with disc displacement: A preliminary study. *Biomedical reports*, *1*(2), 218-222.
- Kaneyama, K., Segami, N., Nishimura, M., Suzuki, T., & Sato, J. (2002). Importance of proinflammatory cytokines in synovial fluid from 121 joints with temporomandibular disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*, *40*(5), 418-423.
doi:S0266435602002152 [pii]
- Kaneyama, K., Segami, N., Sato, J., Nishimura, M., & Yoshimura, H. (2004). Interleukin-6 family of cytokines as biochemical markers of osseous changes in the temporomandibular joint disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg*, *42*(3), 246-250.
doi:10.1016/S0266-4356(03)00258-4
- Kaneyama, K., Segami, N., Sun, W., Sato, J., & Fujimura, K. (2005). Analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1beta, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, *99*(3), 276-284.
- Katrib, A., Smith, M. D., Ahern, M. J., Slavotinek, J., Stafford, L., Cuello, C., . . . Youssef, P. P. (2003). Reduced chemokine and matrix metalloproteinase expression in patients with rheumatoid arthritis achieving remission. *J Rheumatol*, *30*(1), 10-21.

- Katschke, K. J., Jr., Rottman, J. B., Ruth, J. H., Qin, S., Wu, L., LaRosa, G., . . . Koch, A. E. (2001). Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, *44*(5), 1022-1032. doi:10.1002/1529-0131(200105)44:5<1022::AID-ANR181>3.0.CO;2-N
- Kearns, A. E., Khosla, S., & Kostenuik, P. J. (2008). Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*, *29*(2), 155-192. doi:10.1210/er.2007-0014
- Kellesarian, S. V., Al-Kheraif, A. A., Vohra, F., Ghanem, A., Malmstrom, H., Romanos, G. E., & Javed, F. (2016). Cytokine profile in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders: A systematic review. *Cytokine*, *77*, 98-106. doi:10.1016/j.cyto.2015.11.005
- Khosla, S. (2001). Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, *142*(12), 5050-5055. doi:10.1210/endo.142.12.8536
- Kim, K. W., Kim, H. R., Park, J. Y., Park, J. S., Oh, H. J., Woo, Y. J., . . . Lee, S. H. (2012). Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, *64*(4), 1015-1023. doi:10.1002/art.33446
- Kinne, R. W., Brauer, R., Stuhlmuller, B., Palombo-Kinne, E., & Burmester, G. R. (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, *2*(3), 189-202. doi:10.1186/ar86
- Kong, Y. Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., . . . Penninger, J. M. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, *402*(6759), 304-309. doi:10.1038/46303
- Konig, A., Krenn, V., Toksoy, A., Gerhard, N., & Gillitzer, R. (2000). Mig, GRO alpha and RANTES messenger RNA expression in lining layer, infiltrates and different leucocyte populations of synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Virchows Arch*, *436*(5), 449-458.
- Kopp, S. (1998). The influence of neuropeptides, serotonin, and interleukin 1beta on temporomandibular joint pain and inflammation. *J Oral Maxillofac Surg*, *56*(2), 189-191.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., . . . Suda, T. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, *103*(9), 1345-1352. doi:10.1172/JCI5703
- Krisjane, Z., Urtane, I., Krumina, G., Neimane, L., & Ragovska, I. (2012). The prevalence of TMJ osteoarthritis in asymptomatic patients with dentofacial deformities: a cone-beam CT study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, *41*(6), 690-695.
- Kubota, E., Kubota, T., Matsumoto, J., Shibata, T., & Murakami, K. I. (1998). Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. *J Oral Maxillofac Surg*, *56*(2), 192-198.
- Kwan Tat, S., Padrines, M., Theoleyre, S., Heymann, D., & Fortun, Y. (2004). IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, *15*(1), 49-60.

- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., . . . Boyle, W. J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, *93*(2), 165-176.
- Li, C., Cai, H., Meng, Q., Feng, Y., Guo, H., Fang, W., & Long, X. (2016). IL-1beta mediating high mobility group box protein-1 expression in condylar chondrocyte during temporomandibular joint inflammation. *J Oral Pathol Med*, *45*(7), 539-545. doi:10.1111/jop.12401
- Lim, H. W., Lee, J., Hillsamer, P., & Kim, C. H. (2008). Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol*, *180*(1), 122-129.
- Lim, W. H., Toothman, J., Miller, J. H., Tallents, R. H., Brouxhon, S. M., Olschowka, M. E., & Kyrkanides, S. (2009). IL-1beta inhibits TGFbeta in the temporomandibular joint. *J Dent Res*, *88*(6), 557-562. doi:10.1177/0022034509336823
- Liu, F., & Steinkeler, A. (2013). Epidemiology, diagnosis, and treatment of temporomandibular disorders. *Dent Clin North Am*, *57*(3), 465-479. doi:10.1016/j.cden.2013.04.006
- Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C., & Dayer, J. M. (1998). CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, *391*(6665), 344-345. doi:10.1038/34812
- Long, E., Motwani, R., Reece, D., Pettit, N., Hepworth, J., Wong, P., . . . Seegmiller, R. (2016). The role of TGF-b1 in osteoarthritis of the temporomandibular joint in two genetic mouse models. *Arch Oral Biol*, *67*, 68-73. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.03.004
- Lu, L., Zhang, X., Zhang, M., Zhang, H., Liao, L., Yang, T., . . . Wang, M. (2015). RANTES and SDF-1 Are Keys in Cell-based Therapy of TMJ Osteoarthritis. *J Dent Res*, *94*(11), 1601-1609. doi:10.1177/0022034515604621
- Lum, L., Wong, B. R., Josien, R., Becherer, J. D., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., . . . Blobel, C. P. (1999). Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem*, *274*(19), 13613-13618.
- Luster, A. D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, *338*(7), 436-445. doi:10.1056/NEJM199802123380706
- Mackay, C. R. (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*, *2*(2), 95-101. doi:10.1038/84298
- Marijnissen, R. J., Koenders, M. I., Smeets, R. L., Stappers, M. H., Nickerson-Nutter, C., Joosten, L. A., . . . van den Berg, W. B. (2011). Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation. *Arthritis Rheum*, *63*(10), 2939-2948. doi:10.1002/art.30469
- Matsumoto, R., Ioi, H., Goto, T. K., Hara, A., Nakata, S., Nakasima, A., & Counts, A. L. (2010). Relationship between the unilateral TMJ osteoarthritis/osteoarthrosis, mandibular asymmetry and the EMG activity of the masticatory muscles: a retrospective study. *Journal of oral rehabilitation*, *37*(2), 85-92.

- Milam, S. B. (2005). Pathogenesis of degenerative temporomandibular joint arthritides. *Odontology*, 93(1), 7-15. doi:10.1007/s10266-005-0056-7
- Moncada, G., Cortes, D., Millas, R., & Marholz, C. (2014). Relationship between disk position and degenerative bone changes in temporomandibular joints of young subjects with TMD. An MRI study. *J Clin Pediatr Dent*, 38(3), 269-276.
- Monje-Gil, F., Nitzan, D., & Gonzalez-Garcia, R. (2012). Temporomandibular joint arthrocentesis. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 17(4), e575-581.
- Nanki, T., & Lipsky, P. E. (2000). Lack of correlation between chemokine receptor and T(h)1/T(h)2 cytokine expression by individual memory T cells. *Int Immunol*, 12(12), 1659-1667.
- Nanki, T., Nagasaka, K., Hayashida, K., Saita, Y., & Miyasaka, N. (2001). Chemokines regulate IL-6 and IL-8 production by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 167(9), 5381-5385.
- Nishimura, M., Segami, N., Kaneyama, K., Sato, J., & Fujimura, K. (2004). Comparison of cytokine level in synovial fluid between successful and unsuccessful cases in arthrocentesis of the temporomandibular joint. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62(3), 284-287. doi:Doi 10.1016/J.Joms.2003.08.012
- Nitzan, D. W., Dolwick, M. F., & Martinez, G. A. (1991). Temporomandibular joint arthrocentesis: a simplified treatment for severe, limited mouth opening. *J Oral Maxillofac Surg*, 49(11), 1163-1167; discussion 1168-1170.
- Nitzan, D. W., & Price, A. (2001). The use of arthrocentesis for the treatment of osteoarthritic temporomandibular joints. *J Oral Maxillofac Surg*, 59(10), 1154-1159; discussion 1160. doi:10.1053/joms.2001.26716
- Nitzan, D. W., Samson, B., & Better, H. (1997). Long-term outcome of arthrocentesis for sudden-onset, persistent, severe closed lock of the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*, 55(2), 151-157; discussion 157-158.
- Pinto, L. G., Talbot, J., Peres, R. S., Franca, R. F., Ferreira, S. H., Ryffel, B., . . . Cunha, F. Q. (2015). Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1beta production. *Arthritis Res Ther*, 17, 235. doi:10.1186/s13075-015-0759-2
- Sandler, N. A., Buckley, M. J., Cillo, J. E., & Braun, T. W. (1998). Correlation of inflammatory cytokines with arthroscopic findings in patients with temporomandibular joint internal derangements. *J Oral Maxillofac Surg*, 56(5), 534-543; discussion 543-534.
- Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., . . . Takayanagi, H. (2006). Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, 203(12), 2673-2682. doi:10.1084/jem.20061775
- Schiffman, E., Ohrbach, R., Truelove, E., Look, J., Anderson, G., Goulet, J. P., . . . Orofacial Pain Special Interest Group, I. A. f. t. S. o. P. (2014). Diagnostic Criteria for Temporomandibular Disorders (DC/TMD) for Clinical and Research Applications: recommendations of the International RDC/TMD Consortium Network* and Orofacial Pain Special Interest Group. *J Oral Facial Pain Headache*, 28(1), 6-27. doi:10.11607/jop.1151

- Shafer, D. M., Assael, L., White, L. B., & Rossomando, E. F. (1994). Tumor necrosis factor-alpha as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joints with internal derangements. *J Oral Maxillofac Surg*, 52(8), 786-791; discussion 791-782.
- Stegenga, B. (2001). Osteoarthritis of the temporomandibular joint organ and its relationship to disc displacement. *J Orofac Pain*, 15(3), 193-205.
- Suzuki, T., Segami, N., Kaneyama, K., Nishimura, M., & Nojima, T. (1999). Specific expression of interleukin-1 beta in temporomandibular joints with internal derangement: correlation with clinical findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 88(4), 413-417.
- Szekanecz, Z., & Koch, A. E. (2004). Therapeutic inhibition of leukocyte recruitment in inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol*, 4(4), 423-428.
doi:10.1016/j.coph.2004.03.013
- Takahashi, T., Kondoh, T., Fukuda, M., Yamazaki, Y., Toyosaki, T., & Suzuki, R. (1998). Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85(2), 135-141.
- Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*, 7(4), 292-304.
doi:10.1038/nri2062
- Takayanagi, H. (2009). Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. *Nat Rev Rheumatol*, 5(12), 667-676. doi:10.1038/nrrheum.2009.217
- Takayanagi, H., Iizuka, H., Juji, T., Nakagawa, T., Yamamoto, A., Miyazaki, T., . . . Tanaka, S. (2000). Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43(2), 259-269.
doi:10.1002/1529-0131(200002)43:2<259::AID-ANR4>3.0.CO;2-W
- Takayanagi, H., Ogasawara, K., Hida, S., Chiba, T., Murata, S., Sato, K., . . . Taniguchi, T. (2000). T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*, 408(6812), 600-605.
doi:10.1038/35046102
- Tanaka, A., Kumagai, S., Kawashiri, S., Takatsuka, S., Nakagawa, K., Yamamoto, E., & Matsumoto, N. (2001). Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in synovial fluid of the temporomandibular joint accompanied by anterior disc displacement. *J Oral Pathol Med*, 30(1), 59-64.
- Tanaka, E., Detamore, M. S., & Mercuri, L. G. (2008). Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res*, 87(4), 296-307.
- Tominaga, K., Habu, M., Sakedai, M., Hirota, Y., Takahashi, T., & Fukuda, J. (2004). IL-1 beta, IL-1 receptor antagonist and soluble type II IL-1 receptor in synovial fluid of patients with temporomandibular disorders. *Arch Oral Biol*, 49(6), 493-499.
doi:10.1016/j.archoralbio.2003.12.008
- Tozoglu, S., Al-Belasy, F. A., & Dolwick, M. F. (2011). A review of techniques of lysis and lavage of the TMJ. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 49(4), 302-309.
doi:10.1016/j.bjoms.2010.03.008

- Trifari, S., Kaplan, C. D., Tran, E. H., Crellin, N. K., & Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*, *10*(8), 864-871. doi:10.1038/ni.1770
- Tuncel, U. (2012). Repeated sodium hyaluronate injections following multiple arthrocenteses in the treatment of early stage reducing disc displacement of the temporomandibular joint: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg*, *40*(8), 685-689. doi:10.1016/j.jcms.2011.12.003
- Tvrđy, P., Heinz, P., & Pink, R. (2015). Arthrocentesis of the temporomandibular joint: a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, *159*(1), 31-34. doi:10.5507/bp.2013.026
- Vernal, R., & Garcia-Sanz, J. A. (2008). Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. *Infect Disord Drug Targets*, *8*(4), 207-220.
- Vernal, R., Velasquez, E., Gamonal, J., Garcia-Sanz, J. A., Silva, A., & Sanz, M. (2008). Expression of proinflammatory cytokines in osteoarthritis of the temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*, *53*(10), 910-915.
- Wakita, T., Mogi, M., Kurita, K., Kuzushima, M., & Togari, A. (2006). Increase in RANKL: OPG ratio in synovia of patients with temporomandibular joint disorder. *J Dent Res*, *85*(7), 627-632.
- Wang, C., Kang, S. G., Lee, J., Sun, Z., & Kim, C. H. (2009). The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol*, *2*(2), 173-183. doi:10.1038/mi.2008.84
- Wang, X., Dong, L., Liang, Y., Ni, H., Tang, J., Xu, C., . . . Mao, C. (2015). Performance evaluation of FlowCytomix assays to quantify cytokines in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Clin Exp Med*, *8*(9), 16158-16166.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M., & Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, *24*(6), 677-688. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002
- Weber, C., Weber, K. S., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Horuk, R., & Nelson, P. J. (2001). Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood*, *97*(4), 1144-1146.
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., . . . Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(7), 3597-3602.
- Yoshida, K., Takatsuka, S., Tanaka, A., Hatada, E., Nakamura, H., Nakagawa, K., & Okada, Y. (2005). Aggrecanase analysis of synovial fluid of temporomandibular joint disorders. *Oral Dis*, *11*(5), 299-302.
- Zarb, G. A., & Carlsson, G. E. (1999). Temporomandibular disorders: osteoarthritis. *J Orofac Pain*, *13*(4), 295-306.
- Zhang, L., Li, J. M., Liu, X. G., Ma, D. X., Hu, N. W., Li, Y. G., . . . Wang, G. H. (2011). Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*, *31*(4), 606-614. doi:10.1007/s10875-011-9540-8

10. ANEXOS

ANEXO I

FICHA DE EXAMEN DC/TMD

DC/TMD Examination Form		Date filled out (mm-dd-yyyy)																																																																						
Patient _____ Examiner _____		<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">-</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;">-</td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> <td style="width: 20px;"> </td> </tr> </table>			-			-																																																																
		-			-																																																																			
1a. Location of Pain: Last 30 days (Select all that apply)																																																																								
RIGHT PAIN	LEFT PAIN																																																																							
<input type="radio"/> None <input type="radio"/> Temporalis <input type="radio"/> Other m muscles <input type="radio"/> Non-mast structures <input type="radio"/> Masseter <input type="radio"/> TMJ	<input type="radio"/> None <input type="radio"/> Temporalis <input type="radio"/> Other m muscles <input type="radio"/> Non-mast structures <input type="radio"/> Masseter <input type="radio"/> TMJ																																																																							
1b. Location of Headache: Last 30 days (Select all that apply)																																																																								
<input type="radio"/> None <input type="radio"/> Temporal <input type="radio"/> Other																																																																								
2. Incisal Relationships Reference tooth <input type="radio"/> FDI #11 <input type="radio"/> FDI #21 <input type="radio"/> Other																																																																								
Horizontal Incisal Overjet <input type="radio"/> If negative <table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm	Vertical Incisal Overlap <input type="radio"/> If negative <table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm	Midline Deviation Right Left N/A <table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm																																																																						
3. Opening Pattern (Supplemental; Select all that apply)																																																																								
<input type="radio"/> Straight <input type="radio"/> Corrected deviation <input type="radio"/> Uncorrected Deviation <input type="radio"/> Right <input type="radio"/> Left																																																																								
4. Opening Movements																																																																								
A. Pain Free Opening																																																																								
<table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm	RIGHT SIDE	LEFT SIDE																																																																						
	Pain Familiar Pain Familiar Headache	Pain Familiar Pain Familiar Headache																																																																						
B. Maximum Unassisted Opening	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
<table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm																																																																								
C. Maximum Assisted Opening	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
<table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm																																																																								
D. Terminated? <input checked="" type="radio"/> N <input type="radio"/> Y																																																																								
5. Lateral and Protrusive Movements																																																																								
	RIGHT SIDE	LEFT SIDE																																																																						
	Pain Familiar Pain Familiar Headache	Pain Familiar Pain Familiar Headache																																																																						
A. Right Lateral	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
<table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm																																																																								
B. Left Lateral	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
<table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm																																																																								
C. Protrusion	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr><td>Temporalis</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Masseter</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>TMJ</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Other M Musc</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> <tr><td>Non-mast</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td><td>N</td><td>Y</td></tr> </table>	Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y	Masseter	N	Y	N	Y	N	Y	TMJ	N	Y	N	Y	N	Y	Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y	Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Temporalis	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Masseter	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
TMJ	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Other M Musc	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
Non-mast	N	Y	N	Y	N	Y																																																																		
<table border="1" style="width: 40px; height: 20px; display: inline-table;"></table> mm																																																																								
<input type="radio"/> If negative																																																																								

6. TMJ Noises During Open & Close Movements														
RIGHT TMJ						LEFT TMJ								
		Examiner		Patient	Pain w/ Click	Familiar Pain			Examiner		Patient	Pain w/ Click	Familiar Pain	
		Open	Close						Open	Close				
Click		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input checked="" type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input checked="" type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y
Crepitus		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y
7. TMJ Noises During Lateral & Protrusive Movements														
RIGHT TMJ						LEFT TMJ								
		Examiner	Patient	Pain w/ Click	Familiar Pain			Examiner	Patient	Pain w/ Click	Familiar Pain			
Click		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input checked="" type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input checked="" type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	
Crepitus		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	
8. Joint Locking														
RIGHT TMJ						LEFT TMJ								
		Reduction						Reduction						
		Locking	Patient	Examiner				Locking	Patient	Examiner				
While Opening		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Wide Open Position		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
9. Muscle & TMJ Pain with Palpation														
RIGHT SIDE						LEFT SIDE								
		Pain	Familiar Pain	Familiar Headache	Referred Pain			Pain	Familiar Pain	Familiar Headache	Referred Pain			
(1 kg)						(1 kg)								
Temporalis (posterior)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Temporalis (middle)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Temporalis (anterior)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Masseter (origin)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Masseter (body)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Masseter (insertion)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
		Pain	Familiar Pain	Referred Pain				Pain	Familiar Pain	Referred Pain				
TMJ						TMJ								
Lateral pole (0.5 kg)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	Lateral pole (0.5 kg)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Around lateral pole (1 kg)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	Around lateral pole (1 kg)		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
10. Supplemental Muscle Pain with Palpation														
RIGHT SIDE						LEFT SIDE								
		Pain	Familiar Pain	Referred Pain				Pain	Familiar Pain	Referred Pain				
(0.5 kg)						(0.5 kg)								
Posterior mandibular region		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	Posterior mandibular region		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Submandibular region		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	Submandibular region		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Lateral pterygoid area		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	Lateral pterygoid area		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
Temporalis tendon		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	Temporalis tendon		<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y	<input type="radio"/> N	<input type="radio"/> Y			
11. Diagnoses														
Pain Disorders			Right TMJ Disorders				Left TMJ Disorders							
<input type="radio"/> None			<input type="radio"/> None				<input type="radio"/> None							
<input type="radio"/> Myalgia			<input type="radio"/> Disc displacement (select one)				<input type="radio"/> Disc displacement (select one)							
<input type="radio"/> Myofascial pain with referral			<input type="radio"/> ...with reduction				<input type="radio"/> ...with reduction							
<input type="radio"/> Right Arthralgia			<input type="radio"/> ...with reduction, with intermittent locking				<input type="radio"/> ...with reduction, with intermittent locking							
<input type="radio"/> Left Arthralgia			<input type="radio"/> ... without reduction, with limited opening				<input type="radio"/> ... without reduction, with limited opening							
<input type="radio"/> Headache attributed to TMD			<input type="radio"/> ... without reduction, without limited opening				<input type="radio"/> ... without reduction, without limited opening							
			<input type="radio"/> Degenerative joint disease				<input type="radio"/> Degenerative joint disease							
			<input type="radio"/> Dislocation				<input type="radio"/> Dislocation							
12. Comments														
Copyright International RDC/TMD Consortium Network. Available at http://www.rdc-tmdinternational.org Version 12May2013. No permission required to reproduce, translate, display, or distribute.														

ANEXO II

CONSENTIMIENTO INFORMADO



FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITÉ ÉTICO
CIENTIFICO

Ed-25 de octubre 2016

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME 2016/16

1. **Acta de Aprobación de Proyecto titulado "Estudio clínico y análisis in vitro de la resorción ósea inducida en articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis", visado por la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología (DIFO).**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Sra. Paulina Navarrete
Secretaria CEC

Dr. Marco Cornejo
Vice Pdte. CEC

Dra. Weronika Weil
Miembro permanente CEC

Dr. Mauricio Baeza
Miembro permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Alterno CEC

3. **Fecha de Aprobación: 24-10-2016**
4. **Título completo del proyecto: "Estudio clínico y análisis in vitro de la resorción ósea inducida en articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis".**
5. **Investigador responsable:** Dr. Walter Díaz.
6. **Institución Patrocinante:** Departamento de Prótesis Facultad de Odontología de la Universidad de Chile
7. **Documentación Revisada:**
 - Protocolo del Proyecto de Investigación
 - Consentimiento Informado (CI) aprobado por CEC, con timbre y fecha de edición correspondiente, debidamente fechado y firmado por todos los involucrados.

8.- Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizarán las modificaciones en relación a los siguientes aspectos éticos:

- Aspectos formales y de redacción del texto que los hacen más comprensible.
- Se realizaron los cambios y sugerencias propuestas por CEC en relación a los riesgos y beneficios.
- Se explicitan claramente los aspectos relacionados con la confidencialidad de la información de los participantes.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado “Estudio clínico y análisis in vitro de la resorción ósea inducida en articulaciones temporomandibulares afectadas de osteoartritis”.



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



C/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.

Walter Diaz-Gustavo Monasterio

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ARTROCENTESIS

SEPTIEMBRE 2016 – VERSIÓN 3

Este formulario de consentimiento informado se dirige a hombres y mujeres que se les invita a participar en la Investigación “Estudio Clínico y análisis in vitro de la resorción ósea inducida en articulaciones temporomandibulares afectadas de Osteoartritis.”

Investigador Principal: Walter Díaz

Organización: Facultad de Odontología de la Universidad de Chile

Nombre de la Propuesta: Estudio Clínico y análisis in vitro de la resorción ósea inducida en articulaciones temporomandibulares afectadas de Osteoartritis

Este Documento de Consentimiento Informado tiene dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio)
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Se le dará una copia del Documento completo de Consentimiento Informado

PARTE I: Información

Introducción

Soy Gustavo Monasterio, trabajo para el Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estamos investigando sobre la Osteoartritis de la Articulación Temporomandibular, que es muy común en este país y el mundo, sobre todo en mujeres. Le voy a dar información e invitarle a participar de esta investigación. No tiene que decidir hoy si participar o no en esta investigación. Antes de decidirse, puede hablar con alguien que se sienta cómodo sobre la investigación.

Puede que haya algunas palabras que no entienda. Por favor, me para según le informo para darme tiempo a explicarle. Si tiene preguntas más tarde, puede preguntarme a mi, al doctor que investiga o a miembros del equipo.

Propósito

La osteoartritis (OA) de la articulación temporomandibular (ATM) es una enfermedad degenerativa caracterizada por inflamación de la membrana articular, dolor crónico y destrucción cartilaginosa y del hueso bajo el cartílago. Es una enfermedad bastante común y silenciosa en el mundo, dado que los pacientes que la presentan habitualmente no consultan para tratarla cuando el dolor no es muy intenso y viven con ella, mientras sigue avanzando.

Durante esta enfermedad un sinnúmero de sustancias presentes en el fluido dentro de la articulación son los responsables de mantener la inflamación y la destrucción del cartílago y hueso. El dilucidar la función y acción de tales



elementos para esclarecer el funcionamiento de esta enfermedad es la razón por la que hacemos este estudio.

El mismo estudio incluye una intervención quirúrgica ambulatoria denominada “Artrocentesis”, la cual consiste en un lavado articular, bajo anestesia local, mediante dos punciones al interior de la articulación que permite bajar la carga inflamatoria de la misma, pudiendo ser de ayuda para la recuperación de un estado de salud articular. En este estudio, además de ser una herramienta terapéutica será una forma de obtener muestras, a partir del fluido que saldrá de tal lavado, el cual será analizado posteriormente a nivel de laboratorio.

Tipo de intervención de Investigación

Esta investigación incluirá una o más punciones en su articulación seleccionada, así como 2 visitas previas, una para diagnóstico, donde se aplicará un cuestionario y se hará un examen físico en el sector de las articulaciones afectadas, y otra para el examen imagenológico (Resonancia Magnética o Cone-Beam según corresponda), y visita posterior para control y seguimiento.

Las intervenciones asociadas al diagnóstico no representan ningún riesgo, pues sólo consistirán en un examen básico de palpación y movimientos de la articulación que permitirán diagnosticar la enfermedad. El beneficio será obtener un diagnóstico mediante un protocolo estandarizado a nivel mundial.

Los riesgos y beneficios de la intervención denominada Artrocentesis serán detallados más adelante en este documento.



Selección de participantes

Estamos invitando a todos los adultos que relaten haber sentido síntomas como ruido a en alguna articulación del tipo crépito (“arenoso”) y dolor articular continuo (crónico), ambas juntas. Además a aquellos que presenten ruido articular sin dolor, como control.

Participación Voluntaria

Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede elegir participar o no hacerlo. Usted puede cambiar de idea más tarde y dejar de participar aun cuando haya aceptado antes.

Procedimientos y Protocolo

La artrocentesis se realiza en el área de la articulación enferma, se inyecta anestesia local y mediante una aguja se extrae el líquido acumulado en la articulación.

Las pautas dicen que la muestra debe tomarse usando anestesia local que significa que se le dará una inyección próxima al área donde se va a tomar la muestra. Esto dormirá el área de forma que no sienta ningún dolor cuando extraigamos la muestra. Luego extraeremos fluido articular de su articulación usando una aguja de jeringa. Se realizarán dos punciones, una para introducir

suero fisiológico estéril y la segunda para que el fluido pueda salir y realizar así el lavado. Cada vez sacaremos la cantidad de líquido equivalente a una cucharadita de té.

Los procedimientos serán realizados por Cirujanos Máxilo Faciales co-investigadores de este proyecto.

Descripción del Proceso

Durante la investigación hará tres visitas.

- En la primera visita a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FOUCH), se le realizará una ficha clínica que incluirá algunos datos de salud general y un examen físico específico para el diagnóstico de la enfermedad en estudio. En caso de tener alguno de los diagnósticos que son requisitos para el estudio (Osteoartritis de la ATM o Desplazamiento Discal con Reducción), se le hará lectura del presente consentimiento, se le solicitará firmarlo si está de acuerdo y se le citará para la segunda visita.
- En la segunda visita, en dependencias de la FOUCH, se le realizará el lavado articular y se le sustraerá una pequeña cantidad de líquido articular con una jeringa, equivalente a una cucharilla de té. Se analizará en este líquido la presencia de sustancias que influyen el proceso inflamatorio y destructivo de la articulación temporomandibular. También le preguntaremos sobre su salud general.
- En la tercera visita, en dependencias de la FOUCH, que será una semana más tarde, le preguntaremos de nuevo acerca de su salud y controlaremos sus síntomas posteriores a la intervención.



Duración

La investigación le tomará 3 semanas (no necesariamente seguidas). Durante ese tiempo, será necesario que asista a las visitas por lo menos 3 veces, en un total promedio de 2 horas por cada cita, siendo la segunda la que tiene la posibilidad de extenderse más.

Es posible que en caso de alguna molestia o complicación post-operatoria, sea necesario considerar más sesiones. El tiempo máximo estimado será el necesario para que los voluntarios participantes queden en condiciones estables de salud.

Efectos secundarios, riesgos y/o molestias

Dolor o molestia en el sitio de la punción. Puede además presentarse inflamación de la articulación, la cual puede estar acompañada de edema preauricular (aumento de volumen delante de la oreja), enrojecimiento, dolor y restricción en la apertura bucal. Todos estos síntomas, en el curso normal de la intervención debiesen ir disminuyendo a medida que transcurren los días, de forma normal.

A pesar del uso de una adecuada técnica y la habilidad o experiencia del cirujano pueden presentarse complicaciones propias del procedimiento como en todos los procedimientos invasivos que se realicen o derivadas de alguna enfermedad que

padezca el paciente como diabetes, hipertensión, cardiopatías, obesidad, anemia. Estas complicaciones generalmente se resuelven con tratamiento médico, como antibióticos, sueros y reposo.

Frente a cualquier complicación o accidente operatorio, el cirujano a cargo dispondrá de todos los medios para solucionar el evento y otorgar las medidas de mitigación frente a posibles secuelas.

Los tratamientos pertinentes serán realizados en dependencias de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile por especialistas en Cirugía Máxilo Facial y Trastornos Temporomandibulares, investigadores de este estudio.

Complicaciones graves menos frecuentes

Si bien la tasa de éxito de la artrocentesis mencionada en la literatura va de un 70% a 90%, se ha asociado con algunas complicaciones las cuales dependen de la forma interna de la articulación, su relación con estructuras vecinas y el método usado para introducir las agujas. La frecuencia de estas complicaciones relatada en la literatura va de un 2% a 10%, siendo muy baja la posibilidad de sufrir alguna. Estas incluyen lesión del cartílago cercano a la articulación o Infección en la articulación, daño al nervio facial, hematoma preauricular, daño a la arteria superficial temporal, desarrollo de fistula arteriovenosa, sangramiento intra-articular, perforación intracraneal, hematoma extradural, ruptura de parte de la aguja dentro de la articulación, introducción insuficiente de la aguja, fuga de fluido de lavado fuera del espacio articular, daño a la superficie de la ATM, reacción alérgica a la anestesia o drogas administradas posterior al procedimiento.

Si alguna complicación de estas se presentara, el equipo de especialistas pertenecientes a esta investigación pondrá a su disposición todos sus recursos técnicos y humanos para procurar solucionarla.

Beneficios

Si usted participa en esta investigación, tendrá los siguientes beneficios:

- Diagnóstico de patología articular mediante examen clínico e imagenológico (Resonancia Magnética o Cone Beam según corresponda), junto con tratamiento mediante Artrocentesis en el caso que sea necesario totalmente sin costo para usted.
- Alta probabilidad de desaparición de la inflamación y alivio del dolor, luego de realizada la Artrocentesis.
- Seguimiento por un periodo de un año de síntomas de mejoría o dificultades post-tratamiento.

Puede que no haya beneficio para la sociedad en el presente estado de la investigación, pero es probable que generaciones futuras se beneficien.

Confidencialidad

Con esta investigación, se realiza algo fuera de lo ordinario en su comunidad. Nosotros no compartiremos la identidad de aquellos que participen en la



investigación. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. La información acerca de usted que se recogerá durante la investigación será puesta fuera de alcance y nadie sino los investigadores tendrán acceso a verla. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en vez de su nombre. Solo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá la información encerrada en cabina con llave.

Compartición de Resultados

El conocimiento que obtengamos por realizar esta investigación se compartirá con usted antes de que se haga disponible al público. No se compartirá información confidencial. Habrá pequeños encuentros en la comunidad y estos se anunciarán. Después de estos encuentros, se publicaran los resultados para que otras personas interesadas puedan aprender de nuestra investigación.



Derecho a negarse o retirarse

Usted no tiene por qué tomar parte en esta investigación si no desea hacerlo. Puede dejar de participar en la investigación en cualquier momento que quiera. Es su elección y todos sus derechos serán respetados.

Contacto

Si tiene cualquier pregunta puede hacerlas ahora o más tarde, incluso después de haberse iniciado el estudio. Si desea hacer preguntas más tarde, puede contactar cualquiera de las siguientes personas:

Walter Diaz, walterdiazg@gmail.com / +56993384016
Gustavo Monasterio, gmonasterio@ug.uchile.cl

PARTE II: Formulario de Consentimiento

He sido invitado a participar en la investigación de análisis sustancias presentes en la articulación temporomandibular que influyen en la inflamación y destrucción ósea de la misma. Entiendo que recibiré una o más inyecciones en mi(s) articulación(es) temporomandibular(es) y he de realizar dos visitas previas de diagnóstico y una posterior de control y seguimiento.

He sido informado de que los riesgos son mínimos y pueden incluir: Dolor o molestia en el sitio de la punción, complicaciones propias del procedimiento como en todos los procedimientos invasivos que se realicen o derivadas de alguna enfermedad que padezca el paciente como diabetes, hipertensión, cardiopatías obesidad, anemia; y en casos más graves pero mucho menos frecuente: Lesión del cartílago cercano a la articulación y/o Infección en la articulación.

Sé que puede que no haya beneficios para mi persona en caso de que el procedimiento de Artrocentesis no sea tratamiento suficiente, y que no se me recompensará más allá de los gastos de diagnóstico, imagenología (Resonancia Magnética o Cone Beam según corresponda) y valores de la cirugía de Artrocentesis. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado usando el nombre y la dirección que se me ha dado de esa persona.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado.

Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Nombre del Participante _____

Firma del Participante _____

Fecha _____

Día/mes/año _____



Si es Analfabeto

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del testigo _____ Y Huella dactilar del participante

Firma del testigo _____

Fecha _____

Día/mes/año

He leído con exactitud o he sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento informado para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmo que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Nombre del Investigador _____

Firma del Investigador _____

Fecha _____

Día/mes/año

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento

Informado _____ (iniciales del investigador/asistente)



ANEXO III

CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°72

Santiago, 25 de Enero de 2016.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación PRI-ODO 2016 titulado “**Análisis *in vitro* de la resorción ósea inducida en articulaciones temporo-mandibulares afectadas de osteoartritis**”. El Investigador Responsable de este proyecto es el Prof. Walter Díaz, Académico del Departamento de Prótesis, Facultad Odontología, Universidad de Chile.

Todos los ensayos a realizar que involucran procesamiento y desecho de muestras biológicas se realizarán en el laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología, cuyo personal que colaborará se encuentra debidamente entrenado en esta área. Además, en el laboratorio ellos estarán bajo la supervisión del Dr. Vernal.

El CIB certifica que la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades tanto para el manejo del material biológico como la eliminación de éste a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Prof. Díaz para ser presentado en la Dirección de Investigación de la Facultad mencionada.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta