



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS.**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON FIBRINA RICA EN  
PLAQUETAS Y LEUCOCITOS DE ACUERDO CON LA MEDICIÓN DE  
BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN Y REGENERACIÓN TISULAR EN  
PACIENTES CON OSTEOARTRITIS DE LA ARTICULACIÓN  
TEMPOROMANDIBULAR.**

**ANGELA CATHALINA ORREGO HERRERA**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANA-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Aler Fuentes del Campo.**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Rolando Vernal Astudillo.**

**ASESOR**

**Dr. Hugo Santander Navarro.**

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 20/11.  
Santiago-Chile  
2024**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS.**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON FIBRINA RICA EN  
PLAQUETAS Y LEUCOCITOS DE ACUERDO CON LA MEDICIÓN DE  
BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN Y REGENERACIÓN TISULAR EN  
PACIENTES CON OSTEOARTRITIS DE LA ARTICULACIÓN  
TEMPOROMANDIBULAR.**

**ANGELA CATHALINA ORREGO HERRERA**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANA-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Aler Fuentes del Campo.**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Rolando Vernal Astudillo.**

**ASESOR**

**Dr. Hugo Santander Navarro.**

**Adscrito a Proyecto PRI-ODO 20/11.  
Santiago-Chile  
2024**

*A Margarita y Ernesto, por enseñarme lo esencial de la vida.*

*A mis padres Mónica y Paul por su apoyo incondicional  
y acompañarme en cada uno de mis sueños.*

*A mis hermanos Diego y Paul por su paciencia y cariño.*

*A Dios por cumplir lo imposible.*

**AGRADECIMIENTOS:**

A mi familia por acompañarme en todo el proceso, por darme ánimo y amor siempre.

A mis amigas Vane, Ruth, Tamy, Pía, Vale, Javi, Gaby por su apoyo y cariño incluso a los miles de kilómetros de distancia.

A mis compañeros de Clínica Valentina, Benjamín y Nicolás, por su apoyo, por darme confianza y seguridad en cada paso del camino, por sus abrazos, por celebrar juntos y entregarme sus hombros cuando lo necesité.

Al Equipo de Básquetbol FOUCH, por acogerme desde el primer año. Por tantas alegrías y momentos de resiliencia.

A mis amigas y amigos de la Universidad, siempre he pensado que los amigos son la familia que uno puede escoger, agradecida de su apoyo. La Universidad no es fácil y sin duda tener amigos ayuda a que el proceso sea más ameno.

A mi tutor Dr. Aler Fuentes por su paciencia, por ser un gran guía. Por escucharme y buscar soluciones frente a las dificultades que se presentaban. Sin su ayuda no estaría finalizando este momento.

A mi tutor Asociado el Dr. Vernal, por contribuir en mi formación, por sus enseñanzas y todo el conocimiento entregado. Por abrir las puertas del laboratorio desde el primer momento hace varios años atrás. Por despertar en los estudiantes el espíritu de la investigación.

A la Dra. Samanta Melgar, por su ayuda en el laboratorio, por darse el tiempo y la dedicación para enseñar y resolver cada una de mis dudas.

A Michelle por sus conocimientos entregados, por el tiempo dedicado para que este trabajo fuera posible.

Al Dr. Santander y Dr. Miralles, por ser parte del proceso, por su tiempo y sus conocimientos transmitidos.

Al laboratorio de Biología Periodontal por acogerme, por enseñarme, por la disposición entregada y por permitirme formar parte en experimentos de diversos estudios y acercarme a la investigación.

Al Dr. Milla, Dra. Adorno, Dra. Florás y Dra. Fernández por contribuir en mi formación, por la humanidad en su docencia, por apoyarme cada vez que quise presentar en un congreso y por acogerme como su ayudante.

A la Dra. Claudia Lefimil, por su disposición y amabilidad, por ayudar a que fuera posible el desarrollo de parte importante de este trabajo de investigación.

A la Clínica de Cuidados Especiales por demostrar y formar la humanidad de la Atención Odontológica.

Al Proyecto PRI-ODO 20/11 al que se encuentra adscrito el presente trabajo de investigación y a todas aquellas personas que estuvieron involucrados con su desarrollo.

A todos aquellos que formaron parte importante durante el Pregrado en la Universidad de Chile. Docentes, Funcionarios, Compañeras y Compañeros, a todas y todos muchas gracias.

## ÍNDICE

1	RESUMEN: .....	8
2	INTRODUCCIÓN-MARCO TEÓRICO. ....	9
	2.1 Trastornos temporomandibulares .....	9
	2.2 Osteoartritis de la articulación temporomandibular .....	10
	2.3 Tratamiento de la osteoartritis de la articulación temporomandibular: ..	12
	2.4 Biomarcadores moleculares presentes en el líquido sinovial de pacientes con OA de la ATM.....	15
3	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	19
	3.1 HIPÓTESIS: .....	19
	3.2 OBJETIVO GENERAL: .....	19
	3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	19
4	MATERIALES Y MÉTODOS. ....	20
	4.1. Diseño del estudio: .....	20
	4.2 Selección de la muestra de pacientes: .....	20
	4.2.1 Diagnóstico: .....	20
	4.2.2 Criterios de inclusión:.....	20
	4.2.3 Criterios de exclusión: .....	21
	4.3 Obtención de muestra de líquido sinovial: .....	21
	4.4 Obtención de fibrina rica en plaquetas y leucocitos: .....	21
	4.5 Inyección intra-articular:.....	22
	4.6 Procesamiento inicial: .....	22
	4.6.1 Procesamiento FRP-L :.....	23
	4.6.2 Procesamiento líquido sinovial:.....	23
	4.7 Caracterización celular de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (FRP-L) .....	24
	4.8 Extracción de ARN total y transcripción reversa: .....	25
	4.9 Expresión de Factores de crecimiento FRP-L mediante RT-PCR:.....	26
	4.10 Expresión de los factores de transcripción y citoquinas: .....	27
	4.11 Evaluación de la respuesta inflamatoria y regenerativa del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos:.....	29
	4.12 Análisis estadístico:.....	29

5	RESULTADOS:	31
	5.1 Caracterización demográfica de los pacientes:	31
	5.2 Cuantificación celular FRP-L mediante citometría de flujo:	31
	5.2.1 Estrategia de gateo:	31
	5.2.2 Expresión celular:	32
	5.3 Expresión de Factores de Crecimiento de FRP-L (T0) mediante RT-qPCR en tiempo real:	35
	5.4 Cuantificación de biomarcadores moleculares de Líquido sinovial (T0 y T1) mediante RT-qPCR:	35
	5.4.1 Expresión relativa de citoquinas:	36
	5.4.2 Expresión relativa del Factor de Crecimiento TGF- $\beta$ 1:	37
	5.4.3 Expresión relativa de MMP-9 y TIMP-1:	37
	5.4.4 Expresión relativa de RANKL y OPG:	38
6	DISCUSIÓN:	40
7	CONCLUSIONES:	54
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	55
9	ANEXOS:	66
	Anexo 1: Aprobación del Comité de Ética de la Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte:	66
	Anexo 2: Consentimiento informado:	67
	Anexo 3: Expresión relativa por paciente de citoquinas, TGF- $\beta$ 1, MMP-9, TIMP-1, RANKL y OPG obtenida mediante RT-qPCR de líquido sinovial en pacientes con OA:	70



## 1 RESUMEN:

**Introducción:** La osteoartritis (OA) corresponde a una enfermedad degenerativa, multifactorial y considerada como un trastorno poco inflamatorio con respecto a otras patologías articulares sistémicas. Es una enfermedad articular que afecta a la articulación temporomandibular (ATM) generando dolor, deterioro del funcionamiento mandibular y es más frecuente en mujeres. **Objetivo:** Determinar mediante la cuantificación de los biomarcadores de inflamación, regeneración y destrucción tisular la eficacia del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos en pacientes con osteoartritis de la articulación temporomandibular.

**Materiales y métodos:** Se realizó un estudio clínico piloto longitudinal prospectivo. Se reclutaron 5 pacientes, mayores de edad, que fueron diagnosticados con OA según el protocolo de Criterios Diagnósticos para Trastornos Temporomandibulares (DC/TMD) y que cumplieran con los criterios de inclusión del estudio. Se tomaron muestras de Fibrina Rica en Plaquetas y Leucocitos (FRP-L) de cada paciente las cuales fueron procesadas mediante Citometría de Flujo y RT-qPCR. También se obtuvieron muestras de líquido sinovial en tiempo inicial (T0) y 6 meses después de terminado el tratamiento (T1), las cuales fueron procesadas mediante RT-qPCR. Los resultados fueron expresados como expresión relativa. La distribución de datos fue realizada con la prueba de Shapiro-Wilk. El grado de cambio entre T0 y T1 se utilizó prueba de Wilcoxon y un valor p menor o igual a 0,05 se consideró estadísticamente significativo. **Resultados:** Las 5 pacientes corresponden a mujeres (promedio de edad  $46,2 \pm 21,4$ ). La citometría de flujo mediante el marcaje extracelular con anticuerpos monoclonales en las células de la FRP-L permitió la identificación de Plaquetas, Células Dendríticas, Linfocitos T CD4+, Linfocitos B. No existieron diferencias estadísticamente significativas en el grado de cambio de la expresión relativa de los biomarcadores del líquido sinovial en T0 y T1 de interleuquinas (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17), TGF- $\beta$ 1, TIMP-1, MMP-9, OPG y RANKL.

**Conclusiones:** El tratamiento propuesto no mostró eficacia a nivel de biomarcadores moleculares de inflamación, regeneración y destrucción tisular entre T0 y T1.

## **2 INTRODUCCIÓN-MARCO TEÓRICO.**

### **2.1 Trastornos temporomandibulares**

Los trastornos temporomandibulares (TTM) corresponden a un grupo de patologías generadas por alteraciones estructurales y/o funcionales de los músculos masticatorios y la articulación temporomandibular (ATM) (Wu y cols., 2021). Los signos y síntomas frecuentes de los TTM son dolor, ruido articular, rango de movimiento limitado, función de apertura y cierre mandibular deteriorado, desviación mandibular o bloqueo en apertura (Zotti y cols., 2019; Monasterio y cols., 2018). Además, se asocia con erosión ósea y aplanamiento del cóndilo mandibular y de la eminencia articular del hueso temporal, perforación del disco articular, dolor a la palpación de la articulación, hipomovilidad mandibular y dificultad en la masticación (Aragón y cols., 2005; Murphy y cols., 2013).

Su etiología es multifactorial, sin embargo, dentro de los factores que influyen se encuentran las causas físicas y psicológicas (Tik y cols., 2021). La maloclusión producto de pérdida dentaria posterior que genera una sobrecarga articular y los hábitos parafuncionales como: dermatofagia, onicofagia, interposición de objetos, entre otros, influyen en la complejidad de los TTM (van der Meulen y cols., 2006; Winocur-Arias y cols., 2022). La complejidad también aumenta cuando el componente psicológico afecta de manera relevante al paciente. Con frecuencia provocan síntomas de dolor muscular, articular y periarticular. Estos trastornos corresponden a la principal causa de dolor orofacial de origen no odontogénico (Gil y cols., 2018), por lo tanto, es importante el estudio de tratamientos eficaces para los TTM.

A nivel de la población general se menciona que los TTM afectan aproximadamente de un 5 a 15% de los adultos y los síntomas se manifiestan en un 50% de los adultos. Según la evidencia existente, los casos de TTM han ido aumentando en la población en los últimos años (Tik y cols., 2021). Estos trastornos son más frecuentes en mujeres y mayoritariamente se producen entre los 20 y 40 años (Sandoval y cols., 2015; Wu y cols., 2021). Las mujeres padecen con frecuencia dolor crónico, con mayor intensidad y duración (Sandoval y cols., 2015). Producto de estas patologías los pacientes que las padecen se ven afectados psicológica y

económicamente produciendo un deterioro en su calidad de vida (Gil y cols., 2018). El estrés, trastornos de ansiedad y depresión son predisponentes en la perpetuación de síntomas severos de TTM (Dworkin, 1994).

## **2.2 Osteoartritis de la articulación temporomandibular**

La osteoartritis (OA) de la ATM es la enfermedad degenerativa más frecuente y corresponde a uno de los TTM más comunes (De Grandmont, 2010).

La OA corresponde a una enfermedad crónica y degenerativa, considerado como poco inflamatoria en comparación con otras enfermedades articulares como la Artritis Reumatoide o Lupus (Derwich y cols., 2021; Monasterio y cols., 2018), cuya etiología es multifactorial y donde intervienen factores sistémicos y locales (Blanco y cols., 2004; Peña y Fernández, 2007; De Grandmont, 2010). Sin embargo, la sobrecarga de la articulación se considera fundamental para el desarrollo de la patología (De Grandmont, 2010). Es de origen no inflamatorio (Blanco y cols., 2004; De Grandmont, 2010), se caracteriza por un patrón reaccional de la articulación producto de la sobrecarga de esta. Provoca alteraciones degenerativas de los huesos, engrosamiento y remodelación ósea, deterioro y abrasión del cartílago articular y de los tejidos de soporte. Este patrón degenerativo puede provocar erosión ósea, esclerosis y alteraciones como osteofitos y aplanamiento de la superficie del cóndilo, observables en los exámenes imagenológicos. Por lo tanto, el diagnóstico se establece por criterios clínicos e imagenológicos (Peña y Fernández, 2007). Estos cambios son frecuentes con la edad, afectan principalmente a mujeres y a menudo no presentan síntomas. Sin embargo, los cambios inflamatorios como consecuencia de la lesión tisular en la articulación influyen en la aparición de sintomatología dolorosa. También puede provocar una disminución de la función articular y en consecuencia disminuye la dinámica mandibular (De Grandmont, 2010).

El diagnóstico de OA de la ATM se realiza mediante los Criterios de diagnósticos para los trastornos temporomandibulares (DC/TMD)(Schiffman y cols., 2014). Este protocolo permite realizar un examen sistematizado que ayuda en la detección de signos y síntomas, permitiendo una confirmación diagnóstica de la patología correspondiente. El DC/TMD es la herramienta más aceptada y estandarizada para

la evaluación y clasificación de los TTM, destacando que tienen un componente estructural (Eje I) y psicosocial (Eje II). Se encuentra compuesto de dos ejes de evaluación, el eje I corresponde al protocolo para realizar el examen físico determinando el diagnóstico basado en la articulación, la musculatura y estructuras anexas, mientras que el eje II permite evaluar el dolor, estado psicológico y el funcionamiento psicosocial producido por la patología en el paciente (Schiffman y cols., 2014; Tik y cols., 2021).

Aunque el DC/TMD entrega las pruebas básicas para el diagnóstico del dolor de los músculos masticatorios y de la ATM, se pueden producir falsos positivos y falsos negativos. Se pueden realizar otras pruebas complementarias que pueden ayudar en el diagnóstico como prueba de *end-feel*, pruebas estáticas y dinámicas (Schiffman y cols., 2014).

En el caso de los exámenes complementarios de imagenología, se consideran un elemento útil en el diagnóstico. La resonancia magnética (MRI) permite evaluar el estado de las estructuras óseas y no óseas como la musculatura y el tejido blando, principalmente se ocupa para evaluar lo último mencionado, que corresponde a una ventaja en comparación con otros exámenes (Tik y cols., 2021). Las radiografías simples como la ortopantomografía también son utilizadas pero su resultado es limitado, sirven solamente para diagnosticar algunos TTM, no son aptas para realizar un diagnóstico de osteoartritis.

La Tomografía Computarizada de haz cónico (CBCT) permite evaluar con más detalle la estructura ósea de la ATM, por ejemplo, en caso de anquilosis, neoplasias óseas benignas o crecimiento excesivo.

En el caso de la OA se considera que el CBCT tiene ventajas para comprobar el diagnóstico, además de su relación costo-beneficio, presenta una dosis de radiación relativamente baja en comparación a otros exámenes imagenológicos y presenta alta resolución para evaluar los tejidos duros. Es por estos motivos que se ha considerado un examen complementario en el diagnóstico de OA dentro del DC/TMD (Peck y cols., 2014).

### **2.3 Tratamiento de la osteoartritis de la articulación temporomandibular:**

Existen tres objetivos principales para el tratamiento de la OA de la ATM, la reducción del dolor de la articulación, el restablecimiento de los movimientos funcionales normales y el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes (Al-Moraissi y cols., 2019).

Existen distintos métodos de tratamientos, ninguno de ellos es más eficaz, sin embargo, el enfoque procedimental es en orden progresivo. Entre los métodos de tratamiento conservadores y no invasivos se incluyen la fisioterapia, férulas oclusales y farmacoterapia. Los procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos incluyen inyecciones intraarticulares, artrocentesis sola o la combinación de ambas. Finalmente, los procedimientos quirúrgicos invasivos consideran la artroscopía y cirugías articulares abiertas (discectomía, condilectomía alta y artroplastia) (Al-Moraissi y cols., 2019; Derwich y cols., 2021; Işık y cols., 2023a).

Existen diversos estudios que han mencionado que la artrocentesis se utiliza como tratamiento para diferentes TTM y se han estudiado sus resultados en la OA (Tvrđy y cols., 2015; Bousnaki y cols., 2018; Haigler y cols., 2018; Brignardello, 2018, 2019; Zotti y cols., 2019; Tantillo y Katsigiorgis, 2020; Al-Hamed y cols., 2021). Se describe como un método de tratamiento mínimamente invasivo que se encuentra en el límite entre la terapia conservadora y quirúrgica, este procedimiento ayuda a disminuir el dolor generado por los TTM.

La técnica de la artrocentesis consiste en la introducción de dos agujas, la primera se utiliza para introducir la solución de lavado (suero fisiológico o solución de Ringer) en el espacio articular superior y la segunda aguja se utiliza para drenar el líquido (Tvrđy y cols., 2015).

En la literatura podemos encontrar que hay gran variedad de investigaciones para evaluar la efectividad de artrocentesis seguida de la inyección posterior con distintas soluciones como factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas (PRP) y ácido hialurónico (AH) para el tratamiento de OA (Bousnaki y cols., 2018; Haigler y cols., 2018; Brignardello, 2018, 2019; Zotti y cols., 2019; Al-Hamed y cols., 2021). Sin embargo, se sigue destacando la importancia de continuar con la investigación de

los tratamientos, considerando que hay mayor cantidad de estudios sobre el tratamiento con los concentrados antes mencionados.

En vista de la continua investigación y la creación de nuevos protocolos para obtener diferentes concentrados de plaquetas, es que surge la necesidad de clasificarlos. Dohan y cols., en el año 2009 clasifican en cuatro categorías los concentrados en función de su contenido de leucocitos y fibrina:

1. Plasma rico en plaquetas puro (PRP-P)
2. Plasma rico en leucocitos y plaquetas (PRP-L)
3. Fibrina rica en plaquetas pura (FRP-P)
4. Fibrina rica en plaquetas y leucocitos (FRP-L).

El PRP se produce centrifugando sangre completa heparinizada (anticoagulada) durante 15 minutos y separa las plaquetas de los demás componentes sanguíneos. Luego, las plaquetas se diluyen con suero fisiológico para obtener una concentración óptima. Se utiliza por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antibacterianas (Zotti y cols., 2019). Restaura el AH intraarticular, aumenta la síntesis de glucosaminoglicanos realizada por los condrocitos, equilibra la angiogénesis articular, promueve la migración celular, estimula la proliferación celular, aumenta la producción de matriz de cartílago por condrocitos y células estromales mesenquimales derivadas de la médula ósea, y aumenta la producción de AH por sinoviocitos (Zotti y cols., 2019). También ha dado resultados favorables en el tratamiento de TTM incluso mayores que AH (Chung y cols., 2019 ;Zotti y cols., 2019).

La fibrina rica en plaquetas y leucocitos (FRP-L) pertenece a la segunda generación de los concentrados plaquetarios. Surge debido a que el procedimiento de obtención de PRP presentaba algunas desventajas como dificultades en la preparación (cambios de tubo de centrifugación, necesidad de activadores iniciales, entre otros), requiere de anticoagulante en el momento de la extracción de sangre (Castro y cols., 2017a), dependiente del operador y tiene un extenso tiempo para su elaboración (Castro y cols., 2017b). La FRP-L debido a su contenido en leucocitos y plaquetas da como resultado una liberación constante de factores de crecimiento como Factor

de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ 1), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento insulínico (IGF) (Castro y cols., 2017b).

La caracterización y cuantificación del concentrado plaquetario es importante y regularmente señalado en la evidencia científica, debido a que permite realizar la clasificación de este, ayuda a comprender el mecanismo de acción y rol de las distintas células involucradas, permite contrastar de manera más precisa los resultados del estudio con la literatura disponible (Dohan y cols., 2009; Wend y cols., 2017; Kunze y cols., 2022; Dos Santos y cols., 2023; Marín y cols., 2023).

Las plaquetas activadas liberan proteínas biológicamente activas (moléculas de señalización) que promueven el reclutamiento de células inflamatorias, crecimiento, la morfogénesis celular y modulan la respuesta inflamatoria (Mariani y cols., 2016). Las plaquetas en conjunto con los leucocitos promueven la regeneración ósea, específicamente son los linfocitos los que influyen en la diferenciación osteogénica de las células estromales mesenquimales (osteoblastos) (Wend y cols., 2017).

Las células dendríticas regulan la respuesta inmune. Son las principales células presentadoras antigénicas, tienen la capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, generando respuestas inmunológicas específicas. Son capaces de activar también linfocitos B, Células Natural Killer, macrófagos y eosinófilos. (Vázquez y cols., 2012).

Los linfocitos T son células inmunes que se producen en la médula ósea y maduran en el Timo desarrollando la capacidad de reconocer antígenos específicos, son parte de la inmunidad mediada por células. Todas las células T expresan en su superficie un receptor de membrana llamado receptor de la célula T (RCT). Gracias a este receptor los linfocitos T son capaces de identificar el antígeno de forma específica (Siachoque y cols., 2011).

Los linfocitos T CD4+ corresponden a una subpoblación (subtipo) de Linfocitos T y son conocidos como Linfocitos T Helper, colaboradores o cooperadores. Son encargados de coordinar defensas específicas e inespecíficas, mediante la

liberación de sustancias químicas (citoquinas) estimulan el crecimiento y la diferenciación de las células T y B. Los Linfocitos T colaboradores detectan péptidos presentados por moléculas MHC (Complejo Mayor Histocompatibilidad) de clase II, activan otras células del sistema inmune mediante la secreción de citoquinas. Posterior a la activación, los linfocitos T adquieren funciones efectoras. En el caso de los linfocitos T CD4+, se detecta la producción de citocinas que pueden polarizar el resto de la respuesta inmunológica (Siachoque y cols., 2011).

En la literatura existen investigaciones del tratamiento de OA de la ATM con inyecciones de PRP, pero no hay información acerca de la eficacia del tratamiento realizado con infiltración de FRP-L.

La eficacia de los tratamientos en TTM es generalmente evaluada mediante la disminución de sintomatología dolorosa en el paciente, medición de apertura máxima, restablecimiento de movimientos mandibulares funcionales normales y evaluación del cambio en la calidad de vida del paciente. Son pocos los estudios clínicos que consideran dentro de sus objetivos el estudio de la respuesta frente al tratamiento mediante los biomarcadores moleculares (Al-Moraissi y cols., 2019; Jara y cols., 2020; Xu y cols., 2023).

#### **2.4 Biomarcadores moleculares presentes en el líquido sinovial de pacientes con OA de la ATM.**

El líquido sinovial es un gel viscoso de color amarillento claro, tiene funciones relevantes en la ATM como la lubricación, absorción de impactos, protección del cartílago, nutrición del tejido avascular, es el encargado de mantener y regular la fisiología articular. Este líquido se ha considerado fundamental para diversos estudios, debido a que ha sido utilizado como muestra de diagnóstico y para determinar el estado intraarticular de la ATM con su análisis (Iturriaga y cols., 2018; Miyamoto y cols., 2002).

El líquido sinovial es levemente alcalino durante el reposo y su pH disminuye durante la actividad articular. En condiciones de salud está compuesto por proteínas plasmáticas (albúminas, globulinas, fibrinógeno, transferina), azúcares (glucosa, galactosa), lípidos, componentes celulares (macrófagos, monocitos, linfocitos,



leucocitos polimorfonucleares), moléculas lubricantes (AH, lubricina, mucinas, proteoglicano 4 (PRG 4)), citoquinas (proinflamatorias: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ; antiinflamatorias: IL-2, IL-4, IL-10, IL-13), factores de crecimiento y enzimas proteolíticas como metaloproteinasas (MMP-1, MMP-3), inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP), serina, cisteína (Iturriaga y cols., 2018).

En la superficie interna de la cápsula de la ATM se encuentra la membrana sinovial de tejido conectivo laxo que produce y mantiene el líquido sinovial. Los sinoviocitos tipo B son encargados de producir una secreción rica en glicoproteínas y glucosaminoglicanos destacando el AH y la lubricina (Iturriaga y cols., 2018).

En ATM de pacientes asintomáticos se han estudiado los niveles presentes de citoquinas en el líquido sinovial. Se han encontrado de manera constante TNF- $\alpha$  y de forma esporádica INF- $\gamma$  e IL-2 (Iturriaga y cols., 2018). IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TGF- $\beta$ 1 se encontrarían en niveles mínimos (Fang y cols., 1999).

Durante el metabolismo normal las MMPs están en equilibrio con los TIMPs, que corresponde a la homeostasis de la matriz extracelular y el recambio celular. Tienen un rol importante en condiciones fisiológicas y patológicas de la articulación.

IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  promueven la liberación de proteasas estimulando la expresión de enzimas degradantes y mediadores inflamatorios, produciendo la inflamación de la articulación y la degradación de huesos y cartílagos. Citoquinas proinflamatorias aumentarían significativamente en OA y estarían relacionadas con el grado de severidad de la enfermedad y el nivel de dolor.

También se destaca que citoquinas proinflamatorias suprimen los niveles de proteoglicanos como el PRG4 que son secretados por condrocitos. En el proceso degenerativo articular se ha asociado que el PRG4 presenta una degradación y disminuye su síntesis producto de la pérdida de sinoviocitos y la presencia citoquinas inflamatorias (Iturriaga y cols., 2018).

La mantención del fibrocartílago activa a los condrocitos para la secreción de glicosaminoglicanos (GAGs) y colágenos, resultando en una matriz extracelular

organizada que confiere propiedades mecánicas y fisiológicas especializadas para la función del disco articular (Moncada y cols., 2020).

Se ha demostrado que la inducción de MMP-1, MMP-3 y MMP-9 se relacionan con pérdida de colágeno y proteoglicanos de la MEC del fibrocartilago, produciendo la degradación del tejido conectivo fibroso del disco articular. La destrucción de proteoglicanos provoca gran absorción de fluido intersticial, provocando una disminución en la capacidad de resistir las cargas. Cuando continúa este proceso de degradación articular se produce la abrasión del fibrocartilago y la erosión de las superficies óseas subyacentes (Moncada y cols., 2020).

MMP-9 se secreta extracelularmente, influye en factores de crecimiento, en la matriz extracelular, liberación citoquinas que activan vías de señalización que participan en el crecimiento, invasión, migración celular y la inflamación. Además, la expresión elevada de MMP-9 en personas con OA se relaciona con el progreso de la enfermedad degenerativa articular (Zeng y cols., 2015).

La presencia de las metaloproteinasas de matriz (MMP) están asociadas con la degradación del tejido de la ATM y en la progresión de OA (Miyamoto y cols., 2002; Haraden y cols., 2019; Cafferata y cols., 2021). MMP-3 es una proteasa que degrada el colágeno y contribuye en la degradación del cartilago con generación de DAMP (patrones moleculares asociados a la lesión), que producen el aumento de la inflamación sinovial. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína de señalización de la angiogénesis, que aumenta la inflamación mediante la creación de vasos sanguíneos (Miyamoto y cols., 2002; Haraden y cols., 2019; Cafferata y cols., 2021). Además, ha sido demostrado que la matriz extracelular (MEC) del cartilago articular es degradado por MMP y su actividad es inhibida por inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (TIMPs) (Miyamoto y cols., 2002).

La composición del líquido sinovial se ve directamente afectada por las diversas patologías que afectan la articulación. Esta composición ha sido estudiada con mayor frecuencia y facilidad en la articulación de rodilla, no así en ATM debido a las dificultades en el muestreo y el análisis del líquido, principalmente por ser una

articulación de mayor dificultad en el acceso por su pequeño tamaño, se necesita de un profesional especialista para la extracción de la muestra, la cantidad extraída suele ser poca y requiere de un pronto análisis (Kubota y cols., 1997; Altobelli y cols., 2017; Iturriaga y cols., 2018; Haraden y cols., 2019).

Los distintos procesos que se generan producto de la patología, como la inflamación o destrucción tisular, producen cambios en los niveles de los biomarcadores presentes. Éstos pueden ser de gran valor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Es por este motivo la importancia de caracterizar los biomarcadores moleculares presentes en el líquido sinovial que también permite evaluar la eficacia de un tratamiento (Kubota y cols., 1997; Cevitanes y cols., 2014; Haraden y cols., 2019).

Diversos estudios señalan los mediadores inflamatorios que están involucrados en el proceso de inflamación de la OA. Cuando ocurre este evento las células inflamatorias comienzan a actuar junto con las células dendríticas y los macrófagos, produciendo la liberación de citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Kubota y cols., 1997; Miyamoto y cols., 2002; Nefla y cols., 2016; Moncada y cols., 2020). IL-17 juega un rol importante en el metabolismo óseo, se asocia con moléculas que producen daño del cartílago articular y/o el hueso de la articulación. Por otra parte, la OA se asoció con un aumento de los niveles de IL-6 que corresponde a una citoquina inflamatoria. Esto podría producirse producto que la patología tiene un carácter inflamatorio destructivo crónico (Iturriaga y cols., 2018). Además, el aumento en los niveles de citoquinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 genera un aumento del activador del receptor que expresa el ligando del factor nuclear kappa B (RANKL) (Arboleya y Castañeda, 2013; Cafferata y cols., 2021). En la remodelación ósea es importante la proporción de RANKL y osteoprotegerina (OPG), este último factor mencionado se ha comprobado que disminuye su concentración en el líquido sinovial de pacientes con OA en ATM (Cafferata y cols., 2021).

Por lo mencionado anteriormente es que se destaca la importancia de caracterizar y evaluar los niveles de los biomarcadores del líquido sinovial de pacientes con OA antes y después del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos.

### **3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

#### **3.1 HIPÓTESIS:**

**3.1.1.** El tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos produce el aumento de biomarcadores de regeneración tisular y una disminución de los biomarcadores relacionados a la inflamación y destrucción tisular en el líquido sinovial de pacientes con osteoartritis de la articulación temporomandibular.

#### **3.2 OBJETIVO GENERAL:**

**3.2.1** Determinar mediante la cuantificación de los biomarcadores de inflamación, regeneración y destrucción tisular la eficacia del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos en pacientes con osteoartritis de la articulación temporomandibular.

#### **3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 3.3.1** Caracterizar la población celular y factores de crecimiento de la fibrina rica en plaquetas y leucocitos.
- 3.3.2** Cuantificar los biomarcadores de inflamación, regeneración y destrucción tisular presentes en el líquido sinovial de pacientes con osteoartritis de la articulación temporomandibular, antes y después del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos.
- 3.3.3** Comparar los niveles de biomarcadores de inflamación, regeneración y destrucción tisular del líquido sinovial antes y después del tratamiento.
- 3.3.4** Determinar la eficacia del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos para la osteoartritis de la articulación temporomandibular, de acuerdo con el análisis de biomarcadores de inflamación, regeneración y destrucción tisular del líquido sinovial.

## **4 MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **4.1. Diseño del estudio:**

Corresponde a un estudio clínico piloto longitudinal prospectivo, realizado en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte, carta N° 024/2020 (Anexo 1). Todos los participantes del estudio aceptaron de manera voluntaria su participación y firmaron el formulario de consentimiento informado (Anexo 2).

### **4.2 Selección de la muestra de pacientes:**

La muestra de pacientes estuvo constituida por 5 personas, mayores de 18 años. Los pacientes fueron reclutados en la Clínica de Odontología de la Universidad de Chile, en un periodo comprendido entre junio y octubre del año 2021.

#### **4.2.1 Diagnóstico:**

El diagnóstico clínico de la OA se realizó utilizando el protocolo de la taxonomía extendida de DC/TMD (Peck y cols., 2014) y se confirmó mediante una tomografía computarizada de haz cónico (CBCT), este examen imagenológico fue realizado en el servicio de radiología de la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile, fue además realizado el diagnóstico imagenológico por un radiólogo dentomaxilofacial.

La articulación temporomandibular escogida para el estudio correspondió a aquella que presentaba un mayor grado de destrucción y sintomatología.

#### **4.2.2 Criterios de inclusión:**

Se seleccionaron pacientes ASA I o ASA II con diagnóstico de OA de la ATM, diagnosticado mediante el protocolo DC/TMD, definido por presentar artralgia y crepitación (Peck y cols., 2014). Los participantes fueron evaluados clínicamente por odontólogo especialista en TTM y dolor orofacial.

#### **4.2.3 Criterios de exclusión:**

Pacientes que hubieran recibido hace un año o que se encontraran en tratamiento de ortodoncia, tratamiento orofacial-miofuncional o de TTM actual o en los últimos 6 meses. Pacientes con historia de intervención quirúrgica en la ATM, embarazadas o en periodo de lactancia, que tuvieran alergia al paracetamol. Además, también se excluyó a pacientes que presentaran enfermedades sistémicas como artritis reumatoide, diabetes mellitus, trastornos hematológicos asociados con el uso de FRP-L en los cuales destacan trastornos de la función plaquetaria, deficiencia de fibrinógeno, tratamiento anticoagulante, enfermedades autoinmunes o pacientes que se encontraran con inmunosupresión.

#### **4.3 Obtención de muestra de líquido sinovial:**

Se trazó una línea desde el ángulo externo del ojo hasta la parte más central y posterior del tragus (línea Holmlund-Hellsing). 2 mm bajo la línea previamente descrita y 10 mm hacia anterior desde el centro del tragus se ubica el sitio de punción, que corresponde a la zona de máxima concavidad de la fosa mandibular.

La obtención de la muestra del líquido sinovial se realizó mediante una técnica para artrocentesis. Para dar inicio al procedimiento, el Cirujano maxilofacial realizó una técnica anestésica infiltrativa local extracapsular, luego de esto se utilizó una aguja de calibre 21 que fue insertada en dirección inferolateral en el espacio articular para obtener el líquido sinovial de la ATM. La muestra obtenida debía encontrarse sin contaminación sanguínea para realizar un correcto análisis.

En el post-operatorio, se les prescribió analgesia de paracetamol 1 gramo cada 8 horas por 3 días, en caso de ser necesario.

#### **4.4 Obtención de fibrina rica en plaquetas y leucocitos:**

La extracción sanguínea fue realizada por una enfermera, quien utilizó una aguja mariposa de calibre 21 y la posicionó en la vena basílica o cefálica de

cada paciente. Se recolectaron 2 tubos con 9 ml de sangre periférica en tubos de ensayo de vidrio seco sin anticoagulante.

Posteriormente la sangre se colocó en una centrífuga de mesa (*IntraSpin™*, *Intra-Lock international*, *Boca Ratón, Florida, EEUU*), los tubos fueron posicionados de manera opuesta y se centrifugó de manera inmediata a temperatura ambiente utilizando el protocolo cuyo número de patente es 63,381.

Luego del centrifugado la sangre se encuentra separada en dos fracciones: la fracción superior contiene el fibrinógeno líquido (FRP-L), en la parte inferior quedarán contenidos los glóbulos rojos. Se extrajo 2 ml de FRP-L con una jeringa calibre 18 desde el área más cercana a la fracción de glóbulos rojos. Luego de que la muestra terminó el proceso de centrifugado hay 12 minutos disponibles aproximadamente para realizar la infiltración del contenido en la ATM, si se excede este tiempo el fibrinógeno se coagula y no puede inyectarse. La polimerización natural y progresiva formará coágulos de fibrina con una cantidad relevante de factores de crecimiento de plaquetas y leucocitos.

#### **4.5 Inyección intra-articular:**

El mismo punto de punción que se utilizó previamente para la artrocentesis se inyectaron 2 ml de FRP-L al inicio (T0) y a los 30 días posteriores. Se utilizó una aguja de calibre 18 para realizar la inyección de FRP-L. Luego del procedimiento, se les indicó a los pacientes del estudio una dieta blanda durante 3 días. Luego de 6 meses de haber inyectado la segunda dosis de FRP-L (T1) se realizó un nuevo examen imagenológico, examen clínico y la recolección de muestra de líquido sinovial, utilizando la misma técnica de artrocentesis descrita anteriormente.

#### **4.6 Procesamiento inicial:**

Una vez obtenida la muestra fue trasladada inmediatamente al laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

La muestra de FRP-L fue dispensada en tubos Falcon que contenía EDTA, se encontraban debidamente rotulados con el número de paciente y el tipo de muestra. El líquido sinovial también fue depositado en tubos Falcon de 15 ml sin EDTA, se recolectaron aproximadamente 2 ml de cada paciente.

Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente en una caja térmica, en cuyo interior contenía una gradilla. Una vez ingresada al laboratorio se comenzó con el procesamiento inicial de la muestra.

#### **4.6.1 Procesamiento FRP-L :**

En tubos Falcon, 9 ml de FRP-L en 2 ml de EDTA 1 mM (milimolar), se centrifugaron a 400 xg durante 10 min a temperatura ambiente utilizando una centrífuga convencional (Universal 320R, Hettich, Tuttlingen, Alemania). Luego el pellet se resuspendió en PBS (Tampón fosfato salino) y el sobrenadante se almacenó en un tubo Falcon nuevo a -80°C, para posterior análisis.

De la suspensión celular obtenida se realiza el conteo de las células utilizando la cámara de Neubauer (Mariendfeld, Lauda-Königshofen, Alemania). Se realizó dilución 1:10 que contenía la suspensión celular en PBS 1x y Azul Tripano (*Trypan Blue Stain 4%*, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) como marcador de viabilidad que me permitió contar las células vivas (sin tinción).

Luego el sobrenadante se centrifuga a 10.000 xg x 15 min a 4°C (centrifuga Universal 320 R, Hettich, Tuttlingen, Alemania) y fue guardado en 200 µL (microlitros) de RNA Safer (RNAlater™ Soln, invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

#### **4.6.2 Procesamiento líquido sinovial:**

Se utilizaron tubos eppendorf para 2 ml de líquido sinovial en solución salina. Para recuperar las células se realizó una centrifugación a 12.000 xg x 15 min



a 4°C, en una centrífuga de mesa (Z 233 MK-2, Hermle LaborTechnik GmbH, Wehingen, Alemania).

Luego se realizaron dos lavados con 1ml de PBS 1x, posteriormente se vuelve a realizar la centrifugación antes señalada. El pellet obtenido se guarda en 300 µL (microlitros) de RNA Safer (RNAlater™ Soln, invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

Todas las muestras finales obtenidas fueron rotuladas y conservadas a -80°C hasta su siguiente procesamiento.

#### **4.7 Caracterización celular de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (FRP-L):**

La viabilidad celular se realizó según lo mencionado en el punto 4.6.1. Luego, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Para el marcaje extracelular, las células se incubaron con los anticuerpos monoclonales (Biolegend, San Diego, California, EEUU; BD Biosciences, *Becton Dickinson, Madrid, España*; eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU), anti-CD45, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD25, anti-CD56, anti-CD14, anti-CD11b, anti-CD117, anti-CD11c, anti-CD83, anti-HLA-DR, anti-CD41, anti-CD42b, anti-CD62P (Tabla 1). La identificación de la caracterización celular se realizó utilizando Gates secuenciales de acuerdo a las características FSC/SSC.

Adquisición de las muestras procesadas por citometría se realizó en equipo citómetro (*BD LSRFortessa X-20, Becton Dickinson, Madrid, España*), ubicado en la unidad de citometría de flujo FACS en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

**Tabla 1.** Panel de anticuerpos utilizados para la caracterización celular de FRP-L.

Anticuerpo monoclonal	Fluorocromo conjugado	Dilución de trabajo	Célula identificada
CD45	PerCP CY5.5	1:800	Leucocitos en general
CD3	BV 605	1:200	Linfocitos T
CD4	BUV 395	1:200	Linfocitos T CD4+
CD8	BV 510	1:200	Linfocitos T CD8+
CD19	BV 421	1:200	Linfocitos B
CD25	BUV 737	1:200	Linfocitos T activados
CD56	BV 785	1:200	Células NK
CD14	BV 650	1:500	Macrófagos/ Monocitos
CD11b	FITC	1:200	Neutrófilos
CD117	APC Cy7	1:200	Neutrófilos
CD11c	AF700=APC700	1:1000	Células Dendríticas
CD83	BV711	1:100	Células Dendríticas
HLA-DR	PE Cy7	1:400	Células presentadoras de antígeno
CD41	PE	1:200	Plaquetas
CD42b	APC	1:200	Plaquetas
CD62p	PE-CF594	1:1000	Plaquetas activas

#### 4.8 Extracción de ARN total y transcripción reversa de FRP-L y líquido sinovial:

Para la extracción del ARN citoplasmático total se procesaron aproximadamente  $1 \times 10^6$  de células por cada muestra, las células fueron lavadas 2 veces en PBS y lisadas en 400  $\mu$ L de amortiguador de lisis celular que contiene 0,5% Igepal® CA-630 (Rhodia Inc, París, Francia), 50 mM Tris-HCl, a pH 8, 100 mM NaCl y 5 mM  $MgCl_2$  y suplementado con 10mM de VRC (vanadyl-ribonucleosidos) 40 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

La lisis celular completa se obtuvo resuspendiendo vigorosamente las células 10 veces en el amortiguador de lisis. El núcleo fue removido mediante centrifugación a 14.000  $xg \times 10$  seg (centrífuga Z 233 MK-2, Hermle

LaborTechnik GmbH, Wehingen, Alemania). 400  $\mu$ L del sobrenadante fueron sometidos a digestión con 25  $\mu$ g/mL de proteinasa K (Roche Ltd., Basilea, Suiza), en presencia de SDS 1% y EDTA 15 mM (Fluka, Honeywell, Charlotte, Carolina del Norte, EEUU) por 30 min a 37°C. Posteriormente, el ARN fue extraído a un volumen igual de 400  $\mu$ L de cloropan (fenol : cloroformo : alcohol isoamil 25:24:1) (Fluka, Honeywell, Charlotte, Carolina del Norte, EEUU) centrifugado por 10 min a 14.000 xg a temperatura ambiente.

El ARN presente en la solución acuosa se precipitó por 1 hora a -20°C con 0,3 M de acetato de sodio, 1 mL de etanol 100% y 20  $\mu$ g/ $\mu$ L de glicógeno (Roche, Basilea, Suiza), se recuperó mediante centrifugación por 30 min a 14.000 xg y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua mili-Q libre de ARNasas.

El ARN citoplasmático fue cuantificado usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm (Synergy HT, microplate reader. Biotek, Winooski, Vermont, EEUU) y almacenado a -80°C a una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L.

Para obtener la primera cadena de ADNc, 2  $\mu$ g/ $\mu$ L de ARN total fueron retrotranscritos usando un kit específico y siguiendo las recomendaciones del fabricante (iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR, BIO-RAD, Hércules, California, EEUU).

#### **4.9 Expresión de Factores de crecimiento de FRP-L mediante RT-PCR:**

Los niveles de expresión de los mRNA de TGF- $\beta$ 1, PDGF-A, PDGF-B, IGF, FGF-2, VEGF-A, KGF y CTGF fueron determinados mediante PCR en tiempo real a partir de 20 ng de cDNA, utilizando partidores específicos (Tabla 2).

La amplificación mediante PCR en tiempo real se realizó utilizando un reactivo específico SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix.(BIO-RAD, Hércules, California, EEUU) y se cuantificó en un termociclador en tiempo real (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EEUU) el cual se encuentra ubicado en el Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de

Medicina de la Universidad de Chile. Como control de amplificación se analizaron los niveles de expresión de la subunidad de rRNA 18S.

**Tabla 2.** Partidores usados para la amplificación mediante qPCR de los Factores de crecimiento y 18S rRNA.

Factor de Crecimiento	Partidor 5'-3'	Partidor 3'-5'.
<b>TGF-β1</b>	5'-CGC TGC CCA TCG TGT ACT A-3'	5'-CGC ACG ATC ATG TTG GAC-3'
<b>PDGF-B</b>	5'-AAC TAT GCG TCA ACC AAT CGT A-3'	5'-GCG GGG AAC AAG TTG TCA -3'
<b>PDGF-A</b>	5'-GGG CTT CAC CAA GAC CTA CA-3'	5'-TGC AGG GGA TGG ATA AAC A-3'
<b>IGF</b>	5'-CCA CCC TGA CCT GCT GTA A-3'	5'- GGA GGA CAT GGT GTG CAT CT-3'
<b>FGF-2</b>	5'-TCC TGC CAG TGG TAA TAC GAT-3'	5'- CCC TAA GAG TAT AAA GGT ATC CAC AAG-3'
<b>VEGF-A</b>	5'-CTA CCT CCA CCA TGC CAA GT-3'	5'- GAT AGA CAT CCA TGA ACT TCA CCA-3'
<b>KGF</b>	5'-GGG CTT ATC ATG CAG TTT GG -3'	5'-TGT GTC TCA TTC ACG CTC AAG-3'
<b>CTGF</b>	5'-ACA TTA GTA CAC AGC ACC AGA ATG T-3'	5'-GTC ATC TGA TGA TAC TAA CCT TTC TGC-3'
<b>18S</b>	5'-CGC TCC ACC AAC TAA GAA CG-3'	5'-TGG GGA TGA TCA AAA GGA GCC-3'

**TGF-β1:** Factor de crecimiento transformante beta 1; **PDGF-A** y **PDGF-B:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas; **IGF:** Factor de crecimiento insulínico; **FGF-2:** Factor de crecimiento fibroblástico 2; **VEGF-A:** Factor de crecimiento endotelial vascular; **KGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos; **CTGF:** Factor de crecimiento de tejido conectivo; **18S:** 18S rRNA, control endógeno.

#### 4.10 Expresión de los factores de transcripción y citoquinas de líquido sinovial:

Los niveles de expresión de los mRNA de IL-1β, IL-6, TIMP, IL-17, TGF-β1, RANKL, OPG, MMP9 fueron determinados mediante PCR en tiempo real a partir

de 20 ng de cDNA, utilizando partidores específicos (Tabla 3). La amplificación mediante PCR en tiempo real se realizó utilizando un reactivo específico SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, Hércules, California, EEUU) y se cuantificó en un termociclador en tiempo real (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EEUU). Como control de amplificación se analizaron los niveles de expresión de la subunidad de rRNA 18S.

**Tabla 3.** Partidores usados para la amplificación mediante qPCR de las citoquinas, metaloproteinasas y 18S rRNA.

Citoquina	Partidor 5'-3'	Partidor 3'-5'
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	5'-CTG TCC TGC GTG TTG AAA GA- 3'	5'-TTG GGT AAT TTT TGG GAT CTA CA-3'
<b>IL-6</b>	5'-GCC CAG CTA TGA ACT CCT TCT-3'	5'-GAA GGC AGC AGG CAA CAC-3'
<b>IL-17</b>	5'-TGG GAA GAC CTC ATT GGT GT- 3'	5'-GGA TTT CGT GGG ATT GTG AT-3'
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	5'-CGC TGC CCA TCG TGT ACT A-3'	5'-CGC ACG ATC ATG TTG GAC-3'
<b>RANK-L</b>	5'-TGA TTC ATG TAG GAG AAT TAA ACA GG-3'	5'-GAT GTG CTG TGA TCC AAC GA-3'
<b>OPG</b>	5'-CGT CGC CCT GTT CTT CTA TTT-3'	5'-ATG CAG TGA GTG CCA TCT TC-3'
<b>MMP9</b>	5'-GAA CCA ATC TCA CCG ACA GG-3'	5'-GCC ACC CGA GTG TAA CCA TA-3'
<b>TIMP-1</b>	5'-GGG CTT CAC CAA GAC CTA CA- 3'	5'-TGC AGG GGA TGG ATA AAC A-3'
<b>18S</b>	5'-CGC TCC ACC AAC TAA GAA CG- 3'	5'-TGG GGA TGA TCA AAA GGA GCC-3'

**IL-1 $\beta$** : Interleuquina 1 beta; **IL-6**: Interleuquina 6; **IL-17**: Interleuquina 17; **TGF- $\beta$ 1**: Factor de crecimiento transformante beta 1; **RANK-L**: Ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B; **OPG**: Osteoprotegerina; **MMP-9**: Metaloproteinasas de la matriz extracelular 9; **TIMP-1**: Inhibidor tisular de metaloproteinasas de la matriz 1.

#### **4.11 Evaluación de la respuesta inflamatoria y regenerativa del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos:**

La evaluación de la respuesta inflamatoria, regenerativa y de destrucción tisular se obtuvo mediante la comparación de los valores de los biomarcadores antes mencionados, entre T0 y T1.

#### **4.12 Análisis estadístico:**

Debido a que corresponde a un estudio piloto, no presenta cálculo de tamaño muestral. El tamaño de la muestra se realizó considerando un reciente estudio previo (Monasterio y cols., 2018) y el posible retiro de algún participante.

Los datos de qPCR fueron analizados utilizando el software del equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EEUU). La cuantificación relativa se obtuvo normalizando previamente la expresión del mRNA de cada biomarcador molecular a la expresión de mRNA 18s usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y usando los datos de T0 (tiempo inicial) como referencia.

Los niveles de expresión relativa de todos los biomarcadores moleculares medidos (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, TGF- $\beta$ 1, TIMP-1, MMP-9, OPG y RANKL) en el líquido sinovial en T0 se utilizaron para normalizar el análisis, considerándolos como valor 1, con el objetivo de realizar la comparación con los niveles de expresión obtenidos en T1.

Para la distribución de datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Para comparar los resultados entre T0 y T1 de los biomarcadores evaluados, se utilizará la prueba t pareada o la prueba de Wilcoxon dependiendo de la distribución de los datos.

Para este estudio se consideró la eficacia del tratamiento para los cambios en los biomarcadores cuando en la comparación entre T0 y T1 presenta una disminución de los marcadores de inflamación y destrucción tisular,

además de un aumento de los marcadores de regeneración ósea, o si existe una mantención en la expresión de los biomarcadores señalados.

El valor de  $p$  menor o igual a 0,05 se considerará como estadísticamente significativo.

## 5. RESULTADOS:

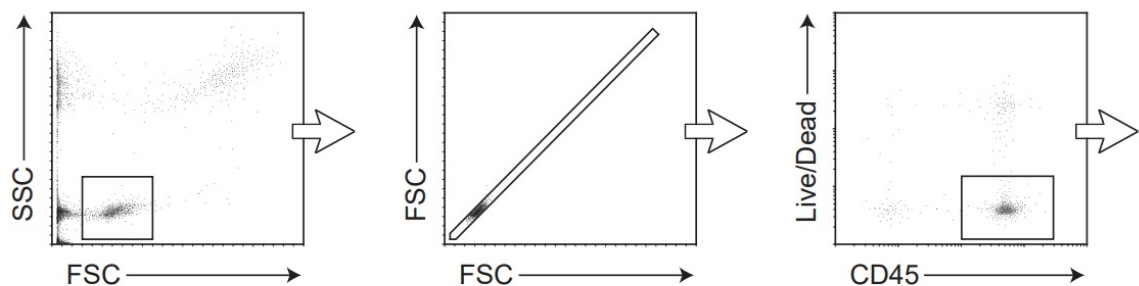
### 5.1 Caracterización demográfica de los pacientes:

Todas las participantes fueron de sexo femenino y de nacionalidad chilena. El rango de edad de los participantes del estudio estuvo entre los 20 y 64 años. Su promedio de edad es de  $46,2 \pm 21,4$  y una mediana de 59 años. 3 pacientes fueron diagnosticados con OA de ATM izquierda y sólo 2 con diagnóstico de OA en ambas ATM. Todas las articulaciones intervenidas fueron en ATM izquierda.

### 5.2 Cuantificación celular FRP-L mediante citometría de flujo:

Se analizaron 5 muestras de FRP-L de cada paciente, obtenidas en T0. Para la identificación de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo se utilizó la estrategia de gateo que se puede observar en la figura 1. La Figura 1 muestra la relación SSC que corresponde a la dispersión lateral de la luz generada que nos indica la complejidad celular y FSC corresponde a la dispersión frontal del haz de luz que muestra el tamaño de la célula. La relación FSC-FSC fue utilizada para la discriminación de dobletes (ocurre cuando el citómetro analiza dos células al mismo tiempo). La relación marcador y células vivas/muertas se presenta de manera biparamétrica para evaluar características de la célula, para lograr identificar la población celular y la viabilidad celular.

#### 5.2.1 Estrategia de gateo:



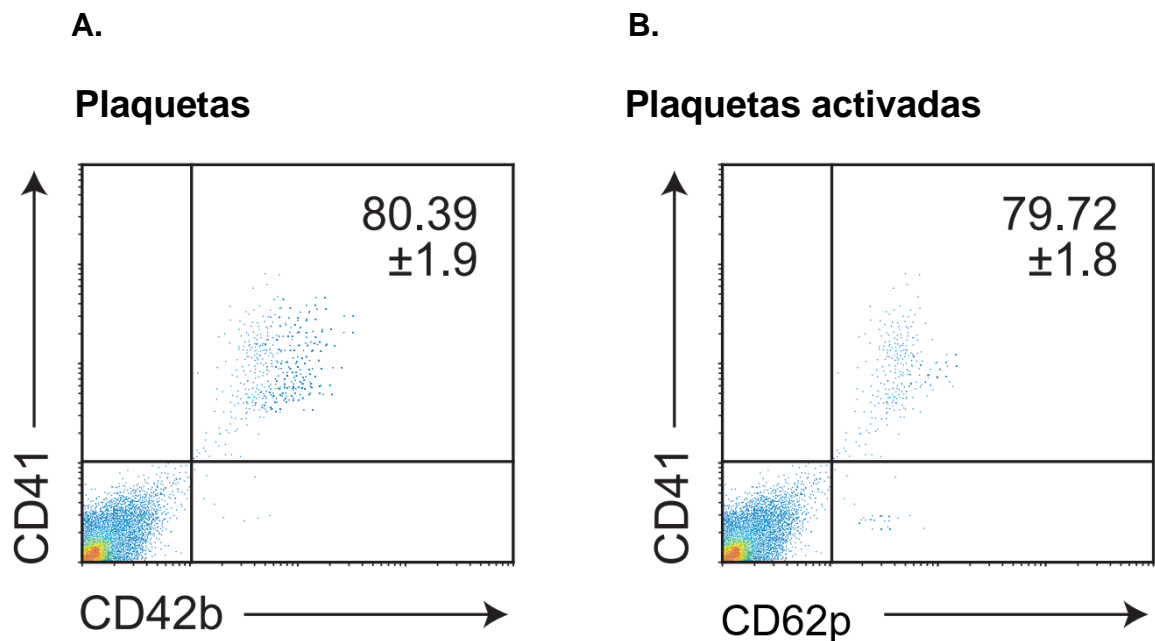
**Figura 1.** Estrategia de gateo para determinación de las poblaciones celulares de FRP-L. Se determinaron basándose en su tamaño (FSC: dispersión frontal, por sus siglas en inglés *forward scatter*) y complejidad (SSC: dispersión lateral, por sus siglas en inglés *side scatter*).



FSC/FSC se eliminan los dobletes (los conglomerados celulares). CD45: corresponde a marcador específico (anticuerpo monoclonal) para identificación de Leucocitos. *Live/Dead* (Vivas/Muertas) es para la identificación de población celulares vivas.

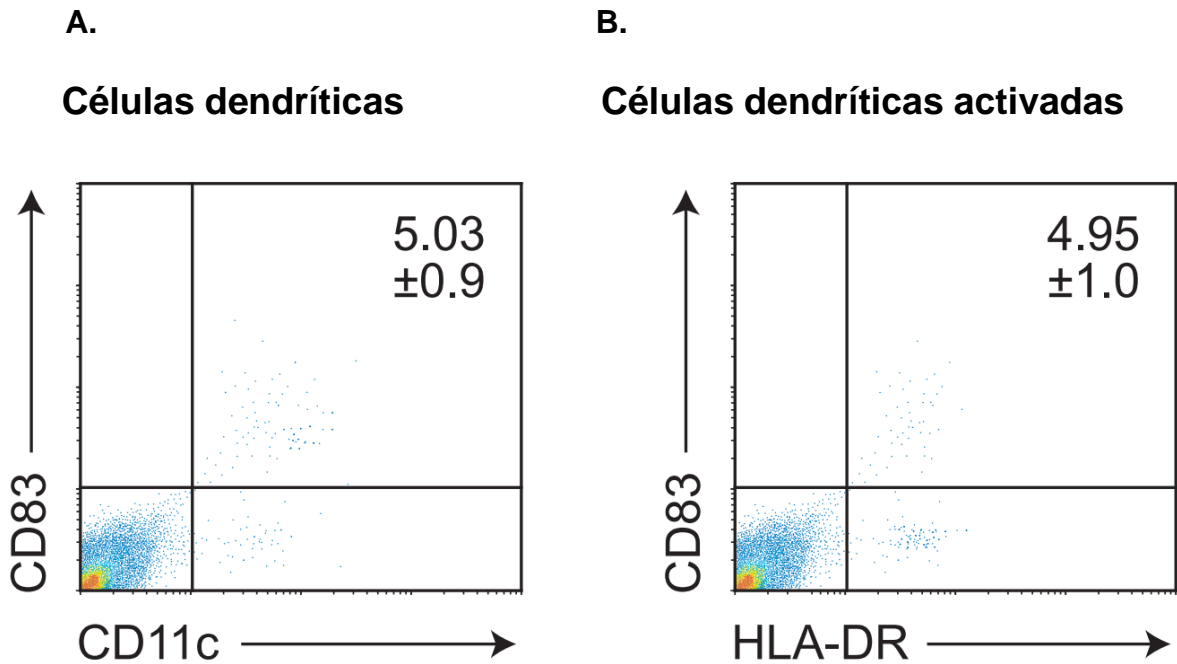
### 5.2.2 Expresión celular:

La expresión celular de la FRP-L obtenida mediante citometría de flujo fue representada en gráfico bidimensional de puntos o gráfico de difracción. Se identificó la población celular de plaquetas como aquellas células que fueron doblemente positivas (expresión positiva para CD42b y CD41), observado en la figura 2A. Las plaquetas activadas son identificadas por ser células de expresión doblemente positiva (positivas para el anticuerpo monoclonal CD62p y CD41). La expresión del anticuerpo CD41 identifica a la célula como plaqueta, la expresión positiva de CD62p demuestra las células que se encuentran activadas (figura 2B) para ambas figuras corresponde al cuadrante superior derecho del gráfico. Las plaquetas corresponden a un 80,39% de la población celular total y las plaquetas activadas corresponden a un 79,72% del total de células identificadas.



**Figura 2.** Gráficos bidimensional de puntos obtenidos por citometría de flujo de FRP-L. La población total de plaquetas se identifica por su doble positividad para CD41 y CD42b (A). La subpoblación de plaquetas activadas expresa además de positividad para CD41, positividad para CD62p (B).

Se identificó la población de células dendríticas como aquellas células que fueron doblemente positivas (expresión positiva para CD83 y CD11c), observado en la figura 3A. La subpoblación de células dendríticas activadas fue identificada por ser positivas para el anticuerpo HLA-DR, junto con el anticuerpo CD83 (figura 3B). De la población total celular presente en la muestra de FRP-L un 5,03% corresponde a células dendríticas y un 4,95% corresponde a esta población celular activada.

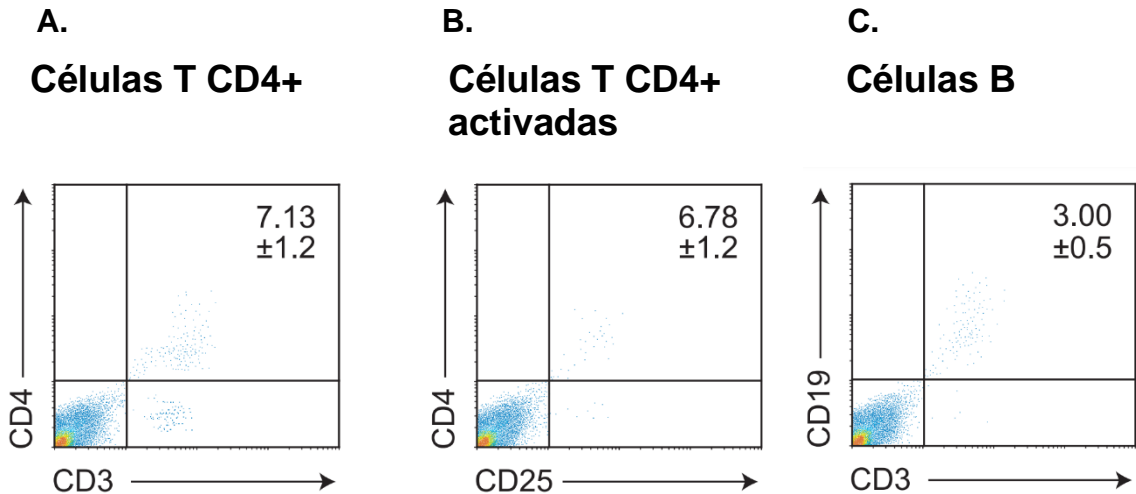


**Figura 3.** Determinación citométrica de células dendríticas. Expresión positiva de CD11c y CD83 corresponde a células dendríticas (A). Las células dendríticas activadas son positivas para el anticuerpo CD83 y HLA-DR (B).

La expresión celular de linfocitos fue identificada mediante la expresión de los distintos anticuerpos. Marcador CD3 positivo identifica población celular de Linfocitos T, para la identificación de la subpoblación de Linfocitos T CD4+ fueron positivos también para el anticuerpo CD4, corresponde al 7,13% de la población celular, cuadrante superior derecho (figura 4A). El anticuerpo CD25 corresponde al marcador de activación de linfocitos T, por lo tanto, la subpoblación identificada como linfocitos T CD4+ activados fue señalada por ser doblemente positivo para marcador CD25 y CD4, corresponde a las células ubicadas en el cuadrante superior

derecho (figura 4B), la cuantificación celular de esta subpoblación es un 6,78% de la población total celular de la muestra.

Se cuantificó que un 3% de las células totales de la muestra corresponden a células B (Linfocito B) identificadas mediante la expresión positiva del anticuerpo CD19 y la expresión negativa el anticuerpo CD3 corresponde al cuadrante superior izquierdo (figura 4C).



**Figura 4.** Identificación y cuantificación de población de linfocitos mediante citometría de flujo. La población de linfocitos T CD4+ fue definida por la expresión positiva de CD3 y CD4 (A). Los linfocitos T CD4+ activados fueron identificados por la expresión positiva de los anticuerpos CD25 y CD4 (B). Los Linfocitos B (células B) fueron determinados por la expresión negativa de CD3 y positiva de CD19 (C).

### 5.3 Expresión de Factores de Crecimiento de FRP-L (T0) mediante RT-qPCR en tiempo real:

**Tabla 4.** Resultados CT promedios de RT-qPCR correspondiente a FRP-L en tiempo inicial (T0).

Factores de Crecimiento	P1 T0	P2 T0	P3 T0	P4 T0	P5 T0
<b>TGF-β1</b>	21,32	32,47	32,58	31,91	31,395
<b>PDGF-a</b>	30,455	54,78	55,56	40,33	47,215
<b>PDGF-b</b>	28,295	31,08	32,895	29,865	29,835
<b>IGF</b>	28,285	31,56	35,335	32,6	33,965
<b>FGF-2</b>	30,21	38,425	34,57	45,845	41,7
<b>VEGF</b>	27,68	30,53	33,695	33,52	34,06
<b>KGF</b>	27,645	30,18	31,72	30,62	30,895
<b>CTGF</b>	29,36	31,915	33,22	31,78	33,38
<b>18S</b>	7,69	25,695	38,405	27,79	29,96

P1 T0: Paciente 1 tiempo inicial, P2 T0: Paciente 2 tiempo inicial, P3 T0: Paciente 3 tiempo inicial, P4 T0: Paciente 4 tiempo inicial, P5 T0: Paciente 5 tiempo inicial.

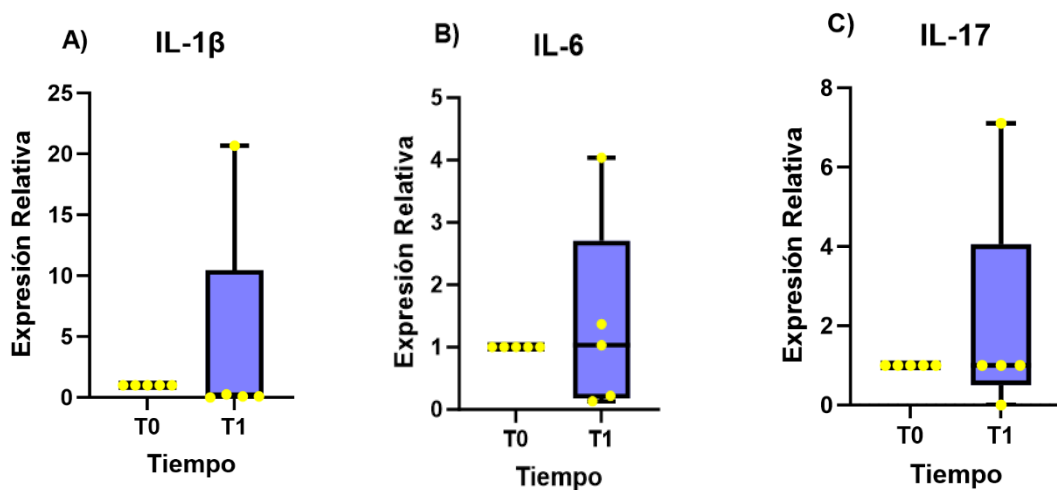
**TGF-β1:** Factor de crecimiento transformante beta 1; **PDGF-a** y **PDGF-b:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas; **IGF:** Factor de crecimiento insulínico; **FGF-2:** Factor de crecimiento fibroblástico 2; **VEGF-a:** Factor de crecimiento endotelial vascular; **KGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos; **CTGF:** Factor de crecimiento de tejido conectivo; **18S:** 18S rRNA, control endógeno.

### 5.4 Cuantificación de biomarcadores moleculares de Líquido sinovial (T0 y T1) mediante RT-qPCR:

El análisis de distribución de los datos de la expresión relativa de RT-qPCR del líquido sinovial de T0 y T1 fue analizada mediante la prueba de Shapiro-Wilk entregó como resultado que los datos tienen una distribución no normal (no paramétrica). La comparación fue evaluada con la prueba de Wilcoxon. La cuantificación relativa fue expresada en mediana.

### 5.4.1 Expresión relativa de citoquinas

Fue posible detectar niveles de expresión de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el líquido sinovial de todos los pacientes con OA. La expresión relativa de IL-1 $\beta$  no tuvo diferencias estadísticamente significativa de T0 y su expresión en T1 (Mediana=0,10) ( $p=0,62$ ) (Fig.5A). Con respecto a la expresión relativa de IL-6 no existen diferencias significativas de la expresión entre T0 y T1 (1,03) ( $p>0,99$ ) (Fig.5B). Con respecto a la expresión relativa de IL-17 no existe diferencia estadísticamente significativa entre T0 y la expresión relativa de la citoquina antes mencionada en T1 (1,00) (valor  $p>0,99$ ) (Fig.5C).



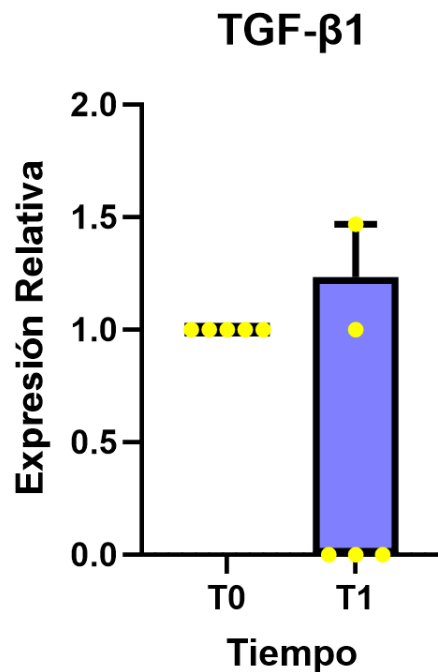
**Figura 5. Cuantificación de expresión relativa de Citoquinas del Líquido Sinovial T0 y T1.**

T0 corresponde al tiempo inicial, T1 es 6 meses posteriores al tratamiento.

Los puntos amarillos de cada gráfica corresponden a los valores individuales obtenidos de la expresión relativa de la citoquina de cada paciente en el tiempo específico. Niveles de expresión relativa de citoquina IL-1 $\beta$  obtenidos en T0 y T1 (A). Niveles de expresión relativa de citoquina IL-6 obtenidos en T0 y T1 (B). Niveles de expresión relativa de citoquina IL-17 obtenidos en T0 y T1 (C).

### 5.4.2 Expresión relativa del Factor de Crecimiento TGF- $\beta$ 1.

Se detectaron niveles de expresión de mRNA de TGF- $\beta$ 1 en el líquido sinovial de los cinco pacientes. Los niveles de expresión obtenidos en T0 (1,00) no se determinó diferencia estadísticamente significativa al ser comparada con la expresión de este factor de crecimiento en T1 (0,00) ( $p=0,25$ ) (Fig.6).



**Figura 6. Cuantificación de expresión relativa de TGF-b1.**

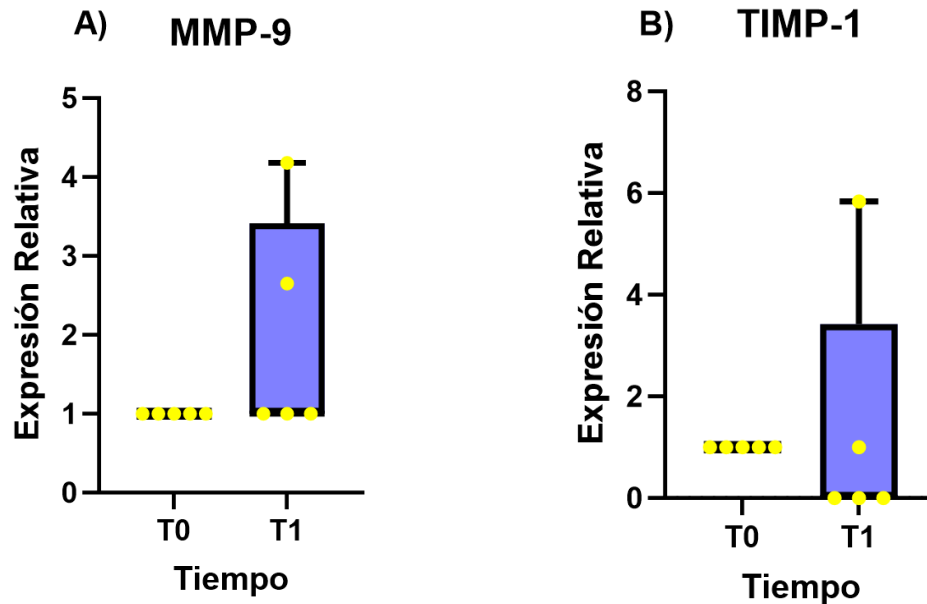
T0 corresponde al tiempo inicial, T1 es 6 meses posteriores al tratamiento.

Puntos de color amarillo corresponden a los valores individuales obtenidos de la expresión relativa de TGF- $\beta$ 1 de cada paciente en el tiempo específico.

### 5.4.3 Expresión relativa de MMP-9 y TIMP-1

Los niveles de expresión de mRNA de MMP-9 y TIMP-1 en el líquido sinovial de todos los pacientes con OA fueron detectados. La expresión de MMP-9 en T0 (1,00) no fue estadísticamente significativa con respecto a su expresión en T1 (1,00) ( $p=0,5$ ) (Fig.7A).

Por otra parte, la expresión relativa de TIMP-1 en T0 no existe una diferencia estadísticamente significativa con respecto a la expresión del Inhibidor tisular de metaloproteinasas de la matriz 1 en T1 (0,00) (valor  $p > 0,99$ ) (Fig.7B).



**Figura 7. Cuantificación de expresión relativa de Metaloproteinasas 9 (MMP-9) e Inhibidor tisular de metaloproteinasas de la matriz (TIMP-1).**

T0 corresponde al tiempo inicial, T1 es 6 meses posteriores al tratamiento.

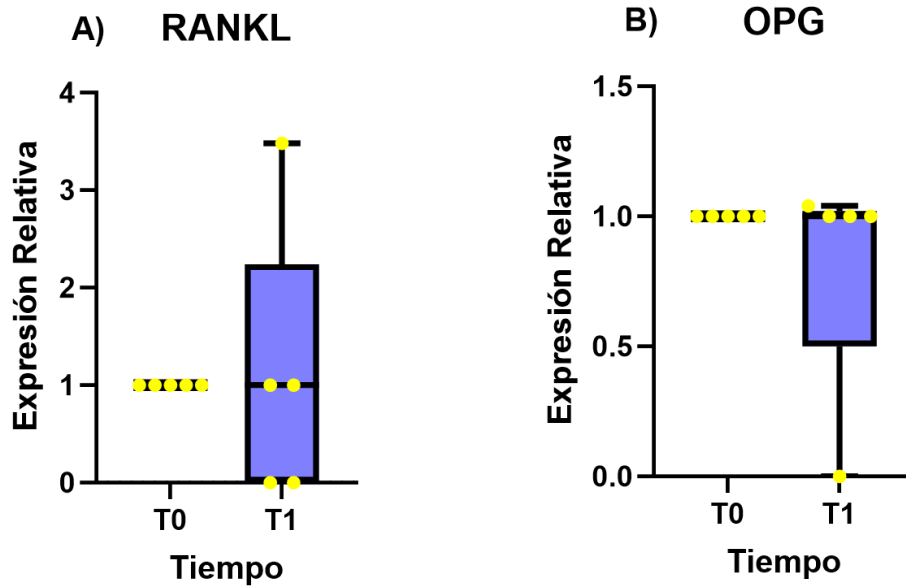
Los puntos amarillos tanto para el gráfico A como B corresponden a los valores individuales obtenidos de la expresión relativa de los biomarcadores de cada paciente en el tiempo específico.

Niveles de expresión relativa de MMP-9 presentes en el líquido sinovial en T0 y T1 obtenidos mediante RT-qPCR (A). Niveles de expresión relativa de TIMP-1 presentes en el líquido sinovial en T0 y T1 obtenidos mediante RT-qPCR (B).

#### 5.4.4 Expresión relativa de RANKL y OPG

Se detectaron niveles de expresión de mRNA de RANKL y OPG en la muestras obtenidas de líquido sinovial. La expresión de RANKL en T0 en comparación con la expresión de RANKL en T1 (1,00) no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,99$ )(Fig.8A). La expresión relativa de OPG en T0 en comparación con su

expresión relativa en T1 (1,00) no obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (valor  $p > 0,99$ ) (Fig.8B).



**Figura 8. Cuantificación de expresión relativa de RANK-L y OPG.**

T0 corresponde al tiempo inicial, T1 es 6 meses posteriores al tratamiento.

Los puntos amarillos tanto para el gráfico A como B corresponden a los valores individuales obtenidos de la expresión relativa de RANKL y OPG de cada paciente en el tiempo específico.

Niveles de expresión relativa de RANKL presentes en el líquido sinovial en T0 y T1 obtenidos mediante RT-qPCR (A). Niveles de expresión relativa de OPG presentes en el líquido sinovial en T0 y T1 obtenidos mediante RT-qPCR (B).



## 6 DISCUSIÓN:

La osteoartritis es una enfermedad degenerativa clasificada como de baja inflamación en comparación con artritis reumatoide, en la que participan biomarcadores moleculares (Derwich y cols., 2021; Monasterio y cols., 2018; Blanco y cols., 2004; Peña y Fernández, 2007; De Grandmont, 2010).

Para el tratamiento se utilizan infiltraciones de distintos productos, que se aplican solos o en combinación con otras técnicas para mejorar el efecto (Al-Moraissi y cols., 2019; Cardoneanu y cols., 2022; Derwich y cols., 2021; Gutiérrez y cols., 2018). En este contexto surge la necesidad de ir encontrando nuevos tratamientos y entender el rol que cumplen los distintos biomarcadores moleculares con respecto al desarrollo de la enfermedad.

Es importante destacar que la fibrina rica en plaquetas (FRP) fue desarrollada como una primera fuente de factores de crecimiento autógenos derivados de la sangre del paciente, sin necesidad de un anticoagulante para su elaboración, ya que los anticoagulantes actuarían como supresores en el proceso de cicatrización (Gutiérrez y cols., 2018; Miron y cols., 2017). Estos factores de crecimiento se encontrarían en una matriz tridimensional de fibrina, lo que potenciaría la regeneración de los tejidos (Miron y cols., 2017). El i-FRP corresponde al concentrado plaquetario en el que se obtiene una presentación inyectable o infiltrable (Miron y cols., 2017; Işık y cols., 2022; Işık y cols., 2023a), que no corresponde al FRP-L infiltrable utilizado en el presente estudio. La técnica de obtención del FRP se basa en la migración de los componentes de la sangre por el efecto de la fuerza gravitacional, lo que genera variabilidad en la estructura del concentrado plaquetario obtenido dependiendo de la centrífuga utilizada, aunque se realice bajo el mismo protocolo de elaboración, influye también el radio, angulación del rotor y el tubo utilizado en la centrifugación (Işık y cols., 2023b). Se han reportado diferentes protocolos de centrifugación, principalmente encargados de modificar tiempo y velocidad, produciendo distintos concentrados y por ende resultados clínicos variables (Gutiérrez y cols., 2018; Işık y cols., 2023b; Kosmidis y cols., 2023; Dos Santos y cols., 2023). Se observan mayor presencia de células regenerativas (Işık y cols., 2023a) con mayor cantidad de factores de crecimiento a velocidades

de centrifugación más lentas y cortas en su elaboración (Miron y cols., 2017; Wend y cols., 2017; Işık y cols., 2022; Kosmidis y cols., 2023). Los leucocitos y las plaquetas requieren una reducción de la fuerza centrífuga rotacional para poder conservar los factores de crecimiento. La disminución del número de células es una de las consecuencias de una alta velocidad de centrifugación, pero también se menciona que un alto número de células principalmente de leucocitos influye negativamente en la liberación de los factores de crecimiento (Mariani y cols., 2016).

Los factores de crecimiento encontrados en el FRP-L son VEGF, PDGF, TGF- $\beta$ 1, EGF (factor de crecimiento epidérmico), IGF, HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y FGF (Wend y cols., 2017; Simões-Pedro y cols., 2022; Jasmine y cols., 2021b).

Debido a que la mayor cantidad de investigación científica está orientada a PRP y FRP, es importante conocer la acción de otros concentrados plaquetarios que podrían presentar mejores propiedades terapéuticas, como la FRP-L. Es necesario mencionar que la mayor cantidad de los estudios hablan de la matriz tridimensional de FRP pero en andamios (Dohan y cols., 2009; Jasmine y cols., 2021b; Xu y cols., 2023), existiendo pocos estudios sobre el análisis de la estructura de la FRP-L inyectable. Jasmine y cols. (2021), publicaron un estudio comparativo de las variaciones arquitectónicas y ultraestructurales de la FRP-L y la FRP inyectable, señalando que las fibras de la matriz son más delgadas en su presentación inyectable, por otra parte, la matriz de FRP-L corresponden a fibras gruesas y rugosas que influye en la resistencia y el potencial de captura y liberación de los factores de crecimiento (biodegradabilidad) (Dohan y cols., 2012). El estudio de Wend y cols., comparó tres matrices distintas de FRP-inyectable que fueron elaboradas disminuyendo solamente la fuerza centrífuga relativa, evaluando las propiedades regenerativas, número total de plaquetas y leucocitos y su distribución (Wend y cols., 2017).

Por otro lado, es relevante destacar que los resultados obtenidos para la caracterización celular mediante la citometría de flujo permiten dar cuenta de la cantidad aproximada de células (Linfocitos T, Linfocitos B, células dendríticas y plaquetas) que están presentes en la FRP-L inyectada en los pacientes, lo cual

permite comprobar que efectivamente el tratamiento propuesto en el presente estudio es de un concentrado plaquetario con alto contenido en leucocitos y plaquetas.

Es necesario recordar que la citometría de flujo es un método de análisis para múltiples parámetros de una célula. Se basa en la medición de la fluorescencia asociada a las células que previamente han sido marcadas con anticuerpos monoclonales ligados a fluorocromos. La utilización de estos fluorocromos permite la detección y cuantificación de parámetros celulares, permitiendo una detección sensible (Monteiro y cols., 2002; Barrera y cols., 2004).

Las células deben estar en una suspensión y son introducidas en un sistema hidrodinámico, de modo que son guiadas a fluir en una fila única en el centro de la corriente. Al ser transportadas por el flujo son interceptadas por una luz láser, causando una dispersión de esta luz lo que nos permite cuantificar el tamaño relativo y la complejidad de la célula. Las plaquetas tienen valores inferiores de dispersión de la luz en comparación a otras células de la sangre, debido a su pequeño tamaño. (Monteiro y cols., 2002; Barrera y cols., 2004).

El resultado de esto es lo que se puede observar en los gráficos de puntos de las figuras 1, 2, 3 y 4. En la figura 1 se señala la estrategia de gateo utilizada. La figura 2 nos muestra que efectivamente el FRP-L tiene una gran cantidad de plaquetas y plaquetas que se encuentran activadas.

En las figuras 3 y 4 por otro lado podemos observar que también se lograron identificar células dendríticas, linfocitos T y linfocitos B en distintas cantidades. La importancia de la citometría de flujo en este estudio fue poder identificar las poblaciones celulares que efectivamente se encontraban en la FRP-L.

La FRP-L tendría efectos positivos en el proceso de cicatrización, ya que las plaquetas, fibrina y leucocitos actuarían sinérgicamente. Tiene un gran potencial de regeneración natural, acelerando el proceso de cicatrización de tejidos blandos y duros (Salgado y cols., 2017; Jasmine y cols., 2021b; Xu y cols., 2023; Kosmidis y cols., 2023).

Las plaquetas tienen un papel fundamental en la hemostasia, cuando hay una lesión se adhieren a las estructuras subendoteliales expuestas, las plaquetas son activadas y se agregan unas a otras, formando así una parte esencial del tapón hemostático primario (Monteiro y cols., 2001; Jasmine y cols., 2021b).

Es importante destacar que no existe un protocolo establecido para caracterizar los concentrados plaquetarios, por lo tanto, al momento de comparar los resultados del presente estudio con otros señalados en la literatura tiene una gran complejidad. Solamente hay un estudio de caracterización de distintas FRP-i según protocolo de elaboración que corresponde al estudio de Wend y cols. del año 2017.

Con respecto a los resultados obtenidos del RT-qPCR de FRP-L también es posible coincidir con lo mencionado por Simões-Pedro y cols. (2022), que efectivamente hay presencia de factores de crecimiento en la FRP-L. Se observa en la Tabla 4 que se encuentran en distintos niveles de expresión debido a que provienen de diferentes individuos.

La importancia de los factores de crecimiento según la literatura es que cumplen una función relevante principalmente en la regeneración de los tejidos. Por este motivo era fundamental tener en consideración las características celulares y moleculares de la FRP-L con el objetivo de comprender posteriormente la respuesta al tratamiento.

El coágulo natural que forma la FRP-L produce una matriz de fibrina que permite la proliferación y migración tisular, la aposición de la matriz y el remodelado (Salgado y cols., 2017; Wend y cols., 2017; Albilá y cols., 2020; Jasmine y cols., 2021b; Işık y cols., 2023b; Kosmidis y cols., 2023; Xu y cols., 2023)

El TGF- $\beta$  es liberado y activa los queratinocitos y el PDGF-a y PDGF-b, IL-1, FGF y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a). Estas estimulan a los fibroblastos para producir colágeno para angiogénesis y bloquean la actividad de proteasas bacterianas (Mariani y cols., 2016; Wend y cols., 2017; Jasmine y cols., 2021b; Kosmidis y cols., 2023).

Entre los factores liberados por las plaquetas está el VEGF-a, que es promotor de la angiogénesis. Otros factores liberados son el IGF, FGF y CTGF que promueven

la división, proliferación y diferenciación celular, aumento de la síntesis de colágeno, estimulación de la angiogénesis y la eliminación del tejido necrótico, con el objetivo de acelerar la reparación y la regeneración tisular. El atrapamiento de células madres mesenquimales en el coágulo de fibrina permite la reparación vascular y tisular (Schär y cols., 2015; Mariani y cols., 2016; Salgado y cols., 2017; Wend y cols., 2017).

Se estimula la diferenciación y la proliferación de osteoblastos, produciendo la integración y el remodelado óseo (Wend y cols., 2017; Jasmine y cols., 2021b; Kosmidis y cols., 2023). Las proteínas morfogenéticas óseas que se encuentran en la matriz de fibrina son liberadas progresivamente e inducen la producción de hueso debido a que son osteoconductoras (guían el crecimiento de reparación ósea). Finalmente, los linfocitos producen factores de crecimiento y contribuyen al remodelado tisular durante la última fase de la cicatrización. Los factores de crecimiento son liberados en el sitio de forma lenta y mantenida durante un tiempo prolongado (Salgado y cols., 2017; Işık y cols., 2023a; Albilia y cols., 2020; Xu y cols., 2023; Kunze y cols., 2022).

La cuantificación de los biomarcadores de inflamación, regeneración y destrucción tisular presentes en el líquido sinovial de pacientes con OA de la ATM, luego de 6 meses posteriores al fin del tratamiento con FRP-L permitió determinar la expresión relativa de las citoquinas IL-1 $\beta$  (fig. 5A), IL-6 (fig.5B) e IL-17(fig.5C) con respecto a la cuantificación de la expresión de los biomarcadores obtenidas en T0 (tiempo inicial antes del tratamiento).

Algunas investigaciones mencionan que hay una correlación positiva entre la concentración de plaquetas y la expresión de genes anabólicos. También una relación entre la expresión de leucocitos y la expresión de genes catabólicos. Reacciones de defensa podrían ser estimuladas por la presencia de leucocitos y citoquinas, produciendo un efecto beneficioso. Un exceso de leucocitos podría anular la capacidad de los factores de crecimiento para modular las citoquinas proinflamatorias (Cabaro y cols., 2018; Baca-González y cols., 2022).

Como fue mencionado anteriormente los leucocitos tienen funciones muy importantes en la inmunidad y en el proceso de regeneración de los tejidos,

produciendo citoquinas y factores de crecimiento. En este sentido, la FRP-L al incluir un alto contenido en plaquetas y leucocitos podría interferir en la capacidad de los factores de crecimiento para modular las citoquinas proinflamatorias generando así una mayor respuesta inflamatoria, si bien se observa mayor respuesta inflamatoria en un paciente, esto no se logró determinar para toda la población del estudio, por lo tanto, no podemos decir que para este estudio se comprueba lo anteriormente mencionado. Ya que no hay diferencias significativas con respecto al aumento de la expresión relativa de citoquinas entre T0 y T1 (Figura 5).

IL-1 $\beta$  tiene relevancia en la remodelación ósea, se ha demostrado que esta citoquina activa directamente la señalización de RANK, además de inducir la osteoclastogénesis y la pérdida ósea medida por RANKL. Induce la infiltración de células inflamatorias y estimula la producción de MMP. FRP-L según el estudio de Baca-González y cols. (2022) muestra mayor liberación de la citoquina antes mencionada. La mayor liberación de IL-1 $\beta$  es entre los días 1 y 7 (Schär y cols., 2015).

IL-6 también corresponde a una citoquina proinflamatoria que estimula RANKL, que es indispensable para la diferenciación y activación de los osteoclastos. Su efecto es que en conjunto con IL-1 $\beta$  provocaría resorción ósea (Baca-González y cols., 2022). IL-6 se expresa significativamente en FRP de forma inyectable (Jasmine y cols., 2021). FRP inyectable parece tener el potencial de mejorar la diferenciación celular temprana (Kosmidis y cols., 2023). FRP-i presenta una mayor expresión de esta citoquina proinflamatoria, estimula el sistema inmunológico generando reclutamiento de monocitos, favoreciendo la homeostasis ósea, mejorando la señalización celular y la regeneración de los tejidos (Jasmine y cols., 2021b).

IL-17 corresponde a una citoquina proinflamatoria que actúa a nivel de receptores Th17, se ha demostrado en el estudio de Monasterio y cols.(2018), que hay una alta expresión de esta interleuquina en pacientes con OA, que la vincula a la patogénesis de la enfermedad. Cafferata y cols.(2021), también menciona que si se establece la respuesta inmune patógena de Th17 y la producción de IL-17 mejora la osteoclastogénesis mediada por Th17 y la actividad de resorción ósea en la ATM.

Por otra parte, en este estudio clínico piloto se obtuvieron expresiones de TGF- $\beta$ 1, RANKL, OPG, MMP-9 y TIMP-1. El estudio de TGF-  $\beta$ 1 (Factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1) fue necesario considerarlo debido a que es un factor responsable de la proliferación y diferenciación de los condrocitos, también para la síntesis y degradación de la MEC (matriz extracelular). El factor de crecimiento antes mencionado influye significativamente en la producción de colágeno y glucosaminoglicano que corresponden a componentes de la MEC. TGF- $\beta$ 1 promueve procesos anabólicos en la ATM aumentando la tasa de proliferación celular (osteoblastos, fibroblastos y condrocitos) y la producción de componentes de la MEC. (da Costa y cols., 2017; Salgado y cols., 2017; Wend y cols., 2017; Xu y cols.,2023; Kosmidis y cols., 2023).

Jasmine y cols. (2021), señala que TGF-  $\beta$ 1 en conjunto con PDGF promueven la cicatrización al iniciar la infiltración de fibroblastos. Ying y cols. (2013), demostraron mediante técnicas histológicas el efecto beneficioso de TGF- $\beta$ 1, pero generaba un cartílago más grueso y desorganizado en comparación al normal. Por otra parte, el estudio de Miron y cols.(2017), también destaca que la FRP inyectable a los 7 días mostró niveles de ARNm significativamente más altos de TGF- $\beta$ 1.

Como fue mencionado anteriormente el TGF- $\beta$ 1 participa en el proceso de cicatrización y remodelación de los tejidos, activando a los condrocitos, fibroblastos, favoreciendo la síntesis de colágeno y junto con las Interleuquinas activando la respuestas celulares (Xu y cols., 2023). Los resultados obtenidos en el estudio clínico piloto demuestran que hay una disminución de este factor de crecimiento en T1 (figura 6), en tres de los casos hay una disminución, en un paciente no existe modificación y solamente en uno hay un aumento. Por lo tanto, esto se podría explicar debido a que TGF- $\beta$ 1 tendría una acción en los primeros días del proceso de reparación tisular, por lo tanto, sería recomendable evaluar antes de los 6 meses posteriores a la infiltración de FRP-L. Cuando se infiltra FRP-L debe haber aumentado significativamente TGF- $\beta$ 1 y esto puede provocar un cuadro inflamatorio temporal, cuya duración no supera los 7 días, de modo que, para los 6 meses de control, es decir en T1 si se encuentra en nivel más bajo que en T0, es, aunque no sea significativo, indicador de un estadio de la enfermedad más apagado o

escasamente inflamado y, por ende, menos doloroso, tal como es indicado por Schär y cols., en el año 2015.

Además, es importante señalar que TGF- $\beta$ 1 en normalidad se encuentra en niveles mínimos, en el caso de OA se presenta en niveles menores que en otras patologías de trastorno interno de la articulación (Fang y cols., 1999; van der Kraan, 2018). La liberación máxima de TGF- $\beta$ 1 de la FRP-L se produce en el día 7 (Schär y cols., 2015), por lo tanto, si se considera el tiempo que transcurre para el análisis de la muestra en T1 tiene sentido que los niveles de este factor de crecimiento se encuentren en niveles bajos.

TGF- $\beta$  tienen actividades biológicas que controlan la regulación de la deposición de matriz extracelular, la proliferación, migración y diferenciación celular. Hay 3 isoformas de TGF- $\beta$  1, 2 y 3 (Proetzel y cols., 1995).

La concentración de esta proteína en su forma activa determina la señalización celular y dependerá del número de diferentes receptores en la membrana celular de los diferentes tipos de células.

En fibroblastos las concentraciones bajas de TGF- $\beta$  activan la ruta Smad 2/3 y concentraciones altas estimulan la vía Smad 1/5/8.

El cartílago del ser humano sano contiene gran cantidad de TGF- $\beta$ 1 que normalmente no es accesible fácilmente por los condrocitos. Este es almacenado en grandes cantidades en la matriz del disco articular y la carga mecánica puede activarlo. Van der Kraan en el 2018 encontró niveles elevados de TGF- $\beta$  activo en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y una concentración a la mitad en el caso de pacientes con OA. Las células de los tejidos de las articulaciones que normalmente no están expuestas al TGF- $\beta$  activo están expuestas a altos niveles en las articulaciones con OA. (Van der Kraan, 2018). En el presente estudio clínico piloto se encontraron niveles bajos de TGF- $\beta$ 1 posterior a la aplicación de FRP-L.

Con respecto a la expresión relativa de MMP-9 y TIMP-1 después de 6 meses de tratamiento en el estudio no hubo diferencias significativas con respecto a la expresión obtenida del líquido sinovial previo al tratamiento (T0).



La importancia de este análisis radica en que el grupo de enzimas de metaloproteinasas de la matriz (MMP) cumplen la principal función de realizar la remodelación de la MEC de diferentes tejidos. Estas enzimas son expresadas tanto en procesos fisiológicos como en procesos patológicos. La actividad de estas MMP está controlada por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz (TIMP). En condiciones patológicas se pierde el equilibrio existente entre ellas (Díaz y cols., 2014). No obstante, en los resultados obtenidos no podemos hacer una relación con este desequilibrio y la OA. Los niveles de MMP-9 aumentaron solamente en dos pacientes (figura 7A), con respecto a TIMP-1 en un paciente aumentó y en otros tres disminuyó su expresión con respecto a T0 (figura 7B).

La actividad de MMP es regulada transcripcionalmente por citoquinas, factores de crecimiento y hormonas. Un equilibrio favorable entre la actividad de MMP y la inhibición de los TIMP es esencial para prevenir o detener el progreso de patologías como la artritis (Gardner y Ghorpade, 2003).

Se menciona también en el estudio de Kunze y cols., en el año 2022, sobre el uso de PRP para la regeneración de ligamentos que además de producir un aumento del colágeno tipo I y III, también aumenta la síntesis de matriz extracelular y la remodelación mediante la relación de MMPs y TIMPs.

TIMP-1 es la forma inducible y es regulada positivamente por IL-1B, TGF- $\beta$ 1, IL-6 y EGF (factor de crecimiento epitelial). Está relacionado a una serie de procesos biológicos, la remodelación tisular, la inhibición de la angiogénesis (Gardner y Ghorpade, 2003).

La Gelatinasa A (MMP-9) está en niveles muy bajos en tejidos normales, se encuentra secretada por células dendríticas, hematopoyéticas, neutrófilos, macrófagos, mastocitos, linfocitos y fibroblastos. Además de ser inhibida por TIMP-1 también su actividad es regulada por TIMP-3. La MMP-9 está involucrada en la resorción ósea (Pereira y Cols., 2016).

Los resultados obtenidos (figura 7) no señalan un gran desequilibrio en la relación MMP/TIMP, hay respuestas particulares de cada paciente frente al tratamiento.

Existe posibilidad de que hay en general mayor expresión de MMP-9 que de TIMP-1, no obstante, son confudentes la expresión particular de algunos pacientes. Se desconoce cuál sería la expresión de MMP-9 y TIMP-1 antes de T1 limitando la interpretación de los resultados.

Por otra parte, la expresión de RANKL y OPG en el líquido sinovial T1 tampoco indicó diferencias estadísticamente significativas en comparación con su expresión en T0 (figura 8 A y B).

Cafferata y cols.(2021), mencionan en su estudio que la sobreexpresión de RANKL y OPG es mayor en OA en comparación a otros trastornos temporomandibulares. Los niveles de RANKL, que corresponde a un inductor clave en la diferenciación y actividad de los osteoclastos, son significativamente mayores en OA. El recambio óseo patológico se puede estimar mediante la relación de RANKL/OPG, determinada por la producción de RANKL y OPG mediada osteoblastos y osteocitos.

RANKL se une a su receptor específico RANK, que es expresado por osteoclastos precursores, induce su unión y la diferenciación en osteoclastos maduros que producirán la resorción ósea.

OPG es un inhibidor de la unión de RANKL a su receptor RANK, inhibiendo la cascada de eventos moleculares que llevan a la diferenciación de osteoclastos y en consecuencia impidiendo la resorción ósea. Por este motivo es relevante conocer la relación antes mencionada, ya que regula la tasa de activación de los osteoclastos y los desequilibrios producen efectos negativos y patologías asociadas.

Por lo tanto, RANK, RANKL y OPG son proteínas que tienen un rol conocido en patologías que involucran el tejido óseo. Las concentraciones de estas proteínas están reguladas por factores, en ausencia de inflamación, el balance es beneficioso para OPG. En presencia de inflamación los mediadores químicos como IL-1B, IL-6, entre otros producen balance en favor a la resorción.

En el caso de RANK se menciona que además de estar vinculada con la diferenciación de osteoclastos, también incluye supervivencia de células

endoteliales, maduración y función de células dendríticas, quimiotaxis y reforzar la respuesta de células T (Neyro y cols., 2011; Asquino y cols., 2022).

La comprensión del complejo sistema OPG/RANKL/RANK es fundamental para entender la fisiopatología ósea. Se ha comprobado que los osteoblastos maduros producen altas cantidades de OPG, generando el bloqueo en el transcurso de la osteoclastogénesis e impediría la formación de osteoclastos. Los Osteoblastos inmaduros mediante descensos en la expresión de OPG e incrementos en la expresión de OPGL (factor de diferenciación de los osteoclastos) son capaces de reclutar a los osteoclastos que se encargarían de limpiar el tejido óseo antiguo (Ferrer y cols., 2002).

En el estudio clínico piloto propuesto los niveles de OPG y RANKL no tienen un comportamiento definido claramente en los pacientes. Para el caso de RANKL (figura 8A) en dos pacientes disminuyó la expresión de RANKL posterior al tratamiento (T1), en dos pacientes no se experimentaron cambios entre T0 y T1 y en un paciente existió aumento de RANKL en T1 con respecto a T0, por lo tanto, podría indicar que para ese paciente se está induciendo la diferenciación de los osteoclastos. No se puede señalar que el tratamiento con FRP-L generaría una disminución de la expresión de RANKL y por lo tanto, una disminución de la resorción ósea.

Siguiendo en la misma línea en el caso de la expresión relativa de OPG (figura 8B), no existen diferencias significativas entre la expresión relativa entre T0 y T1. No hubo variación en tres pacientes en la expresión en T0 y T1, en un paciente se ve un leve aumento de OPG y en otro paciente existió la disminución de OPG. Sin embargo, la disminución de OPG no corresponde al mismo paciente que tiene aumento de RANKL (Anexo 3).

La comparación de los biomarcadores moleculares presentes en T0 y T1 no dieron diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, no hemos podido determinar una asociación directa entre lo que ocurre con estos mediadores a nivel de la OA y posterior a su tratamiento.

No existen diferencias significativas de los biomarcadores presentes en el líquido sinovial de pacientes con OA en T1 y T0 para regeneración tisular, inflamación y destrucción tisular.

Si bien en el estudio se pudieron determinar las expresiones relativas mediante la técnica de RT-qPCR no se obtuvo una correlación clara, para entender lo que realmente pasa en la OA y luego del tratamiento. No es posible determinar la eficacia del tratamiento propuesto, ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la respuesta general del tratamiento propuesto.

Como se puede observar en los gráficos que se encuentran en el anexo 3, todos los pacientes expresaron distintos niveles de los biomarcadores antes señalados, en comparación de T0 y T1, para cada uno tampoco hubo resultados estadísticamente significativos. No es algo que pueda ser extrapolado a la población general, debido a que los resultados fueron diferentes entre ellos y el tamaño de la muestra fue pequeño.

Es relevante señalar que todas las participantes del estudio corresponden a mujeres, dos que se encuentran en edades de 20 y 26 años, en comparación con otras 3 pacientes que sus edades se encuentran sobre los 59 años. Estos factores edad y sexo también pueden influir en relación con la expresión de los biomarcadores presentes.

En este sentido es importante señalar la función que tienen algunos niveles hormonales, que serán señalados a continuación.

Las hormonas sexuales influyen en el metabolismo óseo. Los estrógenos en el mantenimiento de la masa ósea tienen un rol y es consecuencia de su interacción con las interleuquinas, inhiben la resorción y estimulan la formación ósea. En este sentido los estrógenos actúan directamente sobre los osteoblastos, modulando la proliferación y diferenciación, aumentando también la secreción de citoquinas que actuarían de forma paracrina estimulando o inhibiendo la actividad de los osteoclastos. También pueden aumentar los niveles de osteoprotegerina (OPG) por lo que tendrían un rol importante en la regulación de la osteoclastogénesis. Estas funciones se verían influenciadas por el hipopostrogenismo tras la menopausia. Los

andrógenos tienen un efecto anabólico, facilitan la acción osteoblástica e inhiben la resorción ósea al disminuir la secreción de citoquinas como IL-6 (Von Bischoffshausen y cols., 2019; Sánchez y cols., 2020; Moncada y cols., 2020).

Estudios señalan que hay una predisposición femenina a la remodelación disfuncional de la ATM y esto puede ser atribuido a las hormonas sexuales en modulación a las respuestas biológicas de los tejidos articulares, principalmente de niveles bajos de estrógenos y prolactina (Sánchez y cols., 2020). Las mujeres que toman anticonceptivos orales tienen una caída de estrógeno al final del ciclo cuando dejan de tomar medicamentos activos y un nivel relativamente bajo de esta hormona en el momento de la menstruación (Von Bischoffshausen y cols., 2019).

Los estrógenos pueden actuar de forma directa sobre monocitos y macrófagos para regular la producción de citoquinas como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , entre otras. IL-1 $\beta$  y IL-6 están presentes en la ATM cuando hay inflamación. IL-1 con TNF-  $\alpha$  promueven la reabsorción del cartílago articular e inhiben la síntesis de proteoglicano (Von Bischoffshausen y cols., 2019).

En este sentido sería importante analizar los niveles hormonales presentes en los pacientes del estudio y esto podría además influir en el tratamiento, también podría indicar las diferentes respuestas moleculares obtenidas en los distintos pacientes según su grupo etario.

Por otra parte, la HPT (hormona paratiroidea) que es producida en las glándulas paratiroides, es una hormona hipercalcemiente. Realiza su acción directamente sobre el hueso, estimulando osteoclastos y favoreciendo la resorción ósea.

También se destaca que la hormona de crecimiento (HG) actúa sobre los receptores de los osteoblastos, estimulando su actividad, lo que produce un aumento en la síntesis de colágeno, osteocalcina y fosfatasa alcalina (crucial en el proceso de mineralización de la matriz intercelular por parte de los osteoblastos). También actúa de forma indirecta con el aumento de la síntesis de factores de crecimiento de la insulina (IGF) por los osteoblastos, lo que favorece su proliferación y diferenciación.

Una limitación con respecto al estudio de la OA es que el tratamiento fue aplicado solamente en mujeres, de ciertos grupos etarios. También la dificultad del procesamiento de la muestra, por ejemplo: lograr una extracción sin contaminación sanguínea, el procesamiento inmediato, en conjunto con la poca cantidad de líquido sinovial que es posible extraer de la ATM y el breve tiempo de seguimiento con respecto al análisis biomolecular, esto dificulta el análisis obtenido. Sin duda, la mayor limitación en la obtención de resultados más esclarecedores ha sido la toma de muestra de líquido sinovial en un mayor número de pacientes y un control de niveles de expresión de biomarcadores más próximo a T0 o después de la segunda infiltración con FRP-L. Una ventaja de este estudio es que al parecer contribuye con la mantención de la expresión relativa de los biomarcadores de inflamación y destrucción tisular, dificultando la progresión de la enfermedad y no afectando negativamente a ninguno de los pacientes.

Según ha sido mencionado en varios estudios tanto in vitro como ensayos clínicos, se destaca la importancia de seguir investigando sobre la función de las respuestas celulares, como influyen los tratamientos utilizados, la estandarización de protocolos de obtención de FRP-L y el seguimiento en el tiempo de los tratamientos aplicados.

Una vez sean publicados todos los resultados del proyecto al que pertenece el presente estudio que incluyen: aspectos clínicos, imagenológicos y calidad de vida, en conjunto con los datos entregados en este trabajo de investigación será posible determinar la eficacia real del tratamiento propuesto para OA de la ATM.

## **7 CONCLUSIONES:**

- 7.1 El tratamiento propuesto no mostró una disminución a nivel de biomarcadores moleculares de inflamación y destrucción tisular, tampoco un aumento de los biomarcadores asociados a regeneración tisular debido a no encontrarse diferencias significativas en los niveles de las citoquinas, presentes en el líquido sinovial entre antes y después del tratamiento.
- 7.2 El tratamiento es eficaz en la mantención de la expresión relativa de los biomarcadores estudiados entre antes y después del tratamiento.
- 7.3 Es necesario aumentar el seguimiento y número de pacientes para determinar la respuesta al tratamiento durante un mayor tiempo y en etapas previas.

## 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abd M, Wang X, Miusi S, Chai J, Mohamed A, Nefissa M, Ghanaati S, Choukroun J, Choukroun E, Zhang Y, Miron R. (2019). Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma. *Platelets*, 30(2), 213–221.

Albilia J, Herrera C, Weisleder H, Choukroun J, Ghanaati S. (2020). Liquid platelet-rich fibrin injections as a treatment adjunct for painful temporomandibular joints: preliminary results. *Cranio : the journal of craniomandibular practice*, 38(5), 292–304.

Al-Hamed FS, Hijazi A, Gao Q, Badran Z, Tamimi, F. (2021). Platelet Concentrate Treatments for Temporomandibular Disorders: A Systematic Review and Meta-analysis. *In JDR Clinical and Translational Research* 6(2):174–183.

Al-Moraissi E, Wolford L, Ellis E, Neff A. (2020). The hierarchy of different treatments for arthrogenous temporomandibular disorders: A network meta-analysis of randomized clinical trials. *J Craniomaxillofac Surg.* 48(1):9-23.

Altobelli E, Angeletti PM, Piccolo D, De Angelis R. (2017). Synovial Fluid and Serum Concentrations of Inflammatory Markers in Rheumatoid Arthritis, Psoriatic Arthritis and Osteoarthritis: A Systematic Review. *Current Rheumatology Reviews*, 13(3):170-179.

Aragón M, Aragón F, Torres L. (2005). Trastornos de la articulación temporomandibular. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 12(7), 429-435.

Arbolea L, Castañeda S. (2013). Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo. *Reumatología Clínica*, 9(5):303–315.

Asquino N., Vigil G., Pereira V., Bueno L., Bologna R. (2022). Reabsorción ósea en la enfermedad periodontal: el papel de rank, rankl y opg. Una revisión de la bibliografía. *Odontoestomatología*, 24(40), e316.

Baca-Gonzalez L, Serrano R, Rancan L, González F y cols. (2022). Plasma rich in growth factors (PRGF) and leukocyte-platelet rich fibrin (L-PRF): comparative



release of growth factors and biological effect on osteoblasts. *Int J Implant Dent.* 8(1):39.

Barrera I, Drago M, Pérez J, Sainz T y cols. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del instituto nacional de enfermedades respiratorias*, 17(1), 42-55.

Blanco M, Bagán J, Fons A, Poveda R. (2004). Osteoartrosis de la articulación temporomandibular: Estudio clínico y radiológico de 16 pacientes. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal.*

Bousnaki M, Bakopoulou A, Koidis P. (2018). Platelet-rich plasma for the therapeutic management of temporomandibular joint disorders: a systematic review. *In International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 47(2): 188–198.

Brignardello-Petersen R. (2018). Intra-articular injections of platelet-rich plasma may improve pain associated with temporomandibular disorders compared with arthrocentesis and arthroscopy. *In Journal of the American Dental Association* 149(2): e52.

Brignardello-Petersen R. (2019). Injection of platelet-rich fibrin probably reduces pain but not trismus when used after arthrocentesis or arthroscopy in patients with temporomandibular joint osteoarthritis. *In Journal of the American Dental Association* 150(5): e57.

Cabaro S, D'Esposito V, Gasparro R, Borriello F y cols. (2018). White cell and platelet content affects the release of bioactive factors in different blood-derived scaffolds. *Platelets.* 29(5):463-467.

Cafferata EA, Monasterio G, Castillo F, Carvajal P, Flores G y cols. (2021). Overexpression of MMPs, cytokines, and RANKL/OPG in temporomandibular joint osteoarthritis and their association with joint pain, mouth opening, and bone degeneration: A preliminary report. *Oral Diseases* 27(4):970–980.

Cardoneanu A, Macovei L, Burlui A, Mihai I y cols. (2022). Temporomandibular Joint Osteoarthritis: Pathogenic Mechanisms Involving the Cartilage and Subchondral

Bone, and Potential Therapeutic Strategies for Joint Regeneration. *Int J Mol Sci.* 24(1):171.

Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P y cols. (2017a). Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *In Journal of Clinical Periodontology* 44(1):67–82.

Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P y cols. (2017b). Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. *In Journal of Clinical Periodontology* 44(2):225–234.

Cevitanes LH, Walker D, Schilling J, Sugai J, Giannobile W y cols. (2014). 3D osteoarthritic changes in TMJ condylar morphology correlates with specific systemic and local biomarkers of disease. *Osteoarthritis and Cartilage* 22(10):1657–1667.

Chung PY, Lin MT, Chang HP. (2019). Effectiveness of platelet-rich plasma injection in patients with temporomandibular joint osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *In Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 127(2):106–116.

da Costa G, Souza R, de Araújo G, Gurgel B y cols. (2017). Does TGF- $\beta$  play a role in degenerative temporomandibular joint diseases? A systematic review. *Cranio : the journal of craniomandibular practice*, 35(4), 228–232.

de Grandmont P. (2010). Osteoartrosis/osteoartritis de la articulación temporomandibular | Revista Internacional de Prótesis Estomatológica.

Derwich M, Mitus-Kenig M, Pawlowska E. (2021). Mechanisms of Action and Efficacy of Hyaluronic Acid, Corticosteroids and Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Temporomandibular Joint Osteoarthritis-A Systematic Review. *Int J Mol Sci*; 22(14):7405.

Díaz A, Méndez D, Martínez E, Orozco J y cols. (2014). Metaloproteinasas de la matriz en Odontología y sus consideraciones desde el campo de la química computacional. *Revista Cubana de Estomatología*, 51(1), 80-92.

Dohan D, Rasmusson L, Albrektsson T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*, 27(3), 158–167.

Dohan D., Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G. (2012). Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(7), 1145–1152.

Dos Santos R, Araújo J, Queiroz M.(2023). Advances in separation methods for the use of platelet-rich fibrin in tissue repair: an integrative review. *General dentistry*, 71(2), 65–69.

Dworkin SF. (1994). Perspectives on the Interaction of Biological, Psychological and Social Factors in TMD. *The Journal of the American Dental Association* 125(7):856–863.

Fang P, Ma X, Ma D, Fu K. (1999). Determination of interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 in synovial fluid aspirates of patients with temporomandibular disorders. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 57(8), 922–929.

Ferrer J, Tovar I y Martínez P. (2002). Osteoprotegerina y Sistema RANKL/RANK: ¿el futuro del metabolismo óseo?. *Anales de Medicina Interna*, 19(8), 5-8.

Focacci R, Valdés C, Moncada G. (2022). Biomarcadores inflamatorios en líquido sinovial de trastornos intraarticulares de la articulación temporomandibular. Revisión sistemática. *International Journal of Interdisciplinary Dentistry*, 15(1), 59-64.

Gardner J, Ghorpade A. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1: the TIMPed balance of matrix metalloproteinases in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 2003 Dec 15;74(6):801-6.

Gil-Martínez A, Paris-Aleman A, López-de-Uralde-Villanueva I, La Touche R. (2018). Management of pain in patients with temporomandibular disorder (TMD): challenges and solutions. *Journal of Pain Research* 11:571–587.

Gutiérrez D, Hinojosa J, Restrepo A, Muñoz A, Velarde N y cols. (2018). Análisis estructural de la fibrina rica en plaquetas y sus aplicaciones en odontología regenerativa. *Univ Odontol.*; 37(79).

Haigler MC, Abdulrehman E, Siddappa S, Kishore R, Padilla M y cols. (2018). Use of platelet-rich plasma, platelet-rich growth factor with arthrocentesis or arthroscopy to treat temporomandibular joint osteoarthritis: Systematic review with meta-analyses. *In Journal of the American Dental Association* 149(11):940-952.e2.

Haraden CA, Huebner JL, Hsueh MF, Li YJ, Kraus VB. (2019). Synovial fluid biomarkers associated with osteoarthritis severity reflect macrophage and neutrophil related inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 21:146.

Işık G, Kenç S, Özveri B, Günbay S y cols.(2022). Injectable platelet-rich fibrin as treatment for temporomandibular joint osteoarthritis: A randomized controlled clinical trial. *J Craniomaxillofac Surg.* 50(7):576-582.

Işık G, Kenç S, Özveri B, Günbay S, Günbay T. (2023a). Does the Use of Injectable Platelet-Rich Fibrin After Arthrocentesis for Disc Displacement Without Reduction Improve Clinical Outcomes?. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 81(6), 689–697.

Işık G, Kenç S, Özveri B, Günbay S, Günbay T. (2023b). Reply: does the use of injectable platelet-rich fibrin after arthrocentesis for disc displacement without reduction improve clinical outcomes?. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 81(8), 938–939.

Iturriaga V, Mena P, Oliveros R, Cerda C, Torres D y cols. (2018). Importancia del Líquido Sinovial en la Articulación Temporomandibular y sus Implicancias en la Patología Articular. *International Journal of Morphology* 36(1):297–302.

- Jara J, Hidalgo B, Velásquez B. (2020). Eficacia del ácido hialurónico en el tratamiento de los trastornos temporomandibulares. Revisión sistemática. *Avances en Odontoestomatología*, 36(1), 35-47.
- Jasmine S, Thangavelu A, Krishnamoorthy R, Alzahrani K y cols. (2021). Architectural and Ultrastructural Variations of Human Leukocyte-Rich Platelet-Rich Fibrin and Injectable Platelet-Rich Fibrin. *J Microsc Ultrastruct*. 9(2):76-80.
- Jasmine S, Thangavelu A, Krishnamoorthy R, Alshuniaber M, Alshatwi A. (2021b). Cytokine Expression Pattern and Protein-Protein interaction network analysis of Leucocyte Rich Platelet Rich Fibrin and Injectable Form of Platelet Rich Fibrin. *Oral and maxillofacial surgery*, 25(2), 223–229.
- Jasmine S, Thangavelu A, Veeravarmal V, Vijayakumar N, Khan J, Ahmad A. (2022). Quantitative assessment of platelet rich fibrin for the repair of extraction socket in a rat model. *International journal of biological macromolecules*, 222(Pt A), 1168–1174.
- Kargarpour Z, Panahipour L, Miron R, Gruber R. (2022). Blood Clots versus PRF: Activating TGF- $\beta$  Signaling and Inhibiting Inflammation In Vitro. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 5897.
- Kosmidis K, Ehsan K, Pitzurra L, Loos B y cols. (2023). An in vitro study into three different PRF preparations for osteogenesis potential. *J Periodontal Res*. 58(3):483-492.
- Kubota E, Imamura H, Kubota T, Shibata T, Murakami KI. (1997). Interleukin 1 $\beta$  and stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 55(1):20–27.
- Kunze K, Pakanati J, Vadhera A, Polce E, Williams B, Parvaresh K, Chahla J. (2022). The Efficacy of Platelet-Rich Plasma for Ligament Injuries: A Systematic Review of Basic Science Literature With Protocol Quality Assessment. *Orthopaedic journal of sports medicine*, 10(2), 23259671211066504.

Mariani E, Canella V, Cattini L, Kon E, Marcacci M, Di Matteo B, Pulsatelli L, Filardo G. (2016). Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma Injections Do Not Up-Modulate Intra-Articular Pro-Inflammatory Cytokines in the Osteoarthritic Knee. *PLoS one*, 11(6), e0156137.

Marín T, Calcei J, Della F, Martínez J, Arias C, Imam M, Khoury M, Laupheimer M, D'Hooghe P. (2023). Review of Dohan Eherenfest et al. (2009) on "Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)". *Journal of ISAKOS : joint disorders & orthopaedic sports medicine*, S2059-7754(23)00545-X.

Miron R, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U y cols. (2017). Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig.* 21(8):2619-2627.

Miyamoto K, Ishimaru JI, Kurita K, Goss AN. (2002). Synovial matrix metalloproteinase-2 in different stages of sheep temporomandibular joint osteoarthritis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 60(1):66–72.

Monasterio G, Castillo F, Rojas L, Cafferata EA, Alvarez C y cols. (2018). Th1/Th17/Th22 immune response and their association with joint pain, imagenological bone loss, RANKL expression and osteoclast activity in temporomandibular joint osteoarthritis: A preliminary report. *J Oral Rehabil.* 45(8):589–97

Moncada G, Millas R, Valdés C. (2020). Morfología y Fisiopatología del Fibrocartílago de la ATM. Revisión sistemática. *International journal of interdisciplinary dentistry*, 13(3), 151-156.

Monteiro M, Martínez M, O'Connor J. (2002). La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: II. Aplicaciones clínicas. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 51(3),87-99.

Monteiro M, O'Connor J, Martínez M. (2001). La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas: (I) Aspectos Estructurales y Funcionales de las Plaquetas. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 50(3), 111-136.

Murphy M, MacBarb R, Wong M, Athanasiou K. (2013). Temporomandibular disorders: a review of etiology, clinical management, and tissue engineering strategies. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 28(6), e393–e414.

Nefla M, Holzinger D, Berenbaum F, Jacques C. (2016). The danger from within: alarmins in arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12(11):669–683.

Neyro J., Cano A. y Palacios S. (2011). Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 3(2),105-112.

Parra I, Salceda KS, Nájera N, López B y cols. (2019). Determinación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T y células natural killer en sangre periférica de individuos sanos por citometría de flujo. *Bol Med Hosp Infant Mex.* ;76(2):66-78.

Peck CC, Goulet JP, Lobbezoo F, Schiffman E, Alstergren P y cols. (2014). Expanding the taxonomy of the diagnostic criteria for temporomandibular disorders. *Journal of oral rehabilitation* 41(1):2-22.

Peña A, Fernández J. (2007). Prevalencia y factores de riesgo de la osteoartritis | Reumatología Clínica. *Reumatología Clínica*.

Proetzel G, Pawlowski S, Wiles M, Yin M, Boivin G, Howles P, Ding J, Ferguson M, Doetschman T. (1995). Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nature genetics*, 11(4), 409–414.

Salgado Á, Salgado Á y Arriba L. (2017). Nuevas tendencias en regeneración tisular: fibrina rica en plaquetas y leucocitos. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 39(2), 91-98.

Sánchez M. y Becerra W. (2020). Osteoartritis (artrosis) de la articulación temporomandibular. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 80(4), 540-553.

Sandoval I, Ibarra N, Flores G, Marinkovic K, Díaz W y cols. (2015). Prevalence of Temporomandibular Disorders According to RDC/TMD in Older People of Santiago, Chile. *In Int. J. Odontostomat* 9(1):73-78.

Schär M, Diaz J, Kohl S, Zumstein M, Nestic D. (2015). Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clinical orthopaedics and related research*, 473(5), 1635–1643.

Schiffman E, Ohrbach R, Truelove E, Look J, Anderson G y cols. (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 † HHS Public Access. *In J Oral Facial Pain Headache* 28(1):6-27.

Siachoque H, Satisteban N, Iglesias-Gamarra A. (2011). Linfocitos T reguladores: subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Revista Colombiana de Reumatología* , 18 (3), 203-220.

Simões-Pedro M, Tróia P, Dos Santos N, Completo A y cols. (2022) Tensile Strength Essay Comparing Three Different Platelet-Rich Fibrin Membranes (L-PRF, A-PRF, and A-PRF+): A Mechanical and Structural In Vitro Evaluation. *Polymers (Basel)*.14(7):1392.

Tantillo TJ, Katsigiorgis G. (2020). Arthrocentesis - StatPearls - Estantería NCBI. StatPearls.

Tik D, Li S, Leung YY, Almeida E. (2021). diagnostics Temporomandibular Disorders: Current Concepts and Controversies in Diagnosis and Management. *Diagnostics* 11:459.

Tvrdy P, Heinz P, Pink R. (2015). Arthrocentesis of the temporomandibular joint: A review. *Biomedical Papers* 159(1): 31–34.

van der Kraan P. (2018). Differential Role of Transforming Growth Factor-beta in an Osteoarthritic or a Healthy Joint. *Journal of bone metabolism*, 25(2), 65–72.



van der Meulen M, Lobbezoo F, Aartman I, Naeije M. (2006). Self-reported oral parafunctions and pain intensity in temporomandibular disorder patients. *Journal of orofacial pain*, 20(1), 31–35.

Vázquez M, Sureda M, Rebollo J. (2012). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *J. Inmunología*. 31(1):21-30.

Vernal R, Velásquez E, Gamonal J. (2007). Respuesta inmune Th1 en la osteoartritis de la articulación temporomandibular. *Av. Odontoestomatol*; 23 (2): 75-81.

Von Bischoffshausen K, Hempel G, Díaz R. (2019). Rol de los estrógenos en la génesis de los trastornos dolorosos músculo-esqueléticos articulares. *Odontoestomatología*, 21(33), 70-80.

Wend S, Kubesch A, Orlowska A, Al-Maawi S, Zender N, Dias A, Miron R, Sader R, Booms P, Kirkpatrick C, Choukroun J, Ghanaati S. (2017). Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 28(12), 188.

Winocur-Arias O, Winocur E, Shalev-Antsel T, Reiter S, Levartovsky S, Emodi-Perlman A, Friedman-Rubin P. (2022). Painful Temporomandibular Disorders, Bruxism and Oral Parafunctions before and during the COVID-19 Pandemic Era: A Sex Comparison among Dental Patients. *Journal of clinical medicine*, 11(3), 589.

Wu M, Cai J, Yu Y, Hu S, Wang Y y cols. (2021). Therapeutic Agents for the Treatment of Temporomandibular Joint Disorders: Progress and Perspective. *Frontiers in Pharmacology* 11:596099:1-17.

Xu J, Ren H, Zhao S, Li Q, Li C, Bao G, Kang H. (2023). Comparative effectiveness of hyaluronic acid, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in treating temporomandibular disorders: a systematic review and network meta-analysis. *Head & face medicine*, 19(1), 39.

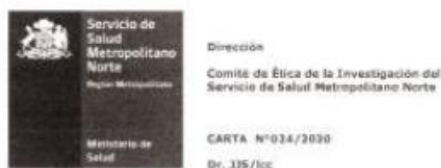
Ying B, Chen K, Hu J, Man C y cols. (2013a). Effect of different doses of transforming growth factor- $\beta_1$  on cartilage and subchondral bone in osteoarthritic temporomandibular joints. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 51(3):241-6.

Zeng, G. Q., Chen, A. B., Li, W., Song, J. H., & Gao, C. Y. (2015). High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genetics and molecular research : GMR*, 14(4), 14811–14822.

Zotti F, Albanese M, Rodella LF, Nocini PF. (2019). Platelet-rich plasma in treatment of temporomandibular joint dysfunctions: Narrative review. *In International Journal of Molecular Sciences* 20(2):277.

## 9. ANEXOS:

### Anexo 1: Aprobación del Comité de Ética de la Investigación del Servicio de Salud Metropolitano Norte.



Santiago, octubre 05 de 2020

Prof. Dr. Aler Fuentes  
Investigador Principal  
Facultad de Odontología  
Universidad de Chile  
Presente

Ref.: Proyecto de Investigación: "Evaluación del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos en pacientes con osteoartritis de la articulación temporomandibular".

Estimado Dr. Fuentes:

Habiéndose recibido el documento de Consentimiento Informado modificado de acuerdo a lo indicado por este Comité se procede a entregar aprobación definitiva al proyecto de la referencia y al Consentimiento Informado, versión 03 de julio de 2020.

Esta aprobación es válida por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha. En caso de requerir tiempo más allá de ese plazo, se deberá solicitar una extensión del mismo.

El CEI-SSMN solicita al Investigador Responsable notificar a este Comité en un plazo no mayor a tres días cualquier evento adverso severo. Asimismo, el comité solicita presentar un informe semestral sobre el progreso del estudio.

Adjunto a la presente sirvase encontrar documento de Consentimiento Informado timbrado, fechado y firmado por el suscrito y del cual hemos conservado copia en nuestros archivos.

Asimismo, se adjuntan Listado de Integrantes del CEI-SSMN, Declaración de Buenas Prácticas Clínicas y carta dirigida a Investigadores Principales en relación a enrolamiento de pacientes.


Lo saluda atentamente,

**CEI-SSM.NORTE**  
Organismo Asesor de la Dirección  
Servicio de Salud  
Metropolitano Norte

DR. JUAN JORGE SILVA SOLÍS  
PRESIDENTE - CEI-SSMN

Calle San José, 1055, Independencia,  
Santiago, Chile  
johana.carrasco@redsalud.gov.cl  
Fono: (56-2) 2575 8200  
www.ssmn.cl

## Anexo 2: Consentimiento informado.



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

versión 03 julio 2020

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CON TOMA DE MUESTRA DE SANGRE Y DE LÍQUIDO SINOVIAL**

Este documento de consentimiento puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pregunte al investigador encargado para que le explique cualquier palabra o información que usted no comprenda claramente.

**Investigador Principal:** Aler Fuentes del Campo. Cirujano dentista. Teléfono: +56 229786420.  
Correo electrónico: aler.fuentes@odontologia.uchile.cl

**Título del proyecto:** "Evaluación del tratamiento con fibrina rica en plaquetas y leucocitos en pacientes con osteoartritis de la articulación temporomandibular".

**Sede del Estudio:** Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Olivos 943, Independencia, Santiago.  
Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea cuidadosamente este formulario de consentimiento.

**1. Introducción**  
Usted ha sido invitado a participar en un estudio piloto de investigación, bajo la supervisión del Dr. Aler Fuentes del Campo de la Universidad de Chile. Antes de que usted decida participar en el estudio por favor lea este consentimiento cuidadosamente y discuta cualquier inquietud que usted tenga con el investigador. Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar la decisión. Haga todas las preguntas que estime convenientes, para asegurarse que entiende los procedimientos del estudio. Toda información personal será confidencial y no será divulgada. Los datos serán codificados y sólo se usarán para este estudio, según manda la ley 19.628 sobre protección de datos de carácter personal y disposiciones aplicables al secreto profesional. No firme este consentimiento a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer todas las preguntas que desee y recibir respuestas satisfactorias a ellas.

**2. Propósito del estudio**  
El propósito de este estudio es analizar el grado de mejoría de los pacientes con osteoartritis de la articulación temporomandibular (articulación de la mandíbula, ATM) y su relación con la mejoría de los tejidos y disminución de la respuesta inflamatoria. El objetivo principal del estudio es evaluar el tratamiento con inyecciones intra-articulares de fibrina rica en plaquetas y leucocitos (concentrado de células que se obtiene de su sangre). Esto podrá permitir realizar un tratamiento más eficaz de esta enfermedad, disminuyendo significativamente el dolor y mejorando las estructuras y funcionalidad de la ATM. Este estudio se realizará en dependencias de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en particular en la Clínica Odontológica. Usted fue seleccionado/a por poseer características compatibles necesarias para este estudio.

**3. Participantes**  
El estudio es completamente voluntario y usted puede abandonarlo en cualquier momento. En este estudio piloto participarán 5 personas adultas de ambos sexos, los cuales recibirán, como tratamiento de la osteoartritis, inyecciones en la ATM de fibrina rica en plaquetas y leucocitos. Este tratamiento ha demostrado ser eficaz en enfermedades que comprometen hueso y tejidos blandos.

**4. Procedimientos**  
Si usted desea participar se le realizarán los siguientes procedimientos:

- a) **historia y examen clínico:** se realizará una entrevista clínica con el fin de conocer su historial de salud. Se realizará un examen clínico de ambas ATM para determinar que posee osteoartritis.
- b) **evaluación de su calidad de vida:** usted completará un cuestionario para determinar el grado de afectación que le provoca el poseer osteoartritis en la ATM.

- c) **examen por imágenes (cone beam):** se realizará un examen por imagen radiológica para confirmar que posee osteoartritis de la ATM.
- d) **toma de muestra de sangre:** Se realizará para procesar la sangre y obtener el concentrado de células a inyectar dentro de su ATM como tratamiento de su enfermedad. Se extraerán 9 ml de sangre por ATM afectada mediante el método estándar por punción en el brazo izquierdo, realizado por una enfermera en las dependencias y según las normas de la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile.
- e) **toma de muestra de líquido sinovial e inyección:** Se tomará una muestra de líquido sinovial, el cual se encuentra dentro de su articulación. El procedimiento es ambulatorio y será realizado por un cirujano maxilofacial en un pabellón de la Clínica Odontológica de la Universidad de Chile. Se limpiará la zona de la piel con solución desinfectante y se aplicará anestesia local. Posteriormente se realizarán dos punciones en la zona para extraer una muestra de líquido de su ATM, con la finalidad de conocer las moléculas inflamatorias y de destrucción de tejidos que se encuentran dentro de su articulación. Luego se inyectarán 3 ml del preparado de su propio concentrado de células sanguíneas dentro de su articulación, como tratamiento de su osteoartritis. Finalmente, se le aplicarán medicamentos para disminuir las molestias post operatorias, con dipirone 1 gr. endovenosa y/o paracetamol 1 gr. cada 8 horas, de acuerdo a la indicación del especialista. En caso de usted tener antecedentes de alergia a la anestesia, antibióticos o analgésicos, debe informarlo inmediatamente al profesional tratante.

Todos los procedimientos (excepto la toma de muestra de sangre e inyecciones) serán realizados al inicio y luego de 6 meses finalizado el tratamiento. La toma de muestra de sangre e inyecciones en la articulación serán realizadas 2 veces en total, al inicio del tratamiento y luego de un mes.

#### 5. Criterios de inclusión

Para ser incluido en el presente estudio usted debe ser mayor de edad y presentar osteoartritis en una o ambas ATM.

#### 6. Criterios de exclusión

No podrá participar en el presente estudio si se encuentra en tratamiento de ortodoncia (frenillos) o en tratamiento de su articulación, tampoco haberse sometido a cirugía de la articulación o presentar otra patología en la articulación. No debe estar embarazada o en período de lactancia. No debe tener diagnóstico de artritis reumatoide, diabetes mellitus, alteraciones de la sangre, de los vasos sanguíneos, enfermedad autoinmune o presentar alergia a la anestesia, antibióticos o analgésicos como dipirone o paracetamol.

#### 7. Riesgos o incomodidades

Usted puede experimentar una ligera molestia o hematoma en la zona de la extracción de sangre. Debido a que la cantidad de sangre a extraer es pequeña, la posibilidad de que experimente mareos o sensación de debilidad general pasajera es baja.

Luego de la extracción de líquido de la ATM y/o de la inyección intra-articular puede existir dificultad en los movimientos de la mandíbula en las primeras 48 horas, para lo cual recibirá las indicaciones de los especialistas tratantes.

En caso de ocurrir efectos adversos producidos por el tratamiento de su ATM, estos serán tratados en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y costeados por el presente proyecto.

#### 8. Manejo y difusión de la información

Los datos obtenidos serán anonimizados, tabulados y almacenados por el investigador responsable en la Universidad de Chile y sólo serán utilizados para la presente línea de investigación.

Las muestras de sangre y de líquido sinovial también serán utilizadas única y exclusivamente para los fines descritos en la presente línea de investigación y serán destruidas una vez utilizadas. A su muestra de líquido sinovial se le asignará un código numérico, con el fin de evitar que la persona que trabaje con su muestra conozca su identidad.

Los resultados de la presente investigación como las imágenes de la ATM podrán ser usados en

CEI-SSM NORTE  
Organismo Asesor de la Dirección  
Servicio de Salud  
Metropolitano Norte

*Mus*

03 JUL 2023

presentaciones a congresos científicos o publicados en revistas científicas nacionales o internacionales, garantizando en todo momento el anonimato de todos los participantes.

#### 9. Beneficios para usted y la sociedad

Si usted decide participar voluntariamente en el estudio, se le realizarán los procedimientos y el tratamiento previamente descrito para la osteoartritis de su ATM, sin costo económico para usted. Usted no recibirá remuneración por participar en el presente estudio. Al participar estará haciendo una libre y generosa contribución para la investigación que podrá ser beneficiosa para futuros pacientes con osteoartritis u otras patologías degenerativas del hueso y tejidos blandos.

En caso de que se observe alguna otra patología se le informará a usted y se derivará de acuerdo a su sistema de salud para recibir el tratamiento correspondiente.

#### 10. Seguimiento

Para proteger sus derechos, la Facultad de Odontología podría en algún momento inspeccionar los registros con los datos suministrados por usted para este proyecto (no por nombres, sino utilizando solamente códigos numéricos). Esto con el fin de asegurarse que sus derechos han sido protegidos.

#### 11. Aclaraciones

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o si experimenta cualquier problema, puede llamar al investigador principal Dr. Aler Fuentes del Campo al teléfono +56229786420.

#### 12. CONSENTIMIENTO

He leído y comprendido la información de estas hojas de consentimiento. Todas mis preguntas sobre el estudio y mi participación han sido atendidas y respondidas satisfactoriamente.

Al firmar esta hoja de consentimiento, no he renunciado a ninguno de mis derechos legales.

Doy mi consentimiento al investigador y sus colaboradores para participar en la presente investigación la realización de los procedimientos y tratamiento previamente descrito, así como el uso y la divulgación de la información obtenida, para los propósitos descritos en este consentimiento.

<b>Nombre de Participante</b>	<b>Firma de Participante</b>
RUT: _____	Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador que toma el consentimiento informado y por el director del establecimiento.

He explicado al Sr(a,ta) \_\_\_\_\_ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

<b>Nombre de Investigador</b>	<b>Firma de Investigador</b>
RUT: _____	Fecha: _____

<b>Nombre de Director del establecimiento</b>	<b>Firma de Director del establecimiento</b>
RUT: _____	Fecha: _____

El presente documento consta de 3 hojas.

3


  
**CEI-SSM NORTE**  
 Organismo Asesor de la Dirección  
 Servicio de Salud  
 Metropolitana Norte  
 03 JUL 2020

### Anexo 3: Expresión relativa por paciente de citoquinas, TGF- $\beta$ 1, MMP-9, TIMP-1, RANKL y OPG obtenida mediante RT-qPCR de líquido sinovial en pacientes con OA.

La primera barra del gráfico para cada paciente corresponde a la expresión relativa en T0 (tiempo inicial) y la segunda barra correspondiente para cada paciente señala la cuantificación en T1 ( 6 meses posterior al tratamiento). La expresión relativa en T0 fue considerada como valor 1 para cada paciente.

