



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS

*“EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E
HISTOLÓGICAS DEL DISCO INTERARTICULAR DE ATM SOMETIDO A ESTRÉS
MECÁNICO”*

PRESENTA

Roxanne Mirella Olvera Farias.

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTOR(ES):

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera.

Dr. Raúl Rosales Ibáñez.

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Juan Bautista Kouri Flores.

Aguascalientes, Ags, Junio 2016



M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente hacemos constar que la estudiante **ROXANNE MIRELLA OLVERA FARIAS** con ID 146109 quien realizó la tesis titulada: "**EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E HISTOLÓGICAS DEL DISCO INTERARTICULAR DE ATM SOMETIDO A ESTRÉS MECÁNICO**", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, el comité tutorial le brindamos nuestro **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento.

A T E N T A M E N T E

Aguascalientes, Ags., a 18 de mayo de 2016.

"SE LUMEN PROFERRE"

Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera
Tutora de tesis

Dr. Raúl Rosales Ibáñez
Tutor de Tesis

Dr. Juan Bautista Kouri Flores
Asesor

A handwritten signature in black ink, written over three horizontal lines. The signature is highly stylized and cursive.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

ROXANNE MIRELLA OLVERA FARIAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E.

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**Evaluación de las características morfológicas e histológicas del Disco Interarticular de ATM sometido al estrés mecánico**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 19 de mayo de 2016

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J Ruiz Gallegos'.

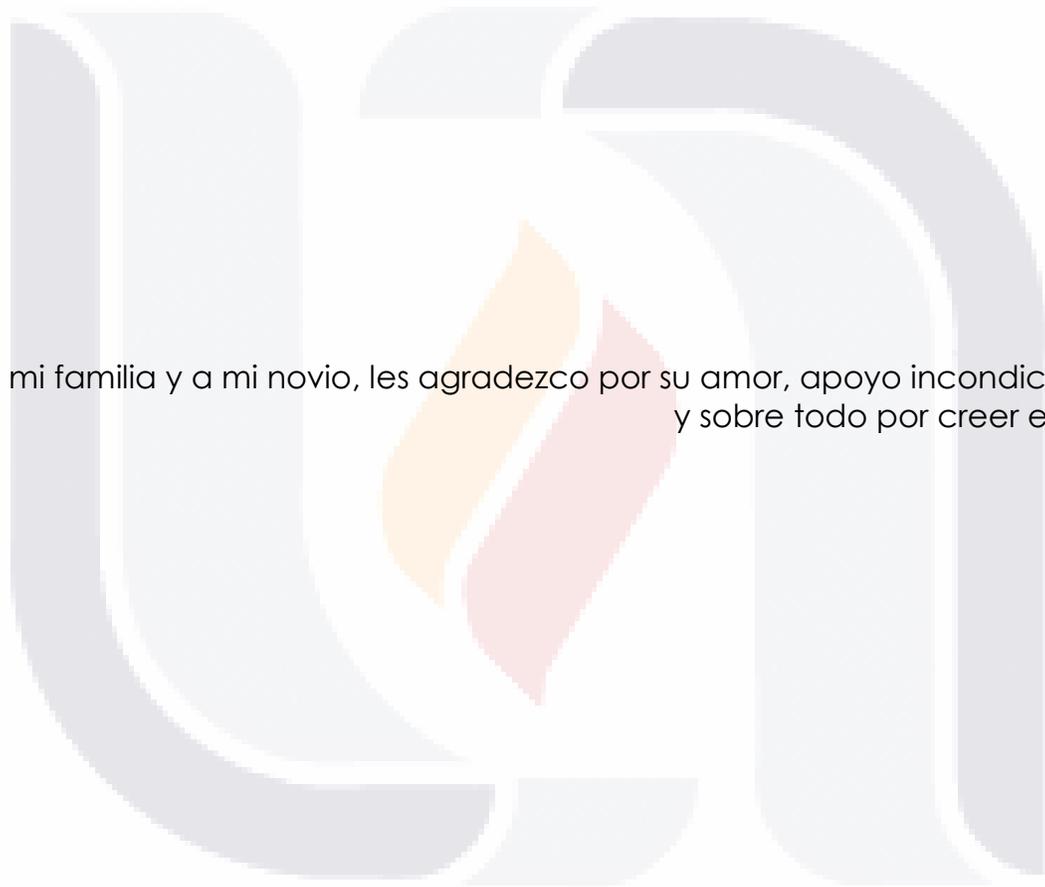
M. en C. **JOSE DE JESUS RUIZ GALLEGOS**

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y al CINVESTAV-IPN donde pude realizar mis estudios teóricos y experimentales para concluir con éxito el Doctorado en Ciencias Biológicas. Estoy agradecida CONACYT por la beca (No. 256312) que me ayudó a desarrollar mi proyecto de investigación. Reconozco el gran apoyo que recibí por parte del Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) como becaria PROMEP UASLP-243 (convenio: PROMEP/103.5/11/5518).

Agradezco al Dr. Raymundo Cruz Pérez quien pertenece al grupo de investigadores del CINVESTAV-IPN en la ciudad de México. A pesar de la distancia siempre estuvo involucrado en el desarrollo de mi tesis. Tuve la gran oportunidad trabajar junto con él para realizar algunos experimentos donde me compartió su gran experiencia y conocimientos. Trabajé en la parte estadística con el Dr. Rogelio Salinas Gutiérrez y el Dr. José Antonio Guerrero Díaz de León para desarrollar un método de cuantificación de color. Gracias a mi comité tutorial integrado por Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera, Dr. Raúl Rosales Ibáñez y Dr. Juan Bautista Kouri Flores quienes hicieron un excelente trabajo para guiar de principio a fin mi investigación. A mis amigos dentro del laboratorio Keila, Moni, Manuel, Flor, Abraham, Adri, Lupita, Mauricio, Saúl, Carlos, Febe y Fabry que hicieron que todo pareciera más fácil. A mis amigos hidrocálidos: Aurelio y Lety que siempre me hicieron sentir como en casa. A mis grandes amigas: Gaby, Liz, Raque, Azzy, Tere, Ane y Edelmira gracias por ser tan lindas conmigo y por estar siempre ahí para mí. Especialmente quiero agradecer a mis papás, a mi hermano Arturo y a mi novio por luchar junto conmigo contra los momentos difíciles... Les entrego un logro más.

DEDICATORIA



A mi familia y a mi novio, les agradezco por su amor, apoyo incondicional
y sobre todo por creer en mi.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR (ATM).	10
1.2 FIBROCARTÍLAGO DE LA ATM Y SU COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA.	12
1.3 CONDROCITOS: CÉLULAS ESENCIALES DEL CARTÍLAGO.	16
1.4 PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DEL CARTÍLAGO.	18
1.5 RELACIÓN DE LA ATM CON LA OCLUSIÓN DENTAL.	20
1.6 TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES (TTM).	22
1.7 OSTEOARTRITIS (OA) EN LA ATM.	25
1.8 MECANISMO DE DESGASTE DEL CARTÍLAGO DE ATM Y OA.	26
1.9 CAMBIOS MICROSCÓPICOS EN EL TEJIDO CARTILAGINOSO OCASIONADOS POR ESTRÉS MECÁNICO.	29
2. JUSTIFICACIÓN	31
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	33
4. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	33
5. OBJETIVOS	34
5.1 GENERAL	34
5.2 ESPECÍFICOS	34
6. METODOLOGÍA	34
6.1 TIPO DE ESTUDIO	34
6.2 LUGAR DE REALIZACIÓN	34

6.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN	35
6.4 VARIABLES INDEPENDIENTES Y DEPENDIENTES	35
6.4.1 <i>Independientes.</i>	35
6.4.2 <i>Dependientes.</i>	36
6.5 GRUPOS DE ESTUDIO.	37
6.6 PROCEDIMIENTOS DENTALES.	38
6.6.1 <i>Desgaste oclusal</i>	38
6.6.2 <i>Interferencia oclusal con resina.</i>	39
6.7 TÉCNICA QUIRÚRGICA PARA LA OBTENCIÓN DE DISCO ARTICULAR DE ATM (Experimentos de prueba).	40
6.8 TÉCNICA QUIRÚRGICA PARA LA OBTENCIÓN ATM EN BLOQUE.	41
6.9 DESCALCIFICACIÓN DE LOS BLOQUES DE ATM.	42
6.10 PREPARACIÓN DE LOS BLOQUES DE ATM PARA REALIZAR CORTES HISTOLÓGICOS.	42
6.11 CORTES HISTOLÓGICOS.	43
6.12 SILANIZADO DE PORTAOBJETOS.	44
6.13 DESPARAFINACIÓN DE LAMINILLAS.	44
6.14 TÉCNICA DE WESTERN BLOT.	45
6.15 TINCIÓN PENTACRÓMICA DE RUSSEL-MOVAT.	47
6.16 INMUNOFLUORESCENCIA.	48
6.17 TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA.	50
6.18 TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON.	50
6.19 ANÁLISIS DE IMÁGENES.	51
6.20 CUANTIFICACIÓN CELULAR DEL DISCO ARTICULAR Y DE LA ZONA SUPERFICIAL DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE ATM.	53
6.21 DETERMINACIÓN DEL GROSOR DE DISCO ARTICULAR Y ZONA SUPERFICIAL DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE ATM.	53
6.22 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	53
7. RESULTADOS	54
7.1 TINCIÓN PENTACRÓMICA RUSSEL-MOVAT.	54

7.2 INMUNOFLUORESCENCIA DE DISCO ARTICULAR DE ATM.	55
7.3 WESTERN BLOT DE DISCO ARTICULAR DE ATM	56
7.4 MORFOLOGÍA TISULAR (TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA, Y TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON).	57
7.4.1 GRUPO CONTROL (<i>Disco articular y Cóndilo de la ATM</i>)	58
7.4.2 GRUPO 1R-TX	60
7.4.3 GRUPO 1R-CL	60
7.4.4 GRUPO 1D-TX	60
7.4.5 GRUPO 1D-CL	61
7.4.6 GRUPO 15R-TX	61
7.4.7 GRUPO 15R-CL	61
7.4.8 GRUPO 15D-TX	62
7.4.9 GRUPO 15D-CL	62
7.5 CUANTIFICACIÓN CELULAR EN EL DISCO ARTICULAR Y CARTÍLAGO DE ATM.	63
7.6 MEDICIÓN DEL GROSOR DEL DISCO ARTICULAR Y ZONA SUPERFICIAL DEL CARTÍLAGO DE ATM.	66
7.7 CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENO EN CORTES CON TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON.	69
8. DISCUSIÓN	71
9. CONCLUSIONES	78
10. BIBLIOGRAFÍA	80
11 ANEXOS	93
11.1 Anexo 1. OBSERVACIONES DEL EXÁMEN PREDOCTORAL	93
11.2 Anexo 2. ANÁLISIS DE IMAGEN	94
11.3 Anexo 3. ARTÍCULO PUBLICADO	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de un corte sagital de ATM humana.	10
Figura 2.	Modelo experimental de Desgaste Unilateral de Molares superiores.	38
Figura 3.	Modelo experimental de Interferencia Oclusal con Resina.	39
Figura 4	Técnica quirúrgica para la obtención de disco articular y ATM.	40
Figura 5.	Obtención de bloques de ATM y su descalcificación.	42
Figura 6.	Procesamiento de Tejidos para cortes histológicos.	43
Figura 7.	Curva de Calibración con ABS para cuantificación de proteínas.	45
Figura 8.	Selección de zona de evaluación en un corte sagital de la ATM (4X).	51
Figura 9.	Espacios de color aplicados a un corte sagital de ATM.	52
Figura 10.	Tinción Pentacrómica de Russel-Movat.	54
Figura 11.	Inmunofluorescencia de disco articular de ATM.	55
Figura 12.	Western Blot de disco articular de ATM.	56
Figura 13.	Análisis Histológico del Disco Articular.	58
Figura 14.	Análisis Histológico del Cartílago Articular de ATM	59
Figura 15.	Análisis Cuantitativo del número de células en el disco articular de ATM.	63
Figura 16.	Análisis Cuantitativo del número de células en la zona superficial del cartílago articular de ATM.	64
Figura 17.	Análisis de los cambios en el grosor del disco articular de ATM en la zona media.	66
Figura 18.	Análisis de los cambios en el grosor de la zona superficial del cartílago articular de ATM en la zona media.	67
Figura 19.	Tinción tricrómica de Masson de cortes de ATM.	69
Figura 20.	Cuantificación de la cantidad de colágeno basada en la intensidad de azul en la escala RGB.	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de Estudio.	37
Tabla 2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	46
Tabla 3. Anticuerpos empleados para Western Blot y sus diluciones.	47
Tabla 4. Anticuerpos empleados para Inmunofluorescencia y sus diluciones.	49



ABREVIATURAS

Articulación Temporomandibular (**ATM**)

Trastornos temporomandibulares (**TTM**)

Matriz extracelular (**MEC**)

Osteoartritis (**OA**)

Glucosaminoglucano (**GAG**)

Ácido Hialurónico (**HA**)



RESUMEN

La articulación temporomandibular (**ATM**) es sensible al estrés mecánico, el cual genera cambios morfológicos por el impacto sobre el plano oclusal. En el presente trabajo el efecto del impacto mecánico fue evaluado en el disco articular y cartílago articular de la articulación temporomandibular utilizando un modelo *in vivo* de alteración del plano oclusal, mediante el análisis de secciones seriales del tejido teñidas con Hematoxilina-Eosina o con la técnica tricrómica de Masson. Se evaluaron 6 grupos de 5 ratas Wistar cada uno, que fueron sujetas a estimulación dental biomecánica mediante la colocación de una interferencia de resina unilateral o por desgaste dental unilateral de los molares superiores izquierdos (cada grupo experimental se dividió en dos lado tratado, TX; y lado contralateral, CL). Cada tratamiento fue evaluado a 1 y 15 días. Los resultados con H-E, mostraron en el grupo control un arreglo de condrocitos en grupos de varios cordones celulares en comparación con los grupos experimentales los cuales mostraron un arreglo de un solo cordón celular a lo largo del disco articular. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el número de células entre el grupo control y los grupos experimentales. En contraste, en el cartílago articular de ATM los condrocitos se distribuyeron aleatoriamente a lo largo de la zona superficial en el grupo control, a diferencia de los grupos experimentales donde se localizaron zonas libres de células y agrupaciones celulares en la zona superficial. Se realizó un análisis de las imágenes teñidas con tricrómica de masson para cuantificar colágena. Este análisis mostró una disminución significativa ($p < 0.05$) en casi todos los grupos experimentales con respecto al control. El proceso biomecánico degenerativo inducido por la modificación del plano oclusal, provocó cambios celulares y tisulares de las estructuras de la articulación temporomandibular que son considerados cambios degenerativos observados en osteoartritis temprana.

ABSTRACT

Temporomandibular joint (TMJ) is sensitive to loading and mechanical stress that provoke morphological changes produced by the impact in the occlusal plane. In the present work, this impact is evaluated in TMJ articular disc and articular cartilage using an *in vivo* model of unilateral occlusal plane impact and by analysis of serial tissue sections stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) or with Masson trichrome technique. Thus, six groups of 5 Wistar rats were subjected to biomechanical dental stimulation by placing unilaterally a resin occlusal interference, or unilateral tooth wear performed in the upper left molars by artificial mechanical devastation (each experimental group were divided in two: treatment side, TX; and contralateral side, CL). Each treatment was evaluated two times at 1 and 15 days post-treatment. By H-E staining, control group showed chondrocytes arrangement as several cord cell groups in comparison with the experimental groups, which showed an arrangement in one cord cell along of articular disc. However, this yielded no difference in the number of cells between control and experimental groups. In contrast, in articular cartilage chondrocytes were random distributed along the superficial zone in control group, while in experimental groups free-cell regions were observed in the superficial zone. An image Blue hue analysis for trichrome stain was performed to quantify collagen, this showed a significant collagen decrease ($p < 0.05$) in almost all experimental groups compared with the control. A degenerative process biomechanically induced by unilateral occlusal plane modification, causes cell and tissue changes on the TMJ structures that remain the degenerative changes observed in early osteoarthritis.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. INTRODUCCIÓN

Los trastornos temporomandibulares (**TTM**) son enfermedades orofaciales muy comunes producidas por alteraciones de la articulación temporomandibular (**ATM**). La prevalencia mundial varía en la población de un 7 a 84% con un rango de edad de 3 a 74 años (Luther, 2007). Afecta al 33% de la población en USA (De Laat and Macaluso, 2002; Manfredini et al., 2010) las cuales muestran similitudes con los desórdenes músculo-esqueléticos de otras partes del cuerpo (Michalak et al., 2013). La prevalencia de TTM varía del 2% en pacientes turcos a un 68% en adultos jóvenes polacos (Sánchez-Pérez et al., 2013). En México la prevalencia es alta con un 46.1% -49.25%, donde las personas jóvenes son los más afectados (26.1%) y en una proporción de 3:1 en mujeres (Sánchez-Pérez et al., 2013; Casanova-Rosado et al., 2006).

La ATM se deteriora con la edad, cambios internos y trauma, provocando dolor y TTM. Su etiología incluye la alteración del plano oclusal por la generación de cargas anormales como tratamientos prostodónticos y ortodónticos, bruxismo y maloclusiones (Celenza and Nasedkin, 1978; Choi et al., 2012). Los TTM son un grupo de condiciones heterogéneas intra-articulares, periarticulares y sistémicas caracterizadas por una disfunción del sistema masticatorio y dolor (Manfredini et al., 2010).

La ATM está formada por el cóndilo mandibular, la fosa mandibular del hueso temporal y el disco articular (Celenza and Nasedkin, 1978; Choi et al., 2012). Las fuerzas de resistencia de compresión, tensiles y mecánicas del disco articular están correlacionadas con la organización estructural de la matriz extracelular (MEC) y su composición biomecánica. Entre los componentes que la integran se encuentran principalmente las fibras de colágeno tipo I pero en las zonas maduras e hipertróficas se expresa colágeno tipo X (Kuroda et al., 2009). El cartílago de ATM tiene anisotropía bajo tensión en los movimientos anteroposteriores del cóndilo. Lo anterior sugiere que la zona fibrosa del cartílago no ATM es comparable con el fibrocartílago del disco articular de la

ATM. Ambos están compuestos por fibras de colágena alineadas circunferencialmente y de forma anteroposterior, lo cual hace que sea un tejido con anisotropía bajo tensión y cizallamiento. Estas últimas características se deben a que el colágeno articular se encuentra organizado en una red tridimensional estable y resistente (Kuroda *et al.*, 2009).

1.1 ARTICULACIÓN TEMPOROMANDIBULAR (ATM).

El cóndilo mandibular junto con el hueso temporal forman la ATM (Celenza *et al.*, 1978; Choi *et al.*, 2012) (**Fig.1**), la cual forma parte del aparato masticador o gnático, que incluye a los dientes y a sus estructuras de soporte, huesos maxilares, mandibulares, así como huesos de la cabeza y cara, músculos de la cabeza y cuello, sistema vascular, nervioso y linfático de estos tejidos. En su conjunto constituyen una unidad funcional cuyos elementos se correlacionan íntimamente entre si y con el resto del organismo (Okeson, 1995; Lescas *et al.*, 2012).

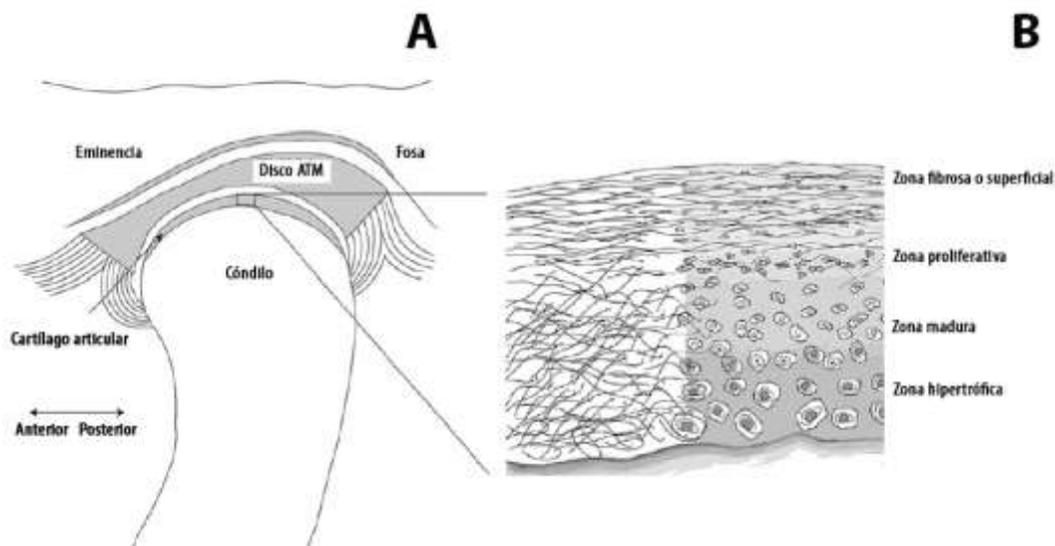


Figura. 1. *Articulación temporomandibular.* **A)** Esquema de un corte sagital de ATM humana, muestra la posición del cóndilo con respecto al disco articular y eminencia-fosa. Las superficies cartilaginosas están en color gris. **B)** Esquema de la arquitectura de la zona del cartílago articular de ATM de la región de figura A. Se agrandó la región rectangular, la cual muestra las 4 zonas: fibrosa, proliferativa, madura e hipertrófica. Esta figura resalta la organización y composición celular de esas zonas (Singh *et al.*, 2008).

La ATM posee características únicas dentro de las articulaciones del cuerpo humano. Los cóndilos mandibulares se articulan en la fosa mandibular del hueso temporal, las áreas articulares de ambos huesos no se corresponden entre sí ya que lo hacen a través de un *disco interarticular* o disco articular (**Fig.1**) lo que genera dos cavidades sinoviales separadas, que la hacen compleja pero deben funcionar al unísono. La ATM es una articulación clasificada como sinovial de tipo bisagra modificada, que permite movimientos conjugados de traslación, rotación, elevación y descenso (Moore *et al.*, 2010; Lescas *et al.*, 2012). A diferencia de las articulaciones tipo bisagra de las cuatro extremidades, la ATM tiene características de movimientos simultáneos de las articulaciones bilaterales durante los movimientos mandibulares, tales como comer y hablar. La ATM derecha e izquierda no pueden moverse independiente una de la otra, y se encuentran estrechamente asociadas con la oclusión dental (Celenza *et al.*, 1978; Choi *et al.*, 2012). El disco articular de ATM es capaz de moverse ligeramente junto con el cóndilo mandibular a lo largo de la eminencia articular durante los movimientos mandibulares (Kuroda *et al.*, 2009). El disco articular de la ATM está conectado en la parte superior con el hueso temporal y en la parte inferior con la mandíbula por estructuras fibrosas laxas que componen la cápsula articular. Las superficies articulares de la TMJ son altamente incongruentes. Si estas superficies estuvieran en contacto directo, el área de contacto sería pequeña en donde se recibiría gran cantidad de fuerza y fricción. La presencia del disco articular de ATM en combinación con el cartílago de ATM en esta articulación distribuyen las fuerzas recibidas en la ATM (Detamore *et al.*, 2003; Nitzan *et al.*, 2001; Scapino *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2003; Tanaka, 2006; Kuroda *et al.*, 2009). Como se mencionó, la ATM es considerada una articulación de tipo sinovial, dentro de sus componentes se encuentra la cápsula que la rodea, tiene la función de brindar estabilidad a las estructuras articulares (Warwick *et al.*, 1973; Kuroda *et al.*, 2009). La cápsula en su interior contiene líquido sinovial que actúa como lubricante durante los movimientos mandibulares (Celenza *et al.*, 1978; Choi *et al.*, 2012). Los extremos articulares de las articulaciones están cubiertos por una delgada y altamente

deformable capa de tejido conectivo llamado: cartílago articular (Warwick *et al.*, 1973; Kuroda *et al.*, 2009). La ATM de acuerdo al tipo de movimiento que realiza es clasificada como una diartrosis, ya que permite movimientos relativos largos (Gray *et al.*, 1995; Kuroda *et al.*, 2009) de los huesos que articulan en reacción a las fuerzas producidas por los músculos que los rodean (Warwick *et al.*, 1973; Kuroda *et al.*, 2009). Generalmente, la actividad diaria es acoplada con el movimiento y la carga de la articulación, las articulaciones diartrodiales tienen un comportamiento con características tribiológicas: fricción, lubricación y protección (Mow *et al.*, 1988; Kuroda *et al.*, 2009).

1.2 FIBROCARTÍLAGO DE LA ATM Y SU COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA.

El cartílago en personas adultas lo encontramos en las superficies articulares de los huesos largos y en traquea, nariz, oídos, laringe y discos intervertebrales. El cartílago contiene células, fibras y sustancia amorfa. Se pueden identificar 3 tipos de cartílago: cartílago hialino, cartílago elástico y fibrocartílago. El *cartílago hialino* es el más abundante y se encuentra ampliamente distribuido en el cuerpo humano, principalmente en los platos epifisales de los huesos de fetos, niños en crecimiento, entre otros. El *cartílago elástico* se encuentra en el oído externo, trompa de Eustaquio, epiglotis y partes de la faringe. El *fibrocartílago* existe en los discos intervertebrales, discos articulares, sínfisis del pubis y en las uniones entre tendones largos y cartílago articular de articulaciones de huesos largos. El cartílago articular de la ATM (será mencionado en el texto como **cartílago de ATM**, mientras que para referirnos al cartílago articular de otras articulaciones lo haremos con el nombre de **cartílago no ATM**) contiene condrocitos y una gran cantidad de macromoléculas de la matriz que los rodean (Knudson *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 2009). La matriz extracelular (**MEC**) de este tejido es mantenida por el balance de las actividades anabólicas y catabólicas de un tipo celular que son los condrocitos los cuales se encuentra distribuidos homogéneamente en todo el cartílago (Díaz *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 1991; Mow *et al.*, 2002; Mow *et al.*, 1999; Frank *et al.*,

1987; Guilak *et al.*, 2006). Los componentes que encontramos en la MEC del cartílago de ATM son: los proteoglicanos, glucosaminoglucanos, colágeno tipo II, IX y XI (Knudson *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 2009). Estas moléculas contribuyen a la flexibilidad del cartílago y a la protección de los componentes articulares de las cargas mecánicas. Las funciones de protección de carga del cartílago son principalmente brindadas por las propiedades viscoelásticas de la red de las fibras de colágeno y a la presión osmótica por la presencia de proteoglicanos (Hardingham *et al.*, 1992; Kuroda *et al.*, 2009). El cartílago de ATM es similar macroscópicamente al cartílago de otras articulaciones, por lo que los cambios patológicos pueden ser similares. En cambio, en su estructura microscópica, el cartílago de ATM tiene diferencias en sus constituyentes ya que contiene un fibrocartílago grueso con multicapas de muchas zonas de fibras de colágeno (Bouvier *et al.*, 1987; Kuroda *et al.*, 2009). La superficie del cóndilo mandibular contiene principalmente colágeno tipo I, que en otras articulaciones es principalmente de colágeno tipo II (Silbermann *et al.*, 1990; Kuroda *et al.*, 2009). Las fibras de colágeno en el fibrocartílago son el componente más abundante, éstas se encuentran distribuidas en las distintas zonas del cartílago (de Bont *et al.*, 1984; Kuroda *et al.*, 2009). La función principal del colágeno es brindar resistencia ténsil al cartílago. El colágeno que contiene el fibrocartílago es colágeno tipo I, mientras que en las zonas que la zona madura e hipertrófica contienen colágeno tipo II y X respectivamente (Delatte *et al.*, 2004; Teramoto *et al.*, 2003; Salo *et al.*, 1996; Kuroda *et al.*, 2009). En el cartílago de ATM el colágeno forma una red tridimensional lo que le da estabilidad, fuerza ténsil y resistencia a las fuerzas dislocantes. Cuando el cartílago de ATM es sometido a compresión, la baja permeabilidad de las redes de colágeno impiden que el fluido intersticial pase a través de su red (Mow *et al.*, 1993; Kuroda *et al.*, 2009). La matriz de colágeno está organizada en una estructura simétrica que brinda fuerzas viscoelásticas del cartílago (Grunder *et al.*, 2006; Kuroda *et al.*, 2009). En el fibrocartílago el colágeno corre en una dirección anteroposterior, lo que sugiere que su orientación permite resistir las fuerzas de dislocación anteroposteriores (Singh *et al.*, 2008; Kuroda *et al.*, 2009).

La sustancia amorfa del cartílago no ATM contiene gran variedad de proteínas no colágenas y polisacáridos. Las moléculas varían en abundancia y estructura de acuerdo a los sitios anatómicos y a la edad de las personas (Gomes *et al.*, 2004; Meyer and Wiesmann, 2006). La resistencia a las fuerzas compresivas se debe a la presencia de proteoglicanos los cuales se encuentran embebidos en una red de colágeno (Stegenga *et al.*, 1991; Mao *et al.*, 1998; Kuroda *et al.*, 2009). Los proteoglicanos son proteínas no colágenas que se unen al fluido intersticial. Bajo compresión este fluido puede presurizarse para proteger contra las fuerzas compresivas, especialmente ante rangos de carga elevados (Li *et al.*, 2004; Kuroda *et al.*, 2009). Los proteoglicanos consisten en un centro de proteína al que se une un glucosaminoglucano (**GAG**). En el agregado, estos son largas cadenas de polisacáridos cargados negativamente. Debido a su carga ellos hacen posible que los proteoglicanos atrapen agua. Los proteoglicanos son el componente más abundante en la MEC en donde contribuyen a mantener la integridad estructural y funcional. Estos conectados crean agregados largos de proteoglicanos que brindan la viscosidad a la MEC. Se localiza en la zona madura e hipertrófica y provee al tejido de presión osmótica que contribuye a la resistencia a la compresión (Mao *et al.*, 1998; Kuroda *et al.*, 2009). El agregado tiene un peso molecular de 205kDa, y se compone de un 87% de condroitín sulfato y 6% de queratán sulfato. Constituye el 10% del peso seco del cartílago, por lo que su alto contenido en la MEC es responsable de su capacidad de resistencia a la compresión de una forma especializada. El agregado es el responsable de la alta presión osmótica; además, se le relaciona con el engrosamiento e hidratación de la red de colágeno. El agregado pertenece a la familia de agregados de proteoglicanos que forma largos complejos multimoleculares con el ácido hialurónico. Todos los miembros de la familia de agregado contienen un dominio globular amino-terminal, el cual es el responsable de unirse al ácido hialurónico. Estas moléculas tienen la capacidad de interactuar con el hialuronato lo cual provee de una función particular de resistencia a la compresión, por lo que se considera un elemento crucial en el mantenimiento

de la estructura y función del cartílago. La interacción del agrecano con el hialuronato se da a través de proteínas de unión. Estas últimas pueden perderse de la matriz cartilaginosa durante periodos de degeneración del cartílago (Gomes *et al.*, 2004; Meyer and Wiesmann, 2006). Versican y decorina son otros de los proteoglicanos presentes en el cartílago de ATM (Kuroda *et al.*, 2009). Los GAGs más importantes en el fibrocartílago y cartílago hialino son el ácido hialurónico (**HA**), condroitín sulfato y queratán sulfato (Knudson *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 2009). El HA consiste en unidades de disacáridos repetidas de ácido glucorónico-D y N- acetyl-D-glucosamina, con un peso molecular aproximado de 800-1900kDa (Laurent *et al.*, 2002; Kuroda *et al.*, 2009). El HA le da la característica de viscoelasticidad, ya que gracias a su estructura, puede formar agregados y redes extensas a temperaturas fisiológicas. Debido a la carga negativa que posee y a su tamaño, contribuye a los eventos fisiológicos asociados con la dinámica de los fluidos y a la homeostasis y mantenimiento de la integridad del tejido conectivo. Su peso en el cartílago de ATM disminuye considerablemente con la edad (Scott *et al.*, 1991; Holmes *et al.*, 1988; Kuroda *et al.*, 2009). El HA es esencial para mantener la viscosidad, por lo que un descenso puede reducir las propiedades biomecánicas. Se ha encontrado en el fluido sinovial donde se piensa que tiene un papel importante en la lubricación de la articulación (Bothner *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1987; Kuroda *et al.*, 2009).

El disco articular se desarrolla inicialmente de tejido conectivo fibroso y después adquiere las características del fibrocartílago (Bae *et al.*, 1998). El disco articular está compuesto por tejido fibroso avascular y aneural (Celenza *et al.*, 1978; Choi *et al.*, 2012). Durante el desarrollo del fibrocartílago, se requiere de las fuerzas mecánicas, como los estímulos de compresión (Benjamin and Evans, 1990; Vogel and Koob, 1989; Bae *et al.*, 1998). La resistencia a las fuerzas compresivas o tensionales en el fibrocartílago se debe a la organización estructural, composición bioquímica y las propiedades de los componentes del disco articular de la ATM (Vogel and Koob, 1989; Bae *et al.*, 1998). En algunos tendones de músculos flexores, se depositan numerosos filamentos de vimentina en las células del fibrocartílago cuando están sujetas a fuerzas compresivas

(Janmey *et al.*, 1991; Bae *et al.*, 1998). De los componentes del citoesqueleto la actina y la tubulina no presentan las propiedades viscoelásticas que tiene la vimentina para resistir la deformación provocada por estrés prolongado y fuerzas dañinas (Janmey *et al.*, 1991; Bae *et al.*, 1998). Este incremento de los filamentos intermedios es considerado una respuesta normal de las células a la presión mecánica. Los filamentos de vimentina pueden tener un rol importante en el mantenimiento de la forma celular cuando se aplican fuerzas mecánicas. El desarrollo de filamentos de vimentina en las células del disco articular en función de la edad parece ser una adaptación de las células a las fuerzas compresivas de la masticación (Bae *et al.*, 1998).

1.3 CONDROCITOS: CÉLULAS ESENCIALES DEL CARTÍLAGO.

La superficie principal de las articulaciones sinoviales es el cartílago no ATM. En los adultos es acelular, donde las células ocupan un volumen del 2% en la totalidad del cartílago, por lo que comparado con la etapa fetal se asocia que con la edad existe una disminución celular en este tejido, la cual se alcanza desde los 20 a 30 años (Stockwell and Meachin, 1979; Meyer and Wiesmann, 2006). Los condrocitos son las células más importantes presentes en el cartílago no ATM (Poole *et al.*, 1982; Meyer and Wiesmann, 2006). Los condrocitos son las células constituyentes del cartílago juegan un papel esencial en la osificación endocondral, que es el proceso por el cual la mayoría de los vertebrados forman los huesos, lo que determina el rango de crecimiento óseo (Hunziker, 1994; Meyer and Wiesmann, 2006). Los condrocitos siempre se generan a partir de células mesenquimatosas, células precondrogénicas o células condrocíticas. Las células precursoras de condrocitos tienen una apariencia general de fibroblastos y sintetizan colágeno tipo I y III, fibronectina y proteoglicanos (von der Mark and Conrad, 1979; Meyer and Wiesmann, 2006). Se ha mostrado que las funciones condrogénicas se encuentran estrictamente asociadas con la forma celular esférica y corresponden a la estructura del citoesqueleto, la expresión de genes cartílago-específicos y la acumulación de

matriz pericelular (Meyer and Wiesmann, 2006). Las funciones de los condrocitos incluyen síntesis, deposición y mantenimiento de la matriz extracelular. Estos componentes incluyen principalmente colágenos específicos del cartílago y proteoglicanos. El colágeno tipo II es específico para cartílagos elásticos maduros, mientras que el tipo I es producto de células inmaduras y de cartílago fibroso, y se encuentra presente en la capa de erosión osificante de los condrocitos hipertróficos (Silbermann *et al.*, 1987; Strauss *et al.*, 1990; Schröter-Kerani *et al.*, 1991; Pirttiniemi *et al.*, 1998). Se ha encontrado que en distintos tipos de cultivos celulares, existe una asociación entre la estabilidad del fenotipo condroblástico y los factores que afectan la morfología de las células del cartílago (Pirttiniemi *et al.*, 1998). Se ha establecido que las interacciones entre condrocitos y la MEC son de importancia crítica en la regulación del desarrollo y mantenimiento del cartílago. Por ejemplo las interacciones entre la superficie celular y los componentes de la MEC tienen un efecto en el metabolismo de los proteoglicanos, expresión génica y respuesta a factores de crecimiento. La parte de MEC que rodea al condrocito se encarga de percibir las señales bioquímicas o biofísicas. Por lo que cualquier interacción directa entre los receptores celulares como las integrinas y la matriz del tejido ocurre en MEC pericelular en el cartílago. La falta de interacción de los condrocitos con la MEC también desactiva las señales de sobrevivencia a la vez que activa las señales de muerte celular programada (apoptosis/anoikis) (Adams *et al.*, 1993; Boudreau *et al.*, 1995; Loeser *et al.*, 1997; Guliak *et al.*, 2006). La matriz que rodea al condrocito ha sido relacionada con funciones biológicas importantes como ser considerada de naturaleza biomecánica, lo cual le da un papel protector de los condrocitos durante la carga ante una pérdida de agua de los proteoglicanos de la zona. Se ha descrito a esta estructura como un filtro o transductor de señales mecánicas, potencialmente hacia una interacción con colágeno tipo IV y las integrinas de la superficie celular o ácido hialurónico. La compresión mecánica altera el depósito de proteoglicanos y la deformación de la matriz que rodea a las células en explantes de cartílago, mientras que la compresión dinámica favorece la síntesis de proteoglicanos. Estos hallazgos

sugieren que las interacciones de la matriz que rodea al condrocito juega un papel importante en la respuesta de los condrocitos a la compresión mecánica, posiblemente a causa del transporte macromolecular y las fuerzas tisulares locales que rodean a las células (Guliak *et al.*, 2006).

1.4 PROPIEDADES BIOMECÁNICAS DEL CARTÍLAGO.

La biomecánica es un punto crítico en la ingeniería de tejidos óseo y de cartílago (Burger and Veldhuijzen, 1993; Meyer and Wiesmann, 2006). Los parámetros físicos y biológicos que afectan el éxito de la regeneración y remodelación incluyen: anatomía macro y microscópica, dirección y cantidad de las fuerzas y la capacidad regenerativa de los tejidos involucrados. Para una mejor comprensión de este tema se requiere entender la reacción de los tejidos ante fuerzas externas. El estrés es definido como la resistencia interna a una fuerza aplicada. Otro concepto, el estrés es considerado como la magnitud igual pero opuesta a la fuerza aplicada, y es distribuida sobre el área de sección transversal del hueso y cartílago. Éste es expresado en unidades de fuerza por unidad de área: $\text{estrés} = \delta = \text{fuerza} / \text{área}$. La mayoría de los patrones de estrés son combinaciones de 3 tipos de estrés, llamados tensión, compresión y desplazamiento (Einhorn, 1999; Meyer and Wiesmann, 2006).

Por lo anterior se ha descrito que los movimientos mandibulares pueden ser continuos o intermitentes, lo cual se convierte en una carga estática o dinámica para la ATM (Tanaka *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2009). La carga estática ocurre por ejemplo durante el apretamiento y el bruxismo; la carga dinámica en cambio se presenta al hablar y masticar (Tanaka *et al.*, 2003; van Eijden *et al.*, 2000; Kuroda *et al.*, 2009). La carga mecánica en la ATM es necesaria para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del tejido articular. Generalmente la carga dinámica es parecido al efecto anabólico de los tejidos de la articulación, mientras que la carga estática, en especial la prolongada o excesiva induce un efecto catabólico. Los movimientos mandibulares de rotación y deslizamiento ocurren simultáneamente entre las superficies

articulares, la ATM está sujeta a diferentes regimenes de carga durante dichos movimientos. Durante la carga natural de la articulación, combinaciones de los tres tipos de carga se presentan en las superficies articulares. Durante la carga articular, las capas del cartílago de ATM y el disco fibrocartilaginoso pueden sufrir deformaciones. Estas deformaciones están acompañadas de fuerzas internas dentro del tejido (Tanaka *et al.*, 2003; van Eijden *et al.*, 2000; Kuroda *et al.*, 2009). El papel funcional del cartílago de ATM es similar al del cartílago no ATM. Juega un papel como absorción del estrés durante su funcionamiento y así permitir los movimientos mandibulares (Tanaka *et al.*, 2003; van Eijden *et al.*, 2000; Kuroda *et al.*, 2009). El cartílago de ATM se comporta como un material viscoelástico no lineal, como el disco articular de ATM. Sus propiedades mecánicas se caracterizan por un rango de fuerza ténsil, dureza ténsil y absorción de impacto en dirección anteroposterior (Patel *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2009). La resistencia a la compresión es principalmente dependiente de la densidad de proteoglicanos (Kuboki *et al.*, 1997; Kuroda *et al.*, 2009). Las articulaciones diartrosis actúan como componente biológico, con características tribiológicas como fricción, lubricación y desgaste. La fuerza de desplazamiento es la mas importante del aspecto tribiológico. Durante la carga, las capas del cartílago de ATM van disminuyendo su adaptación a la forma de las superficies articulares irregulares. El exceso de fuerza de desplazamiento produce fatiga la cual produce un daño irreversible al cartílago (Spirit *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1994; Kuroda *et al.*, 2009). Además, esto puede provocar una interrupción de la lubricación debido a la reducción del peso molecular del HA (Tanaka *et al.*, 2008; Kuroda *et al.*, 2009). El cartílago de la ATM tiene una dirección dependiente de las características de la fuerza por desplazamiento dinámico (Tanaka *et al.*, 2008; Kuroda *et al.*, 2009). Las características de las fuerzas por desplazamiento sugieren que el cartílago condilar tiene una resistencia más débil al estrés por desplazamiento, el cual con mayor facilidad permite la degradación del cartílago de ATM y el fluido sinovial (Kuroda *et al.*, 2009).

1.5 RELACIÓN DE LA ATM CON LA OCLUSIÓN DENTAL.

La oclusión es la intercuspidación entre los dientes superiores e inferiores. Está dividida en oclusión estática donde no hay movimiento de la mandíbula, y la oclusión funcional o dinámica en la cual hay movimientos mandibulares. La oclusión estática puede variar dependiendo de la localización del cóndilo donde existe una posición de oclusión intercuspídea máxima que se refiere al sitio donde contactan los dientes con mayor frecuencia. A esta posición se le conoce como *oclusión céntrica*, la cual está relacionada con la posición de los dientes y la posición del cóndilo de la mandíbula. La oclusión céntrica puede ser modificada por tratamientos prostodónticos y ortodónticos, bruxismo, entre otras. Procedimientos donde la estabilidad de la posición del cóndilo no es mantenida, eventualmente puede causar desórdenes temporomandibulares o maloclusión (Celenza *et al.*, 1978; Choi *et al.*, 2012). Al definir la oclusión céntrica no podemos omitir la relación céntrica, ya que si partimos de la base de que no son los órganos dentarios los que guían la mandíbula, si no la acción neuromuscular de los músculos, entenderemos la importancia de la relación céntrica. La relación céntrica es una posición de la mandíbula relativa al cráneo, que se establece momentáneamente en condiciones de salud, cuando el sujeto: deglute, ocluye voluntariamente o manipulada por el operador (Martínez Ross, 1996). Por otro lado, existe la *oclusión orgánica* que se refiere al conjunto de 3 estabilidades: anterior, oclusal y articular; y al no existir se debe recuperar la estabilidad faltante. La oclusión orgánica natural o reconstruida debe permitir los movimientos, las posiciones, las relaciones y las funciones del sistema estomatognático. La oclusión orgánica, es común denominador para todas las especialidades de la odontología, ya que están muy ligadas de ella. La oclusión orgánica puede incorporarse sin dificultades a todas las especialidades como Ortodoncia, Ortopedia, Cirugía Ortognática, Periodoncia, Prótesis y ajuste oclusal por desgaste mecánico (Martínez Ross, 1996). Cuando la oclusión orgánica llega a perder su armonía se le conoce como oclusión patológica en la cual se manifiestan síntomas articulares,

musculares, dentarios y/o periodontales reconocibles. Cuando la alteración se presenta en la oclusión dentaria, esta repercute en todos los elementos del sistema pero principalmente en las ATM's. A un cambio dado en la posición de los dientes le sigue un cambio en la posición de la mandíbula y en ambos cóndilos. Si el cóndilo de un lado se mueve en una dirección, el opuesto se moverá en forma correspondiente y compensatoria a este movimiento, por ser la mandíbula un hueso único. Estos movimientos son obligados por una oclusión no organizada, los resultados ya sean mínimos u obvios, afectaran las estructuras de las articulaciones, provocando alguna sintomatología patológica (Martínez Ross, 1996). Dentro de algunos factores que pueden producir una oclusión patológica se encuentran los *contactos oclusales*. Los contactos oclusales, reciben otros nombres como *prematuroidades* o *interferencias*, se caracterizan por ser alteraciones en la distancia interoclusal. La etiología de los contactos oclusales puede ser causas directas, las cuales consisten en anomalías de los dientes y de las arcadas dentarias; y causas indirectas que afectan dientes y arcadas (Martínez Ross, 1996).

El *plano de oclusión* se podría describir como la superficie o área masticatoria de oclusión. Corresponde a una superficie imaginaria que toca todos los bordes o protuberancias contactantes de los dientes. El plano de oclusión se puede representar como una recta que pasa equidistante de los bordes incisales y cimas cuspídeas antagonistas en oclusión, esta alcanza casi la línea de cierre de los labios (Martínez Ross, 1996). Cuando el plano oclusal se altera durante procedimientos dentales generales y/o tratamientos de ortodoncia por condiciones como deformidad de la mandíbula, la alteración del plano de oclusión muestra cambios a nivel de ATM, que se observan como un aumento en el cartílago de ATM al aumentar bilateralmente la dimensión vertical. Por otra parte si la remodelación progresiva del cartílago condilar se estimula en primates con un aumento en la dimensión vertical bilateral, se observa un aumento en el grosor del cartílago del cóndilo. También, se ha reportado que la carga funcional masticatoria es un factor que regula el crecimiento del esqueleto facial. Cuando el plano oclusal es alterado, el estrés

mecánico puede actuar en la ATM. Se ha demostrado que la influencia del estrés mecánico se extiende de la capa del cartílago a el resto de las estructuras de la ATM no el cartílago pertenece a la ATM₂. Así, que se ha encontrado en la capa del cartílago que se incrementa, un mayor número de condrocitos apoptóticos cuando se altera el plano oclusal. La capa cartilaginosa de la ATM consiste en condrocitos y matriz extracelular. Ante el estrés mecánico pueden surgir cambios en los componentes del cartílago. La matriz extracelular está compuesta principalmente por colágeno tipo II como colágeno fibrilar. En experimentos previos, para buscar la relación entre el estrés mecánico y los cambios en el colágeno tipo II, se encontró que el colágeno tipo II disminuyó en el cartílago condilar con una carga mecánica leve. Si la carga funcional masticatoria es uno de los tipos de estrés mecánico, el metabolismo de la colágeno II puede cambiar después de la alteración del plano oclusal (Yoshikawa *et al.*, 2008).

1.6 TRASTORNOS TEMPOROMANDIBULARES (TTM).

Los TTM se han descrito con diferentes nombres: desórdenes craneomandibulares, síndrome de Costen (descritos por el otorrinolaringólogo James Costen); también han sido denominados como síndrome doloroso por disfunción de ATM, lesión crónica del menisco, disfunción miofacial, artralgia temporomandibular entre otros, sin llegar a estandarizar la definición, diagnóstico y tratamiento (McNeil *et al.*, 1990; Lescas *et al.*, 2012). Los diversos términos han generado confusión, por que la Asociación Dental Americana ha adoptado el término de trastornos TTM para determinar a un grupo heterogéneo de condiciones (Okeson, 1999; Pérez *et al.*, 2005) intraarticulares, periarticulares y sistémicas (Lescas *et al.*, 2011; Manfredini *et al.*, 2010), caracterizadas por dolor y disfunción del sistema masticatorio (Okeson, 1999; Pérez *et al.*, 2005). Dentro de los pacientes que presentan algún tipo de TTM, del 33-86% presentan signos clínicos (Carlsson and LeResche, 1995; Singh *et al.*, 2008). Algunos de ellos presentan chasquidos o crepitación, dolor de los

músculos masticadores, limitación de los movimientos mandibulares, alteraciones de apertura y cierre oral, cefalea, dolor, tinnitus entre otros (Lescas *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 2005).

Muchos autores han discutido la etiología de los TTM y la relación con los tratamientos ortodónticos. Los resultados han mostrado la dificultad de resaltar un factor en particular, y sugieren que son de origen multifactorial, considerando los principales factores a la estructura del tejido, la salud general y el estrés mecánico (Farrar *et al.*, 1983; De Laat *et al.*, 1986; Okeson *et al.*, 1989; Olsson *et al.*, 2002). Para el desarrollo de los TTM, la biomecánica es un factor relevante ya que las alteraciones biomecánicas resultantes del comportamiento parafuncional o trauma pueden generar o exacerbar una condición patológico existente (Detamore and Athanasiou, 2003a, 2003b; Singh *et al.*, 2008). Varios autores han mostrado la relación entre la morfología de las estructuras articulares y los TTM (Mohlin *et al.*, 1980; Olsson and Lindqvist, 1995; Sonnesen *et al.*, 1998; Legrell, 1999; Olsson *et al.*, 2002). Las *interferencias oclusales* parecen estar asociadas con desórdenes funcionales (Ingervall, 1976; Kirveskari *et al.*, 1992; Olsson *et al.*, 2002). Otros investigadores se basan en que la maloclusión funcional es mas importante que la maloclusión morfológica para el desarrollo de una disfunción mandibular. Sin embargo, la asociación entre las interferencias oclusales y los desórdenes temporomandibulares ha sido cuestionado ya que existen distintos conceptos por autores como Greene y Marbach (1982) que sugieren que los signos de TTM son principalmente expresión de una variación normal. Christensen y Rassouli (1995) encontraron que al eliminar las interferencias oclusales mediante desgastes oclusales selectivos o guardas oclusales, fueron medidas terapéuticas exitosas para los TTM (Olsson *et al.*, 2002).

En la prevalencia de las interferencias oclusales en la población mexicana, se encontró que el 49.25% presentaba dolor de la ATM asociado a bruxismo, con predominio del sexo femenino (3 a 1). Un 47.4% de los pacientes evidenció una relación entre los ruidos articulares y dolor en los movimientos mandibulares (Schiffman *et al.*, 1990; Lescas *et al.*, 2011). En años recientes

algunos estudios han mostrado el papel de las variables oclusales en la incidencia de desórdenes temporomandibulares que es del 27% (Manfredini *et al.*, 2010). Las fuerzas prolongadas sobre las estructuras articulares, como las asociadas a la actividad durante el bruxismo pueden dañar los tejidos articulares a un nivel molecular (Manfredini *et al.*, 2010) y entonces presentar ruidos articulares y dolor (Nitzan *et al.*, 2001; Manfredini *et al.*, 2004; Manfredini *et al.*, 2010). Se ha establecido una asociación entre el dolor en la ATM y el bruxismo, por lo que esto da un soporte a la importancia de las anomalías oclusales en la fisiopatología de los TTM, por lo que no deben ser subestimados (Manfredini *et al.*, 2010). El *bruxismo* puede ser definido como una actividad parafuncional del sistema masticatorio que incluye apretamiento y rechinar de los dientes. Durante el sueño este se presenta como contracciones musculares rítmicas con mayor fuerza que lo normal, creando una fricción y ruido intenso cuando los dientes se rechinan; este evento no puede ser reproducido durante periodos de vigilia (Versiani *et al.*, 2010). Según la *American Academy of Sleep Medicine* el bruxismo pertenece al grupo de desórdenes de movimiento y frecuentemente está asociado a la estimulación del sueño (Manfredini *et al.*, 2004; Versiani *et al.*, 2010). El bruxismo con una causa real es llamado primario, mientras que el secundario es aquel que ocurre asociado al uso de drogas psicoactivas, medicamentos y desórdenes médicos (Versiani *et al.*, 2010). Investigadores han sugerido que existen factores etiológicos locales para el bruxismo como las maloclusiones y factores cognitivos como estrés, ansiedad y trastornos de personalidad (Kato *et al.*, 2003; Lobbezoo and Naeije, 2001; Versiani *et al.*, 2010). El bruxismo puede ser asociado a desórdenes craniomandibulares como dolores de cabeza, desórdenes temporomandibulares, dolor muscular, pérdida temprana de dientes debido a atrición excesiva y movilidad, interrupción del sueño cuando dos personas comparten habitación (Fujita *et al.*, 2003; Gorayeb and Gorayeb, 2002; Ohayon *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2006; Versiani *et al.*, 2010).

La oclusión puede ser la causa de que aparezca una alteración de la ATM, si existe una inestabilidad maxilomandibular no compensada que provoca

una sobrecarga articular, ya sea por que dicha inestabilidad genere bruxismo o por que obligue a trabajar a la ATM en una situación de carga desfavorable (Campo, 2000; Otaño, s/; Lescas *et al.*, 2011). También puede ser que las alteraciones de la ATM o de la musculatura masticatoria provoquen cambios en la oclusión. En trastornos degenerativos avanzados de la articulación, como en la artritis, la destrucción de las superficies articulares puede originar una mordida abierta progresiva, al acortarse la longitud total de la rama ascendente mandibular y rotar la mandíbula hacia atrás (Campo, 2000; Otaño, s/; Lescas *et al.*, 2011).

1.7 OSTEOARTRITIS (OA) EN LA ATM.

La OA es caracterizada por la degeneración progresiva del cartílago no ATM y es una de las enfermedades crónicas articulares más comunes (Lahm *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). La evidencia actual sugiere que la muerte programada de los condrocitos esta muy relacionada con la degeneración de la matriz del cartílago no ATM en la OA. Algunos estudios han reportado que en cartílago con OA en un modelo experimental se incrementó la expresión de LC3-II (marcador de autofagia) que colocalizó con caspasa-3 activa (marcador de apoptosis), lo que sugiere que en la OA la muerte de los condrocitos se da por una combinación de la apoptosis clásica y autofagia (Almonte-Becerril *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). Contrario a este resultado algunos investigadores han reportado una disminución en la expresión de 3 marcadores distintos de autofagia incluyendo LC3, en el cartílago de pacientes con OA y de animales con OA experimental, lo que puede ser atribuido a una pérdida de la autofagia que tendría un papel condroprotector (Zhang *et al.*, 2013).

La ATM es uno de los sitios mas comunes que desarrollan OA (Schmitter *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 1979; Zhang *et al.*, 2013). Basado en hallazgos clínicos (Wang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013) crearon un modelo en ratas con cambios degenerativos en la ATM inducido por un método dental biomecánico, lo que

resultó en una irregularidad del arreglo de los condrocitos y un aumento en la muerte celular (Wang *et al.*, 2010; Jiao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). En este estudio, la presencia de autofagia de condrocitos en etapas tempranas de la degeneración de cartílago de la ATM se monitoreó por SEM (por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscope; Microscopio electrónico de barrido), y la relación de autofagia se evaluó con las vías de señalización para MAP4K3 y mTOR por métodos de inmunohistoquímica, PCR en tiempo real, Western Blot y citometría de flujo (Zhang *et al.*, 2013).

Mian Zhang *et al.*, (2013) emplearon un modelo de distalización de molares como medio de estrés mecánico en ratas Sprague-Dawley y observaron un arreglo irregular de los condrocitos, el cual progresó con el tiempo donde el arreglo de los condrocitos fue cada vez más irregular así como disminuyó la cantidad de condrocitos con el paso del tiempo. La demarcación entre las capas proliferativa y prehipertrófica no se encontró definida como en los grupos controles. La tinción de azul de toluidina tiñe PG en general pero en el cartílago al más abundante es agregado, en donde se considera que este disminuyó en las semanas 8-12 en los grupos experimentales. Al finalizar las 12 semanas, se encontraron algunas zonas libres de células en el cartílago, similar a los cambios degenerativos de lesiones tempranas similares a la OA descritas en reportes previos. La densidad de condrocitos disminuyó significativamente con el tiempo comparadas con el control. También se determinó en este trabajo que el aumento de la autofagia en condrocitos ocurre en un ambiente dental biomecánicamente alterado (Zhang *et al.*, 2013).

1.8 MECANISMO DE DESGASTE DEL CARTÍLAGO DE ATM Y OA.

Durante las actividades normales de la vida diaria, el cartílago no ATM se encuentra expuesto a cargas mecánicas y deformaciones debido a la carga de la articulación (Lai *et al.*, 1991; Mow *et al.*, 2002; Mow *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 1987; Guilak *et al.*, 2006). El factor dominante en relación al cartílago de revestimiento es la edad. Donde la frecuencia y severidad del desgaste del

cartílago parece incrementarse con la edad. Por ejemplo, las enfermedades degenerativas ocurren de forma típica en la quinta y sexta década de la vida cuando el cartílago pierde su densidad celular y con su capacidad adaptativa (Livine *et al.*, 1989; Kuroda *et al.*, 2009). Los cambios relacionados con la edad han sido detectados en los componentes de la ATM (Jibiki *et al.*, 1999; Takano *et al.*, 1999; Kuroda *et al.*, 2009). Algunos cambios observados son disminución de la cantidad de GAGs en el disco articular (Nakano *et al.*, 1996; van Eijden *et al.*, 2000; Kuroda *et al.*, 2009). La causa directa mayor de desgaste del cartílago del cóndilo es la sobrecarga (Nitzan *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2006; Kuroda *et al.*, 2009). En la OA – ATM el mecanismo de sobre carga es probablemente el mismo que en otras articulaciones sinoviales. Los condrocitos, en especial los hipertróficos parecen estar involucrados en los mecanismos de la mecanorespuesta. Ellos permiten el incremento de la actividad metabólica y la activación de procesos patológicos lo que permite una degradación irreversible del cartílago. Los mediadores clave de la degradación del cartílago incluyen a las metaloproteinasas (MMP) (Kuroda *et al.*, 2009). El colágeno tipo II es el primero en ser degradado, y el agrecano que es el componente de la matriz más abundante, es degradado por los dos tipos de enzimas (Little *et al.*, 2005; Stanton *et al.*, 2005; Kuroda *et al.*, 2009). Estas proteasas, en especial la agrecanasa I y II, son mediadores importantes de la pérdida de agrecano en cartílago de ATM. La expresión y actividad de las metaloproteinasas son estimuladas por las citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β cuyos niveles se incrementan durante la patogenénesis de la OA (Kuroda *et al.*, 2009). Las MMP-1, MMP-3 y MMP-9 son abundantes en cartílago y fluido sinovial en articulaciones en condiciones patológicas (Tanaka *et al.*, 1998; Vaatainen *et al.*, 1998; Kuroda *et al.*, 2009). La presión ténsil cíclica ha demostrado incrementar la expresión de MMP-13 (Wong *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2009). Además otro factor de crecimiento, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es sobre expresado mientras que la expresión de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMP)-1 disminuyen su expresión. La presión hidrostática parece tener el efecto opuesto. La expresión de VEGF en OA parece ser

progresiva con la sobrecarga mecánica. La inducción con VEGF en condrocitos por sobrecarga está asociada con la activación del factor de transcripción que induce hipoxia-1 (HIF-1) el cual es conocido por que se une a un elemento de respuesta de hipoxia (HRE) en el promotor del gen VEGF humano (Forsythe *et al.*, 1996; Kuroda *et al.*, 2009). Después de la sobre carga de condrocitos resultan altamente inmunopositivos a HIF-1 a lo que a su vez resulta en la inducción del VEGG. El VEGF es aumentado por hipoxia y citocinas actúan principalmente en las células endoteliales estimulando la proliferación, migración en inducción de varios genes involucrados en la remodelación de tejido. Se ha reportado que VEGF juega un papel importante no solo en el reclutamiento de células endoteliales si no que también participan en el reclutamiento de osteoclastos. El VEGF junto con el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) tienen una función común en la resorción ósea osteoclástica. Por lo tanto el VEGF producido por condrocitos puede ser responsable de la migración, diferenciación y estimulación de preosteoclastos y osteoclastos dentro del cartílago. Con lo anterior se puede inducir la destrucción de cartílago mediante invasión vascular que es considerado como un mecanismo temprano para convertir el cartílago en hueso (Kuroda *et al.*, 2009). Cuando la articulación está expuesta a sobrecarga, la presión intra-articular se incrementa, lo que produce una hipoxia temporal, la cual se recupera por una reoxigenación el término de la degradación por sobrecarga (Grootveld *et al.*, 1991; Kuroda *et al.*, 2009). El ciclo de hipoxia-reperusión se ha reportado como una liberación de especies radicales oxidativas reactivas (ROS). Uno de los efectos ROS en articulaciones sinoviales en la inhibición de la biosíntesis y degradación de HA, ambos causan una reducción marcada de la viscosidad del fluido sinovial. Además la fragmentación de HA permite la destrucción de cartílago aumentando la expresión de MMP y la sobre expresión de CD44. El proceso de regulación de la producción de HA es controlado por interleucinas (IL-1 β , factor de necrosis tumoral (TNF- α), interferón (IFN- γ) y factor de crecimiento transformante (TGF- β). Esto indica que las citocinas en el líquido sinovial pueden ser responsables de la progresión de los cambios degenerativos de la ATM (Kuroda *et al.*, 2009).

Las propiedades biomecánicas y fisicoquímicas del cartílago de ATM se encuentran relacionadas con el transporte de agua intersticial y fases iónicas en el tejido. Debido a la naturaleza permeable y porosa de la matriz de colágeno, la compresión mecánica del cartílago articular de ATM induce exudación de agua intersticial, la cual produce un incremento de la concentración de proteoglicanos, cambiando así las concentraciones iónicas intersticiales. Por ejemplo la disrupción de la red de colágeno en la OA permite un incremento del agua contenida en el tejido y una pérdida de proteoglicanos, y un decremento correspondiente en la osmolaridad pericelular. Lo cual sugiere que los cambios en la matriz que rodea al condrocito y en las propiedades de la MEC, lo que puede alterar significativamente los ambientes de fuerzas de estrés y fluido de los condrocitos. El conocimiento de los mecanismos que regulan la fisiología del condrocito son indispensables para la salud y enfermedad del tejido cartilaginoso (Guliak *et al.*, 2006).

Con respecto a la OA-ATM, el mecanismo de sobrecarga es probablemente el mismo que en otras articulaciones sinoviales. Los condrocitos, están involucrados en los mecanismos de mecano-respuesta (Wong *et al.*, 2003; Kuroda *et al.*, 2009). Esto puede incrementar la actividad metabólica y activación de los procesos patológicos, los cuales pueden conducir a una degradación irreversible del cartílago (Abramson *et al.*, 2006; Kuroda *et al.*, 2009).

1.9 CAMBIOS MICROSCÓPICOS EN EL TEJIDO CARTILAGINOSO OCASIONADOS POR ESTRÉS MECÁNICO.

Las cargas mecánicas anormales pueden alterar la función celular, lo que puede cambiar la estructura y composición de la matriz extracelular, eventualmente se desencadenan patologías tisulares u orgánicas como osteoporosis, osteoartritis, tendinopatías, aterosclerosis y fibrosis (en cartílago, hueso, tendón, vasos sanguíneos, corazón, pulmón y piel). Las células en los tejidos son responsables de la remodelación en respuesta a fuerzas mecánicas.

Es bien reconocido que las fuerzas mecánicas juegan un papel importante en la regulación de funciones celulares, incluyendo regulación genética, síntesis de proteínas, crecimiento, muerte y diferenciación celular, que son esenciales para mantener la homeostasis en los tejidos (Ross, 1986; Chicurel *et al.*, 1998; Grodzinsky *et al.*, 2000; Ireland *et al.*, 2001; Riley *et al.*, 2002; Bag *et al.*, 2004; Borer *et al.*, 2004; Eckes and Krieg, 2004; Lammerding *et al.*, 2004). Se ha visto que el estrés mecánico en los condrocitos del cartílago produce gran variedad de fenómenos físicos, eléctricos y bioquímicos, incluyendo deformación, presión hidrostática, presión osmótica y cambios en el pH (Gray *et al.*, 1988; Guilak *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2010). Algunas vías de señalización son activadas en los condrocitos por el estrés mecánico (Millward-Sadler *et al.*, 1999; Salter *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2010). El estrés mecánico produce cambios directos en los niveles de transcripción, traducción y modificaciones post-traducción, composición extracelular y degradación de la matriz tisular. Estos cambios se ven reflejados en la biosíntesis de MEC de los condrocitos, la remodelación, la degradación y la reparación de tejido cartilaginoso (Grodzinsky *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2010). Mecánicamente es posible la inducción del aumento de la citocina condroprotectiva IL-4 en condrocitos articulares humanos, la cual es considerada como un regulador importante en el mantenimiento de la estructura y función del cartílago no ATM (Millward-Sadler *et al.*, 1999; Salter *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2010). Además, los estímulos mecánicos en los condrocitos han mostrado alterar la organización del citoesqueleto y su morfología (Spiteri *et al.*, 2010). El incremento de la acumulación de MEC inducida por la fuerza mecánica durante la formación de tejido cartilaginoso *in vitro*, es mediada en parte por los cambios transitorios en la morfología celular (Spiteri *et al.*, 2010). La morfología del condrocito está determinada por la organización del citoesqueleto de actina, el mecanismo por el cual la forma celular regula la función del condrocito puede deberse al rearrreglo de los filamentos de actina. De hecho los cambios en el citoesqueleto de actina se han descrito en condrocitos sujetos a compresión dinámica, y se ha sugerido que el fenotipo y la producción de MEC está influenciada por la distribución de los microfilamentos

de actina (Spiteri *et al.*, 2010). Por otra parte Benya *et al.*, (1988) demostraron el efecto de la morfología celular en el comportamiento del condrocito fue indirecto y que los cambios en la organización de la actina fueron responsables de los cambios subsecuentes en la síntesis de MEC del condrocito. En este estudio se observó que al incubar condrocitos no diferenciados con citocalasina D para inducir la destrucción de los filamentos de actina, no se produjo alteraciones en la morfología celular de los condrocitos ni hubo alteraciones en la secreción de colágeno tipo II (Benya *et al.*, 1988; Spiteri *et al.*, 2010). Por lo que la morfología del condrocito por sí sola no puede regular la síntesis de matriz y la formación de tejido: sin embargo, el citoesqueleto de actina produce señales que pueden alterar la actividad biosintética (Spiteri *et al.*, 2010).

En el estudio realizado por Sharma se observó que los cambios inducidos por la presión cíclica induce cambios en la morfología del condrocito, de redondo a elipsoidal, se asocian con el incremento de la actividad metaloproteinasa específica (Sharma *et al.*, 2007; Spiteri *et al.*, 2010). Al someter al cartílago a estrés mecánico cíclico, continuo y excesivo, como resultado se induce la producción de IL-1 y de algunas MMPs, que puede inducir la degradación del cartílago *in vitro* (Fujisawa *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

La oclusión dental ha sido parte esencial de todos los tratamientos dentales en odontología restaurativa. El tratamiento dental puede alterar las relaciones oclusales estáticas y dinámicas, con la finalidad de alcanzar lo más cercano posible una oclusión ideal. La Articulación Temporomandibular (ATM) tiene una relación muy directa con la oclusión dental, ya que se los dientes marcan la posición final del disco articular al momento de cerrar la boca, y en los movimientos bucales. Por lo que es importante conocer los conceptos más básicos de oclusión para llegar al entendimiento de cómo es que interacciona

la articulación con los dientes (Martínez Ross, 1996). Las alteraciones oclusales comúnmente se presentan en pacientes con prostodoncia, ortodoncia, periodoncia y cirugía (Wright, 2005; Kundinger *et al.*, 1991; Xie *et al.*, 2013). En la práctica odontológica, los dentistas necesitan considerar que la mayoría de los tratamientos realizados con mucha frecuencia, como el uso de dentaduras por pérdida de dientes, corrección de maloclusiones por extracciones dentales, pueden significar la alteración de la oclusión de los pacientes. Sin embargo, ¿que pasará con la alteración oclusal? La experiencia clínica sugiere que procedimientos en los cuales se puede alterar la oclusión puede resultar en una incomodidad aguda para el paciente, la cual puede permanecer por pocos días o progresar a un dolor crónico del sistema estomatognático incluyendo un desorden temporomandibular (McNeill *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 2013).

Los TTM incluyen un grupo de condiciones crónico dolorosas que involucran las articulaciones temporomandibulares, los músculos de la masticación y estructuras asociadas y tejidos (McNeill *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 2013). Los TTM son más comúnmente observados en individuos en edades de 20 a 40 (Wright, 2005; Gesch *et al.*, 2004; de Kanter *et al.*, 1993; Xie *et al.*, 2013). Aproximadamente el 33% de la población al menos tiene un síntoma de desorden temporomandibular y del 3-6% hasta el 7% de la población tiene un desorden temporomandibular con una severidad para ir en busca de tratamiento (Wright, 2005; Schiffman *et al.*, 1990; Xie *et al.*, 2013). La etiología de los desórdenes temporomandibulares es multifactorial (McNeill *et al.*, 1997; Xie *et al.*, 2013), donde las alteraciones oclusales son la causa más frecuente (Ekberg *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2013). Numerosos estudios han demostrado que las interferencias oclusales pueden causar cambios en los patrones de contracción mioeléctricos de los músculos de la mandíbula (Randow *et al.*, 1976; Riise *et al.*, 1982; Shiau *et al.*, 1989; Sheikholeslam *et al.*, 1983; Ingervall *et al.*, 1982; Karlsson *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a los daños potenciales irreversibles en los humanos con estudios de interferencias oclusales a largo plazo, aun no se establecen los cambios producidos. Algunos modelos animales han sido evaluados para investigar este problema (Xie *et al.*, 2013).

Estudios realizados mencionan que el fibrocartílago es marcadamente delgado en pacientes edéntulos donde las fuerzas oclusales son sustancialmente reducidas, sugiriendo que el mantenimiento del fibrocartílago depende de la fuerza mecánica intermitente (*Deschner et al., 2006*). Sin embargo, existe poca información sobre el papel de las fuerzas mecánicas sobre el la morfología y distribución celular, así como los cambios sobre la cantidad de las fibras de colágeno en el fibrocartílago.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es posible inducir cambios en los componentes del citoesqueleto y de la matriz extracelular del disco articular de ATM mediante la aplicación de estrés mecánico modificando la oclusión dental?

4. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

El estrés mecánico sobre el disco articular de la Articulación Temporomandibular, provoca cambios en la morfología tisular y celular, en la expresión de proteínas de citoesqueleto (actina, vimentina y tubulina), y cambios en la expresión de componentes de matriz extracelular, los cuales pueden ser detectados por inmunorreconocimiento específico y tinciones histológicas especiales.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERAL.

Evaluar las modificaciones que sufre el disco articular de la ATM cuando es sometido a estrés mecánico.

5.2 ESPECÍFICOS.

1. Evaluar los cambios en arquitectura del disco articular de ATM.
2. Evaluar la expresión de los componentes del citoesqueleto de las células presentes en el cartílago del disco articular de ATM.
3. Evaluar la expresión de los componentes de la matriz extracelular del cartílago del disco articular de ATM.
4. Evaluar la expresión de proteínas asociadas a procesos degenerativos.

6. METODOLOGÍA

6.1 TIPO DE ESTUDIO.

El tipo de estudio de este trabajo es: **experimental in vivo**.

6.2 LUGAR DE REALIZACIÓN.

1. Laboratorio de Biología Celular y Tisular, del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.
2. Laboratorio de Ciencias Básicas, de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
3. Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
 4. Bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.
 5. Clínica dental de la Maestría en Ciencias Biomédicas en el área de Rehabilitación bucal de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

6.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN.

Los criterios de selección utilizados para los animales de experimentación fueron:

INCLUSIÓN: Ratas Wistar Macho de 200 a 250g. Libres de enfermedad.

ELIMINACIÓN: Ratas Wistar Macho fuera del peso y con presencia de alguna enfermedad.

ELIMINACIÓN: Ratas Wistar Macho a las que se les hiciera comunicación pulpar al realizar la cavidad en el primer molar superior izquierdo y las ratas que fallecieran durante el tiempo del experimento.

6.4 VARIABLES INDEPENDIENTES Y DEPENDIENTES.

6.4.1 Independientes

Estrés mecánico

- *Definición conceptual:* es la aplicación de una fuerza que dista de lo óptimo y actúa sobre un organismo. Es un estímulo dañino que puede llegar a ser nocivo. Desde el punto de vista físico es la fuerza que actúa sobre un cuerpo, y este responde con una reacción proporcional a la fuerza con la que se ha actuado sobre él.
- *Definición operacional:* el estrés mecánico se indujo de dos formas distintas para alterar el plano de oclusión en Ratas Wistar. La primera fue a través de la colocación de una interferencia oclusal de resina en el

primer molar superior izquierdo; y la otra forma es a través del desgaste de todos los molares superiores izquierdos.

- *Escala de medición:* dicotómica nominal

6.4.2 Dependientes

Matriz extracelular

- *Definición conceptual:* es el componente no celular presente en todos los tejidos y órganos que estabiliza la estructura física de los tejidos, además de iniciar mecanismos bioquímicos y biomecánicos necesarios para la morfogénesis, diferenciación y homeostasis celular.
- *Definición operacional:* la presencia de los componentes de la matriz extracelular colágeno tipo I, agregan y ácido hialurónico serán evaluados por tinción Tricrómica de Masson, inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.
- *Escala de medición:* categórica nominal

Componentes del citoesqueleto

- *Definición conceptual:* Es un entramado tridimensional de proteínas que provee el soporte interno para las células.
- *Definición operacional:* la presencia de componentes del citoesqueleto actina, tubulina y vimentina serán evaluados mediante inmunohistoquímica y Western blot.
- *Escala de medición:* categórica ordinal.

Marcadores de degeneración de cartílago

- *Definición conceptual:* son moléculas que se presentan en patologías degenerativas del cartílago.

- Definición operacional: la expresión de marcadores de degeneración de cartílago MMP-3, MMP-9 y proteína HMGB-1 serán evaluados mediante inmunohistoquímica y Western Blot.
- *Escala de medición*: categórica nominal.

6.5 GRUPOS DE ESTUDIO.

En este estudio se emplearon un total de 180 ratas Wistar macho de 200 a 250g. Los animales de experimentación fueron obtenidos del bioterio de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Se siguieron los lineamientos del comité de bioética de Universidad Autónoma de San Luis Potosí para el empleo de animales en investigación. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en 3 grupos (ratas sanas o grupo control **(C)**), ratas con interferencia oclusal **(R)** y ratas con desgaste oclusal **(D)** de 60 ratas cada uno, y de cada grupo se evaluaron 20 ratas para cada tiempo de evaluación (1, 15 y 30 días) (**Tabla 1**).

GRUPOS	TIEMPOS DE EVALUACIÓN		
	1 día	15 días	30 días
Control (C)	20 ratas Wistar	20 ratas Wistar	20 ratas Wistar
Interferencia oclusal de Resina (R)	20 ratas Wistar	20 ratas Wistar	20 ratas Wistar
Desgaste oclusal (D)	20 ratas Wistar	20 ratas Wistar	20 ratas Wistar

Tabla 1. Distribución de los grupos de estudio y tiempos de evaluación.

6.6 PROCEDIMIENTOS DENTALES.

Como se describió previamente se realizaron dos tipos de desórdenes oclusales unilaterales: interferencia oclusal de resina y desgaste dental. Los procedimientos dentales se realizaron en ratas anestesiadas con pentobarbital intraperitoneal a una dosis promedio de 35mg/kg de peso. Las ratas se sujetaron en un soporte diseñado para facilitar el trabajo odontológico donde la boca permaneció abierta durante el tratamiento (**Fig. 2A**).



Figura 2. Modelo experimental de Desgaste Unilateral de Molares Superiores. **A)** Soporte empleado para mantener abierta la boca de la rata. **B)** Inclinación de la fresa DR5 de diamante para realizar el desgaste oclusal. **C)** Desgaste unilateral de molares superiores a nivel de tercio cervical del diente.

Las ratas fueron mantenidas durante el tiempo de experimentación a una temperatura de 21-23°C, con fotoperiodos de 12 h. El alimento y el agua se administraron *ad libitum*.

6.6.1 Desgaste oclusal

El procedimiento de desgaste dental se hizo en los molares superiores izquierdos utilizando una fresa DR5 de alta velocidad (**Fig. 2B**). Se eliminó en su totalidad la corona clínica de los molares (**Fig. 2C**).

6.6.2 Interferencia oclusal con resina

Se colocó la interferencia de resina en el primer molar superior izquierdo. En primer lugar se realizó una cavidad en el molar con una fresa de bola de carburo #1 (**Fig. 3A**).

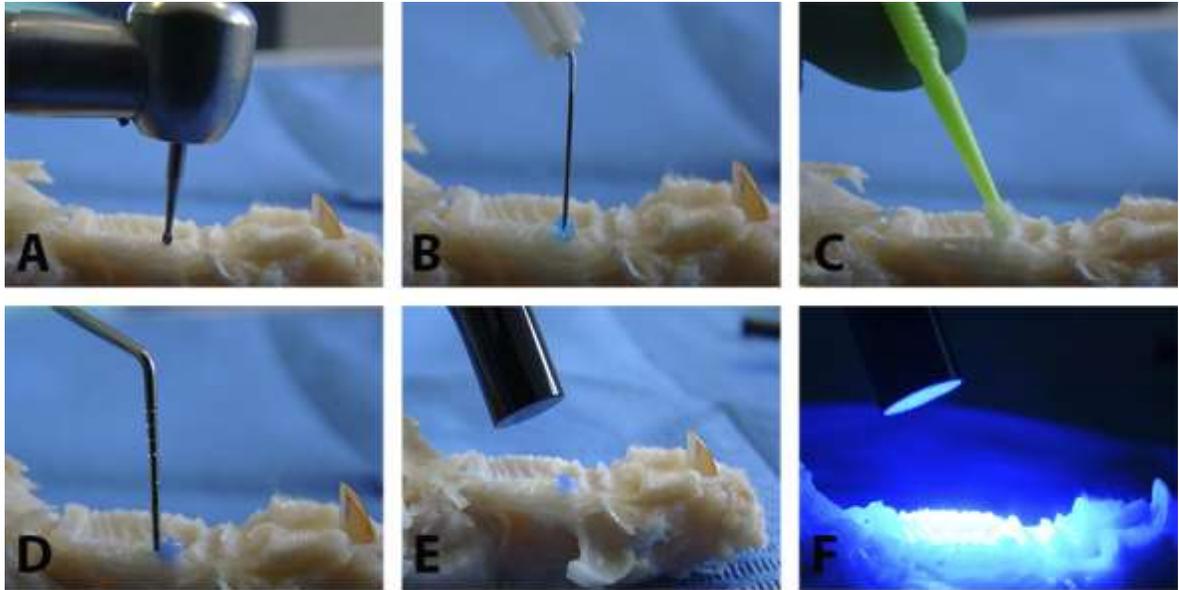


Figura 3. Modelo experimental de Interferencia oclusal con resina. **A)** Realización de cavidad con fresa de bola de carburo. **B)** Colocación de ácido grabador por 15 segundos. **C)** Colocación de Adhesivo. **D)** Colocación de obturación de resina en color azul y verificación de altura con sonda periodontal milimetrada. **E)** Interferencia oclusal de resina sin fotopolimerizar. **F)** Se termina la restauración con fotopolimerización de la resina durante 30seg.

En seguida, se desinfectó la cavidad con clorhexidina al 0.2% y se procedió a colocar el ácido grabador (Prodesa ®) por 20 seg (**Fig. 3B**), para hacer porosa la superficie dental y favorecer la adhesión de la resina. Se lavó la cavidad durante 20 segundos y en seguida se agregó el adhesivo (Te-Econom Bond, Ivoclar ®) el cual tiene la función de proveer la adhesión entre la dentina y esmalte con la resina (**Fig. 3C**). El adhesivo se fotopolimerizó durante 20 segundos con una lámpara de LED (Orisol, CE.). Posteriormente se colocaron dos capas de resina de color azul (Twinky Star, CE. Voco) (**Fig. 3E**) para facilitar la visualización durante el procedimiento, las cuales se fotopolimerizaron por 30

seg (Fig. 3F). Se verificó con una sonda periodontal milimetrada que la interferencia de resina sobrepasara el plano oclusal 1mm (Fig. 3F). Transcurrido el tiempo de evaluación de cada grupo las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital intraperitoneal de 80mg/kg de peso. De cada rata Wistar se obtuvieron dos articulaciones temporomandibulares: una derecha y otra izquierda. El lado **izquierdo** fue el lado donde se realizaron modificaciones oclusales por lo cual al disco articular de este lado se le consideró como tratado (TX), mientras que el lado derecho fue el opuesto a donde se realizó la modificación oclusal por lo que a este disco articular se denominó contralateral(CL).

6.7 TÉCNICA QUIRÚRGICA PARA LA OBTENCIÓN DE DISCO ARTICULAR DE ATM (Experimentos de prueba).

Se realizó el abordaje quirúrgico (Fig. 4A) con una incisión superficial desde el lóbulo de la oreja hasta llegar a los incisivos centrales inferiores (Fig. 4B).

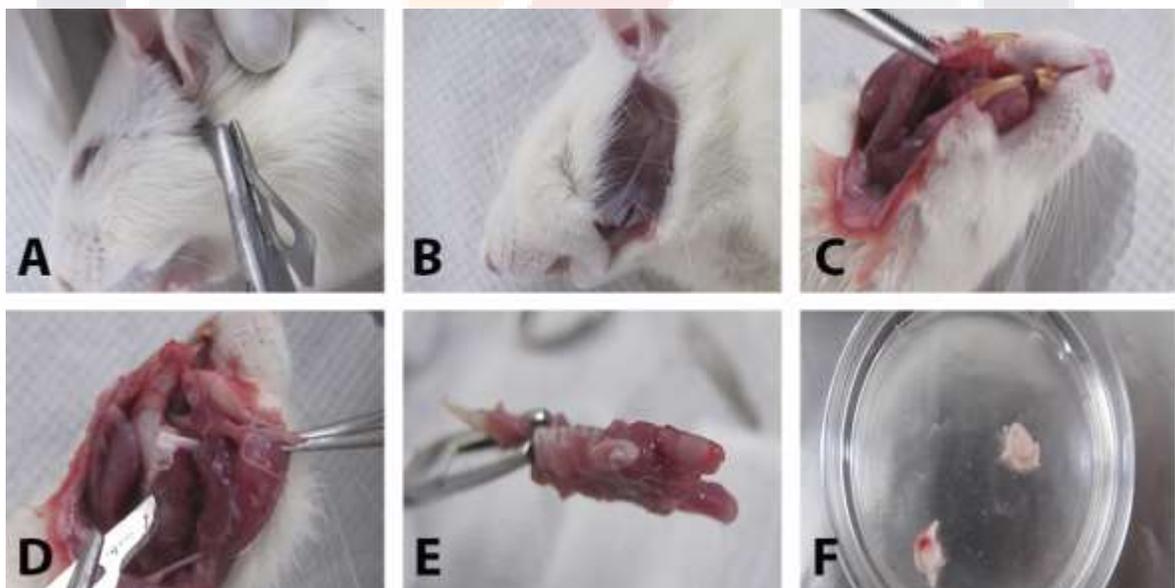


Figura 4. Técnica Quirúrgica para la obtención de disco articular y ATM. **A)** Para iniciar la técnica quirúrgica usó una hoja de bisturí #15. **B)** Primera incisión debajo del lóbulo de la oreja por el borde inferior de la mandíbula hasta la línea media. **C)** Separación de mandíbulas en la línea media. **D)** Eliminación de tejido conectivo que rodea a la mandíbula. **E)** Mandíbula donde se muestra el disco articular circular de color blanquecino. **F)** Discos articulares obtenidos.

Posteriormente se disecaron los tejidos (vaina muscular superficial, vaina muscular profunda, músculo masetero). Para facilitar la disección se realizó la separación de las mandíbulas en derecha e izquierda a nivel de los dientes incisivos centrales inferiores (**Fig. 4C**). Se expuso el hueso de la mandíbula, evitando tocar el cóndilo de la mandíbula y escotadura sigmoidea (**Fig. 4D**). En seguida se separó por completo la mandíbula para localizar el disco articular (**Fig. 4F**). Los discos obtenidos (**Fig. 4F**) por esta técnica se emplearon para los experimentos de Western Blot y se colocaron inmediatamente en crioviales para congelarse a -80°C hasta su procesamiento.

6.8 TÉCNICA QUIRÚRGICA PARA LA OBTENCIÓN ATM EN BLOQUE.

Originalmente se planeó realizar los cortes histológicos únicamente del disco articular, sin embargo se encontraron muchas dificultades para obtener muestras completas y donde fuera posible identificar la ubicación anterior y posterior del mismo. Debido a lo anterior, se realizó disecciones en bloque de la ATM, con el fin de obtener cortes histológicos sagitales para la observación al microscopio. La disección en bloque de la ATM se inició al eliminar toda la piel de la rata con tijeras de disección. Posteriormente, se retiró el tejido muscular circundante a la zona de la ATM,. Se realizaron 4 cortes utilizando un disco de dos luces de diamante (**Fig. 5A**), el primero fue un corte coronal a la mitad del arco cigomático, el segundo fue un corte coronal anterior al conducto auditivo externo, el tercero fue un corte transversal 2-3mm por encima el arco cigomático y el último un corte transversal a 5 mm por debajo del arco cigomático. Posteriormente, se introdujo una espátula en sentido sagital para desprender en su totalidad el bloque de la ATM (**Fig. 5B, C**). Los bloques de la ATM se emplearon para técnicas histológicas por lo que se fijaron en formalina neutra al 10% en PBS 1X.

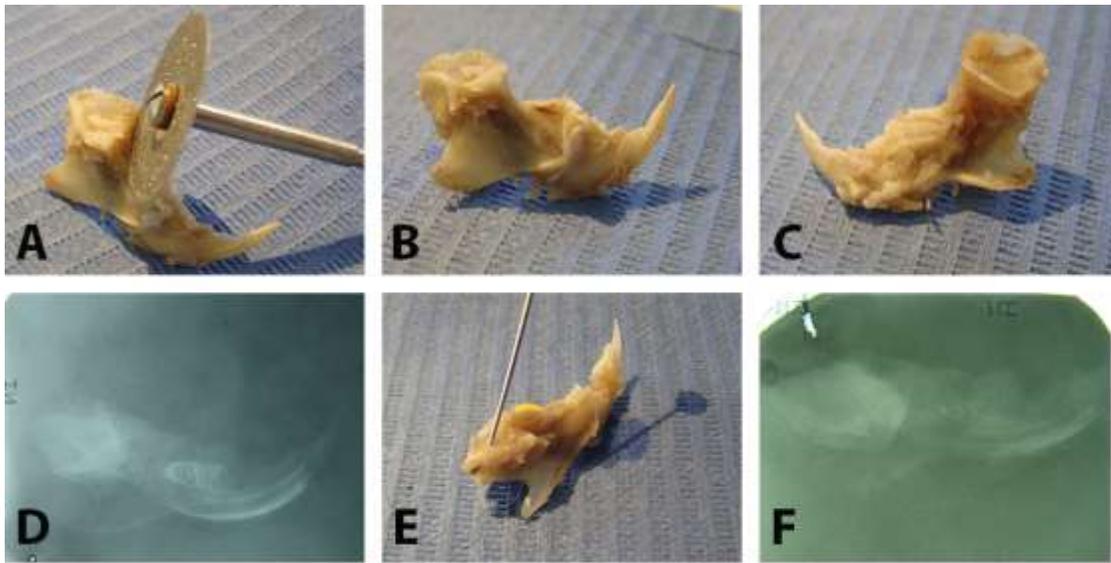


Figura 5. Obtención de bloques de ATM y su descalcificación. **A)** Los bloques de ATM se realizaron con un disco de diamante de dos luces. **B)** Vista externa de la articulación temporomandibular, donde se distingue el arco cigomático. **C)** Vista interna de la articulación temporomandibular, donde se aprecia una estructura cóncava que corresponde al hueso temporal del cráneo. **D)** Radiografía inicial de mandíbula para visualizar las estructuras calcificadas. **E)** Verificación del proceso de descalcificación realizado con EDTA/Formalina. **F)** Radiografía final del proceso de descalcificación de los bloques de ATM.

6.9 DESCALCIFICACIÓN DE LOS BLOQUES DE ATM.

Se obtuvieron 60 bloques de ATM que fueron histológicamente procesados (n=5). El proceso de descalcificación de los bloques de las articulaciones se hizo con una solución de EDTA al 14% y formalina al 10% a un pH de 7.4, a temperatura ambiente. El tiempo de descalcificación fue de 15 días, con recambios de la solución EDTA/formalina cada semana. Se verificó la descalcificación mediante radiografías (**Fig. 5D, F**) y a través de la consistencia del tejido utilizando un instrumento puntiagudo (**Fig. 5E**).

6.10 PREPARACIÓN DE LOS BLOQUES DE ATM PARA REALIZAR CORTES HISTOLÓGICOS.

Los bloques de ATM descalcificados se colocaron en cassettes para ser procesados en el histoquinet (**Fig. 6A**) que realiza una deshidratación en

alcoholes ascendentes para que el tejido pueda ser incluido en la parafina. Al finalizar este proceso se realizaron los cubos con parafina líquida a 56°C, donde las articulaciones fueron orientadas para la obtención de cortes sagitales (**Fig. 6B,C**) .

6.11 CORTES HISTOLÓGICOS.

Se realizaron cortes histológicos de ATM sagitales (incluye: disco articular, cartílago de ATM, hueso y músculo) de un espesor de 5 μm con un micrótopo (Leica, RM2125RT) (**Fig. 6D**).

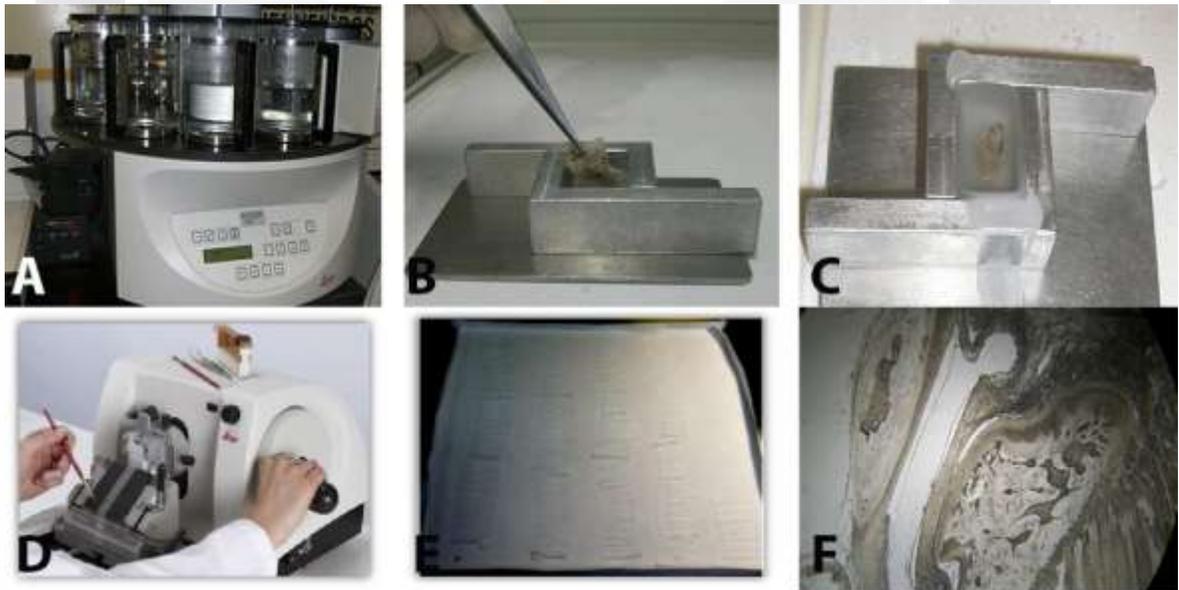


Figura 6. *Procesamiento de tejidos para cortes histológicos.* **A)** Los bloques de ATM descalcificados se colocan en el Histoquinet. **B)** Los bloques de ATM son orientados en los cubos de aluminio. **C)** Se rellenó el cubo en su totalidad con parafina líquida **D)** Los cubos de parafina que ya incluyen la ATM, se cortaron en Microtopo para obtener cortes de 5 μm . **E)** Cortes seriales de cada cubo de parafina. **F)** Microfotografía empleada para la localización de la zona de interés de la ATM, utilizando un microscopio de luz.

Previo al corte de los tejidos, los cubos de parafina fueron enfriados asegurar que cada corte saliera completo. El área donde se localizan las estructuras de interés es aproximadamente de 300 μm . Para este trabajo se realizaron cortes seriales (**Fig. 6F**), el número total de cortes completos de ATM

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fueron en promedio 64 cortes, de los cuales se tomaron las secciones correspondientes a los cortes entre el 20 y 40 para realizar las pruebas necesarias. En promedio de tiempo para cortar cada cubo fué de 6 horas. Los cortes fueron recuperados en portaobjetos silanizados (**Fig. 6F**).

6.12 SILANIZADO DE PORTAOBJETOS.

Los portaobjetos nuevos se lavaron con agua caliente y jabón dextran. En seguida se enjuagaron con agua destilada para eliminar en su totalidad el jabón, después se sumergieron en alcohol ácido durante 1 minuto y se dejaron secar en papel. A continuación se colocaron en acetona pura durante 1 minuto para posteriormente pasarlos por una solución silano-acetona (1:50) durante 3 segundos. Se dejaron secar por completo para recuperar sobre ellos los cortes de los tejidos.

6.13 DESPARAFINACIÓN DE LAMINILLAS.

El proceso de desparafinación se inició colocando las muestras en la incubadora (Model 12-140 Quincy Lab, Inc.) a una temperatura de 63°C durante toda la noche, para que el tejido se adhiera mejor al portaobjetos. A continuación se realizaron dos cambios de Xilol por 10 minutos, después dos cambios de alcohol al 100% durante 5 minutos, dos cambios de alcohol al 96% durante 3 minutos, un cambio de alcohol al 80% por 3 minutos, un cambio de alcohol al 70% por 3 minutos y un cambio de agua destilada por 5 minutos y en este momento se inicia la tinción.

6.14 TÉCNICA DE WESTERN BLOT.

Los discos articulares de ATM fueron procesados para la extracción de proteínas. Las muestras se homogenizaron en un Polytron (Kinematica) utilizando un amortiguador de lisis que se compone de Tris-HCl 25mM (pH 7.6), NaCl 150mM, EDTA 0.2mM (pH 8), DTT 0.5mM, triton X-100 al 1% y coctel de inhibidores de proteasas (complete Mini. Roche). Las muestras homogenizadas se incubaron a 4°C por 30 minutos con agitación. El material insoluble se eliminó al centrifugar el tejido homogenizado a 12,000rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se alicuotó para su almacenaje a -80°C. Se realizó la cuantificación de proteínas por el método de Bradford obteniendo la siguiente gráfica de la curva de calibración (**Fig. 7**).

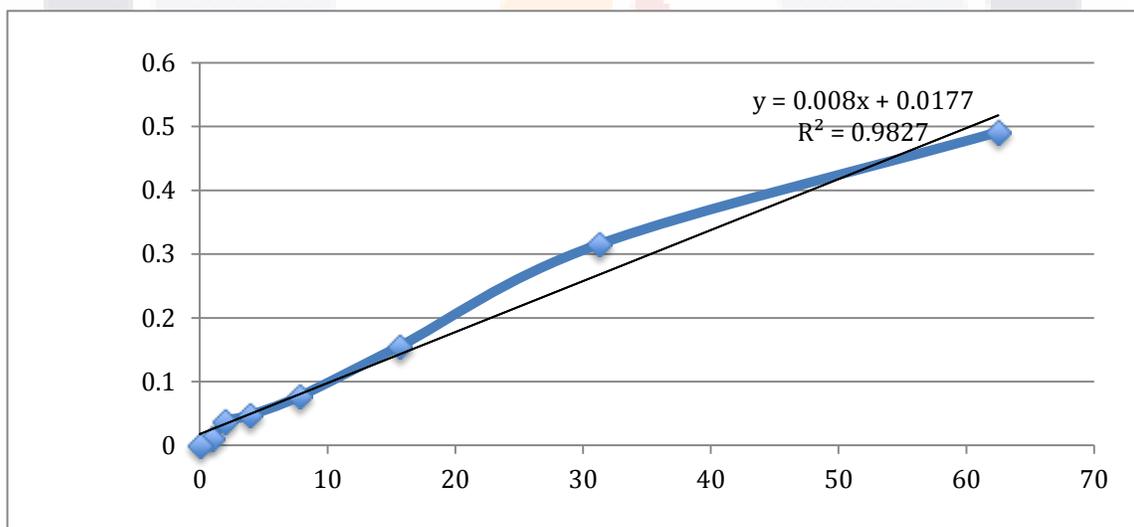


Fig. 7. Curva de calibración con ABS para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

A Continuación se muestra una tabla donde se muestra la cantidad total de proteína obtenida en cada grupo (**Tabla 2**).

Tiempo (días)	Grupos	Proteína total (µg)
1	Control	7273.33
1	1R-CL	3033.33
1	1R-TX	4533.33
15	Control	5453.33
15	15R-CL	3493.33
15	15R-TX	3713.33

Tabla 2. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford. En la nomenclatura el número indica el tiempo de evaluación. El grupo de estudio de interferencia oclusal de resina (R) y el lado tratado de la ATM (TX) y el lado contralateral (CL).

Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en geles al 15% en donde se cargo una cantidad de 50µg de proteína por pozo. Enseguida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot, Bio-Rad) durante 1 hr a 350 mA. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó con una solución de leche descremada al 5% y BSA al 0.5% en TBS-T (Sigma Aldrich). Para realizar el inmunoblot se utilizaron anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) en distintas diluciones (**Tabla 3**) en una solución de TBS-T con leche descremada al 0.5% y BSA al 0.05%: conejo policlonal anti-Tubulina β, cabra policlonal anti-Actina, conejo policlonal anti-MMP-3, conejo policlonal anti-Vimentina, ratón monoclonal anti-HMGB-1. Los anticuerpos primarios se incubaron una noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios peroxidados que se emplearon fueron: burro anti-cabra IgG (Jackson immunoresearch), Cabra anti-ratón IgG (Pierce, InmunoPure), burro anti-conejo (Jackson immunoresearch). Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La detección de la reacción se llevó a cabo por la técnica de quimioluminiscencia con el kit ECL plus (Pierce, Rockford, IL).

Proteína	Anticuerpo 1°	Dilución	Anticuerpo 2°	Dilución
MMP-3	Conejo policlonal anti-MMP-3	1:1,000	Burro anti-conejo IgG	1:20,000
Vimentina	Conejo policlonal anti-Vimentina	1:1,000	Burro anti-conejo IgG	1:25,000
Actina	Conejo policlonal anti-Actina	1:1,000	Burro anti-conejo IgG	1:30,000
HMGB-1	Conejo policlonal anti-HMGB-1	1:1,000	Cabra anti-conejo IgG	1:20,000
Tubulina β	Conejo policlonal anti-Tubulina β	1:1,000	Burro anti-conejo IgG	1:20,000
<i>Anticuerpos conejo policlonal (Santa Cruz Biotechnology), Anticuerpos Cabra anti-conejo IgG (Pierce Immunopure), Anticuerpos burro anti-conejo IgG</i>				

Tabla 3. Anticuerpos empleados para Western Blot y sus diluciones.

6.15 TINCIÓN PENTACRÓMICA DE RUSSEL-MOVAT.

Al inicio de la investigación se realizaron cortes únicamente de disco articular y fueron empleadas para las pruebas de la Tinción Pentacrómica de Russel-Movat. Las muestras se sumergieron en una solución de Voerhoeff elástica durante 15 minutos, después se colocaron en agua a 37°C durante 20 minutos, y posteriormente se colocaron en agua destilada. A continuación se incubaron en cloruro férrico al 2% (aproximadamente 2 minutos) hasta que las fibras elásticas estuvieran bien definidas y el fondo apareciera en gris, en ese momento se detuvo la reacción con agua destilada. Después, se incubaron en tiosulfato de sodio al 5% por 1 minuto, se lavaron en agua tibia 5 minutos, y se dejaron en ácido acético glacial al 3% por 3 minutos. Inmediatamente después se tiñó con azul alcian al 1% por 20 minutos hasta que las mucinas se tornaron azules y el tejido muscular fuera apreciable; se lavó con agua 37°C durante 10 minutos con un cambio de agua destilada. Se sumergieron en solución de rojo escarlata-fucsina ácida por 2 minutos enjuagando en varios cambios de agua destilada. Se colocaron en ácido acético al 1% durante 2 minutos, en seguida

se hicieron dos cambios de ácido fosfotúngstico al 5% por 3 minutos observando en el microscopio que el tejido conectivo fuera claro y que no se desaparecieran las fibras elásticas. Se utilizó un cambio en ácido acético al 1% por 5 minutos. Se realizaron tres deshidrataciones con alcohol etílico absoluto para hacer la tinción con saffron alcohólica durante 15 minutos y seguido de 3 deshidrataciones con alcohol absoluto y finalmente 2 cambios en xilol. Se montaron con entelan y cubreobjetos para ser observados en el microscopio óptico (Leica, ICC50).

6.16 INMUNOFLORESCENCIA.

Los cortes histológicos se desparafinaron y se hidrataron en agua destilada por 5 minutos, en seguida se colocaron en PBS 1X durante 5 minutos. A continuación se realizó el desenmascaramiento de antígeno con citrato de sodio al 0.1, pH de 6.

Se colocaron los portaobjetos en un recipiente con citrato de sodio, este recipiente se montó sobre una cama de hielo para evitar el calentamiento excesivo. Se colocó en el microondas a una potencia de 750W durante 5 ciclos de 30 segundos. Se dejó enfriar paulatinamente y se sumergieron los portaobjetos en PBS 1X. Se continuó con el bloqueo con albúmina bovina al 1% en PBS-T durante 45 minutos a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween durante 5 minutos cada uno. Se colocaron los anticuerpos primarios (**Tabla 4**), durante toda la noche a 4°C. Se lavó el anticuerpo primario con tres lavados con PBS-Tween de 5 minutos cada uno. Se incubó el anticuerpo secundario (**Tabla 4**) durante 2 horas a temperatura ambiente protegidos de la luz y se lavó tres veces con PBS-T por 5 minutos cada uno.

Proteína	Anticuerpo 1°	Dilución	Anticuerpo 2°	Dilución
MMP-3	Conejo policlonal anti-MMP-3	1:1,000	Alexa Fluor 488. Anti-conejo IgG	1:500
Vimentina	Conejo policlonal anti-Vimentina	1:1,000	Alexa Fluor 488. Anti-conejo IgG	1:500
Actina	Conejo policlonal anti-Actina	1:1,000	Alexa Fluor 488. Anti-conejo IgG	1:500
HMGB-1	Conejo policlonal anti-HMGB-1	1:1,000	Fluoresceína (FITC). Cabra Anti-rata IgG	1:500
Tubulina β	Conejo policlonal anti-Tubulina β	1:1,000	Alexa Fluor 488. Anti-conejo IgG	1:500
MMP-9	Conejo policlonal anti-MMP-9	1:1,000	Alexa Fluor 488. Anti-conejo IgG	1:500
Colágeno	Conejo policlonal anti-Colágeno	1:1,000	Alexa Fluor 488. Anti-conejo IgG	1:500
HA	Conejo policlonal anti-HA	1:1,000	Alexa Fluor 488. Anti-conejo IgG	1:500
Agrecan	Conejo policlonal anti-Agrecan	1:1,000	Alexa Fluor 488. Anti-conejo IgG	1:500
<i>Anticuerpos conejo policlonal (Santa Cruz Biotechnology), Alexa Fluor 488 Anti-conejo IgG (Invitrogen Detection Technologies), Fluoresceína (FITC) Cabra Anti-rata IgG (Jackson ImmunoResearch)</i>				

Tabla 4. Anticuerpos empleados para Inmunofluorescencia y sus diluciones.

Finalmente, se hizo la tinción nuclear con Sytox Naranja (Invitrogen, Molecular Probes) durante 10 minutos, y se hicieron 2 lavados con PBS-T durante 5 minutos cada uno y un último enjuague rápido con agua destilada. Las

muestras fueron montadas con Antifade (Abnova) para observarlas en el microscopio confocal.

6.17 TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA.

Las tinciones histológicas fueron realizadas según *Armed Forces Institute of Pathology laboratory methods*. Los cortes desparafinados se colocaron en hematoxilina por 2 minutos, un cambio de agua destilada por 1 minutos y se tiñeron después con eosina por 1 minuto y se dejaron en agua destilada por 5 minutos. Se inició con la deshidratación en alcoholes ascendentes durante 3 minutos, un cambio de alcohol al 70%, un cambio de alcohol al 80%, dos cambios de alcohol al 96%, dos cambios de alcohol al 100% y finalmente se colocaron en dos cambios de xilol durante 5 minutos. Se realizó el montaje con entelan (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) y cubreobjetos para observarse las muestras al microscopio óptico (Leica, ICC50, Wetzlar, Germany).

6.18 TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON.

Posterior a la desparafinación de las laminillas, se colocaron en solución fijativa de Bouin durante 1h a 56°C, transcurrido el tiempo se enjuagaron con agua corriente hasta que los tejidos perdieron el color amarillo para tornarse blancos. Se tiñeron las laminillas con hematoxilina férrica durante 15 minutos, enseguida se enjuagaron con agua corriente hasta eliminar el exceso de hematoxilina. El siguiente colorante fue rojo escarlata-fucsina ácida por 20 minutos con su respectivo lavado. Se colocaron después en ácido fosfotúngstico por 15 minutos y se lavaron para teñir con anilina azul durante 5 minutos hasta observar las fibras de colágeno en azul. Para eliminar el excedente de colorante azul se agregó ácido acético por 1 minuto y después se enjuagaron con agua corriente. Finalmente se deshidrataron con 3 cambios de alcohol al 96% por un minuto, seguido de dos cambios de alcohol al 100% por 1 minuto y tres cambios de Xilol por un minuto cada uno. Para observar al

microscopio óptico las laminillas se montaron con Entelan ((Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Las muestras teñidas con tinción tricrómica de Masson fueron utilizadas para observar la distribución de las células del cartílago, cuantificación celular, cuantificación de colágeno y evaluación del grosor del disco articular y cartílago articular de ATM.

6.19 ANALISIS DE IMÁGENES.

Todas las observaciones se realizaron en el microscopio Leica DM1000 microscope (Wetzlar, Germany). Las imágenes fueron adquiridas mediante la cámara Leica EC System (Wetzlar, Germany) en aumentos de 20X (Tinción tricrómica de Masson) y 100X (H&E) en el programa LAS EZ (3.0). El disco articular y cartílago de ATM fueron divididos sagitalmente en 3 partes iguales: tercio anterior, medio y posterior, con el empleo del Photoshop CS6 (Adobe System LTD, USA). Para los análisis de esta investigación únicamente se estudió el tercio medio (**Fig. 8**), esto debido a que se conoce que la zona media es el sitio que recibe mayor carga en la ATM, como lo reportado por de Zhang *et al.*, 2013.

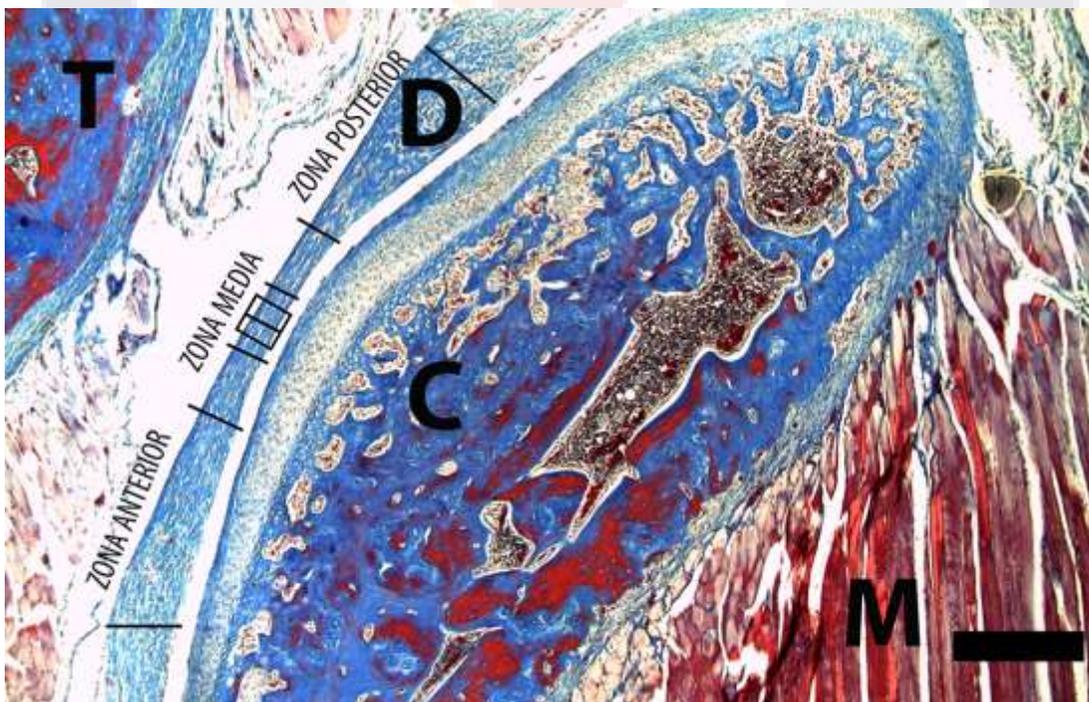


Figura 8. Selección de zona de evaluación en un corte sagital de la ATM (4X). Tinción con Tricrómica de Masson. Hueso temporal (**T**), Disco articular (**D**) Cóndilo mandibular (**C**) y Músculo (**M**). Barra de Escala 200µm.

Para la cuantificación de células se analizó el disco articular y la zona superficial del cartílago, los cuales están compuestos de fibrocartílago. Nueve imágenes de cada zona fueron evaluadas. La cuantificación se aplicó para un área determinada de 200µm X 200µm del tercio medio en las imágenes de tinción tricrómica de Masson 100X. La cuantificación se realizó por triplicado y el promedio fue empleado para el análisis estadístico. La cuantificación de colágeno se realizó mediante el análisis de la coloración azul de la tinción tricrómica de Masson. El análisis se realizó mediante el uso de espacios de color RGB (por sus siglas en inglés, Red, Green and Blue) y HSV (por sus siglas en inglés, Hue, Saturation and Value) (**Anexo 2**). El espacio RGB por si solo no nos permite eliminar los colores que no son azules por lo que se utilizó el espacio HSV el cual permitió eliminar todas las tonalidades que no fueran azules. En la **Fig. 9** se muestra una imagen en original y con la aplicación de los espacios de color utilizados y podemos observar como con el espacio HSV únicamente seleccionamos para cuantificar el color azul.

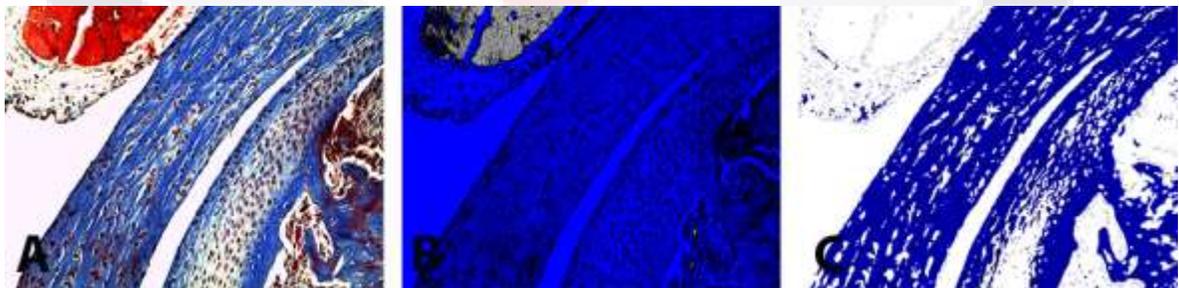


Figura 9. Espacios de color aplicados a un corte sagital de ATM. **A)** Imagen original **B)** Espacio de Color RGB en el canal Azul, **C)** Espacio de color HSV en el canal H en un rango de 100-200.

De cada imagen se tomó una muestra aleatoria de aproximadamente el 20% del tercio medio, para lo cual se aplicó una malla de cuadros de 12.5µm X 12.5µm. Diez cuadros de cada imagen fueron necesarios para completar el 20%. Con la muestra seleccionada de todos los grupos, se crearon imágenes

llamadas imagen-selección especial, las cuales se analizaron con el Software R (Software R, 2012) y el uso de dos librerías jpeg y biOps. En primer lugar se filtraron las tonalidades azules a través del uso del espacio de color HSV, trabajando con el canal H del tono o matiz en un rango de 100 a 200 (www.workwithcolor.com). Este rango permite detectar las tonalidades azules y eliminar los tonos fuera de nuestro interés. Una vez filtradas las tonalidades azules, se transformó el espacio de color HSV al espacio RGB con la finalidad de evaluar únicamente el canal azul. Los valores se obtuvieron por triplicado en el espacio RGB (0-255) de cada grupo de tratamiento. Esta forma de analizar la tonalidad de azul de la imagen permitió obtener una gran cantidad de datos debido a que se trabaja a nivel de píxeles.

6.20 CUANTIFICACIÓN CELULAR DEL DISCO ARTICULAR Y DE LA ZONA SUPERFICIAL DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE ATM.

Para la cuantificación de células se analizó el disco articular y la zona superficial del cartílago, los cuales están compuestos de fibrocartílago. Nueve imágenes de cada zona fueron evaluadas. La cuantificación se aplicó para un área determinada de $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ del tercio medio. La cuantificación se realizó por triplicado y el promedio fue empleado para el análisis estadístico.

6.21 DETERMINACIÓN DEL GROSOR DE DISCO ARTICULAR Y ZONA SUPERFICIAL DEL CARTÍLAGO ARTICULAR DE ATM.

Para la determinación del grosor del disco articular y zona superficial del cartílago de ATM se hicieron mediciones por triplicado de cada corte en el tercio medio y el valor promedio fue utilizado para el análisis estadístico.

6.22 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software R (Software R, 2012). La cuantificación de colágeno fue expresada en promedio \pm desviación estándar de cada grupo (n=9) del color azul en el espacio RGB, considerando todos los píxeles de las imágenes-selección especial. El número de condrocitos, grosor del disco articular y cartílago de ATM también fueron expresados en promedio \pm desviación estándar de cada grupo. Todos los datos fueron comparados por 2 pruebas de comparación múltiple one-way ANOVA y Tukey. En todos los casos, los valores de P menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

7. RESULTADOS

7.1 TINCIÓN PENTACROMICA RUSSEL-MOVAT.

Se realizó la tinción Pentacrómica de Russel-Movat en cortes de disco articular de ATM. La morfología tisular del disco articular se muestra en la **Fig.10**. En la imagen se observó una distribución paralela de las fibras de colágeno teñidas en color rosa amarillento, con células fibrocartilaginosas intercaladas entre ellas distinguidas por su núcleo color morado intenso; en las zonas subyacentes a las células del fibrocartílago se observa en color azul las mucinas producidas por dichas células .

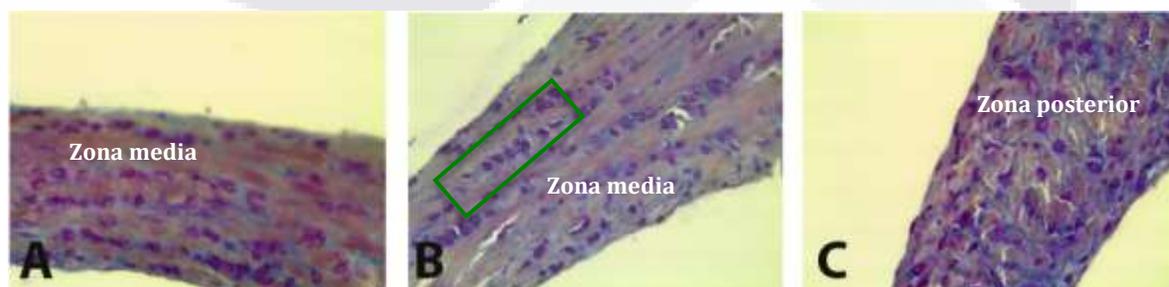


Figura 10. Tinción Pentacrómica de Russel-Movat en muestras de tejido de interferencia oclusal de resina. Cortes Sagitales de disco articular de ATM. 20X. **A)** Microfotografía de disco articular sano. **B)** Microfotografía de disco articular del grupo 15R-TX **C)** Microfotografía de disco articular del grupo 15R-CL. Las imágenes se muestran con resultados no tangibles ya que no es posible observar diferencias entre los grupos, debido a que el colágeno teñido en color rojo-café no se

distingue claramente, ya que el disco articular es fibrocartilago el colágeno debe apreciarse en gran cantidad. Las agrupaciones celulares en hileras (rectángulos verdes □).

La distribución de las fibras de colágeno cambiaron en las zonas anterior y posterior del disco articular donde presentaron una distribución no homogénea. A diferencia de la zona media donde las fibras de colágeno fueron paralelas entre sí. Se observó una morfología celular redondeada en la mayor parte del disco, además en algunas zonas se presentaron agrupaciones en hileras horizontales paralelas a la superficie del tejido se observan en el recuadro en color verde (**Fig.10B**). La tinción Pentacrómica de Russel Movat no resultó ser adecuada para visualizar la cantidad de colágeno presente en cada uno de los grupos, ya que los diferentes colorantes de los componentes estructurales teñidos se superponen unos con otros, lo que evita una distinción clara de las fibras de colágeno y de las características del fibrocartilago. Por lo que se optó por cambiar a otra técnica de tinción específica para colágeno.

7.2 INMUNOFLOURESCENCIA DE DISCO ARTICULAR DE ATM.

El análisis de inmunofluorescencia se realizó por microscopía confocal en imágenes tomadas a un aumento de 40X . Las unidades empleadas para las mediciones fueron unidades relativas de fluorescencia. Las moléculas determinadas para el citoesqueleto a los diferentes días de evaluación fueron Actina, Vimentina y Tubulina; para procesos degenerativos MMP-3 (**Fig.11**), MMP-9 y HMGB-1; y las moléculas de matriz extracelular fueron Colágeno tipo I, Agrecan y Ácido Hialurónico.

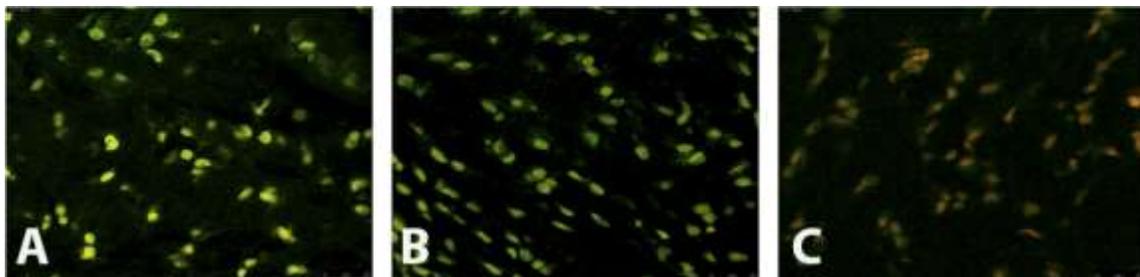


Figura 11. *Inmunofluorescencia de disco articular de la ATM de grupo de interferencia oclusal de resina. A)* Expresión de MMP-3 en disco articular sano. **B)** Expresión de MMP-3 en disco articular del lado tratado a 15 días de evaluación **C)** Expresión de Vimentina en disco articular del lado tratado a 15 días de evaluación. Las imágenes se muestran con resultados no tangibles ya que no es posible observar diferencias entre los grupos.

Estos son resultados preliminares por lo que se debe hacer las replicas adecuadas para obtener datos cuantitativos representativos para obtener conclusiones con un sustento estadístico.

7.3 WESTERN BLOT DE DISCO ARTICULAR DE ATM.

La técnica de Western Blot se empleó para muestras de disco articular de ATM de ratas sometidas a estrés mecánico mediante la colocación de interferencia oclusal de resina. Los resultados mostraron que la bandas para las proteínas estudiadas corresponden con los pesos moleculares esperados: Actina 43 kDa, MMP-3 de 55 kDa, HMGB-1 de 30 kDa y Tubulina-β de 55 kDa (**Fig.12**).

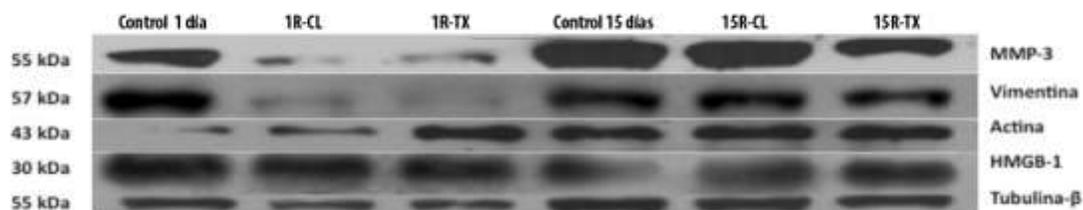


Figura 12. *Western Blot de disco articular de ATM.* En esta figura se muestra la expresión relativa de las proteínas MMP-3, HMGB-1, Vimentina y Actina en el disco articular. Se compararon la expresión las proteínas ya mencionadas en los tiempos de evaluación de 1 y 15 días; de los grupos controles y tratados con interferencia oclusal. Se encontró que aun día de tratamiento en el grupo tratado la expresión de vimentina y MMP-3 disminuyó notoriamente. Se observó por el contrario una sobreexpresión de MMP-3 a los 15 días de tratamiento del lado contralateral. Las otras proteínas se presentaron sin cambios aparentes. Como control interno se utilizó la Tubulina- β.

A un día después del la colocación de la interferencia oclusal de la resina la expresión de MMP-3 en el disco articular de la ATM de los grupos de interferencia oclusal de resina en el lado tratado y contralateral disminuyó visiblemente comparado con el grupo control. Hubo un aumento en la

expresión de MMP3 en las ratas control de 15 días (quizá asociado a la edad) con respecto a las de 1 día pero a los 15 días y comparado al control de 15 días hubo una disminución en la expresión de MMP3 en el TX pero no en el CL. En los estudios realizados por *Gilbert et al., 2010* se encontró que esta metaloproteinasa puede encontrarse con expresiones variables ante la presencia de estrés mecánico. Al determinar la expresión de Vimentina a un día de tratamiento se encontró que su expresión disminuyó claramente en los discos de la ATM de los grupos 1R- TX y 1R-CL comparado con el grupo control. A los 15 días de evaluación, no se observaron cambios en los discos de la ATM de los grupos 1R- TX y 1R-CL respecto al control. Según *Deschner et al., 2006* esta disminución de la vimentina puede deberse a que el fibrocartilago; además, de tener un papel importante en la homeostasis y remodelación del cartilago, también puede participar en la prevención de la degradación de matriz extracelular. Los reportes obtenidos por *Li et al., 2010* mostraron que el estrés mecánico puede producir una degradación inicial de vimentina de los condrocitos, con un subsecuente rearrreglo de los filamentos intermedios. Por su parte, la expresión de la Actina y HMGB-1, no mostraron diferencias evidentes en relación con los grupos controles. La tubulina se empleó como control de carga. Para este experimento se realizó un único experimento, por lo cual los datos solo nos pueden dar una idea del comportamiento de estas proteínas en el disco articular de ATM cuando es sometido a estrés mecánico. Por lo que se deben realizar experimentos adicionales para hacerlo por triplicado y obtener información confiable y con sustento estadístico.

7.4 MORFOLOGÍA TISULAR (TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA, Y TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON).

Ninguno de los animales murió durante el tiempo del estudio. El análisis histológico de los 3 grupos de estudio en los diferentes tiempos de evaluación no mostró signos de inflamación.

7.4.1 GRUPO CONTROL (Disco articular y Cóndilo de la ATM)

La evaluación de la morfología celular y tisular se realizó en las muestras teñidas con H&E y Tricrómica de Masson . En el disco articular de la ATM el colágeno se encontró en grupos de fibras compactas y gruesas que se extienden en sentido antero-posterior y paralelas entre sí. Los condrocitos están dispuestos paralelos entre las fibras de colágeno, solos o en pequeñas hileras (**Fig.13**). Se observaron las células con núcleos redondeados localizados en su laguna y una pequeña cantidad de material de matriz amorfo circundante. Los condrocitos presentaron núcleos redondeados. Las fibras de colágeno ocupan en su gran mayoría el tejido y se contaron en promedio 57 células en un segmento de disco articular de 200µm (**Fig.15**).

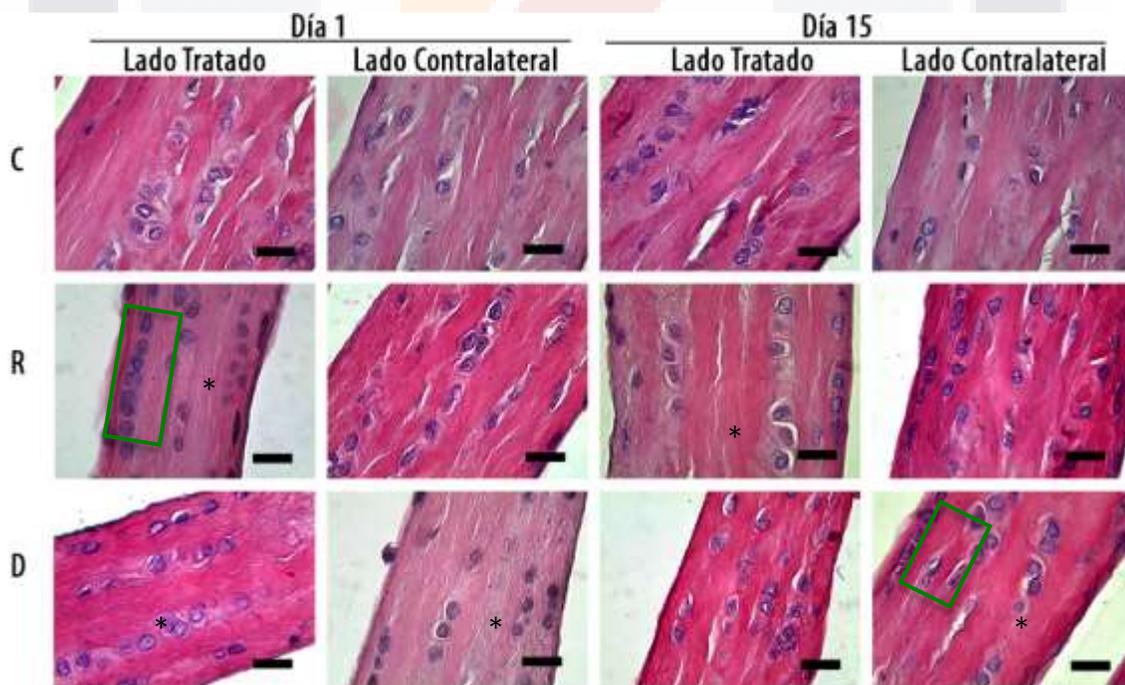


Figura 13. Análisis Histológico en el Disco Articular (100X). Secciones sagitales de disco articular de ATM teñidas con Hematoxilina-Eosina. Los Grupos fueron designados con una letra: Grupo control

("C"), Grupo de interferencia oclusal de resina ("R") y Grupo de desgaste ("D"). Barra de escala 10 μm. La morfología celular en los grupos experimentales y control son muy similares, ya que se muestran condrocitos de núcleo redondeado con un citoplasma reducido. En los grupos experimentales podemos observar con mayor frecuencia que el grupo control, alineamientos celulares de una célula de espesor (rectángulos verdes □). Se observaron zonas libres de células (asterisco *)

En el grupo control, la superficie del cóndilo se encuentra cubierta por una delgada capa fibrocartílago. Este presentó características similares de los condrocitos del disco articular con disposición paralela a las fibras de colágeno. El cartílago de ATM mostró una morfología como la que se describe en la literatura (Fig.14), en la cual se observaron las capas definidas: Zona fibrosa, proliferativa, intermedia, hipertrófica y calcificada. La zona superficial presentó un grosor constante las fibras de colágena teñidas de color rosado intenso que corren en sentido antero-posterior, donde los condrocitos que se encontraron paralelos a la superficie y tienen una forma aplanada. La zona media se caracterizó por mayor cantidad de condrocitos de morfología redondeada rodeados de gran cantidad de matriz extracelular lo que le da una coloración azul menos intensa. La zona profunda se describe con condrocitos dentro de su laguna, las cuales se encuentran rodeadas por colágeno teñido de azul intenso (Fig.14).

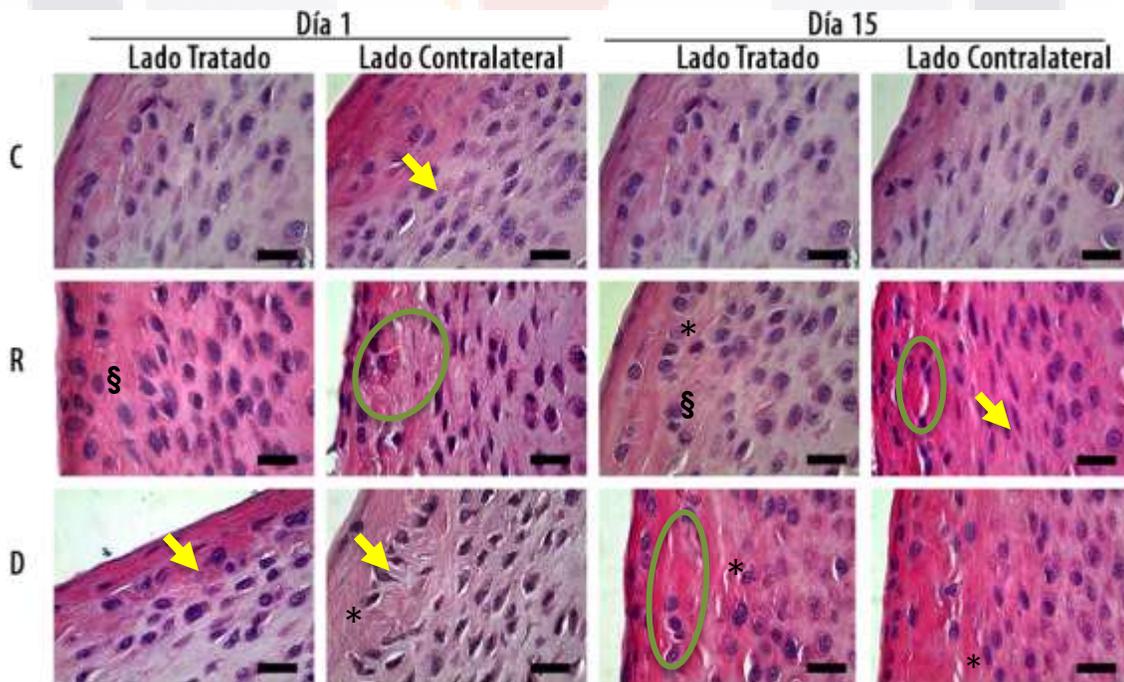


Figura 14. Análisis Histológico en el Cartílago Articular de ATM (100X). Secciones sagitales de cartílago articular de ATM teñidas con Hematoxilina-Eosina. Los Grupos fueron designados con una letra: Grupo control ("C"), Grupo de interferencia oclusal de resina ("R") y Grupo de desgaste ("D"). Barra de escala 10 μm . En el grupo control la morfología de las células fue redondeadas y ligeramente ahusadas con una disposición paralelas a la superficie. En los grupos experimentales la morfología celular se observó células ahusadas y alargadas (Flechas amarillas \blacktriangledown), y otras de forma poliédrica. En los grupos experimentales de 15 días las células se acomodaron de forma irregular en las diferentes zonas del cartílago de ATM. Se observaron zonas libres de células (asterisco *) y agrupaciones celulares (círculo verde \bullet). El colágeno en grupos experimentales se encontró con desorganización de las fibras (espiral \S)

7.4.2 GRUPO 1R-TX

Los discos articulares del grupo 1R-TX mostraron una morfología similar al grupo control, excepto con algunos cambios que se mencionan a continuación. En la zona media en su parte superior del disco articular se observaron hileras de condrocitos (6 - 8 células) paralelas entre si (**Fig.13**, rectángulo verde \square). La zona superficial del cartílago de ATM mostró un grosor mayor en comparación con el grosor del disco articular. Se encontró mayor cantidad de células en la zona superficial y desorganizadas en comparación con otras capas de cartílago de ATM. La morfología celular en la zona media del cartílago de ATM en dos muestras fueron aplanadas que las controles (**Fig.14**, flechas amarillas \blacktriangledown).

7.4.3 GRUPO 1R-CL

En el disco articular de este grupo se observaron hileras de condrocitos apilados en cerca de los bordes del disco. Se observó zonas desprovistas de condrocitos en algunas zonas del disco articular (**Fig.13**, asterisco *). En el cartílago de ATM la zona superficial presenta desorganización de las fibras de colágeno, existen algunas áreas con agrupaciones celulares (**Fig.14**, círculo \bullet) y otras zonas acelulares (**Fig.14**, asterisco *). Las células de la zona media no se distinguen claramente adoptaron morfologías de las células hipertróficas de la capa profunda, al igual que se observó desorganización de esta zona (**Fig.14**).

7.4.4 GRUPO 1D-TX

La morfología del disco articular es similar al control, sin embargo se observaron agrupamientos en hileras de condrocitos. En el cartílago de ATM, la zona superficial mostró un grosor mayor comparado con el grosor del disco articular (**Fig. 18**) en todas las muestras, en la unión entre las dos zonas la colágena empezó a desorganizarse (**Fig.14**).

7.4.5 GRUPO 1D-CL

En el disco articular la zona media en la parte inferior mostró hileras de condrocitos en diferentes áreas (**Fig.13**, rectángulos verdes □), al igual que se localizan zonas desprovistas de células (**Fig.13**, asterisco *). En el cartílago de ATM la zona superficial mostró un grosor mayor donde el colágeno se encontró desorganizado. Se encontraron áreas con agrupaciones celulares y áreas libres de células. En la zona media la morfología es irregular en las células redondeada- aplanadas (**Fig.14**, flechas amarillas ▼).

7.4.6 GRUPO 15R-TX

En el disco articular se observaron distintas áreas con presencia de una hilera de condrocitos. En la zona media del disco articular se encontró poca cantidad de células en comparación con otros grupos pero sin diferencia con el grupo control (**Fig. 15**) y zonas extensas de colágeno (**Fig.13**). En el cartílago de ATM en la zona superficial muestra un grosor mayor que el disco articular donde la colágena se encuentra desorganizada. Presenta distintas capas de fibras de colágeno, entre las cuales se hay zonas con algunas agrupaciones celulares o filas de condrocitos. Además se encontró que el colágeno no se encuentra organizado en sentido antero-posterior si no que forma como espirales (**Fig.14**, espiral §).

7.4.7 GRUPO 15R-CL

En el disco articular se observó al igual que en otros grupos experimentales hileras de condrocitos. En el cartílago de ATM en la zona superficial muestra un grosor mayor, las fibras de colágeno no presentaron un arreglo paralelo entre si, y las células de esta capa se encontraron desorganizadas y en otras zonas mostraron agrupaciones. En la zona media se presenta una morfología en las células con una tendencia elipsoidal a redondeada (**Fig.14**, flechas amarillas ↘).

7.4.8 GRUPO 15D-TX

En el disco articular se localizaron distintas áreas que muestran una hileras de condrocitos. Las fibras de colágeno predominaron en el tejido del disco articular con células aisladas (**Fig.13**). En el cartílago de ATM la zona superficial muestra un grosor mayor, las fibras de colágeno no presentaron un arreglo paralelo entre si, y las células de esta capa se encuentran desorganizadas (**Fig.14**).

7.4.9 GRUPO 15D-CL

En el disco articular en la zona media en distintas áreas del disco articular se mostraron hileras de condrocitos. En el cartílago de ATM en la zona superficial presentó un grosor mayor, las fibras de colágeno no mantuvieron un arreglo paralelo entre si, y las células de esta capa se observaron desorganizadas. En la zona media se presentó una morfología en las células con una tendencia poliédricas (**Fig.14**).

En resumen en los grupos experimentales, el disco articular presentó una morfología celular similar al grupo control. Sin embargo, se presentó un hallazgo sobresaliente en la distribución celular en estos grupos ya que se observaron filas de una célula de espesor, las cuales se presentaron de forma más frecuente y

en filas de mayor número de células en los grupos de 15 días de tratamiento (**Fig.13**, rectángulo verde □). En cambio, en el cartílago de ATM de los grupos experimentales se observó en el lado tratado sin cambios morfológicos, a diferencia del lado contralateral donde la morfología se tornó ahusada. El arreglo de los condrocitos se tornó irregular, y con el paso del tiempo la distribución irregular de los condrocitos fue más notoria (**Fig.14**, espiral §).

7.5 CUANTIFICACIÓN CELULAR EN EL DISCO ARTICULAR Y CARTÍLAGO DE ATM.

Se cuantificaron células en disco articular y zona superficial del cartílago de ATM.

No hubo cambios de los grupos experimentales con respecto al grupo control. El grupo 1R-TX mostró un aumento estadísticamente significativo (50%) en la celularidad en el disco articular respecto al grupo control (**Fig. 15**). Además se encontró una disminución estadísticamente significativa (34-46%) al comparar este mismo grupo con los 4 subgrupos de 15 días de tratamiento comparado con 1R-TX (**Fig. 15**).

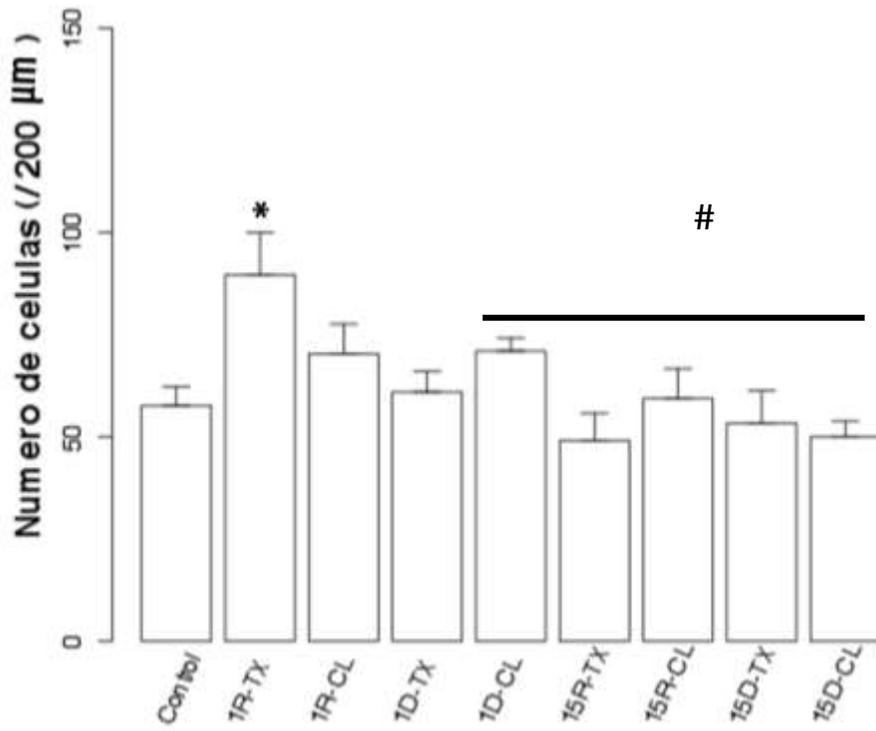


Figura 15. Análisis Cuantitativo del número de células en el disco articular de ATM. Se muestra un aumento significativo * $P < 0.05$ en el grupo 1R-TX respecto al control. Los grupos experimentales de 15 días presentaron una disminución significativa al ser comparados con el grupo 1R-TX # $P < 0.05$.

El grupo de desgaste de 1 día (1D-TX y 1D-CL) de tratamiento presentó un aumento significativo (50%-63%) del número de células en la zona superficial respecto al grupo control (**Fig. 16**).

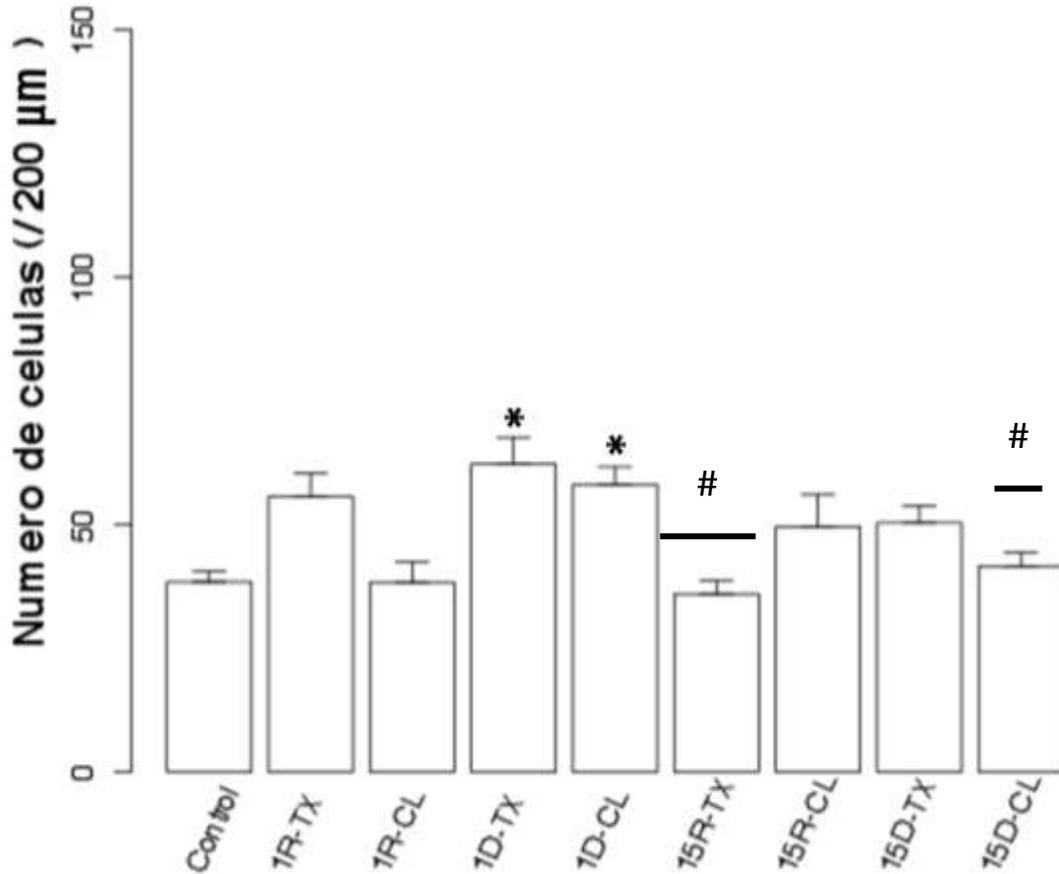


Figura 16. Análisis Cuantitativo del número de células en la zona superficial del cartílago de ATM. Muestra un aumento significativo * $P < 0.05$ en el grupo 1D-TX y 1D-CL respecto al control. Los grupos experimentales de 15 días (15R-TX y 15D-CL) presentaron una disminución significativa al ser comparados con el grupo 1D-TX # $P < 0.05$.

Los grupos de 15 días de evaluación los subgrupos 15R-TX y 15D-CL mostraron una disminución significativa (33%-42%) en relación al grupo 1D-TX. La comparación con este grupo 1D-TX es por que al hacer comparación entre grupos fue con el grupo control el que mostró una diferencia significativa. Cabe resaltar que independientemente de las diferencias en los conteos celulares en esta zona, al final de los 15 días, se encontraron algunas zonas libres de células, similar a los cambios degenerativos o lesiones tempranas tipo osteoartritis descritas en reportes previos (Wang *et al.*, 2010; Jiao *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2010). Por lo que se piensa que hubo un rearrreglo de condrocitos

que se agruparon y dieron lugar a la aparición de zonas libres de células (**Fig. 16**)



7.6 MEDICIÓN DEL GROSOR DEL DISCO ARTICULAR Y ZONA SUPERFICIAL DEL CARTÍLAGO DE ATM.

El grosor del disco articular y de la zona superficial del cartílago de ATM fue medido utilizando el software LAS EZ. De cada imagen analizada se tomaron 3 mediciones en distintas áreas del tercio medio.

El grupo 15D-TX presentó una disminución marcada significativamente (32%) en el grosor del disco articular respecto al grupo control (**Fig. 17**).

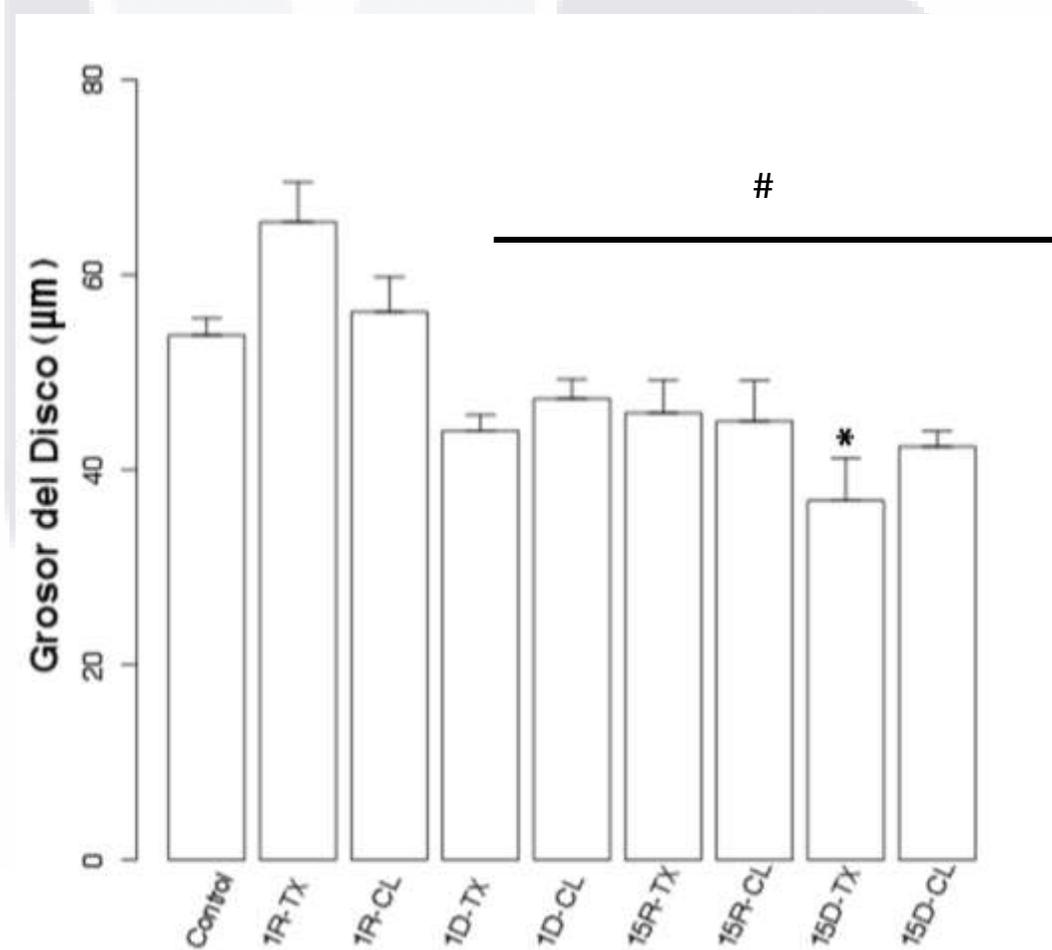


Figura 17. Análisis de los cambios en el grosor del disco articular de ATM en la zona media. Se encontró una disminución significativa * $P < 0.05$ en el grupo 15D-TX respecto al control. Sin embargo, los grupos experimentales 1D, 15D y 15R presentaron una disminución significativa al ser comparados con el grupo 1R-TX # $P < 0.05$.

Por otro lado, se observó que el disco articular de la ATM de los grupos de 1 y 15 días de desgaste, y el grupo de 15 días de interferencia oclusal mostraron una disminución significativa (30-44%) al compararse con el grupo 1R-TX. La comparación con este grupo 1R-TX es por que al hacer comparación entre grupos fue con el grupo contra el que mostró una diferencia significativa. Por lo que podemos relacionar que el grosor del disco articular disminuyó con el tiempo de evolución posterior a la alteración unilateral del plano de oclusión (Fig. 17). En la zona superficial del cartílago de ATM se observó un aumento (31-46%) del grosor para los grupos de desgaste de 1 y 15 días, y el grupo 15R-CL (Fig. 18).

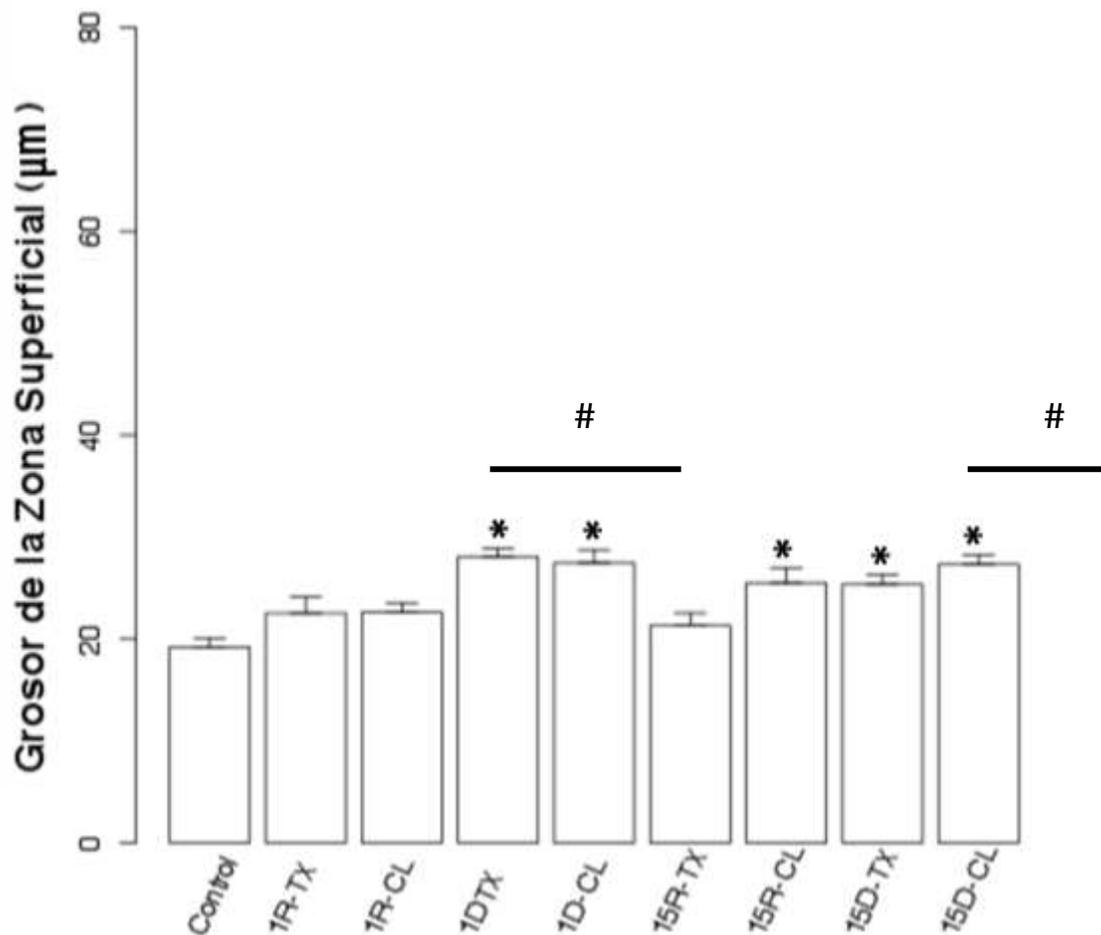


Figura 18. Análisis de los cambios en el grosor de la zona superficial del cartílago de ATM en la zona media. Se encontró un aumento significativo * P < 0.05 en los grupos 1D, 15D y 15R-CL respecto al control. Los grupos 1D-TX, 1D-CL y 15D-CL aumentaron significativamente en el grosor de la zona superficial comparados con 15R-TX # P < 0.05.

El grupo 15R-TX mostró una disminución (30%) en el grosor comparado con el grupo de desgaste de 1 día y el subgrupo 15D-CL. La comparación con este grupo 15R-TX es por que al hacer comparación entre grupos fue con el grupo contra el que mostró una diferencia significativa. Por lo que se considera que existe una similitud en general en los cambios que produce el estrés mecánico con la alteración unilateral del plano de oclusión, sin embargo en el grupo de la interferencia oclusal los cambios se observan en una u otra articulación (lado tratado o lado contralateral) (**Fig. 18**).



7.7 CUANTIFICACIÓN DE COLÁGENO EN CORTES CON TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON.

La tinción Tricrómica de Masson reveló con coloración azul la presencia de fibras de colágeno. La cuantificación de colágena mediante espacios de color RGB y HSV mostró una disminución significativa (2-13%) para la mayoría de los grupos experimentales, excepto en el grupo 1R-TX en el cual no se presentaron cambios (**Fig.19**).

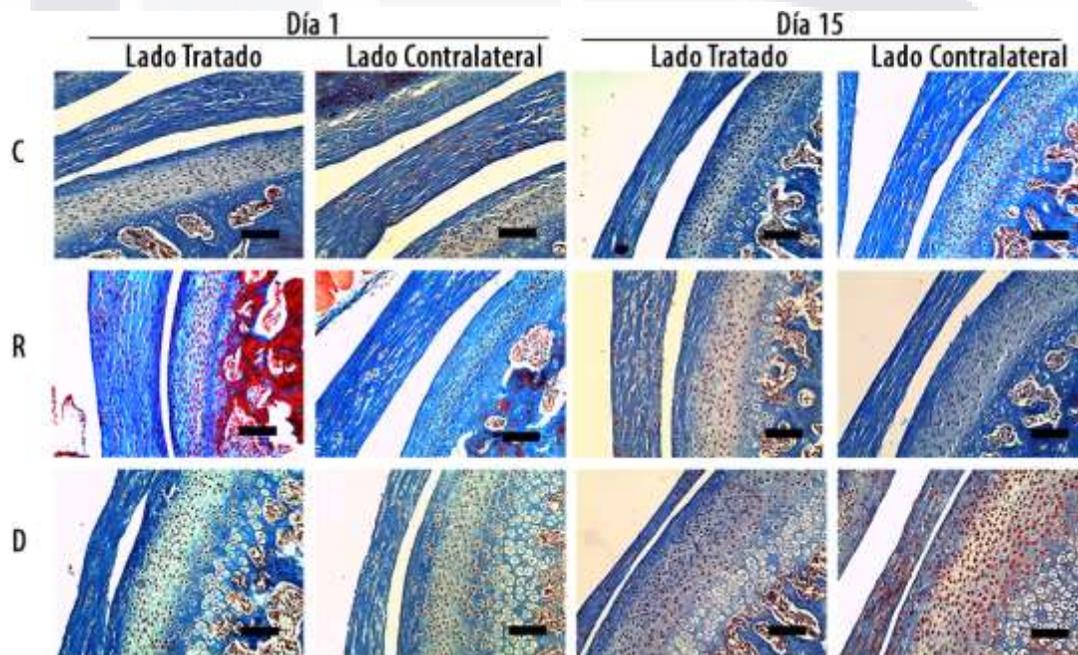


Figura 19. Análisis Histológico de Disco Articular y Cartílago de ATM (20X). Secciones sagitales de disco articular y cartílago de ATM teñidas con Tricrómica de Masson. Los Grupos fueron designados con una letra: Grupo control ("C2"), Grupo de interferencia oclusal de resina ("R") y Grupo de desgaste ("D"). Barra de escala 50 μ m. La tinción tricrómica de Masson mostró una disminución de la intensidad azul en los grupos experimentales por lo que se realizó el análisis de imágenes para hacer la comparación. Podemos observar que el disco articular del grupo control se observa de mayor grosor que en los grupos experimentales, pero por el contrario la zona superficial del cartílago de ATM se encuentra engrosado de manera considerable. Se encontraron en el disco articular algunas zonas libres de células así como también en la zona superficial, sin embargo en este último se presentaron agrupamientos de células.

La cantidad de colágeno aumentó significativamente en el grupo 1R-CL (2%) respecto al grupo control. Sin embargo, la cantidad de colágeno disminuyó significativamente (13%) para los grupos: 1D-TX, 15D-CL, 15R-TX y 15R-CL comparado con el grupo control (**Fig. 20**).

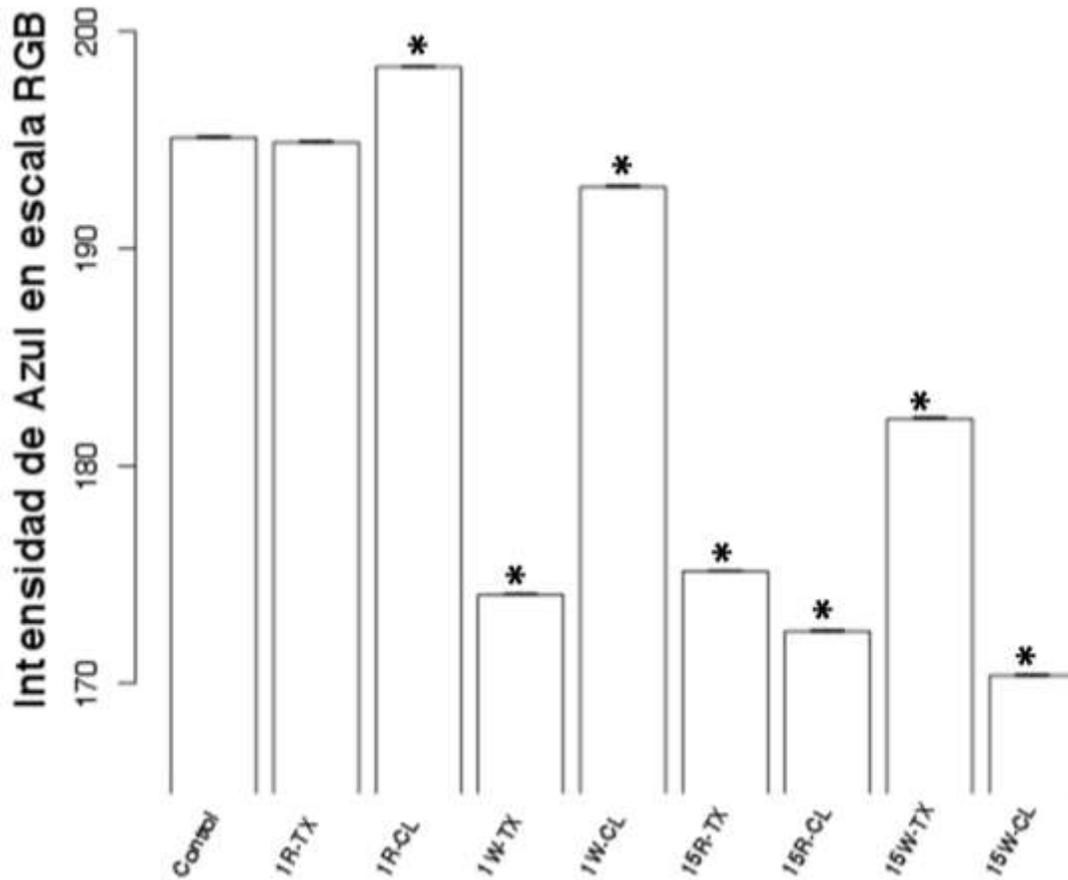


Figura 20. Cuantificación de la cantidad de colágeno basada en la intensidad de azul en la escala RGB (0-255). Acercamiento de la gráfica original (160-200). Se presentó un aumento significativo $*P<0.05$ en el grupo 1R-CL respecto al grupo control. Además, se mostró una disminución significativa en los grupos 1D, 15R y 15D respecto al control. Por lo que observamos que ante la presencia del estrés mecánico la cantidad de colágeno se ve disminuida en el disco articular.

Con estos resultados podemos observar que la alteración del plano oclusal unilateral puede provocar cambios en la cantidad de colágeno en tiempos cortos de evaluación. Por lo que al presentarse una alteración oclusal de este tipo es suficiente para inducir fenómenos de degeneración de cartílago (**Fig. 20**).

8. DISCUSIÓN

Una alteración maxilomandibular no compensada puede causar una sobrecarga articular. Ya sea por que dicha inestabilidad se genere bruxismo o por que obligue a trabajar a la ATM en una situación de carga desfavorable (Campo, 2000; Otaño *et al.*, 2005; Lescas *et al.*, 2011). Una interferencia oclusal y el bruxismo pueden provocar alteraciones en la ATM (Manfredini *et al.*, 2010). Este trabajo de investigación se centró en la inducción de estrés mecánico mediante la alteración del plano de oclusión. Inicialmente se trabajó con solo un modelo experimental de interferencia oclusal de resina; sin embargo, se requería comparar con una alteración más severa del plano oclusal por lo que se incluyó el grupo de desgaste dental unilateral de todos los molares superiores. En este trabajo se comenzó con el análisis histológico únicamente del disco articular de ATM. Con los discos articulares se realizó tinción pentacrómica de Russel-Movat, técnica de inmunofluorescencia (para identificar marcadores de degeneración de cartílago). En las muestras teñidas con la tinción Pentacrómica de Russel-Movat no logramos observar los detalles que esperábamos por lo que se reemplazó esta tinción por la Tricrómica de Masson. De los experimentos realizados con las técnicas de inmunofluorescencia y western blot solo obtuvimos resultados preliminares para un solo grupo por lo que se necesita complementar los grupos para realizar un análisis estadístico. Cuando realizaron las pruebas preliminares de western blot de disco articular determinamos la cantidad de tejido requerida para cada repetición por lo que se aumentó el número de especímenes para que la prueba tuviera fundamento estadístico. Estas muestras de tejido se tienen congeladas a -86°C . Las muestras de disco articular son un tejido muy pequeño se tuvieron muchas dificultades para su correcto manejo histológico donde la información que podíamos obtener era muy limitada. Ante esta situación se decidió hacer el análisis histológico de la ATM en bloque, con esto pudimos obtener una visión completa de la ATM. Para analizar las ATM en bloque y tener suficiente cantidad de tejido

para hacer los experimentos de western blot se emplearon 180 ratas wistar. Por lo que se decidió después de analizar los resultados preliminares de las técnicas empleadas enfocar el trabajo a procesar las muestras histológicamente y se usaron las tinciones tricrómica de masson y H-E. Además, con las muestras teñidas con la tinción tricrómica se diseñó un método de cuantificación de colágeno a través de la coloración azul. De forma conjunta se midió el grosor y número de células de fibrocartilago del disco articular y zona fibrosa del cartilago del cóndilo de ATM. Ambos modelos *in vivo* de estrés mecánico fueron utilizados en este estudio para simular estas dos situaciones frecuentes que se presentan en la práctica clínica odontológica. El modelo de interferencia oclusal unilateral fue realizado solo de un lado por que generalmente una interferencia oclusal es unilateral. Sin embargo el bruxismo usualmente es bilateral, pero para poder comparar los resultados del modelo de interferencia unilateral se aplicó el modelo de desgaste dental unilateral el cual pudiera simular una situación de bruxismo y poder evaluar los cambios a nivel de la ATM en ambos modelos experimentales. Los tiempos de evaluación fueron 1 y 15 días, para evaluar los cambios presentados a corto plazo. Nuestra hipótesis fue que el grupo de desgaste dental presentaría mayor daño articular comparado con el grupo de interferencia oclusal. Otra de las hipótesis fue que el lado de trabajo se encontraría mas afectado que el lado contralateral. Sin embargo, nuestros resultados mostraron distintos resultados entre el lado tratado y contralateral en los grupos experimentales en los dos tiempos evaluados. Por esta razón nuestra hipótesis fue rechazada. Se escogieron ratas Wistar como modelo animal por que los dientes molares no erupcionan continuamente, a diferencia de sus dientes anteriores. En el modelo de plano oclusal de conejos realizado en el estudio de Yoshikawa *et al.*, 2008 se produjeron cambios ocasionados por la carga funcional masticatoria, los cuales fueron muy similares a la OA. Sin embargo, los dientes de los conejos erupcionan continuamente y provocan una regresión del plano oclusal alterado (Yoshikawa *et al.*, 2008). En los molares de ratas Sprague-Dawley la alteración del plano oclusal produjo cambios degenerativos en la ATM. Algunos de ellos fueron: rearrreglos irregulares

de condrocitos, zonas libres de células, incremento de la síntesis de metaloproteinasas, disminución de la proliferación de condrocitos y pérdida de hueso subcondral (Zhang *et al.*, 2013). Otro estudio de oclusión modificada no mostró ningún cambio en el cartílago de ATM, donde se realizaron extracciones unilaterales o aumento de la altura oclusal (Kikuta, 1980; Toyoshima *et al.*, 2003).

El menisco juega un papel importante para distribuir la carga en los compartimientos articulares así como la absorción del choque mecánico (Englund *et al.*, 2009; Englund *et al.*, 2009B; Englund *et al.*, 2009C; Ding *et al.*, 2007; Pauli *et al.*, 2011; Kurosawa *et al.*, 1980; Badlani *et al.*, 2013). Anteriormente, no existía una asociación entre la degeneración del menisco y la OA (Bedi *et al.*, 2010; Badlani *et al.*, 2013). El desgarramiento del menisco, una degeneración no traumática, daño del menisco o una disfunción pueden ser causas de OA (Pauli *et al.*, 2011; Englund *et al.*, 2009; Badlani *et al.*, 2013). Ahora se sabe que una rodilla sana puede desarrollar OA debido a un desgarramiento del menisco y un menisco intacto puede degenerar en una rodilla artrítica (Hellio Le Graverand *et al.*, 2001; Gigante *et al.*, 1994; Copenhaver *et al.*, 1978; Cook *et al.*, 1999; Cook *et al.*, 2006; Chiari *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 1983; Pauli *et al.*, 2011). Otros estudios indican que la degeneración del menisco inicia dentro del propio tejido más que en la superficie y de ahí se esparce sobre las superficies articulares del menisco, con el tiempo, progresando en una disrupción total o pérdida (Pauli *et al.*, 2011). El daño o disfunción del menisco altera la mecánica de la rodilla y puede iniciar o acelerar la cascada patológica dando lugar a la OA (Bedi *et al.*, 2010; Badlani *et al.*, 2013). Nuestros resultados de forma similar de los modelos *in vivo* de alteración del plano oclusal unilateral mostraron a los 15 días de evaluación cambios degenerativos como condrocitos de morfología aplanada y una distribución irregular del colágeno. Los cambios degenerativos observados con el desgaste dental unilateral fueron similares a los encontrados en un estudio donde se realizaron extracciones unilaterales (Kikuta, 1980). El estrés mecánico en la ATM produce daños en el disco articular y disminución en la cantidad de colágeno, lo cual tiene una relación estrecha con el tiempo de evaluación de los grupos experimentales.

El colágeno es el componente más abundante en el disco articular, por lo que cuantificamos la presencia de este componente en muestras teñidas con la tinción tricrómica de Masson con un novedoso y fácil procedimiento, que usa dos espacios de color. La cuantificación de colágeno con esta técnica mostró que la mayoría de los grupos experimentales excepto 1R-TX tuvieron un decremento de la cantidad de colágeno. La cantidad de colágeno en 1R-CL mostró un incremento significativo respecto al grupo control, mismo resultado encontrado en inflamación temprana de la ATM en ratas Sprague-Dawley donde también se encontró un aumento de la presencia de agregan y glucosaminoglucanos (Wang *et al.*, 2010). La cantidad de colágeno disminuyó significativamente en el grupo de desgaste dental unilateral a 1 y 15 días de evaluación. En OA temprana provocada por estrés mecánico se han observado cambios similares, donde por PCR cuantitativo la concentración de colágeno tipo II disminuyó en las regiones superficiales del menisco mientras que en zonas profundas se encontraron zonas en proceso de reparación donde se incrementó la concentración de colágeno (Zhang *et al.*, 2013; Lahm *et al.*, 2010). Sin embargo, se requiere realizar más pruebas específicas utilizando los dos modelos experimentales de esta investigación para determinar los tipos de colágeno presentes.

La síntesis de metaloproteinasas está relacionada con la disminución del colágeno por que estas son las enzimas responsables de degradar esta proteína (Zhang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010). La OA resulta de un fallo de los condrocitos para mantener la homeostasis entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz (Goldring *et al.*, 2007; Buckwalter *et al.*, 2006; Buckwalter *et al.*, 2005; Aigner *et al.*, 2004; Heijink *et al.*, 2012). Esta pérdida de la homeostasis resulta en: un incremento del contenido de agua y disminución del contenido de proteoglicanos, un debilitamiento de la red de colágena por un decremento de la síntesis de colágeno tipo II y una degradación de las colágenas preexistentes (Buckwalter *et al.*, 2005; Heijink *et al.*, 2012). En el presente estudio, la modificación del plano oclusal unilateral provocó cambios en la cantidad de colágena a corto plazo.

Existen múltiples vías regulatorias por las cuales los condrocitos perciben y reaccionan ante los estímulos mecánicos, incluyendo las vías de señalización y mecanismos que pueden dar lugar a cambios directos a nivel de la transcripción, traducción, post-traducción, organización extracelular mediada por células y degradación de la matriz extracelular (Buckwalter *et al.*, 2005; Grodzinsky *et al.*, 2000; Heijink *et al.*, 2012).

Las articulaciones sinoviales pueden permanecer intactas por la carga repetitiva durante las actividades normales de la vida diaria sin, desarrollar OA (Buckwalter *et al.*, 2006; van Dijk *et al.*, 1995; Heijink *et al.*, 2012). Sin embargo, la demanda mecánica que excede a la tolerancia, lo que es la habilidad para reparar y mantenerse por sí mismo, el cartílago no ATM juega un papel importante en el desarrollo y progresión de la degeneración de la articulación (Buckwalter *et al.*, 2006; Buckwalter *et al.*, 2005; Heijink *et al.*, 2012). Un estrés de contacto mecánico excesivo puede directamente dañar el cartílago no ATM y el hueso subcondral y adversamente alterar la función del condrocito (Buckwalter *et al.*, 2006; Heijink *et al.*, 2012). En nuestros experimentos, el número de condrocitos en el disco articular fue el mismo que en el grupo control, pero su estado metabólico claramente no es suficiente para producir colágeno. Este dato está apoyado por el hecho que encontramos una cantidad disminuida de colágeno en el análisis de la tonalidad azul de la tinción tricrómica de Masson. Por otro lado, las fibras de colágeno en la zona superficial del cartílago no ATM producidas por la edad se encuentran relacionadas con los procesos degenerativos.

En el menisco de rodilla, se han observado cambios de mayor magnitud atribuidos a la edad; al emplear la tinción de Safranina O, se observó una disminución en la densidad celular, degeneración mucoide con pérdida de la organización de las fibras de colágeno (Pauli *et al.*, 2011). Nuestros resultados muestran que la superficie del cartílago de ATM presentó una distribución de fibras de colágena bien organizadas y paralelas en los grupos control, a diferencia de los grupos experimentales donde se observó desorganización de las fibras de colágeno.

El cartílago de ATM del grupo de desgaste unilateral a un día de evaluación mostró un incremento significativo del número de condrocitos en la zona superficial, mientras que a los 15 días este grupo permaneció como el control. En el disco articular, hubo un incremento significativo del 50% en el número de células en el grupo 1R-TX, probablemente se debe a cambios en la estructura del tejido que puede resultar en mayor número de células en la región central.

Los *clusters* celulares son una característica de un punto de reparación temprana en las capas de cartílago de ATM en osteoartritis (Fujii *et al.*, 1976; Mankin *et al.*, 1982; Fujii *et al.*, 2002; Yoshikawa *et al.*, 2008), y es una respuesta a la producción de matriz extracelular en presencia de estrés mecánico en condrocitos (Kubokawa *et al.*, 1994; Yoshikawa *et al.*, 2008). En un modelo de alteración de la ATM en el cual se realizó la distalización de molares en ratas Sprague Dawley, se observó a los 15 días de tratamiento la presencia de áreas de tejido libres de células en el cartílago de ATM, similar a los cambios degenerativos o lesiones tempranas de OA reportadas en otros estudios (Wang *et al.*, 2010; Jiao *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). En este estudio fue posible identificar *clusters* celulares y zonas libres de células en fibrocartílago del cartílago de ATM, así como cambios en la producción de matriz extracelular, al modificar el plano oclusal unilateralmente con una interferencia oclusal de 1mm de altura, o al desgastar todos los molares superiores izquierdos. Los agregados celulares pueden encontrarse con una disposición distinta a las típicas descritas en OA. Pauli *et al.*, (2011) empleó un modelo de OA en rodilla y encontró en el menisco agregados celulares lineales, lo cual se atribuyó a una proliferación fibro-condrocítica o pseudoclonaje (Pauli *et al.*, 2011). Se piensa que el fenómeno descrito por Pauli como *clusters* (agrupamientos) celulares en menisco articular de rodilla en OA es el mismo observado en el menisco de la ATM en los grupos con estrés mecánico inducido. En estos grupos se presentó una mayor frecuencia de alineamientos y con mayor número de células. Esto puede estar relacionado con las zonas que reciben el impacto cuando se somete a estrés mecánico la ATM.

Un estudio realizado por *Yoshikawa et. al., (2008)* mostró que el grosor del cartílago de ATM sufre modificaciones en respuesta al estrés mecánico. La alteración del plano oclusal la realizaron mediante el desgaste dental bilateral en dientes en algunos dientes anteriores y molares. Dentro de los resultados que obtuvieron *Yoshikawa et. al., (2008)* observaron en la eminencia articular del temporal que la capa de cartílago se adelgazó a los 3 días de tratamiento incluso se encontraron algunos *clusters* de células. El área de expresión de colágeno tipo II disminuyó en esta área comparado con el grupo control. A los 7 días encontraron un adelgazamiento del cartílago de la eminencia articular y cóndilo, junto con una disminución del área de expresión de colágeno II y en este tiempo de evaluación observaron la aparición de algunos *clusters* celulares. Sin embargo, los cambios que obtuvieron a los 15 días de tratamiento el cartílago de la eminencia articular y del cóndilo se engrosaron, no encontraron *clusters* celulares y el área positiva para colágeno II disminuyó cuando lo compararon contra su control (*Yoshikawa et al., 2008*). Los hallazgos a los 3 días de tratamiento en el modelo de *Yoshikawa et. al., (2008)* respecto grosor del cartílago de ATM del cóndilo son similares a los encontrados en los modelos experimentales del presente estudio a un día de tratamiento, ya que en el grupo de interferencia el grosor se aumentó pero sin mostrar diferencias significativas, por el contrario el grupo de desgaste presentó en ambas articulaciones un aumento significativo en el grosor del cartílago de ATM. Por lo que observamos que hay una modificación casi inmediata del grosor del cartílago de ATM post modificación de plano oclusal.

Según los objetivos propuestos se cumplieron 2 objetivos el 1 y 3, sin embargo se requiere hacer futuras investigaciones que incluyan la expresión componentes de citoesqueleto, moléculas de matriz extracelular distintas al colágeno y proteínas asociadas a procesos degenerativos. Respecto a las variables dependientes no se evaluaron los componentes del citoesqueleto ni la degeneración de cartílago, debido a que el estudio fue muy amplio y se enfocó a matriz extracelular.

9. CONCLUSIONES

La tinción Pentacrómica de Russel-Movat no mostró ser efectiva para distinguir las fibras de colágeno. Por esta razón se utilizó la Tinción Tricrómica de Masson por ser una tinción específica para colágeno.

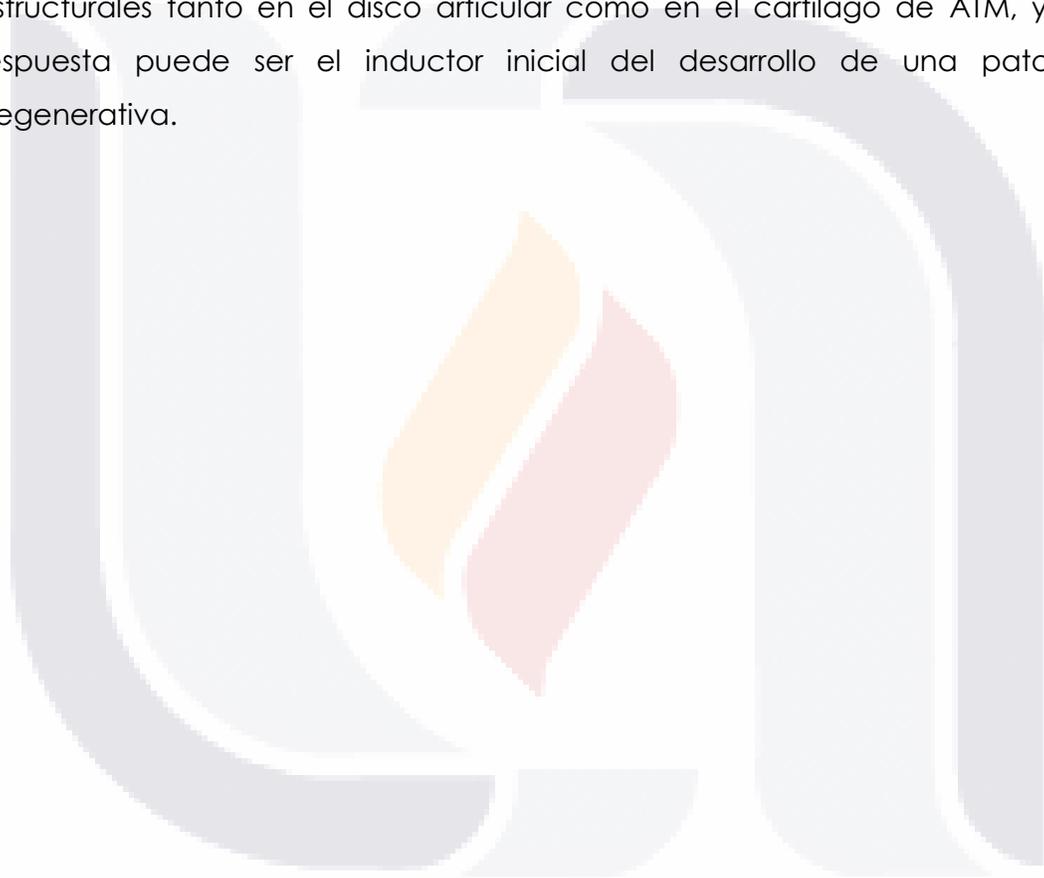
Las inmunofluorescencias realizadas en disco articular de ATM para evaluar la presencia de las proteínas Actina, Vimentina y Tubulina, MMP-3, MMP-9, HMGB-1, colágeno tipo I, agregcan y ácido hialurónico no se realizaron en todos los grupos y no se hicieron las repeticiones necesarias para obtener resultados con sustento estadístico.

La técnica de Western Blot realizada mostró que la bandas para las proteínas estudiadas corresponden con los pesos moleculares esperados: Actina 43 kDa, MMP-3 de 55 kDa, HMGB-1 de 30 kDa y Tubulina- β de 55 kDa. Se encontró que la Vimentina y la MMP-3 disminuyeron a un día de tratamiento en el grupo 1R-TX (interferencia oclusal con resina). La vimentina es una proteína de citoesqueleto intermedio que ha sido relacionada con el estrés mecánico. Estos resultados obtenidos solo nos pueden darnos una idea del comportamiento de estas proteínas en el disco articular de ATM cuando es sometido a estrés mecánico, ya que se requiere hacer las pruebas por triplicado para obtener información confiable y con sustento estadístico.

Respecto a la morfología del tejido del disco articular se observó la presencia de hileras de condrocitos se volvió un fenómeno frecuente en los grupos con tratamiento, así como se encontraron zonas libres de células donde el componente abundante fue el colágeno.

La zona superficial del cartílago de ATM de los grupos tratados en la mayoría de los grupos se encontró de un espesor mayor, y en algunos casos la organización de las fibras y células se perdió. Otro fenómeno importante fue la presencia de agregados de condrocitos y zonas libres de células en el cartílago de ATM ya que se ha descrito como característico de la OA.

El estrés mecánico induce un arreglo de cordones celulares en los 2 tipos de modelos experimentales empleados en el presente estudio. El grupo de desgaste unilateral produjo cambios similares a los encontrados a estudios donde se realizaron extracciones unilaterales. El análisis de los espacios de color HSV y RGB representa un nuevo método semicuantitativo para cuantificar colágeno cuando se emplea la tinción tricrómica de Masson. Finalmente, la modificación del plano oclusal puede inducir cambios morfológicos y estructurales tanto en el disco articular como en el cartílago de ATM, y esta respuesta puede ser el inductor inicial del desarrollo de una patología degenerativa.



10. BIBLIOGRAFÍA

A

Abramson SB, Attur M, Yazici Y. Prospects for disease modification in osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2(6):304-12.

Adams JC, Watt FM. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*. 1993; 117(4):1183–1198.

Adams ME, Billingham ME, Muir H. The glycosaminoglycans in menisci in experimental and natural osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1983; 26(1):69-76.

Aigner T, Rose J, Martin J, Buckwalter J. Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res* 2004; 7(2):134-145.

Almonte-Becerril M, Navarro-Garcia F, Gonzalez-Robles A, Vega-Lopez MA, Lavallo C, Kouri JB. Cell death of chondrocytes is a combination between apoptosis and autophagy during the pathogenesis of Osteoarthritis within an experimental model. *Apoptosis*. 2010;15(5):631–638.

American Academy of Sleep Medicine. International classification of sleep disorders, pocket version: diagnostic and coding manual. 2nd ed. Westchester: American Academy of Sleep Medicine; 2006.

B

Badlani JT, Borrero C, Golla S, Harner CD, Irgang JJ. The effects of meniscus injury on the development of knee osteoarthritis: data from the osteoarthritis initiative. *Am J Sports Med*. 2013; 41(6):1238-44.

Bae YC, Park KP, Park MJ, Ihn HJ. Development of vimentin filaments in the cells of the articular disc of the rat squamosomandibular joint with age. *Arch Oral Biol*. 1998;43(7):579-83.

Bag R, Suleman N, Guntupalli KK. Respiratory failure in interstitial lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2004;10(5):412–418.

Bedi A, Kelly NH, Baad M, Fox AJ, Brophy RH, Warren RF, Maher SA. Dynamic contact mechanics of the medial meniscus as a function of radial tear, repair, and partial meniscectomy. *J Bone Joint Surg Am*. 2010; 92(6):1398-1408.

Benjamin M, Evans EJ. Research review: fibrocartilage. *J Anat*. 1990;171:1-15.

Benya PD, Brown PD, Padilla SR. Microfilament modification by dihydrocytochalasin B causes retinoic acid-modulated chondrocytes to reexpress the differentiated collagen phenotype without a change in shape. *J Cell Biol*. 1988;106(1):161–170.

Borer JS, Truter SL, Gupta A, Herrold EM, Carter JN, Lee E, Pitlor L. Heart failure in aortic regurgitation: the role of primary fibrosis and its cellular and molecular pathophysiology. *Adv Cardiol*. 2004;41:16–24.

Bothner H, Wik O. Rheology of hyaluronate. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1987;442:25-30.

Boudreau N, Myers C, Bissell MJ. From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. *Trends Cell Biol.* 1995;5(1):1-4.

Bouvier M, Zimny ML. Effects of mechanical loads on surface morphology of the condylar cartilage of the mandible in rats. *Acta Anat (Basel).* 1987;129(4):293-300.

Burger EH, VeldhuijzenJP. Influence of mechanical factors on bone formation, resorption, and growth in vitro. In: Hall BK (ed) *Bone, Vol 7, Bone Growth-B.* CRC Press, Boca Raton, 1993;(7):37-56.

Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005;54:465-480.

Buckwalter JA, Martin JA, Brown TD. Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology.* 2006;43(3-4):603-609.

C

Campo A. *Rehabilitación oral y oclusal.* Harcourt, Madrid. 2007;26-7.

Carlsson GE, LeResche L. Epidemiology of temporomandibular disorders. In: Sessle BJ, Bryant PS, Dionne R. (Eds.) *Temporomandibular Disorders and Related Pain Conditions.* IASPPress, Seattle. 1995;211-226.

Casanova-Rosado JF, Medina-Solís CE, Vallejos-Sánchez AA, Casanova-Rosado AJ, Hernández-Prado B, Avila-Burgos L. Prevalence and associated factors for temporomandibular disorders in a group of Mexican adolescents and youth adults. *Clin Oral Investig.* 2006;10(1):42-9.

Celenza FV, Nasedkin JN. *Occlusion: the state of the art.* Quintessence Publishing Co Inc. Chicago. 1978:31-46.

Chiari C, Koller U, Dorotka R, Eder C, Plasenzotti R, Lang S, Ambrosio L, Tognana E, Kon E, Salter D, Nehrer S. A tissue engineering approach to meniscus regeneration in a sheep model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(10):1056-65.

Chicurel ME, Chen CS, Ingber DE. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10(2):232-239.

Christensen LV, Rassouli NM. Experimental occlusal interferences. Part I. A review. *J of Oral Rehabil.* 1995; 22: 515-20.

Choi KY, Yang JD, Chung HY, Cho BC. Current concepts in the mandibular condyle fracture management part I: overview of condylar fracture. *Arch Plast Surg.* 2012;39(4):291-300.

Cook JL, Fox DB, Malaviya P, Tomlinson JL, Kuroki K, Cook CR, Kladakis S. Long-term outcome for large meniscal defects treated with small intestinal submucosa in a dog model. *Am J Sports Med.* 2006;34(1):32-42.

Cook JL, Tomlinson JL, Kreeger JM, Cook CR. Induction of meniscal regeneration in dogs using a novel biomaterial. *Am J Sports Med.* 1999;27(5):658-65.

Copenhaver W, Kelley D, Wood R. *Bailey's Textbook of Histology.* Baltimore: Williams & Wilkins. 1978.

D

de Bont LG, Boering G, Havinga P, Liem RS. Spatial arrangement of collagen fibrils in the articular cartilage of the mandibular condyle: a light microscopic and scanning electron microscopic study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1984;42(5):306-13.

de Kanter RJ, Truin GJ, Burgersdijk RC, van't Hof MA, Battistuzzi PG, Kalsbeek H, Käyser AF. Prevalence in the Dutch adult population and a meta-analysis of signs and symptoms of temporomandibular disorder. *J Dent Res.* 1993;72(11):1509-18.

De Laat A, van Steenberghe D, Lesaffre E. Occlusal relationships and temporomandibular joint dysfunction. Part II: Correlations between occlusal and articular parameters and symptoms of TMJ dysfunction by means of stepwise logistic regression. *J Prosthet Dent.* 1986;55(1):116-21.

De Laat A, Macaluso GM. Sleep bruxism is a motor disorder. *Mov Disord.* 2002;17:67-69.

Delatte M, Von den Hoff JW, van Rheden RE, Kuijpers-Jagtman AM. Primary and secondary cartilages of the neonatal rat: the femoral head and the mandibular condyle. *Eur J Oral Sci.* 2004;112(2):156-62.

Deschner J, Rath-Deschner B, Agarwal S. Regulation of matrix metalloproteinase expression by dynamic tensile strain in rat fibrochondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(3):264-72.

Detamore MS, Athanasiou KA. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Tissue Eng.* 2003;9(6):1065-87.

Detamore MS, Athanasiou KA. Tensile properties of the porcine temporomandibular joint disc. *J Biomech Eng.* 2003 b;125(4):558-565.

Detamore MS, Athanasiou KA. Structure and function of the temporomandibular Joint disc: implications for tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 a;61(4):494-506.

Díaz M, Loera A, Ramírez F, Olvera R, Guerrero A. Matriz extracelular: ¿es el andamio de los tejidos?. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.* 2012; 56:53-60.

Ding C, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Abram F, Raynauld JP, Cicuttini F, Jones G. Meniscal tear as an osteoarthritis risk factor in a largely non-osteoarthritic cohort: a cross-sectional study. *J Rheumatol.* 2007;34(4):776-84.

E

Eckes B, Krieg T. Regulation of connective tissue homeostasis in the skin by mechanical forces. *Clin Exp Rheumatol.* 2004;22(3 Suppl33):S73-76.

Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;(367 Suppl):S59-67.

Ekberg E, Vallon D, Nilner M. The efficacy of appliance therapy in patients with temporomandibular disorders of mainly myogenous origin. A randomized, controlled, short-term trial. *J Orofac Pain*. 2003;17(2):133-139.

Englund M. Meniscal tear e a common finding with often troublesome consequences. *J Rheumatol*. 2009; 36(7):1362-4.

Englund M, Guerhazi A, Roemer FW, Aliabadi P, Yang M, Lewis CE, Torner J, Nevitt MC, Sack B, Felson DT. Meniscal tear in knees without surgery and the development of radiographic osteoarthritis among middleaged and elderly persons: the multicenter osteoarthritis study. *Arthritis Rheum*. 2009 B;60(3):831-9.

Englund M. The role of the meniscus in osteoarthritis genesis. *Med Clin North Am*. 2009 C;93(1):37-43.

F

Farrar WB. Craniomandibular practice: the state of the art; definition and diagnosis. *J Craniomandibular Pract*. 1982-1983;1(1):4-12.

Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4604-13.

Frank EH, Grodzinsky AJ. Cartilage electromechanics—II. A continuum model of cartilage electrokinetics and correlation with experiments. *J Biomech*. 1987;20(6): 629-639.

Fujii K, Inoue H. Biology of bone and cartilage—application of basic science for practice medicine. Kanehara & Co, Tokyo. 2002;157-8.

Fujii K, Kuboki Y, Sasaki S. Aging of human bone and articular cartilage collagen. Changes in the reducible crosslinks and their precursors. *Gerontology* 1976;22: 363-70.

Fujisawa T, Hattori T, Takahashi K, Kuboki T, Yamashita A, Takigawa M. Cyclic mechanical stress induces extracellular matrix degradation in cultured chondrocytes via gene expression of matrix metalloproteinases and interleukin 1. *J Biochem*. 1999;125(5):966-975.

Fujita Y, Motegi E, Nomura M, Kawamura S, Yamaguchi D, Yamaguchi H. Oral habits of temporomandibular disorder patients with malocclusion. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2003;44(4):201-7.

G

Gesch D, Bernhardt O, Alte D, Schwahn C, Kocher T, John U, Hensel E. Prevalence of signs and symptoms of temporomandibular disorders in an urban and rural German population: results of a population-based Study of Health in Pomerania. *Quintessence Int*. 2004;35(2):143-150.

Gigante A, Specchia N, Greco F. Age-related distribution of elastic fibers in the rabbit knee. *Clin Orthop Relat Res*.1994;(308):33-42.

Gilbert HT, Hoyland JA, Millward-Sadler SJ. The response of human annulus fibrosus cells to cyclic tensile strain is frequency-dependent and altered with disc degeneration. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(11): 3385-3394.

Gomes RR Jr, Farach-Carson MC, Carson DD. Perlecan functions in chondrogenesis: insights from in vitro and in vivo models. *Cells Tissues Organs.* 2004;176(1-3):79-86.

Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):626-634.

Corayeb MAM, Corayeb R. Cefaléia associada a indicadores de transtornos de ansiedade em uma amostra de escolares de Ribeirão Preto, SP. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002;60(3-B):764-68.

Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ, Lee RC. Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res.* 1988;6(6):777-792.

Gray RJM, Davies SJ, Quayle AA. *Temporomandibular Disorders: a Clinical Approach.* London: British Dental Association. 1995.

Green CD, Marbach JJ. Epidemiologic studies of mandibular dysfunction. *J of Prosthet Dent.* 1982; 48:184-90.

Griffin CJ, Powers R, Kruszynski R. The incidence of osteo-arthritis of the temporomandibular joint in various cultures. *Aust Dent J.* 1979;24(2):94-106.

Grodzinsky AJ, Levenston ME, Jin M, Frank EH. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. *Annu Rev Biomed Eng.* 2000;2:691-713.

Grootveld M, Henderson EB, Farrell A, Blake DR, Parkes HG, Haycock P. Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-magnetic resonance spectroscopy. *Biochem J.* 1991;273(2):459-67.

Grunder W. MRI assessment of cartilage ultrastructure. *NMR Biomed.* 2006;19(7):855-76.

Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, Youn I, Choi JB, Cao L, Setton LA, Haider MA. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:498-512.

Guilak F, Ratcliffe A, Mow VC. Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: A confocal microscopy study. *J Orthop Res.* 1995;13(3):410-421.

H

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992;6(3):861-70.

Heijink A, Gomoll AH, Madry H, Drobníč M, Filardo G, Espregueira-Mendes J, Van Dijk CN. Biomechanical considerations in the pathogenesis of osteoarthritis of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012; 20(3):423-35.

Hellio Le Graverand MP, Vignon E, Otterness IG, Hart DA. Early changes in lapine menisci during osteoarthritis development: part I: cellular and matrix alterations. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9(1):56-64.

Holmes MW, Bayliss MT, Muir H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size. *Biochem J.* 1988;250(2):435-41.

Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech.* 1994;28(6):505-19.

I

Ingervall B, Carlsson GE. Masticatory muscle activity before and after elimination of balancing side occlusal interference. *J Oral Rehabil.* 1982;9(3):183-192.

Ingervall B. Functionally optimal occlusion: the goal of orthodontic treatment. *Am J Orthod.* 1976;70(1):81-90.

Ireland D, Harrall R, Curry V, Holloway G, Hackney R, Hazleman B, Riley G. Multiple changes in gene expression in chronic human Achilles tendinopathy. *Matrix Biology.* 2001;20(3):159-169.

J

Janmey PA, Euteneuer U, Traub P, Schliwa M. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *J Cell Biol* 1991;113(1):155-160.

Jiao K, Wang MQ, Niu LN, Dai J, Yu SB, Liu XD, Wang GW. Death and proliferation of chondrocytes in the degraded mandibular condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Apoptosis.* 2009;14(1):22-30.

Jiao K, Wang MQ, Niu LN, Dai J, Yu SB, Liu XD. Mandibular condylar cartilage response to moving 2 molars in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;137(4):460.e1-8; discussion 460-1.

Jibiki M, Shimoda S, Nakagawa Y, Kawasaki K, Asada K, Ishibashi K. Calcifications of the disc of the temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med.* 1999;28(9):413-9.

K

Karlsson S, Cho SA, Carlsson GE. Changes in mandibular masticatory movements after insertion of nonworking-side interference. *J Craniomandib Disord.* 1992;6(3):177-183.

Kato T, Thie NMR, Huynh N, Miyawaki S, Lavigne GJ. Topical review: sleep bruxism and the role of peripheral sensory influences. *J Orofac Pain.* 2003;17(3):191-213.

Kikuta T. A histopathological studies of the temporomandibular joint following unilateral loss of occlusion in the rhesus monkey. *J Kyusyu Dent Soc.* 1980;34: 254-74

Kirveskari P, Alanen P, Jämsä T. Association between craniomandibular disorders and occlusal interferences in children. *J Prosthet Dent.* 1992;67(5):692-6.

Knudson W, Kuettner KE. Proteoglycans. In: Wortmann RL, Ed. *Primer on the Diseases.* Atlanta: Arthritis Foundation. 1997;33-8.

Kubokawa T. The mechanism of articular cartilage degeneration in osteoarthritis. *J Jpn Orthop Assoc.* 1994;68(5): 415-25.

Kuboki T, Shinoda M, Orsini MG, Yamashita A. Viscoelastic properties of the pig temporomandibular joint articular soft tissues of the condyle and disc. *J Dent Res*. 1997;76(11):1760-9.

Kundinger KK, Austin BP, Christensen LV, Donegan SJ, Ferguson DJ. An evaluation of temporomandibular joints and jaw muscles after orthodontic treatment involving premolar extractions. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1991;100(2):110-115.

Kuroda S, Tanimoto K, Izawa T, Fujihara S, Koolstra JH, Tanaka E. Biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2009;17(11):1408-15.

Kurosawa H, Fukubayashi T, Nakajima H. Load-bearing mode of the knee joint: physical behavior of the knee joint with or without menisci. *Clin Orthop Relat Res*. 1980;(149):283-290.

L

Lai WM, Hoy JS, Mow VC. A triphasic theory for the swelling and deformation behaviors of articular cartilage. *J Biomech Eng*. 1991;113(3): 245-258.

Lahm A, Kasch R, Mrosek E, Spank H, Erggeet C, Esser J, Merk H. Semiquantitative analysis of ECM molecules in the different cartilage layers in early and advanced osteoarthritis of the knee joint. *Histol Histopathol*. 2012;27(5):609-615.

Lahm A, Mrosek E, Spank H, Erggelet C, Kasch R, Esser J, Merk H. Changes in content and synthesis of collagen types and proteoglycans in osteoarthritis of the knee joint and comparison of quantitative analysis with Photoshop-based image analysis. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2010;130(4):557-64.

Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1015:53-70.

Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J*. 1992;6(7):2397-404.

Legrell PE. Craniofacial morphometric changes following temporomandibular joint disk displacement. Thesis, Umea University, Sweeden. 1999.

Lescas O, Hernández ME, Sosa A, Sánchez M, Ugalde-Iglesias C, Ubaldo-Reyes L, Rojas-Granados A, Ángeles-Castellanos M. Trastornos tempromandibulares. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2012; 55(1):5-11.

Li H, Yang HS, Wu TJ, Zhang XY, Jiang WH, Ma QL, Chen YX, Xu Y, Li S, Hua ZC. Proteomic analysis of early-response to mechanical stress in neonatal rat mandibular condylar chondrocytes. *J Cell Physiol*. 2010;223(3):610-22.

Li LP, Herzog W. Strain-rate dependence of cartilage stiffness in unconfined compression: the role of fibril-reinforcement versus tissue volume change in fluid pressurization. *J Biomech*. 2004;37(3):375-82.

Little CB, Mittaz L, Belluoccio D, Rogerson FM, Campbell IK, Meeker CT, Bateman JF, Pritchard MA, Fosang AJ. ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum*. 2005;52(5):1461-72.

Livine E, Weiss A, Silbermann M. Articular chondrocytes lose their proliferative activity with aging yet can be restimulated by PTH-(1-84), PGE1, and dexamethasone. *J Bone Miner Res.* 1989;4(4):539-48.

Lobbezoo F, Naeije M. Bruxism is mainly regulated centrally, not peripherally. *J Oral Rehabil.* 2001;28(12):1085-91.

Loeser RF. Growth factor regulation of chondrocyte integrins. Differential effects of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor beta on alpha 1 beta 1 integrin expression and chondrocyte adhesion to type VI collagen. *Arthritis Rheum.* 1997;40(2):270-276.

Luther F. TMD and occlusion part II. Damned if we don't? Functional occlusal problems: TMD epidemiology in a wider context. *British Dental Journal.* 2007; 202(1): 38-9

M

Manfredini D, Landi N, Romagnoli M, Bosco M. Psychic and occlusal factors in bruxers. *Aust Dent J.* 2004;49(2):84-9.

Manfredini D, Peretta R, Guarda-Nardini L, Ferronato G. Predictive value of combined clinically diagnosed bruxism and occlusal features for TMJ pain. *Cranio.* 2010;28(2):105-13.

Mankin HJ. Current concepts review. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg.* 1982;64(3): 460-6.

Mao JJ, Rahemtulla F, Scott PG. Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. *J Dent Res.* 1998;77(7):1520-8.

Martínez-Ross E, Fernández-Cano A. *Oclusión Orgánica y Ortognatodoncia.* Editorial Amolca. 1ª Edición. 2009. México.

McNeill C, Mohl ND, Rugh JD, Tanaka TT. Temporomandibular disorders: diagnosis, management, education, and research. *J Am Dent Assoc.* 1990;120(3):253-257.

Mendler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J Cell Biol.* 1989;108(1):191-7.

Meyer U, Wiesmann HP. *Bone and Cartilage Engineering.* Springer 2006 Germany. 2006;25-27, 30-32, 35,36, 38,39.

Michalak M, Paulo M, Bożyk A, Zadrożny Ł, Wysokińska-Miszczuk J, Michalak I, Borowicz J. Incidence of abnormalities in temporomandibular joints in a population of 1,100 urban and rural patients lacking teeth and other parafunctions in 2003-2008. An international problem. *Ann Agric Environ Med.* 2013;20(1):86-90.

Millward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, Nishida K, Caldwell H, Nuki G, Salter DM. Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J Cell Biol.* 1999;145(1):183-189.

Mohlin B, Ingervall B, Thilander B. Relation between malocclusion and mandibular dysfunction in Swedish men. *Eur J Orthod.* 1980;2(4):229-38.

Moore KL, Dalley AF, Agur AM. *Anatomía Humana con orientación clínica.* 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins. 2010;916-27.

Mow VC, Guo XE. Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. *Ann Rev Biomed Eng.* 2002;4:175-209.

Mow VC, Mak AF. Lubrication of diarthrodial joints. In: Skalak R, Chen S, Eds. *Handbook of Bioengineering.* New York, NY: McGraw-Hill Book Co.; 1988:1-34.

Mow VC, Wang CC, Hung CT. The extracellular matrix, interstitial fluid and ions as a mechanical signal transducer in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999;7(1): 41-58.

N

Nakano T, Scott PG. Changes in the chemical composition of the bovine temporomandibular joint disc with age. *Archs Oral Biol.* 1996;41(8-9):845-53.

Nitzan DW. The process of lubrication impairment and its involvement in temporomandibular joint disc displacement: a theoretical concept. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59(1):36-45.

O

Ohayon MM, Li KK, Guilleminault C. Risk factors for sleep bruxism in the general population. *Chest.* 2001;119(1):53-61.

Okeson JP. Etiología e identificación de los trastornos funcionales del sistema masticatorio. En: *Oclusión y afecciones temporomandibulares.* 3rd edn. Mosby-Doyma, Madrid. 1995;149-77

Olsson M, Lindqvist B. Mandibular function before and after orthodontic treatment. *Eur J Orthod.* 1995;17(3):205-14.

Olsson M, Lindqvist B. Occlusal interferences in orthodontic patients before and after treatment, and in subjects with minor orthodontic treatment need. *Eur J Orthod.* 2002;24(6):677-87.

Osborn JW. The disk of the human temporomandibular joint; design, function and failure. *J Oral Rehabil.* 1985;12(4): 279-293.

Otaño LG, Llanes RM, Delgado CL, Grau I, Castillo R. Interferencias oclusales en pacientes de alta de ortodoncia. *Rev Cubana Estomatol.* 2005; 42:0.

P

Patel RV, Mao JJ. Microstructural and elastic properties of the extracellular matrices of the superficial zone of neonatal cartilage by atomic force microscopy. *Front Biosci.* 2003;8:a18-25.

Pauli C, Grogan SP, Patil S, Otsuki S, Hasegawa A, Koziol J, Lotz MK, D'Lima DD. Macroscopic and histopathologic analysis of human knee menisci in aging and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(9):1132-41.

Pérez E, Aldana E, Ruelas MG, Díaz RM. Frecuencia de trastornos temporomandibulares en mujeres climatéricas en el Instituto Nacional de Perinatología. *Revista de la Asociación Dental Mexicana.* 2005;62(3):85-90.

Pirttiniemi P, Kantomaa T. Effect of cytochalasin D on articular cartilage cell phenotype and shape in long-term organ culture. *Eur J Orthod.* 1998;20(5):491-9.

Poole AR, Pidoux I, Reiner A, Rosenberg L. An immunoelectron microscope study of the organization of proteoglycan monomer, link protein, and collagen in the matrix of articular cartilage. *J Cell Biol.* 1982;93(3):921-37.

R

Randow K, Carlsson K, Edlund J, Oberg T. The effect of an occlusal interference on the masticatory system. An experimental investigation. *Odontol Revy.* 1976;27(4):245-256.

Riise C, Sheikholeslam A. The influence of experimental interfering occlusal contacts on the postural activity of the anterior temporal and masseter muscles in young adults. *J Oral Rehabil.* 1982;9(5):419-425.

Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, Bank RA. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biology.* 2002;21(2):185-195.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—an update. *N Engl J Med.* 1986;314(8):488-500.

S

Salter DM, Millward-Sadler SJ, Nuki G, Wright MO. Integrin-interleukin-4 mechanotransduction pathways in human chondrocytes. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391: S49-S60.

Salo LA, Hoyland J, Ayad S, Kielty CM, Freemont A, Pirttiniemi P, Kantomaa T, Grant ME, Thomas JT. The expression of types X and VI collagen and fibrillin in rat mandibular condylar cartilage. Response to mastication forces. *Acta Odontol Scand.* 1996;54(5):295-302.

Sánchez-Pérez L, Irigoyen-Camacho ME, Molina-Frechero N, Mendoza-Roaf P, Medina-Solís C, Acosta-Gío E, Maupomé G. Malocclusion and TMJ disorders in teenagers from private and public schools in Mexico City. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013;18(2):312-8.

Santos ECA, Bertoz FA, Pignatta LMB, Arantes FM. Avaliação clínica de sinais e sintomas da disfunção temporomandibular em crianças. *Rev Dental Press Ortod Ortop Facial.* 2006;11(2):29-34.

Scapino RP, Canham PB, Finlay HM, Mills DK. The behaviour of collagen fibres in stress relaxation and stress distribution in the jaw-joint disc of rabbits. *Arch Oral Biol.* 1996;41(11):1039-52.

Scott JE, Cummings C, Brass A, Chen Y. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochem J.* 1991;274(3):699-705.

Sharma G, Saxena RK, Mishra P. Differential effects of cyclic and static pressure on biochemical and morphological properties of chondrocytes from articular cartilage. *Clin Biomech(Bristol, Avon).* 2007;22(2):248-255.

Sheikholeslam A, Riise C. Influence of experimental interfering occlusal contacts on the activity of the anterior temporal and masseter muscles during submaximal and maximal bite in the intercuspal position. *J Oral Rehabil.* 1983;10(3):207-214.

Shiau YY, Ash MM. Immediate and delayed effects of working interferences on EMG and jaw movements. In: van Steenberghe D, de Laat A, eds. *Electromyography of jaw reflexes in man.* Leuven: Leuven University Press; 1989:311-326.

Shibata S, Yokohama-Tamaki T. An in situ hybridization study of Runx2, Osterix, and Sox9 in the anlagen of mouse mandibular condylar cartilage in the early stages of embryogenesis. *J Anat.* 2008;213(3):274-83.

Silbermann M, Reddi AH, Hand AR, Leapman R, von der Mark K, Franzen A. Chondroid bone arises from mesenchymal stem cells in organ culture of mandibular condyles. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1987;7(1):59-79.

Silbermann M, von der Mark K. An immunohistochemical study of the distribution of matrical proteins in the mandibular condyle of neonatal mice. I. Collagens. *J Anat.* 1990;170:11-22.

Singh M, Detamore MS. Biomechanical properties of the mandibular condylar cartilage and their relevance to the TMJ disc. *J Biomech.* 2009;42(4):405-17.

Schiffman EL, Friction JR, Haley DP, Shapiro BL. The prevalence and treatment needs of subjects with temporomandibular disorders. *J Am Dent Assoc.* 1990;120(3):295-303.

Schmitter M, Essig M, Seneadza V, Balke Z, Schröder J, Rammelsberg P. Prevalence of clinical and radiographic signs of osteoarthritis of the temporomandibular joint in an older persons community. *Dentomaxillofac Radiol.* 2010; 39(4):231-234.

Schröter-Kermani C, Hinz N, Risse P, Zimmermann B, Merker HJ. The extracellular matrix in cartilage organoid culture: biochemical, immunomorphological and electron microscopic studies. *Matrix.* 1991;11(6):428-41.

Smith MM, Ghosh P. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblasts is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatol Int.* 1987;7(3):113-22.

Sonnesen L, Bakke M, Solow B. Malocclusion traits and symptoms and signs of temporomandibular disorders in children with severe malocclusion. *Eur J Orthod.* 1998;20(5):543-59.

Spirit AA, Mak AF, Wassell RP. Nonlinear viscoelastic properties of articular cartilage in shear. *J Orthop Res.* 1989;7(1):43-9.

Spiteri C, Raizman I, Pilliar RM, Kandel RA. Matrix accumulation by articular chondrocytes during mechanical stimulation is influenced by integrin-mediated cell spreading. *J Biomed Mater Res A.* 2010;94(1):122-9.

Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ. ADAMST5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. *Nature.* 2005;434(7033):648-52.

Stegenga B, de Bont LG, Boering G, van Willigen JD. Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint: a review. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49(10):1079-88.

Stockwell, R.A. and G. Meachin. Adult Articular Cartilage. In Freeman, M.A.R. (ed.) 2nd edn. Pitman Medical, Tunbridge Wells. 1979;69-144.

Strauss PG, Closs EI, Schmidt J, Erfle V. Gene expression during osteogenic differentiation in mandibular condyles in vitro. *J Cell Biol.* 1990;110(4):1369-78.

Sun L, Wang M, He J, Liu L, Chen S, Widmalm SE. Experimentally created nonbalanced occlusion effects on the thickness of the temporomandibular joint disc in rats. *Angle Orthod.* 2009;79(1):51-53.

T

Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, Tanne K. Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. *Histochem Cell Biol.* 2005;123(3):275-81.

Tanaka E, Rego EB, Iwabuchi Y, Inubushi T, Koolstra JH, van Eijden TMGJ, *et al.*, Biomechanical response of condylar cartilage-on-bone to dynamic shear. *J Biomed Mater Res.* 2008;85(1):127-32.

Tanaka E, van Eijden T. Biomechanical behavior of the temporomandibular joint disc. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(2):138-50.

Tanaka E, Yamano E, Dalla-Bona DA, Watanabe M, Inubushi T, Shirakura M, Sano R, Takahashi K, van Eijden T, Tanne K. Dynamic compressive properties of the mandibular condylar cartilage. *J Dent Res.* 2006;85(6):571-5.

Tanaka S, Hamanishi C, Kikuchi H, Fukuda K. Factors related to degradation of articular cartilage in osteoarthritis: a review. *Semin Arthritis Rheum.* 1998;27(6):392-9.

Takano Y, Moriwake Y, Tohno Y, Minami T, Tohno S, Utsumi M, Yamada M, Okazaki Y, Yamamoto K. Age-related changes of elements in the human articular disk of the temporomandibular joint. *Biol Trace Elements Res.* 1999;67(3): 269-76.

Teramoto M, Kaneko S, Shibata S, Yanagishita M, Soma K. Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J Bone Miner Metab.* 2003;21(5):276-86.

Toyoshima Y, Iizuka T, Aita H, Ohata N. Effect of experimental traumatic occlusion on temporomandibular joint. *J Oral Biol.* 2003;45:407-17.

V

Vaatainen U, Lohmander LS, Thonar E, Hongisto T, Agren U, Ronkko S, Jaroma H, Kosma VM, Tammi M, Kiviranta I. Markers of cartilage and synovial metabolism in joint fluid and serum of patients with chondromalacia of the patella. *Osteoarthritis Cartilage.* 1998;6(2):115-24.

van Eijden TMGJ. Biomechanics of the mandible. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(1):123-36.

van Dijk CN, Lim LS, Poortman A, Strubbe EH, Marti RK. Degenerative joint disease in female ballet dancers. *Am J Sports Med.* 1995;23:295–300.

Versiani LP, Ayrton O, Moraes SA. The relationship between bruxism, occlusal factors and oral habits. *J Orthod.* 2010;15(2): 97-104.

Vogel KG, Koob TJ. Structural specialization in tendon under compression. *Int Rev Cytol.* 1989;115:267-293.

von der Mark K, Conrad G. Cartilage cell differentiation: review. *Clin Orthop Relat Res.* 1979;139:185-205.

W

Wang GW, Wang MQ, Wang XJ, Yu SB, Liu XD, Jiao K. Changes in the expression of MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and aggrecan in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Arch Oral Biol.* 2010;55(11):887–895.

Wang MQ, Xue F, He JJ, Chen JH, Chen CS, Raustia A. Missing posterior teeth and risk of temporomandibular disorders. *J Dent Res.* 2009;88(10):942–945.

Warwick R, Williams PL. *Gray's Anatomy.* Philadelphia, PA: Saunders Co.; 1973.

Wong M, Siegrist M, Goodwin K. Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary chondrocytes. *Bone.* 2003;33(4):685-93.

Wright EF. *Manual of temporomandibular disorders.* Ames (IA): Wiley; 2005:60–111.

X

Xie Q, Li X, Xu X. The difficult relationship between occlusal interferences and temporomandibular disorder - insights from animal and human experimental studies. *J Oral Rehabil.* 2013; 40(4):279-95.

Y

Yoshikawa S, Nodai E, Habu M, Furuta N, Fukuda J, Yamaguchi K. Influence of altered occlusal plane on rabbit temporomandibular joint cartilage. *J Oral Pathol Med .* 2008;37(1):30-7.

Z

Zhang M, Zhang J, Lu L, Qiu ZY, Zhang X, Yu SB, Wu YP, Wang MQ. Enhancement of chondrocyte autophagy is an early response in the degenerative cartilage of the temporomandibular joint to biomechanical dental stimulation. *Apoptosis.* 2013;18(4):423-34.

Zhu W, Chern KY, Mow VC. Anisotropic viscoelastic shear properties of bovine meniscus. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;(306):34-45.

Zhu W, Mow VC, Koob TJ, Eyre DR. Viscoelastic shear properties of articular cartilage and the effects of glycosidase treatments. *J Orthop Res.* 1993;11(6):771-81.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. OBSERVACIONES DEL EXÁMEN PREDOCTORAL

- **Agregar otro grupo experimental realizando desgaste dentario**, con la finalidad de provocar un desbalance oclusal más severo y compararlo con el grupo de interferencia oclusal de resina. Este punto si se realizó y se agregó en la tesis.
- **Obtener la cantidad suficiente de tejido para realizar los ensayos de Western Blot por triplicado y técnicas histológicas; para los tiempos de evaluación sugeridos en el estudio: 1 día y 15 días.** Se trabajaron los 2 grupos experimentales a los 2 tiempos de evaluación. El tiempo de 30 días fue eliminado debido a que la interferencia oclusal de resina era desalojada.

Todas las muestras de disco articular que se obtuvieron para realizar los Western Blot (15 ratas por grupo) se encuentran almacenadas en crioviales en el ultracongelador Revco. No se hicieron los ensayos por que se limitó la investigación.

- **Diseño de sondas para hibridación *in situ*.**

Las sondas diseñadas fueron las siguientes:

Name	Sequence	5'
Actin B	ggggactcctcgtgggacacgacgagtggc	Fluorescein
Actin BR	ggggactcctcgtgggacacgacgagtggc	Rhodamine
Actin BT	ggggactcctcgtgggacacgacgagtggc	TAMRA
HMGB-1	cggtgattggaacggaccatgtcagaccccc	Fluorescein
HMGB-1R	cggtgattggaacggaccatgtcagaccccc	Rhodamine
HMGB-1T	cggtgattggaacggaccatgtcagaccccc	TAMRA

MMP-3	ccgggcaaaggtagagagagttctac	Fluorescein
MMP-3R	ccgggcaaaggtagagagagttctac	Rhodamine
MMP-3T	ccgggcaaaggtagagagagttctac	TAMRA
Tubulin B3	ggtctatccccggttaagaccctcc	Fluorescein
Tubulin B3R	ggtctatccccggttaagaccctcc	Rhodamine
Tubulin B3T	ggtctatccccggttaagaccctcc	TAMRA
Vimentin	gcgcggacccgctggagatgctcctcc	Fluorescein
VimentinR	gcgcggacccgctggagatgctcctcc	Rhodamine
VimentinT	gcgcggacccgctggagatgctcctcc	TAMRA

Las sondas fueron diseñadas a partir de las siguientes secuencias:

- Rattus norvegicus actin, beta (Actb), mRNA
- Rattus norvegicus tubulin, beta 3 class III (Tubb3), mRNA
- Rattus norvegicus vimentin, mRNA (cDNA clone MGC:72372 IMAGE:5621065), complete cds
- Rattus norvegicus high mobility group box 1 (Hmgb1), mRNA
- Rattus norvegicus matrix metalloproteinase 3 (Mmp3), mRNA

Solo se realizó una prueba sin embargo no se obtuvieron resultados por lo que se requiere estandarizar la técnica para estas muestras de tejido.

- **Obtener la disección en bloque de la Articulación Temporomandibular**, en lugar de utilizar únicamente el disco articular de ATM. Ya que al obtener completa la articulación se podía tener la orientación original, así como poder observar cambios en el cartílago de ATM. Por lo que se diseñó la técnica para su obtención y posteriormente se procesaron los bloques de ATM para realizar los cortes histológicos adecuadamente.

- **Realizar la Tinción tricrómica de Masson para observar las fibras de colágena en los diferentes grupos.** La tinción utilizada inicialmente fue la pentacrómica de Russel-Movat con la cual no se distinguía la tinción específica de la colágena por la gran cantidad de colorantes empleados con esta

técnica. La tinción Tricrómica de Masson se realizó y agregó en este trabajo de tesis.

11.2 Anexo 2. ANÁLISIS DE IMÁGEN

ESPACIOS DE COLOR RGB Y HSV

Un modelo de color es un modelo matemático abstracto que describe la forma en la que los colores pueden representarse como tuplas de números, normalmente como tres o cuatro valores o componentes de color (p.e. RGB y CMYK son modelos de color). Sin embargo, un modelo de color que no tiene asociada una función de mapeo a un espacio de color absoluto es más o menos un sistema de color arbitrario sin conexión a un sistema de interpretación de color.

Añadiendo cierta función de mapeo entre el modelo de color y un espacio de color de referencia se obtiene una "huella" en el espacio de color de referencia. A esta "huella" se la conoce como gama de color y, en combinación con el modelo de color, define un nuevo espacio de color. Por ejemplo, Adobe RGB y sRGB son dos espacios de color absolutos diferentes basados en el modelo RGB.

En el sentido más genérico de la definición dada, los espacios de color se pueden definir sin el uso de un modelo de color. Estos espacios son un conjunto de nombres o números definidos por la existencia de un conjunto correspondiente de muestras de color físico, lo cual se centra en el concepto de un modelo matemático.

ANÁLISIS DE IMAGEN USANDO EL ESPACIO DE COLOR RGB

La forma mas conocida de representar una imagen digital a color es a partir de sus componentes rojo, verde y azul, que definen el modelo de color

RGB (en inglés Red, Green, Blue). RGB es un modelo de color basado en la síntesis aditiva (p.e. para formar nuevos colores se suman otros), con el que es posible representar un color mediante la mezcla por adición de los tres colores de luz primarios rojo, verde y azul. Cada una de las componentes puede tomar valores entre 0 y 255, que indican la cantidad de cada color primario que forma el color (hay más presencia del color primario entre mayor sea el valor). De manera esquemática, el espacio RGB se puede representar mediante un cubo. En el cual conforme nos vayamos moviendo en cada uno de los ejes iremos formando nuevos colores. Bajo esta representación, una imagen digital a color está formada por tres matrices que indican cada una de las componentes RGB que producen el color de cada uno de los píxeles. Los canales en una representación alternativa para mostrar la cantidad de color de cada uno de los canales.

Para aislar un solo color empleando este sistema no podríamos ya que un color es la mezcla de otros, por ejemplo el blanco es la combinación de todos los colores. Una forma de solucionar esto sería definir reglas tales como la cantidad que debe contener de cada uno de los componentes para formar el color que se quiere aislar, sin embargo podría no ser muy exacto. Por lo que otra solución para aislar un color en particular de una imagen sería emplear otro espacio de color como el HSV donde los colores propiamente estén separados unos de los otros (<http://es.wikipedia.org/wiki/RGB>).

ANÁLISIS DE IMAGEN USANDO EL ESPACIO DE COLOR HSV

Otra representación de una imagen digital es la dada por el espacio HSV, este modelo fue creado en 1978 por Alvy Ray Smith. Consiste en una transformación (considere esta transformación como un cambio de coordenadas, como de coordenadas cartesianas a coordenadas polares) no lineal del espacio de color RGB, y se puede usar en progresiones de color.

El espacio HSV (del inglés Hue, Saturation, Value) tiene también tres componentes Matiz, Saturación y Valor. También es llamado HSB (Hue, Saturation, Brightness – Matiz, Saturación, Brillo).

- MATIZ: es un valor entre 0 y 1 que representa un ángulo de 0 a 360°. Cada valor corresponde a un color y permite saber los tonos de matices de colores puros que forman cada píxel.
- SATURACIÓN: representa una distancia a un eje (llamado de brillo), cuyos valores posibles van del 0 al 1. A este parámetro también se le suele llamar “pureza” y cuanto menor sea la saturación de un color, más decolorado estaría, llegando al blanco que es cuando la saturación es 0 independientemente del matiz.
- VALOR: es también un valor entre 0 y 1. 0 siempre es negro y, dependiendo de la saturación, podría ser blanco o un color más o menos saturado. La representación esquemática de este espacio es un cono.

El componente H se caracteriza por un color, este se muestra de manera representativa en la escala de arcoiris. Los otros dos componentes S y V no representan color por lo que al analizar una imagen con alguno de estos componentes la imagen se vería blanco y negro. Al utilizar este sistema de color podríamos separar un color en particular de la imagen empleando el componente de matiz H. Se tiene que definir los rangos de este componente donde se incluyen los tonos de interés a separar (**www.workwithcolor.com**), al hacer esto entonces podemos extraer el color deseado de una imagen y esto puede ser cuantificado empleando un software que analice imágenes en base a este sistema de color HSV (http://es.wikipedia.org/wiki/Modelo_de_color_HSV).



11.3 Anexo 3. ARTÍCULO PUBLICADO

Microscopy Research, 2016, 4, 20-31
 Published Online April 2016 in SciRes. <http://www.scirp.org/journal/mr>
<http://dx.doi.org/10.4236/mr.2016.42003>



Unilateral Impact of Altered Loading by Changing Teeth Height on the TMJ Fibrocartilage: Disc and Condyle of Wistar Rats

Roxanne M. Olvera-Farias¹, Jose Raymundo Cruz-Perez², Rogelio Salinas-Gutierrez³, Jose Antonio Guerrero-Diaz de Leon³, Juan B. Kouri-Flores², Raul Rosales-Ibañez⁴, David Masuoka Ito⁵, Alma Lilian Guerrero Barrera^{6*}

¹Departamento de Morfología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

²Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular CINVESTAV-IPN, Mexico City, Mexico

³Departamento de Estadística, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

⁴Departamento de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

⁵Departamento de Estomatología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

⁶Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Departamento de Morfología, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México

Email: alguerre@correo.uaa.mx

Received 16 December 2015; accepted 11 April 2016; published 14 April 2016

Copyright © 2016 by authors and Scientific Research Publishing Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Temporomandibular joint (TMJ) is sensitive to loading and mechanical stress that provokes morphological changes produced by the impact in the occlusal plane. Here, this impact is evaluated in TMJ articular disc and articular cartilage using an *in vivo* model of unilateral occlusal plane impact and by analysis of serial tissue sections stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) or with Masson trichrome technique. Thus, six groups of 5 Wistar rats (200 - 250 g) are subjected to biomechanical dental stimulation by placing unilateral resin occlusal interference, or unilateral tooth wear made by upper left molars artificial mechanical devastation (1 control and 2 experimental groups for each treatment). Each treatment is evaluated two times at 1 and 15 days post-treatment. By H-E staining, control groups show chondrocytes arrangement as several cord cell groups in comparison with the experimental groups, which show an arrangement in one cord cell along of articular disc. However, this yields no significant difference ($p < 0.05$) in cell number between control and experimental groups. In contrast, in articular cartilage chondrocytes are random distributed along the superficial zone in control groups, while in experimental groups cell-free regions are

*Corresponding author.

How to cite this paper: Olvera-Farias, R.M., *et al.* (2016) Unilateral Impact of Altered Loading by Changing Teeth Height on the TMJ Fibrocartilage: Disc and Condyle of Wistar Rats. *Microscopy Research*, 4, 20-31.
<http://dx.doi.org/10.4236/mr.2016.42003>

observed in superficial zone. An image Blue hue analysis for trichrome stain is performed to quantify collagen; this shows a significant collagen decrease ($p < 0.05$) in almost all experimental groups compared with the controls. A degenerative process biomechanically induced by unilateral occlusal plane modification, causes cell and tissue changes on the TMJ structures that remain the degenerative changes observed in early osteoarthritis.

Keywords

Articular Disc, Articular Cartilage, Dental Occlusion, Collagen, Temporomandibular Joint

1. Introduction

Temporomandibular disorders (TMDs) are commonly orofacial diseases produced by temporomandibular joint (TMJ) alteration. TMD worldwide prevalence varies between 7% and 84% of the population within an age range of 3 - 74 years [1] and affects about 33% of patients in USA [2] [3] showing many similarities to musculoskeletal disorders of other parts of the body [4]. TMD prevalence varies from 2% in Turkish patients to 68% in young polish adults [5]. In Mexico, TMD prevalence is high (46.1% to 49.25%) affecting mainly young people (26.1%) and shows a 3:1 proportion in females. Woman has a higher risk of TMJ muscular tenderness or pain than males because of hormonal, behavioral or psychological differences [5] [6].

TMJ is deteriorated with age, internal changes and trauma, causing pain and TMD. Its etiology includes alteration of the occlusal plane and generation of abnormal loads as prosthodontic and orthodontic treatments, bruxism and malocclusions [7] [8]. TMDs are group of intra-articular, periarticular and systemic heterogenic conditions, characterized by masticatory system dysfunction and pain [3].

TMJ is formed by the mandibular condyle, the mandibular fossa in the temporal bone and the articular disc [7] [8]. The compressive, tensional and mechanical force resistance of the disc is correlated with the extracellular matrix (ECM) structural organization and its biochemical composition made mainly by type I collagen fibers, even in the mature and hypertrophic zones wherein is accompanied by type X collagen. The condylar cartilage has anisotropy under tension consistent with the primary anteroposterior motion of the condyle, suggesting that the cartilage fibrous zone is comparable with the TMJ disc fibrocartilage. Both the fibrous zone of the condylar cartilage and TMJ disc has circumferentially and anteroposteriorly aligned collagen fibers, producing an anisotropic tissue under tension and shear. The articular collagen is arranged in a tridimensional stable and resistant network to both tension and shear forces [9]. The chondrocyte response to mechanical compression involves ECM interactions. The mechanical load affects the cell metabolism, proliferation and differentiation, because it plays a key role in cell growth, adaptation, architecture and tissular regeneration [10].

As is explained before, TMJ mechanical stress is a risk factor to develop degenerative pathologies, alterations in the occlusal plane generates abnormal loads. Because to this, here using an *in vivo* model of modified occlusal plane by unilateral occlusal interference or unilateral tooth wear, the microscopic changes in the chondrocyte and collagen distribution in TMJ and in the articular disc are studied.

2. Methods

2.1. Experimental Animals

The UASLP Ethics Committee approved all the experimental procedures. None of the specimens treated died of illness during study period. In the histological analysis made here not observe inflammation signs in any of the groups in the TMJ. Methodology is summarized in Figure 1. Briefly, thirty adult male Wistar rats of 200 - 250 g were used for the experimental work, they were maintained at 21 °C - 23 °C during the experiment with a photoperiod of 12 h. Feed and water were provided ad libitum. The Wistar rats were provided by the animal center of the Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.

Six groups of 5 animals were made. Two treatments were done: resin occlusal interference and unilateral tooth wear. For both treatments a control group of 5 animals were made respectively. Two times of evaluation were made at one and 15 days after each treatment. One day timepoint was chosen because early symptoms are presented after an occlusal interference and early histological changes are suspected to appear.

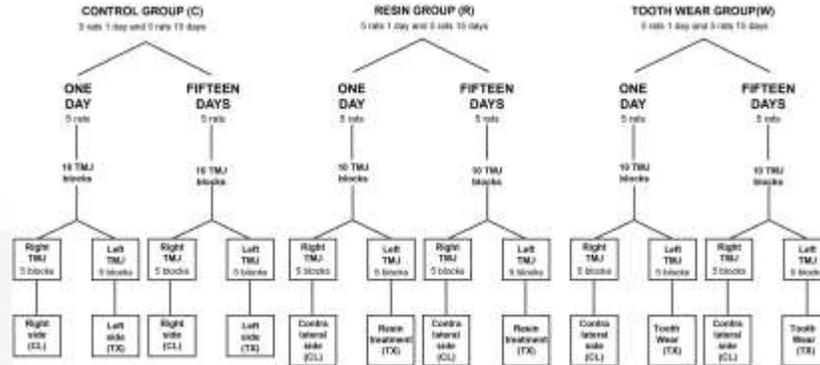


Figure 1. Flow diagram of experimental methodology.

For the clinical procedures the rats were anaesthetized with intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (35 mg/kg body weight). The animals were euthanized at the end of each evaluation time using an overdose of intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg/kg body weight).

After sacrifice, the obtained TMJ's were separated in left side (treatment side, TX) and right side (contralateral side, CL) as is described in tissue preparation. The animals did not show any behavioral changes, they continue eating at the same rate as the control and they did not display any signs on TMJ pain during the experimental time.

2.2. Experimental Unilateral Occlusal Disorder

As described before, two types of unilateral occlusal disorder were performed; resin occlusal interference and unilateral tooth wear (Figure 1) [11] [12]. The Resin unilateral occlusal interference (R group) was performed by making a small cavity with a high speed round bur #1, then the enamel and dentin surfaces were etched with 37% phosphoric acid (Prodensa R, México) for 20 seconds. The cavity was covered with the adhesive (Te-Econom Ivoclar Vivadent, Asia). Finally, the cavity was filled with two layers of blue resin (Twinky Star, CE Voco, Germany); which was polymerized using a led curing light (Orisol, Miami, USA). One millimeter over the occlusal plane height verification was done with a graduated periodontal probe.

Unilateral tooth wear group (B group) was done by artificial mechanical devastation of superior left molars, using a high-speed diamond DR5 bur. The limit of the artificial mechanical devastation was until the cervical area (1 mm teeth bur down).

2.3. Tissue Preparation

Because to the shape of the articular disc, and in order to obtain sections extended properly, en bloc dissection was made. Also the condyles were analyzed because they are the most studied structure in OA and they were used to correlate the changes observed in this tissue with the articular disc.

Sixty TMJ blocks were obtained and histologically processed (n = 5). The decalcification and fixation of the tissue samples were done at the same time using a descaling and fixative solution (17% EDTA/10% Formalin). For decalcification the tissue samples were incubated with gently shaking during fifteen days in descaling and fixative solution.

The samples were divided in three groups: the control, unilateral tooth wear and unilateral resin occlusal interference groups. Dental treatments were done on the left side defining as treated side (TX) to this joint and the right side joint was defined as contralateral side (CL) (Figure 1).

After decalcification/fixation, samples were processed to embed in paraffin and then were cut with microtome (Leica RM 2125RT). The 5 µm thick sections of TMJ in sagittal plane were cut and mounted in silanized-coated slides. For the analysis of articular disc and articular cartilage sections were divided in three parts, anterior,

medial and posterior as describe as Zhang *et al.* [13]. The central section was selected for the analysis of each TMJ because this zone is the most affected in a biomechanical model.

2.4. H-E Staining

Histological methods were done according with the Armed Forces Institute of Pathology laboratory methods [14]. Deparaffinized tissues were submerged in hematoxylin during 2 minutes, after the slides were washed in distilled water for 1 minute. Immediately the slides were stained with Eosin for 2 minutes, and rinsed in distilled water during 5 minutes. Finally, the dehydration process was performed using three changes of one minute 96% alcohol followed by two changes of one minute with 100% alcohol and three changes of Xilol for one minute. The slides were mounted with Entellan (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) to microscope observation (Leica, ICC50, Wetzlar, Germany).

2.5. Masson Trichrome Staining

Deparaffinized tissues were post fixated in Bouin solution during one hour at 56°C. Then each slide was submerged in Ferric Hematoxylin solution during 15 minutes. After that, slides were stained with Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin solution for 15 minutes. Then slides were incubated for fifteen minutes with Phosphotungstic Acid. Finally a Blue Anilin Staining procedure during 5 minutes was performed until bluish collagen fibers were observed. Between each stain washes with distilled water were performed. The dehydration was performed using three changes of one minute 96% alcohol followed by two changes of one minute with 100% alcohol and three changes of Xilol for one minute. The slides were mounted with Entellan (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) to microscope observation (Leica, ICC50, Wetzlar, Germany).

2.6. Image Analysis

All the observations were made using a Leica DM1000 microscope (Wetzlar, Germany). Images were acquired with the Leica EC System (Wetzlar, Germany) at 20X (Trichrome Stain) and 100X (H-E) augmentation using LAS EZ (3.0 Software). Using Photoshop CS6 Adobe System LTD, USA/Software) articular disc and cartilage were divided sagittally in three equal parts: anterior, medial and posterior. For the analysis, only was evaluated the medial third of each section because to the form of the articular disc and also because that is the zone where the load is higher, as reported by Zhang [13]. The quantification of cells was made at the articular disc and for the superficial zone of articular cartilage, which are compound by fibrocartilage. The superficial zone was defined by the border between superficial and proliferative zones based on cell morphology and matrix composition. Nine images of each zone were evaluated. The quantification was made using 200 × 200 μm of the central area. To evaluate the thick of the articular disc and the superficial zone of articular cartilage nine images of each group were taken and three measures were done at central area, the average value obtained was used for statistical analysis.

All data was compared by one-way ANOVA. In all cases, p values less than 0.05 were considered statistically significant.

2.7. Image and Statistical Analysis for Collagen Quantification

Image analysis for trichrome stain was performed in order to quantify collagen and is summarized in Figure 2. The Blue hue represents the collagen in the tissue. The collagen quantification was performed in 9 samples stained with Masson's Trichrome Stain using the Blue hue analysis of the images obtained by microscopy. The measurement of blue hue collagen was focus on the articular disc and the superficial zone of the condylar cartilage. The image analysis was performed using RGB (red, green and blue color) and HSV (Hue, saturation and value) color spaces. Each image obtained was divided by one template of 100 squares of 12.5 μm × 12.5 μm. A randomized sample of 20% approximately was taken from each image and statistically analyzed using R Software [15]. For the image analysis in R, JPEG and biOps libraries were used. The different blue hues were separated using the HSV color space in a tone range of 100 - 200 in the H channel. This range allowed to detect bluish tonalities and to eliminate the rest of the colors presents in the image. Once that the blue tones were filtered, the HSV color space was transformed to RGB space with the finality of evaluate only the blue canal. Values were three times obtained in the RGB space (0 - 255 scale) for each treatment group. This method of

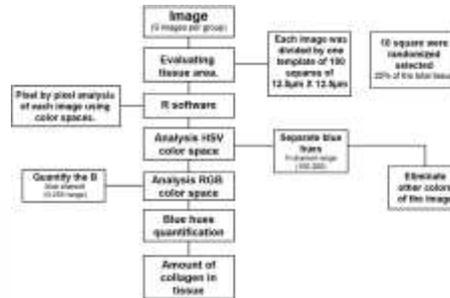


Figure 2. Flow diagram of collagen quantification method.

blue tone image analysis allows us to obtain a great amount of data because is working at pixel level.

Statistical analysis was performed using R Software [15]. Collagen quantification was expressed in each group ($n = 9$) blue color hue in the RGB space in average \pm standard deviation, considering every special image selection pixels. Disc chondrocyte cell density and articular disc thickness were also average and standard deviation expressed for each group. All data was compared by one-way ANOVA and Tukey multi-comparison test method. In all cases, p values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Articular Disc Cell Morphology

The articular disc in control group showed a normal composition of regular connective tissue and fibrocartilage. Also the morphology of chondrocytes was normal, oriented at the same direction that collagen fibers. Sometimes isolated or in a small cell cords arrangement. Cells showed rounded and big nuclei. There was high quantity of collagen fibers in the articular disc. In the experimental groups the articular disc presented similar cell morphology to the control group without signs of inflammation. However, an important finding was observed in the cell distribution in one cord cell arrangement along of articular disc (Figure 3).

3.2. Articular Cartilage Cell Morphology

In control groups the articular cartilage showed the five normal layers: fibrous or superficial, proliferative, intermediate, hypertrophic and calcified zones. The superficial layer was similar to articular disc with chondrocytes oriented in parallel and with normal structure. Collagen fibers also were organized as parallel fibers in anteroposterior direction (Figure 4). In the experimental groups articular cartilage was observed without any morphological changes in the treated side but the chondrocyte morphology became flattened with big and flattened nuclei in some contralateral groups (1R-CL, 1W-CL, 15R-CL and 15W-CL). The chondrocyte and collagen arrangement became irregular and deteriorate after 15 days of treatment in treated and contralateral sides (1R-CL, 1W-CL, 15R-CL and 15W-CL) (Figure 4).

3.3. Articular Disc and Articular Cartilage Cell Quantification

In articular disc the 1R-TX group showed a statistically significant but transitory increase (50%) in articular disc cell number comparing with the control (Figure 5(a)). A statistically significant decrease (34% - 46%) in cellularity was found in the experimental fifteen days groups (15R and 15W, both sides) when comparing with 1R-TX group (Figure 5(a)).

At 1 day, articular cartilage in tooth wear group in both TMJ presented a significant cell number increase (50% - 63%) in the superficial zone compared with control (Figure 5(b)). The 15R-TX and 15W-CL groups showed a significant cell density decrease (33% - 42%) when compared with 1W-TX. Independently of the quantitative analysis of this zone, at the end on the fifteen days in experimental groups, cell free areas were founded, reflected that a chondrocyte rearrangement happened. Cell clusters, which leaved place for cell free zones were

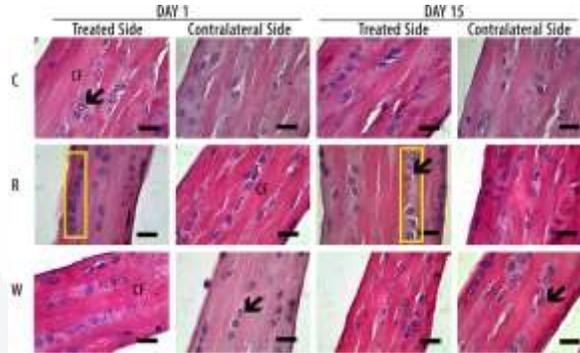


Figure 3. Histological Analysis of Articular Disc (X100). TMJ articular disc sagittal sections stained with H-E. The groups were designed with a letter: Control group (“C”), unilateral resin occlusal interference (“R”) and unilateral tooth wear group (“W”). Scale Bar, 10 μ m. The anterioposterior direction of the tissue is going from left to right. The cellular morphology in the experimental and control groups are similar. They showed a rounded nucleus (purple stained) with diminished cytoplasm (light pink around nuclei, marked with a black arrow). The collagen fibers (CF) are stained with intense pink, they constitute de major part of the articular disc tissue. The morphological analysis made with H&E stain, showed in control groups, chondrocytes arrangement as several cord cell groups in comparison with the experimental groups which showed an arrangement in one cord cell along of articular disc (yellow rectangle).

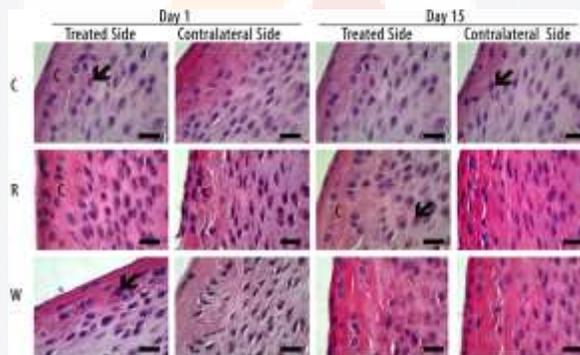


Figure 4. Histological Analysis of Articular Cartilage (X100). TMJ articular cartilage sagittal sections stained with H&E. The groups were designed with a letter: Control group (“C”), unilateral resin occlusal interference (“R”) and unilateral tooth wear group (“W”). Scale Bar 10 μ m. The anterioposterior direction of the tissue is going from left to right. The control group presented a rounded nucleus (black arrow), lightly tapered cellular morphology in a parallel distribution with collagenous fibers (CF). The experimental groups presented flattened cell morphology. In the day 15 of evaluation all the groups excepting the control, the cells changed their normal arrangement in the articular cartilage zones.

observed (Figure 5(b)).

3.4. Articular Disc and Superficial Zone of Articular Cartilage Thickness Evaluation

The 15W-TX group presented a significant decrease (32%) in articular disc thickness in comparison to control

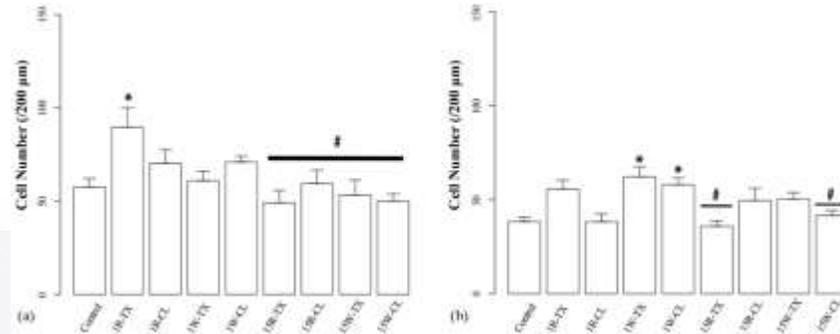


Figure 5. Articular disc and articular cartilage cell quantification. (a) Cell quantification analysis in articular disc. Control samples represents 1 and 15 days. The cell density in the 1R-TX presented a significant increase * $p < 0.05$ compared with the control. The 15R-TX, 15R-CL, 15W-TX and 15W-CL had a significant decrease compared with the 1R-TX group. # $p < 0.05$ when the values compared with 1R-TX. (b) Cell quantification analysis in articular cartilage superficial zone. The 1W-TX and 1W-CL group had a significant increase * $p < 0.05$ compared with control. The 15R-TX and 15W-CL groups presented a significant diminution compared with 1W-T. # $p < 0.05$, when the values compared with 1W-TX.

group (Figure 6(a)). The unilateral tooth wear group (both TMJ) in the two evaluation time and the fifteen day unilateral resin occlusal interference (15R, both sides) showed a significant decrease (30% - 44%) in cell density when compared 1R-TX. Apparently articular disc thickness diminished with time after resin modified unilateral occlusal plane (Figure 6(a)).

An important thickness increase (31% - 46%) in the superficial zone of articular cartilage was found in the one and fifteen day tooth wear groups (1W and 15W, both sides) and 15R-CL respect the control (Figure 6(b)). The 15R-TX group showed thickness diminution (30%) compared with one day of unilateral tooth wear group (1W, both sides) and the 15W-CL groups. There is general a similarity in the changes produced by mechanical stress due to the unilateral modification of the occlusal plane. However in the occlusal interference group the changes were observed in either treated or contralateral side (Figure 6(b)).

3.5. Articular Disc Collagen Quantification

Masson's Trichrome Stain shows with blue tones, the presence of collagen fibers (Figure 7). The staining showed a diminution in the blue intensity in the experimental groups (Figure 7(b)), also is observed that the articular disc diminished their thickness in the experimental groups. Some free cell zones were observed (Figure 7(b)), are marked by black arrows. The collagen quantification by RGB and HSV color spaces showed a decrease significantly (2% - 13%) in almost all the experimental groups, except in the 1R-TX there was no changes (Figure 7(a)). And in the 1R-CL the collagen quantity was significantly increased (2%) when comparing to control group. However the collagen quantity significantly diminished (13%) in the 1W-TX, 15W-CL, 15R-TX and 15R-CL groups compared with control (Figure 7(a)). By these findings is observed that the modified unilateral occlusal plane can provoke collagen amount changes even in a short times.

4. Discussion

Any no-compensated maxillomandibular alteration that causes an articular overload as occlusal interference and bruxism provokes TMJ alteration; both types of biomechanical stress *in vivo* model used here stimulated these two frequent conditions in dental practice [3]. The occlusal unilateral interference model was performed because usually the clinic occlusal interference is unilateral. Although the clinic bruxism usually is bilateral, in order to make comparable our experimental results, unilateral tooth wear (simulating a bruxism) model was applied in this study. The evaluation times were 1 or 15 days post-treatment, because we were interested in estimating the changes presented at short time. We hypothesized that the tooth wear group would have greater articular changes when compared to the occlusal interference group. Here was also expected that the articular damage was more

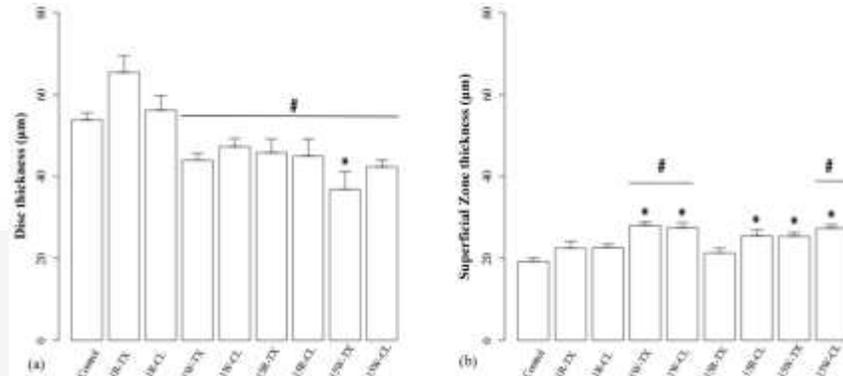


Figure 6. Articular disc and superficial zone of articular cartilage thickness evaluation. (a) Thickness analysis of articular disc. Control samples represents 1 and 15 days. The 15W-TX group presented a significant decrease $p < 0.05$ compared with control. The 1W, 15W and 15R both sides groups had a significant decrease compared with 1R-TX group. # $p < 0.05$ when the values compared with 1R-CL. (b) Thickness analysis of articular cartilage superficial zone: The 1W-TX, 1W-CL, 15W-TX, 15W-CL and 15R-CL groups had a significant increase $p < 0.05$ compared with control. * $p < 0.05$ when the values compared with 15R-TX.

important in treated side comparing with contralateral side. However our findings show variable affection rate between treated and contralateral side at different time points and in-between groups. For that reason we rejected our hypothesis.

Wistar rats were chosen as animal model, because their teeth not erupted continuously, and our results could be compared with other obtained in previous related studies that used the same model. In the model of modified occlusal plane in rabbit, expression changes produced by continuous masticatory functional loading were similar to osteoarthritis (OA). However, the rabbit teeth erupted continuously and provoked regression of the pre-altered occlusal plane over time [11]. In rat molars Sprague-Dawley, occlusal plane alteration, Zhang *et al.* observed degenerative changes in TMJ, as irregular array of chondrocytes, cell-free areas, increased synthesis of matrix metalloproteinases (MMPs), diminished chondrocyte proliferation, and subchondral bone loss [13]. Other dental occlusion modification studies did not show any articular cartilage modification when unilateral extractions or occlusal height were performed [12] [16].

The articular disc is similar to articular meniscus that plays a main role in the load distribution at articular compartments and in the mechanical shock absorption function. Meniscal tear, non-traumatic degeneration, meniscal damage or dysfunction causes OA [17]-[19]. Similarly, our results *in vivo* model of unilateral occlusal plane impact are showed in the treatment after 15 days degenerative changes as chondrocytes flattened morphology and collagen irregular arrangement. The degenerative changes observed with unilateral tooth wear are similar to changes found with unilateral extractions [12]. Mechanical stress in the TMJ produces damage in the articular disc and collagen decreasing related with the time in the experimental groups.

The most abundant component of ECM in the articular disc is collagen to estimate the total quantity of this protein detected by Masson's trichrome stain, a new easy technique is performed, using 2 color spaces. Thus, a collagen decrease is found in almost all the experimental groups, except in the 1R-TX, which shows no change. The collagen quantity in 1R-CL shows significant increased when comparing to control group, as is found in early TMJ inflammation of Sprague-Dawley rat in which also is increased aggrecan and glycosaminoglycan [20].

The collagen quantities decreased significantly in the unilateral tooth wear showed after 1 and 15 days, as well as happen in the resin occlusal interference group. In early knee OA provoked by mechanical stress similar changes are observed, where collagen type II concentration observed by quantitative PCR is decreased in superficial regions while in the deeper zones in repairation process showed an increasing in this kind of collagen [11] [21]. However, in our model more studies to determine the collagen types expressed are necessary.

R. M. Olvera-Farias *et al.*

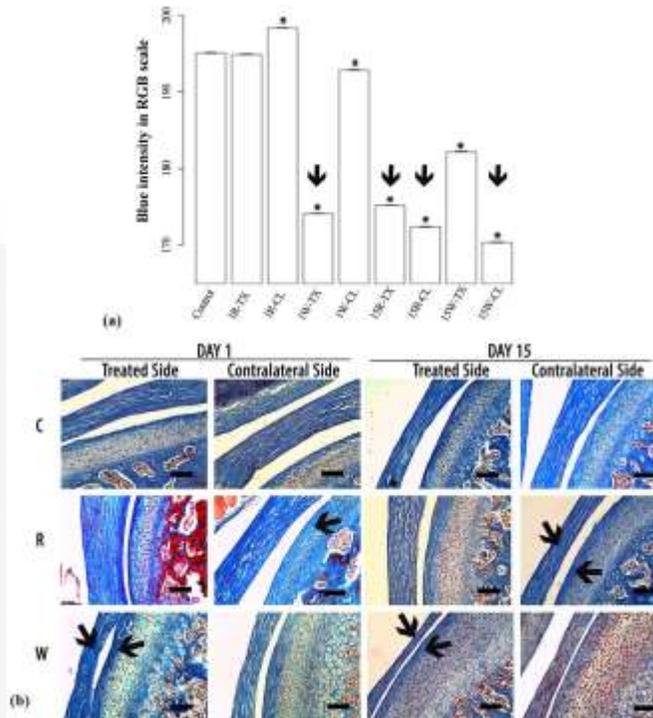


Figure 7. Articular disc collagen quantification (X20). (a) Collagen Quantification using Blue hue in RGB scale (160 - 200). This is a closer look of the original graph (0 - 255). Control samples represents 1 and 15 days. The 1R-CL group presented a significant increase $p < 0.05$ compared with their control. The 1W-TX, 15R-TX, 15R-CL y 15W-CL groups showed noticeable diminution of the collagen compared with control group (shown with down arrow). (b) Histological Analysis of Articular Disc and Articular Cartilage. TMJ sagittal sections were stained with Masson's Trichrome Stain. The groups were designed with a letter: Control group ("C"), unilateral resin occlusal interference ("R") and unilateral tooth wear group ("W"). Scale Bar 50 μ m. The staining showed a diminution in the blue intensity in the experimental groups. The articular disc diminished their thickness in the experimental groups. The articular cartilage presented a superficial zone thickened. We observed some free cells zones (indicated with a black arrow) in the articular disc and in articular cartilage superficial zone, in this last the cells were in clusters.

The synthesis of MMPs is also related with collagen decreasing, because they are the enzymes that degrades this protein [13] [20]. When the balance between ECM synthesis and its degradation fails, the water content is increased, the proteoglycan and type II collagen diminishes and finally the collagen network weakens [22]. Homeostasis then is important to avoid these changes [11], when the homeostasis of ECM production and chondrocyte proliferation fails OA is produced. The modified unilateral occlusal plane can provoke collagen amount changes even in short times, as our results showed. There are multiple regulatory pathways in chondrocytes that react to mechanical stimuli, including, signaling pathways and mechanisms that can directly lead to transcription, translation and posttranslation changes, cell mediated extracellular organization and ECM degradation. The synovial joints can maintain intact load during normal life activities without develop OA. However, when the mechanical load exceeds the cartilage tolerance to repair and maintain itself; the cartilage damage plays an important role in development and progression of articular degeneration in different ways. An excessive surface contact stress can cause direct damage to articular cartilage and subchondral bone, and adversely alter the chondro-

cyte function [22]. In our experiments, the number of chondrocytes in articular disc was the same as the control group, but clearly the metabolic stage of them was not enough to produce collagen, because was showed a less quantity of collagen, based in the blue hue of the Masson's Trichromic Stain, it could provoke decreased production of this protein.

The disorganization of collagen fibers in the superficial zone in articular cartilage produced by age is related to degenerative process. Our results showed articular cartilage surface parallel-organized collagen distribution in control groups whereas in condyle articular cartilage experimental groups, disorganization of collagen fibers was observed. In the knee meniscus, major changes have been observed with patient age increase when using Safranin O, showing a cell density diminution, mucoid degeneration and loss of collagen fiber organization [17], more studies at molecular level are necessary to show this kind of changes in our model.

The articular cartilage in the unilateral tooth wear group at 1 day of evaluation, a significantly increased number of chondrocytes at the superficial zone was observed, while the 15 days unilateral tooth wear group remain as the control. The 50% increase in cell number in the 1R-TX of the articular disc perhaps is due to changes to the tissue structure that would result in more cells in the central region. The cellular clusters are a characteristic of early reparation in the different layers of OA articular cartilage, where the chondrocyte mechanical stressed modified their ECM production [14]. Here, experimental groups showed cellular clusters as cord cells groups and cell-free areas in articular fibrocartilage and changes in the changes in the amount of matrix components. The mechanical stress on TMJ produced some scattered cell-free areas in articular cartilage, similar to degenerative changes or early OA-like lesions at 12 weeks after occlusal plane alteration [13] [23] [24]. The cellular clusters can adopt a different distribution from the typical OA accumulations. Pauli *et al.* induced a knee OA model and studied the knee menisci in which they noted a decrease in cell density, mucoid degeneration associated with some loss of collagen fiber organization and presence of cell aggregates. Although not resembling the typical OA cell clusters, which indicated a local fibro-chondrocyte proliferation or pseudo-cloning. The appearance of these clusters was as cellular alignments [17]. Our results suggest that mechanical stressed TMJ articular disc present the same phenomenon, showing cell distribution in one cord cell arrangement along of articular disc.

In the articular disc also was observed a marked diminution in the thickness in the 15W-TX compared with control group, instead the other groups that showed any differences. Unilateral tooth wear is an intense mechanical stress compared with occlusal interference because was produced an imbalance of the occlusal plane, and that is the reason for this change at 15 days post-treatment. When the articular cartilage thickness was analyzed in the resin occlusal interference group at 1 and 15 days any changes was observed, except for 15R-CL group, which their thickness increased significantly respect the control, this seems be related with the significant increased of collagen that this group also present, as Wang *et al.* observed, they related these changes with a hypertrophic response to mechanical stress [20]. Also unilateral tooth wear group in both evaluation times showed a significantly rise of thickness when was compared with control. Stimulated bruxism produces a high-speed modification in the thickness of the articular cartilage, showing the importance of relation of the occlusal plane with the TMJ. Yoshikawa *et al.* observed with experiment of occlusal plane alteration in articular cartilage at 3 day after treatment a thinning structure, they also observed cell cluster formation, as is showed in our results, they found that after 1 week this thinning disappear, then after 2 weeks of treatment they observed an increased thickness [11].

Is important for the dentist identify occlusal disorders in their patients in order to establish an immediately treatment ranging from self-care conservative treatment to surgical treatment when needed. In this study were observed degenerative changes in short term, so the treatment in time can prevent degenerative pathologies [13].

There are numerous studies that evaluate the superficial zone articular cartilage chondrocyte damage in the TMD which ones had proved to have a main role in the OA development [13] [25].

Modified unilateral occlusal plane at 1 and 15 days after treatment provoked a decreased collagen quantity and tissue thickness decreasing in articular disc. This was correlated with the articular cartilage degenerative changes in their TMJ. The mechanical stress induced an arrangement in cord cells in both occlusal interference or unilateral tooth wear. The unilateral tooth wear produced similar changes that found with unilateral extractions. The HSV and RGB color spaces analysis represent a new semi-quantitative method to quantify collagen when thricrome stain is used. Finally, the modified unilateral occlusal plane can induce morphological and structural changes in both articular cartilage and articular disc and they can act as an initial inductor of developing degenerative pathology.

Acknowledgements

Roxanne Mirella Olvera Farias was supported by CONACYT scholarship No. 256312.

References

- [1] Luther, F. (2007) TMD and Occlusion Part II. Damned If We Don't? Functional Occlusal Problems: TMD Epidemiology in a Wider Context. *British Dental Journal*, **202**, 38-39. <http://dx.doi.org/10.1038/bdj.2006.123>
- [2] De Laat, A. and Macaluso, G.M. (2002) Sleep Bruxism Is a Motor Disorder. *Movement Disorders*, **17**, 67-69. <http://dx.doi.org/10.1002/mds.10064>
- [3] Manfredini, D., Peretta, R., Guarda-Nardini, L. and Ferronato, G. (2010) Predictive Value of Combined Clinically Diagnosed Bruxism and Occlusal Features for TMJ Pain. *Crania: The Journal of Craniomandibular Practice*, **28**, 105-113. <http://www.maneyonline.com/doi/pdfplus/10.1179/cm.2010.015>
<http://dx.doi.org/10.1179/cm.2010.015>
- [4] Michalak, M., Paulo, M., Bożyk, A., Zadrozny, L., Wysokińska-Miszczuk, J., Michalak, I. and Borowicz, J. (2013) Incidence of Abnormalities in Temporomandibular Joints in a Population of 1100 Urban and Rural Patients Lacking Teeth and Other Parafunctions in 2003-2008. An International Problem. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **20**, 86-90.
- [5] Sánchez-Pérez, L., Irigoyen-Camacho, M.E., Molina-Frecherro, N., Mendoza-Roaf, P., Medina-Salo, L.A., Hoyland, J. and Thomas, J.T. (1996) The Expression of Types X and VI Collagen and Fibrillin in Rat Mandibular Condylar Cartilage. Response to Mastication Forces. *Acta Odontologica Scandinavica*, **54**, 295-302. <http://dx.doi.org/10.3109/00016359609003541>
- [6] Casanova-Rosado, J.F., Medina-Solis, C.E., Vallejos-Sánchez, A.A., Casanova-Rosado, A.J., Hernández-Prado, B. and Avila-Burgos, L. (2006) Prevalence and Associated Factors for Temporomandibular Disorders in a Group of Mexican Adolescents and Youth Adults. *Clinical Oral Investigations*, **10**, 42-49. <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-005-0021-4>
- [7] Celenza, F.V. and Nasedkin, J.N. (1978) Occlusion: The State of the Art. Quintessence Pub. Co., Chicago.
- [8] Choi, K.Y., Yang, J.D., Chung, H.Y. and Cho, B.C. (2012) Current Concepts in the Mandibular Condyle Fracture Management Part I: Overview of Condylar Fracture. *Archives of Plastic Surgery*, **39**, 291-300. <http://dx.doi.org/10.5999/aps.2012.39.4.291>
- [9] Kuroda, S., Tanimoto, K., Izawa, T., Fujihara, S., Koolstra, J.H. and Tanaka, E. (2009) Biomechanical and Biochemical Characteristics of the Mandibular Condylar Cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*, **17**, 1408-1415. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2009.04.025>
- [10] Guilak, F., Alexopoulos, L.G., Upton, M.L., Youn, I., Choi, J.B., Cao, L. and Haider, M.A. (2006) The Pericellular Matrix as a Transducer of Biomechanical and Biochemical Signals in Articular Cartilage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1068**, 498-512. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1346.011>
- [11] Yoshikawa, S., Nodai, E., Habu, M., Furuta, N., Fukuda, J. and Yamaguchi, K. (2008) Influence of Altered Occlusal Plane on Rabbit Temporomandibular Joint Cartilage. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, **37**, 30-37. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00577.x>
- [12] Kikuta, T. (1980) A Histopathological Study of the Temporomandibular Joint Following Unilateral Loss of Occlusion in the Rhesus Monkey. *Journal of the Kyusyu Dental Society*, **34**, 254-274.
- [13] Zhang, M., Zhang, J., Lu, L., Qiu, Z.Y., Zhang, X., Yu, S.B., Wu, Y.P. and Wang, M.Q. (2013) Enhancement of Chondrocyte Autophagy Is an Early Response in the Degenerative Cartilage of the Temporomandibular Joint to Biomechanical Dental Stimulation. *Apoptosis*, **18**, 423-434. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-013-0811-0>
- [14] Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B. and Sobin, L.H. (1994) Armed Forces Institute of Pathology: Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington DC. <http://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=mdp.39015029715979;view=1up;seq=6>
- [15] Software R Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>
- [16] Toyoshima, Y., Iizuka, T., Aita, H. and Ohata, N. (2003) Effect of Experimental Traumatic Occlusion on Temporomandibular Joint. *Journal of Oral Biology*, **45**, 407-417. <http://dx.doi.org/10.2330/joralbiosci1965.45.407>
- [17] Pauli, C., Grogan, S.P., Patil, S., Otsuki, S., Hasegawa, A., Koziol, J. and D'Lima, D.D. (2011) Macroscopic and Histopathologic Analysis of Human Knee Menisci in Aging and Osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, **9**, 1132-1141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2011.05.008>
- [18] Englund, M., Guermazi, A. and Lohmander, L.S. (2009) The Meniscus in Knee Osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, **35**, 579-590. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rdc.2009.08.004>

- [19] Badlani, J.T., Borrero, C., Golla, S., Harner, C.D. and Irrgang, J.J. (2013) The Effects of Meniscus Injury on the Development of Knee Osteoarthritis: Data from the Osteoarthritis Initiative. *American Journal of Sports Medicine*, **41**, 1238-1244. <http://dx.doi.org/10.1177/0363546513490276>
- [20] Wang, G.W., Wang, M.Q., Wang, X.J., Yu, S.B., Liu, X.D. and Jiao, K. (2010) Changes in the Expression of MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and Aggrecan in the Condylar Cartilage of Rats Induced by Experimentally Created Disordered Occlusion. *Archives of Oral Biology*, **55**, 887-895. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.07.013>
- [21] Lahm, A., Mrosek, E., Spank, H., Erggelet, C., Kasch, R., Esser, J. and Merk, H. (2010) Changes in Content and Synthesis of Collagen Types and Proteoglycans in Osteoarthritis of the Knee Joint and Comparison of Quantitative Analysis with Photoshop-Based Image Analysis. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, **130**, 557-564. <http://dx.doi.org/10.1007/s00402-009-0981-y>
- [22] Heijink, A., Gomoll, A.H., Madry, H., Drobnič, M., Filardo, G., Espregueira-Mendes, J. and Van Dijk, C.N. (2012) Biomechanical Considerations in the Pathogenesis of Osteoarthritis of the Knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, **20**, 423-435. <http://dx.doi.org/10.1007/s00167-011-1818-0>
- [23] Sun, L., Wang, M., He, J., Liu, L., Chen, S. and Widmalm, S.E. (2009) Experimentally Created Nonbalanced Occlusion Effects on the Thickness of the Temporomandibular Joint Disc in Rats. *Angle Orthodontist*, **79**, 51-53. <http://dx.doi.org/10.2319/091907-450.1>
- [24] Wang, X.D., Kou, X.X., Mao, J.J., Gan, Y.H. and Zhou, Y.H. (2012) Sustained Inflammation Induces Degeneration of the Temporomandibular Joint. *Journal of Dental Research*, **91**, 499-505. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034512441946>
- [25] Saarakkala, S., Julkunen, P., Kiviranta, P., Makitalo, J., Jurvelin, J.S. and Korhonen, R.K. (2010) Depth-Wise Progression of Osteoarthritis in Human Articular Cartilage: Investigation of Composition, Structure and Biomechanics. *Osteoarthritis and Cartilage*, **18**, 73-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2009.08.003>

