

Nº DE R  
279394

+  
A475c  
2019



**Universidad  
de Valparaíso**  
CHILE

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CONEXINAS EN  
CÉLULAS MADRE OBTENIDAS DESDE LA PAPILA DENTAL  
HUMANA**



Trabajo de investigación  
requisito para optar al  
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Guillermo Alvial Galvéz  
Mauricio Quezada Bermudez  
Claudia Sepúlveda Fariás

Docente Guía: Dr. Isaac García Carrillo

Valparaíso - Chile  
2019

*Quiero agradecer a toda mi familia, especialmente a mis padres y mi hermana, quienes me apoyaron y acompañaron durante toda la carrera. A mis amigos y compañeros, quienes compartieron conmigo en los momentos buenos y malos de estos últimos años.*

*Al Dr. Isaac García, que gracias a su guía, apoyo y disposición fue posible realizar esta tesis. Y para finalizar, a mis compañeros de tesis y todas las personas que estuvieron presentes y contribuyeron de alguna manera durante este proceso.*

**Guillermo Alvial Gálvez**

*Agradecer a mi madre, Geovanna, y mi padre, Miguel; por su incondicional apoyo en este largo camino, su empuje en cada momento de flaqueza y su total dedicación para poder convertirme en profesional de la salud.*

*A mi hermana y hermano por ser fuentes de inspiración y perseverancia. A mis amigos y amigas, y personas especiales, que estuvieron en cada momento que lo necesite.*

*A mi grupo de trabajo, por su constancia y disposición para sacar un excelente trabajo adelante. A Dr. Isaac García por sus aportes, guía y enseñanza, a pesar de las dificultades del camino, logramos concretar un bello desafío.*

*A mis abuelas y abuelos, por su profundo amor. Por ellos, Vamos por una salud digna en todo Chile.*

**Mauricio Quezada Bermúdez**

*Me gustaría agradecer a mis padres Jacqueline y Eduardo, quienes me han apoyado con mis estudios y han invertido mucho dinero en materiales.*

*A mis hermanas Andrea, Gabriela e Isidora quienes han sido un apoyo siempre.*

*A mis abuelos paternos, Graciela y Eduardo que siempre han tenido un fe inmensa en que sus nietas saldrían adelante y que siempre estaban pendiente de como me iba en la Universidad. Tata, no me ves titularme pero te dedico este logro con mucho amor.*

*A mis amadas mascotas que siempre me han acompañado en mis momentos de estudios nocturnos y alegrado cuando más lo necesitaba, sobre todo a mi Baloo.*

*Al Doctor Isaac García quien nos acogió, nos enseñó y guió durante todo el proceso de esta tesis.*

*Y a mi Cristian quien ha sido parte de uno de los años más lindos de mi vida.*

**Claudia Sepúlveda Farias**

## ÍNDICE

1. Introducción .....	1
2. Marco Teórico.....	2
2.1. Dolor Dental .....	2
2.1.1. Generalidades del Dolor Dental .....	2
2.1.2. Teorías del Dolor Dental.....	5
2.2. Células Madre.....	7
2.2.1. Generalidades.....	7
2.2.2. Células Madres Embrionarias .....	8
2.2.3. Células Madres Adultas.....	9
2.3. Conexinas.....	13
2.3.1. Definición y Generalidades.....	13
2.3.2. Estructura.....	14
2.3.3. Funciones.....	14
3. Objetivos.....	16
3.1. Objetivo General.....	16
3.2. Objetivos Específicos: .....	16
4. Hipótesis .....	16
5. Materiales y Métodos .....	17
5.1. Tipo de Estudio.....	17
5.2. Universo.....	17
5.3. Criterios de Inclusión y Exclusión de Pacientes.....	17
5.3.1. Inclusión .....	17
5.3.2. Exclusión.....	17
5.4. Criterios de Inclusión y Exclusión de las Muestras .....	17
5.4.1. Inclusión .....	17
5.4.2. Exclusión.....	17
5.5. Muestras .....	18
5.5.1. Aprobación del estudio y Consentimiento informado .....	18
5.5.2. Proceso de Recolección y Procesamiento de la Muestra .....	18
5.6. Cultivo Celular .....	18
5.7. Inmunocitoquímica e Inmunofluorescencia .....	18
5.8. <i>Western Blot</i> .....	20

5.8.1. Preparación de la Muestra .....	20
5.8.2. Electroforesis .....	20
5.8.3. Transferencia .....	21
5.8.4. Bloqueo .....	22
5.8.5. Detección .....	22
6. Resultados.....	23
6.1. Cultivo Celular .....	23
6.2. Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.....	24
6.3. <i>Western Blot</i> .....	26
7. Discusión .....	27
8. Conclusión .....	28
9. Sugerencias.....	29
10. Resumen .....	30
11. Referencias Bibliográficas.....	31

## 1. INTRODUCCIÓN

Nuestra tesis surge dentro de un proyecto enfocado en dilucidar los mecanismos de nocicepción dental, que no se conocen en detalle, a diferencia del dolor periférico. En este sentido, no hay suficiente evidencia científica que muestre cuál y cómo es el mecanismo molecular de la nocicepción dental, tampoco existen reportes científicos evaluando esta pregunta fundamental que haya utilizado odontoblastos derivados de dientes extraídos desde humanos.

Por la dificultad de extraer odontoblastos humanos para estudiar directamente los mecanismos de la nocicepción dental, es necesario obtener células que podamos extraer, cultivar y que sean capaces de diferenciarse en células odontoblásticas (odontoblasto-*like*).

Para solucionar este problema, la estrategia es la utilización de células madre o *Stem Cells* de la papila apical (SCAP), ya que son células madre de origen mesenquimático relativamente fáciles de extraer, que presentan una buena tasa de proliferación (el doble que las *Stem cells* de la pulpa) y adhesión al plástico lo que son características favorables para realizar cultivos celulares. Además, se pueden diferenciar en células dentinogénicas funcionales.

Este estudio será de tipo descriptivo *in vitro* y se utilizarán técnicas de laboratorio como Inmunocitoquímica, Inmunofluorescencia y *Western Blot* para la localización subcelular de conexinas (Cx) y su expresión.

Se utilizarán células madres de la papila apical de dientes humanos, cultivadas en el Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica de la Facultad de Odontología.

Se espera establecer localización subcelular y niveles de expresión de Cx en SCAP, para que en estudios posteriores se puedan diferenciar en células odontoblásticas y poder utilizarlas como modelo celular de células humanas para estudiar los mecanismos de nocicepción dental.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Dolor Dental

#### 2.1.1. Generalidades del Dolor Dental

El dolor dental es una de las causas más comunes por las cuales los pacientes solicitan atención odontológica, representando el motivo de consulta más frecuente de urgencia odontoestomatológica, tanto en servicios de urgencias extrahospitalarios, como intrahospitalarios<sup>1</sup>. La caries dental representa la causa más común de dolor dental, cuya prevalencia mundial es muy alta. Se ha reportado que al 2010, la caries en dientes permanentes continúa como el problema de salud global más prevalente, afectando 2.4 billones de personas y la caries en dientes temporales constituye la décima condición de salud más prevalente, afectando 621 millones de niños en el mundo<sup>2</sup>. La caries dental no tratada puede llevar a pulpitis, la cual se origina por la invasión de microorganismos orales comensales hacia la pulpa debido a caries. La irritación de la pulpa dental por estímulos mecánicos, químicos, térmicos o eléctricos también puede causar inflamación pulpar<sup>3</sup>.

La pulpitis sintomática puede ser una condición extremadamente dolorosa y es una de las principales razones por la cual los pacientes buscan tratamiento dental. La pulpitis se asocia frecuentemente con dolor intenso y persistente a estímulos térmicos. El dolor puede ser espontáneo, difuso o referido. La hipersensibilidad dentinaria es otra condición de dolor odontogénico común, su prevalencia varía ampliamente, con un rango entre 3 a 98%<sup>3</sup>. El dolor provocado por la hipersensibilidad dentinaria surge debido a la dentina expuesta que responde a un estímulo típicamente térmico, táctil, osmótico o químico y que no puede ser atribuido a ningún otro defecto o enfermedad dental. La dentina puede ser expuesta por erosión química, atrición/abrasión mecánica del esmalte, y/o por pérdida de cemento posterior a una recesión gingival<sup>4</sup>.

El diente es un tejido único que consiste en tejidos blandos densamente innervados y vascularizados rodeado por tejidos duros mineralizados. Existen algunas diferencias que distinguen dolor en el diente de aquel en otros tejidos del cuerpo. Primero, la pulpa dental, rodeada por dentina y esmalte, tiene un espacio limitado para aumentar en un estado inflamatorio, y esta baja adaptación produce dolor exagerado, incluso en inflamación moderada<sup>5</sup>.

En contraste, una temperatura caliente o fría dolorosamente nociva usualmente no provoca dolor en un diente sano no inflamado debido a la capacidad de aislamiento térmico del esmalte dental<sup>6</sup>. Sin embargo, cuando la capa de esmalte se pierde y la dentina es expuesta, estímulos térmicos leves evocan dolor repentino y punzante en el diente. Además, un débil estímulo de aire a la dentina expuesta provoca un dolor abrupto intenso, el cual es muy diferente de la piel, donde, en condiciones normales, el mismo estímulo de aire evoca simplemente la sensación de un toque ligero<sup>5</sup>.

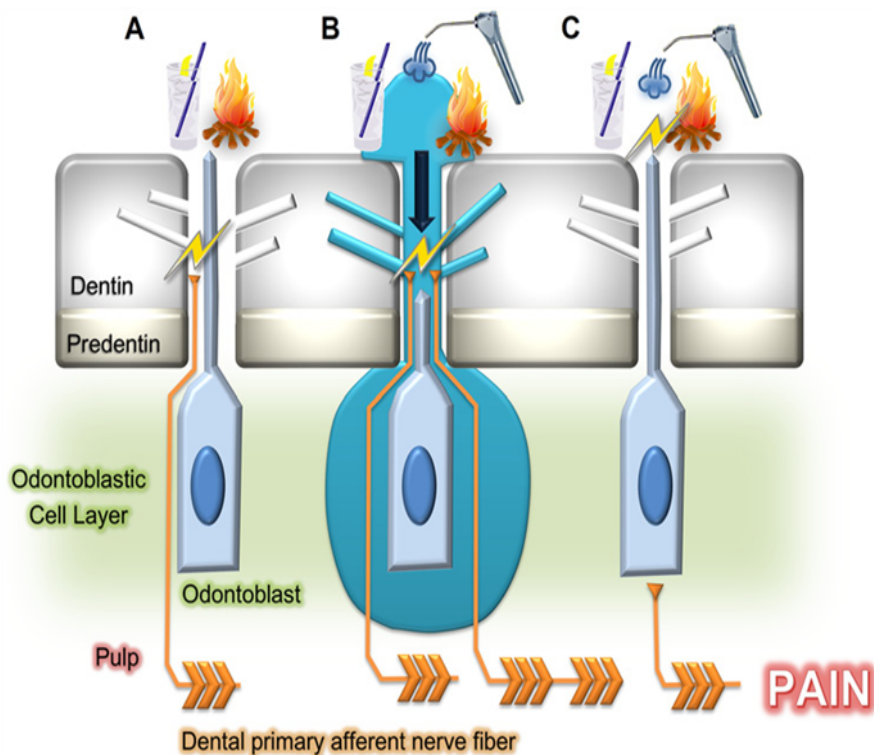
Debido a todos estos factores, es que podríamos sostener que los mecanismos involucrados en la generación y codificación del dolor dental ya sea por caries o pérdida de estructura de la barrera mineral, es diferente a la que se presenta en otros

tejidos. Además, las neuronas dentales en sí mismas, pueden poseer propiedades adicionales que son diferentes a aquellas de otros tejidos del cuerpo<sup>7</sup>.

Para explicar la nocicepción dental, se han propuesto tres posibles mecanismos:

1. Teoría Neural
2. Teoría Hidrodinámica y
3. Teoría Odontoblasto-transductor.

En cada uno de estos mecanismos, la activación de aferentes dentales primarias eventualmente entrega nocicepción dental al sistema nervioso central. En las últimas décadas, se ha observado progresos importantes en nuestro entendimiento no sólo de las propiedades neuroanatómicas de las terminaciones nerviosas libres y neuronas dentales nociceptivas (cuerpos celulares neuronales, los cuales están ubicados en el ganglio trigémino), sino también de los mecanismos celulares y moleculares de la nocicepción dental<sup>8, 9</sup>.



**Figura 1:** Tres hipótesis para explicar la nocicepción dental. A) Teoría neural, B) Teoría hidrodinámica y C) Teoría odontoblasto-transductor<sup>7</sup>.

### 2.1.1.1. Estructuras Celulares y Moleculares Involucradas en el Proceso de Nocicepción Dental

Los Odontoblastos son células especializadas de la pulpa dental originadas desde la cresta neural las cuales migran bajo el epitelio oral y se diferencian en células que organizarán y regularán la síntesis de la matriz mineral dental<sup>10</sup>. Durante la maduración, los odontoblastos exhiben cambios en la expresión de genes, adquiriendo una morfología típica con un cuerpo y un largo proceso<sup>11</sup>. Los cuerpos de los odontoblastos están ubicados en la interfaz del complejo dentina-pulpa donde ellos están organizados en una empalizada entre el tejido mineral (esmalte y dentina) y el vivo (pulpa) del diente. De hecho, los odontoblastos están conectados en su polo apical (las zonas que están conectando los procesos con los cuerpos) por numerosos complejos de unión (*tight junction* y *desmosoma-like*) formando una barrera selectiva, controlando la relación y tráfico entre dentina-pulpa y viceversa, bajo condiciones fisiológicas y patológicas<sup>12</sup>.

En adición a la formación de dentina, los odontoblastos presumiblemente median las etapas tempranas del proceso sensorial, jugando un papel clave en la sensaciones mecánicas, térmicas y químicas, estas, en dolor y sensibilidad dental<sup>12</sup>. En este sentido, los odontoblastos expresan receptores de potencial transitorios (TRP) mecanosensibles, químiosensibles y térmicosensibles, junto a canales iónicos ácido-sensibles que son necesarios para iniciar el proceso sensorial<sup>13</sup>.

Además, se ha demostrado que canales iónicos presentes en odontoblastos inducen la liberación de ATP, que es el transmisor primario entre odontoblastos y fibras nerviosas, iniciando así la transmisión de una modalidad sensorial dada al sistema nervioso central<sup>14</sup>. Estudios recientes, además sugieren que los odontoblastos expresan diferentes canales iónicos comúnmente encontrados en neuronas sensoriales, tales como canales de potasio mecanosensitivos y TREK-1 K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, y canales de Na<sup>+</sup> voltaje dependientes<sup>15</sup>.

La mayoría de los axones de los nervios que inervan un diente entran a la pulpa dental a través del ápice. Análisis de microscopía electrónica de las fibras nerviosas en la pulpa dental muestran que alrededor de 70-90% de los axones son no mielinizados (Fibras C)<sup>16</sup>. Los axones restantes son mayormente poco mielinizados (Fibras A $\delta$ ) y una muy baja cantidad son densamente mielinizados (Fibras A $\beta$ )<sup>17</sup>. En la pulpa radicular, los axones emiten sólo algunas ramas, pero en la pulpa coronal, los axones se ramifican ampliamente para formar el plexo de *Raschkow*. Los axones pierden su vaina de mielina principalmente en la pulpa coronal y emergen como terminaciones nerviosas libres (forma de abanico o cepillo).

Muchos axones terminan muy cercanos a los odontoblastos, como también a las células sub-odontoblásticas y peri-odontoblásticas<sup>18</sup>, y algunos entran en los túbulos dentinarios y continúan a lo largo del proceso odontoblástico por una corta distancia, no mayor a 0,2 mm en la parte interior de la dentina. Otros axones generan terminaciones en ambos, la pulpa y los túbulos dentinarios. Se ha reportado que alrededor de un 30-70% de los procesos odontoblásticos de un diente están en estrecha relación con las terminaciones nerviosas en la parte interior de la dentina<sup>12</sup>.

Todo el entramado odontoblasto-fibras nerviosas, mediado por distintos canales de comunicación, conduce el estímulo sensorial vía ganglio trigémino, determinando la nocicepción dental; sin embargo, aún no se entiende completamente cómo estas estructuras celulares establecen comunicación entre sí, lo cual genera controversia en torno a las teorías del dolor dental, teniendo diferentes corrientes de investigación celular, molecular y electrofisiológicas en el campo.

## 2.1.2. Teorías del Dolor Dental

### 2.1.2.1. Teoría Neural

Esta teoría describe el rol de las neuronas nociceptivas del ganglio trigémino que inervan la pulpa dental (aférentes dentales primarias). Para jugar un papel sensorial, las neuronas deben expresar un receptor que tome parte en la transducción de un estímulo específico a impulso eléctrico. Investigaciones acerca de receptores nociceptivos revelaron la expresión funcional de varios canales TRP temperatura-sensitivo en neuronas del ganglio trigémino y, más específicamente, en neuronas aferentes primarias dentales. Registros electrofisiológicos con aplicación de capsaicina o temperatura nociva, sugieren expresión funcional de TRPV1 y TRPV2 en neuronas aferentes primarias dentales de roedores. Una combinación de análisis electrofisiológicos, RT-PCR unicelular e inmunohistoquímica revelaron que neuronas aferentes dentales expresan TRPV1 y TRPV2 más abundantemente en relación con la población de neuronas del ganglio trigémino, consistente con la visión tradicional de que la mayoría de las neuronas aferentes dentales son nociceptoras<sup>19</sup>.

Los estímulos fríos son una frecuente causa de dolor dental que no puede ser explicada por la expresión y activación de TRPV1 o TRPV2<sup>20</sup>. Es sabido que subpoblaciones de fibras neurales A $\delta$  y C son receptoras de frío. Experimentos con calcio han demostrado que las respuestas de las neuronas a temperaturas frías (bajo 18 °C) son más prevalentes en el ganglio trigémino (14%) que en el ganglio de la raíz dorsal (7%). Receptores TRPM8 Y TRPA1 son activados por temperaturas bajas con umbrales de 25°C y 17°C, respectivamente. Similar a TRPV1, TRPM8, está preferentemente expresado en neuronas de tamaño pequeño del ganglio trigeminal y además activados por varios compuestos químicos, incluyendo mentol, mentona, eucaliptol, WS-3 e Icilina<sup>21</sup>.

Los patrones de expresión de TRPM8 y TRPA1 en neuronas dentales aferentes primarias han sido bien documentados. La regulación de TRPA1 en respuesta a una injuria dental experimental sugiere que el receptor de frío puede jugar un rol central en el dolor dental. Sin embargo, es interesante que la prevalencia de expresión de TRPM8 y TRPA1 en neuronas del ganglio trigémino fue más baja que TRPV1, a pesar de la propensión a estímulo frío que induce dolor dental<sup>22</sup>. Además, los receptores de frío TRPM8 Y TRPA1 son co-expresados con subpoblaciones de TRPV1-positivas en neuronas dentales aferentes. Estas observaciones pueden ayudar a explicar porque es difícil discriminar entre estímulos fríos y calientes aplicados al diente, pero continúa siendo un misterio la razón por la que estímulos fríos son una de las causas más

frecuentes de dolor dental, lo cual no explica a cabalidad los procesos de la transducción neural en el diente.

### *2.1.2.2. Teoría Hidrodinámica*

El dolor dental intenso y repentino puede ser provocado por estímulos inocuos normales como el agua a presión, soplo de aire, o sustancias dulces.

Este amplio rango de dolor dental no puede ser explicado solamente por transducción de temperaturas nocivas por canales TRP. La sensación de dolor pulsátil a menudo descrito por pacientes con pulpitis crónica sugiere que el dolor dental puede ser inducido por presiones hidrostáticas aplicadas por el tejido pulpar inflamado encerrado por la dura estructura dentinaria<sup>23</sup>.

La teoría hidrodinámica trata con la forma en que las ingestas de frío y calor fuerzan a mover el fluido intratubular y luego estimular la transducción de señales de dolor. Hoy en día, esta teoría es bien aceptada entre investigadores. Un reflejo de ese reconocimiento puede ser visto por el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria usando terapia láser para ocluir o estrechar los túbulos, y también considerando el efecto de otros factores mecánicos como el estrés hiperosmótico en la sensación de dolor<sup>24</sup>.

Recientemente se sugirió que el movimiento hacia adentro y hacia afuera del líquido dentinario contribuye de manera diferente al dolor dental<sup>25</sup>. Desde el movimiento hacia afuera del fluido, la respuesta a los estímulos fríos es más rápida que desde el movimiento hacia adentro por los estímulos calientes. La sensación de frío es más fácilmente detectada por las fibras A $\delta$  en los túbulos dentinarios como el dolor agudo en la pulpitis temprana. A medida que avanza la pulpitis, las fibras C sensibilizadas en el tejido pulpar profundo se pueden activar mediante movimientos internos del fluido dentinario por estímulos calientes y percibido como dolor sordo.

Recientemente se han dilucidado las implicancias de los transductores de fuerza mecánica. Entre los varios candidatos que muestran mecanosensibilidad se encuentran TRPV1, TRPV2, y TRPA1, cuya expresión ya ha sido demostrada en aferentes dentales; la expresión de otros candidatos mecanotransductores como TRPV4 y TRPM3, han sido reportados sólo en neuronas del ganglio trigémino, pero no en aferentes dentales primarias<sup>19</sup>. La presencia de estos múltiples mecanotransductores en estudio podría ser crucial en la comunicación química en la dinámica del dolor, pero aún no hay una comprensión a cabalidad de su expresión y funcionamiento ante los diversos estímulos.

### *2.1.2.3. Teoría Odontoblasto – Transductor*

Los odontoblastos constituyen una capa celular en la parte más externa de la pulpa dental y secretan una matriz mineralizada de calcio para formar dentina. Su ubicación estratégica, junto con varias líneas de evidencia, sugiere que los odontoblastos podrían jugar un rol adicional como transductores sensoriales. Para confirmar tal rol, se deben cumplir los siguientes tres criterios:<sup>7</sup>

- 1) Expresión funcional de receptores para estímulos específicos.
- 2) Capacidad de transmitir señales posterior a la activación de receptores.
- 3) Una estructura sináptica entre odontoblastos y neuronas<sup>7</sup>.

Apoyando el primer criterio hay datos que demuestran la expresión de varios miembros de los canales TRP en ratas y odontoblastos humanos. Se observó que en odontoblastos de ratas neonatales expresan TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4 y TRPM3 por RT-PCR unicelular, inmunohistoquímica, y análisis de imágenes de calcio; sin embargo, en un estudio separado, los odontoblastos aislados de ratas adultas no mostraron evidencia de TRPV1 y TRPV2<sup>26</sup>.

Los receptores de frío TRPM8 y TRPA1 no se detectaron en ninguno de los estudios, lo que sugiere que cualquier posible papel sensorial de los odontoblastos podría no involucrar TRPM8 y TRPA1, al menos en ratas. Sin embargo, experimentos de imágenes de calcio mostraron que los odontoblastos humanos expresan TRPM8 y TRPA1, así como TRPV1<sup>27</sup>. Curiosamente, de los canales TRP sensibles a temperatura identificados en odontoblastos, TRPV1, TRPV2, TRPV4 y TRPM3, se cree que también serían mecanosensibles. Por lo tanto, es posible que estos receptores puedan contribuir a un papel sensorial de los odontoblastos por mecanotransducción. Además, la expresión de los canales de K<sup>+</sup> mecanosensibles y los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo N fueron encontrados en odontoblastos<sup>28</sup>. Recientemente, se demostró que la cooperación de los canales de TRP con canales K<sup>+</sup> mecanosensibles participan en la percepción de la temperatura, lo que sugiere además el papel de los odontoblastos como células sensoriales<sup>29</sup>.

Junto a esto, la comunicación a través de neurotransmisores puede ocurrir entre el nervio pulpar y los odontoblastos o entre células interodontoblásticas y odontoblastos. La denervación sensorial de la pulpa no altera la formación de dentina y las propiedades inmunológicas de los odontoblastos, lo que sugiere un rol para las células interodontoblásticas<sup>30</sup>. Estas células forman conexiones *Gap junction (GJ)* con los odontoblastos adyacentes<sup>31</sup>, por lo cual se podrían encontrar en estas zonas diferentes proteínas de unión como ocludinas (Cx26, Cx32, Cx43) y panexinas (PANX-1, PANX-2, PANX-3)<sup>32</sup> que podrían jugar un rol fundamental en la comunicación celular frente a diferentes estímulos, lo cual lo hace relevante debido a su posible participación en la nocicepción dental.

## 2.2. Células Madre

### 2.2.1. Generalidades

Las células madre son células indiferenciadas caracterizadas por su capacidad de proliferación, auto renovación, diferenciación y regeneración tisular. Estas células se dividen principalmente en dos grandes grupos según su tejido de origen, pueden ser células madre embrionarias y células madres adultas. También se pueden dividir por su capacidad de diferenciación.

### 2.2.1.1. Clasificación de Células Madre según su Capacidad de Diferenciación

- **Totipotenciales**

Únicamente el cigoto y las descendientes de las dos primeras divisiones son células totipotenciales ya que tienen la capacidad de formar tanto el embrión como el trofoblasto de la placenta.

- **Pluripotenciales**

A los cuatro días las células totipotenciales empiezan a diferenciarse, formando el blastocisto y la masa celular interna. Las células de la masa celular interna son consideradas pluripotenciales y pueden diferenciarse en las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero pierden la capacidad de formar la placenta.

- **Multipotenciales**

Presentes en una gran cantidad de tejidos adultos, son células capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas de acuerdo a su localización; por ejemplo, las células madre del sistema nervioso central tienen el potencial de generar tres tipos celulares: neuronas, oligodendrocitos y astrocitos.

- **Unipotenciales**

Son células capaces de generar un solo tipo de célula específica; por ejemplo, las células madre en la membrana basal de la epidermis interfolicular, que producen únicamente células escamosas o queratinocitos<sup>33</sup>.

Estudios recientes han demostrado que es posible obtener células pluripotentes a partir de células somáticas diferenciadas. Ésto se logró al introducir mediante retrovirus (transfección viral), cuatro factores de transcripción altamente expresados en células madre embrionarias (Oct-3/4, Sox2, KLF4 y c-Myc) en fibroblastos de ratón, lo que generó células similares a las células madres embrionarias en morfología, proliferación y pluripotencia, las que se conocen actualmente como células madre pluripotentes inducidas (iPSC)<sup>34</sup>.

### 2.2.2. Células Madres Embrionarias

Son células madre pluripotenciales obtenidas de la masa celular interna del blastocisto temprano, capaces de proliferar y mantenerse indiferenciadas indefinidamente *in vitro*. Estas células madres embrionarias fueron aisladas y cultivadas por primera vez a partir de embriones de ratón en 1981<sup>35, 36</sup>. Posteriormente, en un estudio de 1998 se generaron líneas de células madres embrionarias a partir de blastocistos humanos<sup>37</sup>. Esto abrió la posibilidad de utilizar estas células con la capacidad de diferenciarlas en prácticamente cualquier tipo celular para desarrollar terapias de trasplante celular para tratar enfermedades como la diabetes juvenil, alteraciones neuronales, enfermedades cardíacas y hepáticas. Sin embargo, el uso de células madre embrionarias para investigación y el desarrollo de tratamientos no está exento de complicaciones, por un lado, están las implicancias éticas por el uso de

embriones humanos, principalmente relacionados con la obtención de estas células, las cuales se obtienen actualmente de tres fuentes:

1. Líneas de células madres embrionarias existentes.
2. Embriones que no fueron utilizados durante procedimientos de fertilización *in vitro*.
3. Embriones creados a partir de células somáticas al implantar el núcleo de esta célula en un ovocito enucleado con fines de investigación (técnica de transferencia nuclear).

De estas tres fuentes, la obtención a partir líneas de células madre existentes es la menos controversial en comparación al uso de embriones no utilizados resultantes de procedimientos de fertilización *in vitro*, mientras que la creación de embriones a partir de células somáticas para investigación es la que presenta más objeciones éticas, con grupos discutiendo desde perspectivas religiosas y morales. Por otro lado, el uso de este tipo de células presenta dificultades en la selección del fenotipo celular deseado por su capacidad para diferenciarse en virtualmente cualquier tipo celular, la formación de tumores benignos por su gran capacidad proliferativa, y el rechazo del trasplante<sup>38, 39</sup>.

### 2.2.3. Células Madres Adultas

Las células madre adultas o somáticas son células multipotentes indiferenciadas, con capacidad de autorrenovación. Estas células tienen la función de mantener y reparar los tejidos y órganos en los que se encuentran. Su capacidad de diferenciación es limitada en comparación con las células madre embrionarias, ya que estarían limitadas a diferenciarse a tipos celulares correspondientes al tejido en el que residen. Sin embargo, hay estudios recientes que demuestran la capacidad de diferenciarse en células de diferente linaje bajo condiciones especiales<sup>40</sup>.

Estas características esenciales de las células madre fueron descritas por primera vez en células de la médula ósea de ratón en 1961, donde se observan como células capaces de formar colonias de varias líneas celulares hematopoyéticas<sup>41</sup>.

Desde su descubrimiento, se ha logrado aislar células madre capaces de responder a daños tisulares en casi todos los tejidos del cuerpo, incluso en el sistema nervioso central y el corazón. Sin embargo, su activación en estos tejidos después de un estímulo nocivo parece ser pequeña y tardía. A pesar de encontrarse prácticamente en todos los tejidos, se ha demostrado que residen en áreas localizadas conocidas como nichos de células madre, entre los cuales se han podido identificar la presencia de células madre neurales en el ventrículo anterolateral y el hipocampo del cerebro, células hematopoyéticas, mesenquimáticas y progenitoras endoteliales en la médula ósea, células madre epidermales esparcidas a lo largo de la membrana basal en la piel, células madre adiposas en tejido graso, también se ha denominado células progenitoras de tejido conectivo a un grupo heterogéneo de células madre responsables de la reparación y renovación musculoesquelética, en el tracto digestivo se cree que las células madre se encuentran la capa basal de la mucosa y en la base del epitelio de las criptas en el intestino delgado. Otros nichos de células madre se han

identificado en el hígado, corazón, órganos reproductivos, riñón, pulmones, el limbo esclero corneal del ojo, la retina, en el epitelio olfatorio y en tejido dentario<sup>33, 40, 42</sup>.

### 2.2.3.1. Células Madre Mesenquimáticas

Son células madre adultas de origen embrionario mesodermal, descubiertas por primera vez en médula ósea. La presencia de células madre no hematopoyéticas en médula ósea, capaces de diferenciarse a otros tipos celulares de origen mesenquimático fue descubierto por *Friedenstein et al.*, al posicionar muestras de médula ósea en placas de cultivo plásticas y remover las células no adherentes después de cuatro horas, descartando las células hematopoyéticas del tejido. Al principio observaron células adherentes heterogéneas en apariencia, pero también observaron células adherentes fusiformes en focos de dos a cuatro células, las cuales permanecieron inactivas los primeros dos a cuatro días y posteriormente empezaron a multiplicarse rápidamente. Después de varios pasajes se pudo observar un cultivo homogéneo con células adherentes parecidas a fibroblastos, también descubrieron que estas células podían formar colonias que se asemejan a pequeños depósitos de hueso y cartílago. En los años siguientes se demostró que estas células tenían capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación a múltiples tipos celulares mesenquimáticos, cumpliendo los criterios para ser consideradas células madre<sup>43, 44</sup>.

Estas células se han podido aislar de varios tejidos además de médula ósea, como por ejemplo tejido adiposo, tendón, membrana sinovial, hueso trabecular, tejidos embrionarios, el sistema nervioso, piel, periostio, músculo y ligamento periodontal<sup>45</sup>.

Desde el punto de vista morfológico, los cultivos celulares resultantes son todavía heterogéneos, ya que contienen células que van desde células con forma de huso estrecho hasta células poligonales grandes y, en cultivos confluentes, algunas células son ligeramente cuboidales.

Fenotípicamente, estas células expresan una serie de marcadores de superficie, sin embargo, ninguno de estos es específico para células madre mesenquimáticas. En general, se acepta que las células madre mesenquimáticas humanas adultas no expresan los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11. Tampoco expresan las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 o CD40 ni las moléculas de adhesión CD31 (molécula de adhesión de las células plaquetarias / endoteliales [PECAM] -1), CD18 (antígeno-1 asociado a la función leucocitaria [LFA-1]), o CD56 (molécula de adhesión celular neuronal-1), pero pueden expresar CD105 (SH2), CD73 (SH3 / 4), CD44, CD90 (Thy-1), CD71 y STRO-1, así como las moléculas de adhesión CD106 (molécula de adhesión celular vascular [VCAM] -1), CD166 (molécula de adhesión celular de leucocitos activados [ALCAM]), molécula de adhesión intercelular (ICAM) -1, y CD29. Es importante mencionar que hay una expresión variable de muchos de los marcadores mencionados debido a la variación en la fuente del tejido, el método de aislamiento y cultivo, y las diferencias de especies, además, muchos marcadores pueden verse influenciados por factores secretados por células accesorias en los pasajes iniciales<sup>44</sup>.

El fenotipo inmune de estas células es ampliamente descrito como MHC I+, MHC II-, CD40-, CD80- y CD86-, por lo que se consideraría no inmunogénico y, por lo tanto, el trasplante en un huésped alogénico puede no requerir inmunosupresión. El MHC de clase I puede activar las células T, pero, con la ausencia de moléculas coestimuladoras, una señal secundaria no se activaría, dejando las células T anérgicas<sup>46</sup>. Esta característica les otorga un atractivo terapéutico, sin embargo, todavía no hay claridad sobre los mecanismos exactos mediante los cuales estas células ejercen sus propiedades inmunomoduladoras<sup>44, 46</sup>.

Además de las características morfológicas y fenotípicas reportadas sobre las células madre mesenquimáticas, que son muy variables, éstas pueden identificarse por su funcionalidad, ya que su capacidad de diferenciación inducida *in vitro* a tejido óseo, adiposo y cartilaginoso quizás sea el único requisito crítico para identificar supuestas poblaciones de células madre mesenquimáticas. Se han reportado otras vías de diferenciación *in vitro* a células cardíacas y neuronas<sup>44, 46</sup>.

#### 2.2.3.2. Células Madre Dentales

Los tejidos dentales surgieron como una nueva fuente de células madres, con el beneficio de ser de obtención más simple y menos invasiva que las fuentes nombradas anteriormente<sup>47, 48</sup>. Estas células poseen características de células madre mesenquimáticas, presentando una morfología similar a fibroblastos, capacidad de regeneración y diferenciarse a distintos linajes celulares, junto con características inmunomoduladoras, por lo que su estudio ha ganado interés al ser buenos candidatos para terapias de regeneración de tejidos y el tratamiento de enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

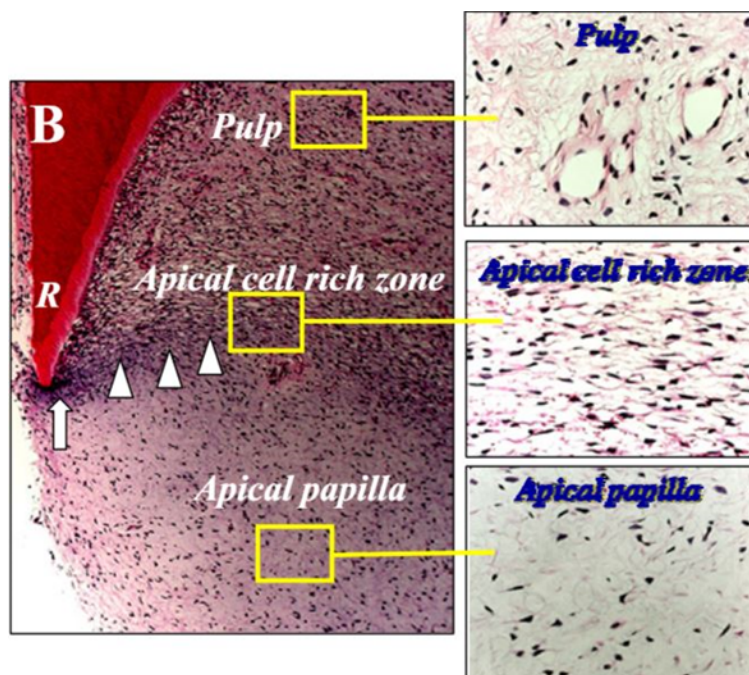
En relación a sus marcadores de superficie, las células madres dentales expresan marcadores específicos para células madre mesenquimales como STRO-1, CD146, CD106 y CD44. Sin embargo, no expresan marcadores hematopoyéticos como CD11b, CD45 y CD34<sup>49</sup>.

Dentro de los diferentes tipos de células madre dentales aislados hasta el momento, podemos encontrar a las células madre de la pulpa dental, células progenitoras del folículo dental, células madre de papila apical, células madre de germen dental, células madre del ligamento periodontal y células madre de dientes deciduos exfoliados. Estas células son capaces de diferenciarse a tejido óseo, adiposo, cartilaginoso, neuronal, muscular y dental. Incluso, se ha demostrado que las células madre de la pulpa dental han sido capaces de diferenciarse a células secretoras de insulina<sup>49</sup>.

#### Células Madres de la Papila Apical

Esta nueva población de células madre fue descubierta y aislada de la papila apical de dientes humanos con sus raíces en formación el 2006 por *Sonomaya*<sup>50</sup>. La papila apical corresponde a un tejido blando presente en el ápice de dientes en formación, que se puede separar fácilmente. Histológicamente se observa como un

tejido muy acelular y avascular en relación al tejido pulpar, del cual se encuentra separado por una zona rica en células.



**Figura 2:** Corte histológico con tinción hematoxilina eosina de del ápice radicular de un diente en formación<sup>51</sup>.

Para la extracción de estas células, las muestras generalmente se obtienen de terceros molares de sujetos jóvenes de entre 18 y 20 años, posteriormente se extrae el tejido blando de la superficie apical de estos dientes, se disgrega el tejido y se somete a una digestión mediante una solución de colagenasa tipo I y dispasa por 30 minutos a 37°C, obteniendo una suspensión de células aisladas tras pasar por un “colador” de 70 µm. Posteriormente se pueden “sembrar” en placas de cultivo en un medio de cultivo “Eagle modificado” con suero fetal bovino al 15%<sup>50, 51</sup>.

En el mismo artículo publicado por Somomaya el 2006, demostró las capacidades de diferenciación osteogénica y dentinogénica *in vitro* de estas células cultivándolas con un suplemento de L-ascorbato-2-fosfato, dexametasona y fosfato inorgánico para inducir mineralización. Además, mostró su capacidad de diferenciación funcional *in vivo* a células dentinogénicas al trasplantar células madre de la papila apical a ratones inmunocomprometidos con hidroxapatita/tricalcio-fosfato como portador<sup>50</sup>. Posteriormente, se describió que estas células también presentaban potencial de diferenciación adipogénica y neurogénica<sup>51</sup>.

La expresión de marcadores de superficie y moléculas intracelulares es muy similar a otras células madre mesenquimáticas, siendo positivos para marcadores como CD146 y STRO-1, que son marcadores tempranos de este tipo de células,

también comparten la característica de no presentar marcadores hematopoyéticos (Tabla I).

Por otro lado, las células madre de la papila apical se han podido diferenciar hasta el momento de otras células madre mesenquimáticas en cuanto a la expresión de marcadores, únicamente por la expresión de CD24, por lo que sería el único marcador que las diferenciaría de las células madre de la pulpa<sup>51</sup>.

<b>Marcadores Positivos</b>	<b>Marcadores Negativos</b>
CD13, CD24, CD29, CD44, CD49, CD51	CD14, CD18
CD56, CD61, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
CD106, CD146, CD166, STRO-1, Oct3/4	CD117, CD150
Sox-2, Nanog, Notch 3, vimentin, survivin	

**Tabla I:** Expresión de marcadores en células madre de la papila apical<sup>52</sup>.

## 2.3. Conexinas

### 2.3.1. Definición y Generalidades

*Schadzek et al.* en el 2019 describen a las Cx como proteínas que forman canales de unión entre células. Los canales de unión permiten el intercambio de iones y pequeños metabolitos entre las células de un tejido<sup>53</sup>.

También describen que para formar un canal de unión tipo GJ, los hemicanales, formados por Cx, dentro de la membrana de las células que están en contacto se acoplan entre sí generando un poro entre estas células que permite la difusión de pequeños metabolitos de 1 a 2 kDa entre el espacio citoplásmico de las células que interactúan<sup>53</sup>.

*Goodenough* en 1996 describe que la comunicación celular está mediada a través de una familia de proteínas llamadas Cx y los canales GJ que en sí comprenden estas proteínas<sup>54</sup>.

Seis de estas proteínas de Cx se conectan y se ensamblan en un canal a través de la membrana plasmática que puede intercambiar pequeñas moléculas entre el citoplasma y el espacio extracelular como hemicanales. Pero también cuando estos hemicanales se acoplan con un hexámero compatible vecino, es decir otro hemicanal, se forma un GJ. La comunicación intercelular a través de GJ genera intercambio de iones, micro ARN, pequeños metabolitos como la glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), antioxidantes y péptidos entre las células, lo que les permite coordinar sus fenotipos y responder a las condiciones ambientales<sup>55</sup>.

Por lo tanto, las Cx cumplen tres funciones celulares principales, que serían: intercambio de pequeñas moléculas entre células a través de GJ, intercambio de

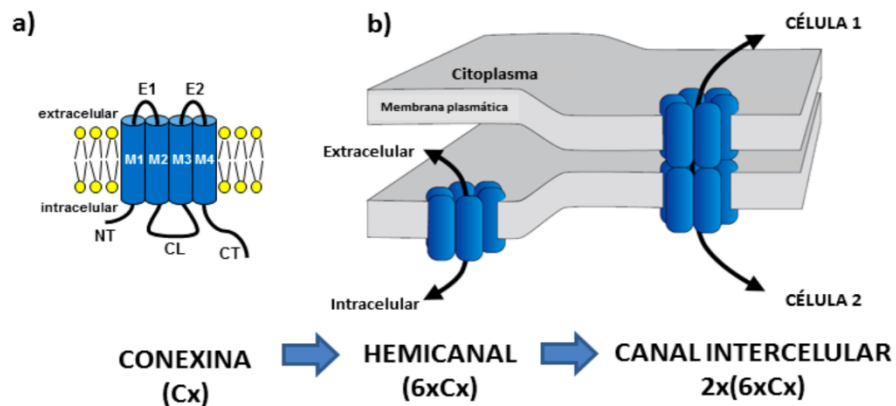
pequeñas moléculas entre una célula y el espacio extracelular a través de hemicanales, y unión a proteínas intracelulares <sup>55</sup>.

### 2.3.2. Estructura

Maeda 2009 y Barrio 2012 describen la estructura de un hemicanal compuesto de seis subunidades de Cx, que forma complejos hexaméricos de proteínas transmembrana de Cx que se oligomerizan a lo largo de la vía de tránsito entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Estos complejos hexaméricos se insertan en la membrana celular donde forman hemicanales, con poros de 14Å, que al unirse al hemicanal de una célula vecina generan un canal tipo GJ<sup>56, 57</sup>.

Cada Cx posee: cuatro dominios transmembrana (M1-M2-M3-M4), dos asas extracelulares (E1, E2), un asa intracelular (CL) y los extremos amino y carboxilo terminal orientados hacia el lado citoplasmático celular (Figura 3a)<sup>58</sup>.

Estas hélices transmembrana son mayoritariamente hidrofóbicas para anclarse en la bicapa lipídica a excepción de unos cuantos residuos hidrofílicos que se alinean y orientan hacia la luz del poro permitiendo la formación del canal de comunicación (hemicanal) (Figura 3b), compuesto por seis unidades de Cx, que se une a otro hemicanal y forman un GJ (Figura3b).



**Figura 3:** Conexinas y canales a) Conexina (Cx) b) Hemicanal (6Cx) a la izquierda y *Gap Junction* (2(6Cx)) a la derecha<sup>58</sup>.

### 2.3.3. Funciones

El diámetro del poro que se forma en el hemicanal de Cx es de aproximadamente 14 Å, que equivale a 1,4 nm y permite el intercambio de iones y moléculas de hasta 1 kDa como segundos mensajeros o metabolitos. Este intercambio de material permite que un conjunto de células coordine importantes funciones biológicas como lo son el desarrollo, la sincronización celular, la actividad neuronal, la respuesta inmune, el metabolismo, la proliferación o la diferenciación<sup>54, 57</sup>.

En ocasiones este tipo de comunicación no solamente es importante para las células que están comunicadas entre sí, también puede afectar a otros tipos celulares<sup>57</sup>.

Por tanto, nos encontramos frente a proteínas diseñadas para constituir un poro de comunicación que interrumpe la barrera intercelular que constituye la membrana plasmática, pero que además poseen una cola citoplasmática para comunicarse con proteínas intracelulares. No es de extrañar entonces que estas proteínas sean tan relevantes para regular el correcto funcionamiento de muchos procesos biológicos<sup>57</sup>.

También hemos aprendido que las Cx desempeñan otras funciones biológicas, además de mediar la comunicación intercelular. Los hemicanales formados por ciertas Cx también pueden ser funcionales y abrirse por depolarizaciones del potencial de membrana, permitiendo la difusión o intercambio de iones y metabolitos (como el ATP, el cAMP, el IP<sub>3</sub> y el glutamato) entre el interior y el exterior celular, pudiendo participar en la homeostasis iónica y actuar como vías secretoras y de señalización autocrina y paracrina. La probabilidad de apertura de los hemicanales está regulada de forma muy estricta a concentraciones fisiológicas de Ca<sup>2+</sup> extracelular, que evita la pérdida de metabolitos y de los gradientes iónicos a través de la membrana celular<sup>58</sup>.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo General

- Caracterizar la expresión de Cx en células madre de la papila apical dental humana.

### 3.2. Objetivos Específicos:

- Obtener células madre de la papila apical a partir de terceros molares con raíces en formación extraídos en pabellón de cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso.
- Determinar la expresión de Cx43 y Cx26 en células madre de la papila apical dental humana.
- Determinar la localización subcelular de Cx43 en células madres de la papila apical dental humana.

## 4. HIPÓTESIS

Existe expresión de Cx43 en células madre obtenidas desde la papila apical dental humana.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Tipo de Estudio

Estudio descriptivo observacional in vitro de la expresión de Cx43 en células madre de la papila apical dental humana.

### 5.2. Universo

Terceros molares sanos con indicación de exodoncia, sin formación radicular completa, en pacientes atendidos en el pabellón de cirugía maxilofacial, en la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, donados mediante consentimiento informado escrito y asentimiento verbal del paciente, entre los meses de Agosto de 2018 y Enero de 2019.

### 5.3. Criterios de Inclusión y Exclusión de Pacientes

#### 5.3.1. Inclusión

- Pacientes sistémicamente sanos.
- Pacientes con terceros molares sanos con indicación de exodoncia por ortodoncia.
- Pacientes con terceros molares sanos con raíces en formación, sin cierre apical.
- Pacientes que firmen el consentimiento informado y que deseen participar.

#### 5.3.2. Exclusión

- Dientes con necrosis pulpar, pulpitis reversible, pulpitis irreversible y restos radiculares.
- Pacientes con dientes afectados por lesión tanto caries activas como detenidas.
- Pacientes con tumor o quiste en relación a tercer molar.

### 5.4. Criterios de Inclusión y Exclusión de las Muestras

#### 5.4.1. Inclusión

- Dientes con formación radicular entre Nolla 7 y 8.

#### 5.4.2. Exclusión

- Reabsorción radicular fisiológica oblicua u horizontal.
- Muestras que posterior al procesamiento y chequeo presenten una fijación deficiente.
- Dientes que evidencian pérdida del tejido pulpar.

## 5.5. Muestras

### 5.5.1. Aprobación del estudio y Consentimiento informado

El presente proyecto ha sido aprobado de acuerdo a los protocolos del Comité Institucional de Bioética de la Investigación en Seres Humanos de la Universidad de Valparaíso. Las muestras procesadas en este trabajo han sido donadas en forma voluntaria mediante asentimiento verbal del paciente y consentimiento informado escrito firmado por el paciente.

### 5.5.2. Proceso de Recolección y Procesamiento de la Muestra

Se realizaron diversos protocolos para llegar al objetivo de tesis en el Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, a continuación se describen los procedimientos.

## 5.6. Cultivo Celular

Los cultivos celulares primarios de células madres de la papila apical se conservaron en medio (MEM) en placas de 90 mm, se realizaron subcultivos (pasaje celular), luego de 3 semanas del cultivo primario, alcanzada una confluencia >70%:

- a) Se eliminó el medio (MEM) en el cual se encontraban las células utilizando una pipeta para posteriormente realizar tres lavados con solución *buffer* fosfato-salina (PBS) 1X.
- b) Se agregó 1 ml de tripsina a la placa y se dejó actuar durante 10 a 15 minutos en la incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Incubadora de CO<sub>2</sub> *Forma*<sup>TM</sup> serie 3, *Thermo Scientific*®).
- c) Se realizó la aplicación de medio a la placa de cultivo disgregada, con una técnica de *up and down* para favorecer la disgregación celular, llevando éste a un tubo cónico previamente estéril.
- d) Se realizó centrifugado de la muestra disgregada a 2000rpm, durante tres minutos.
- e) Se utilizó nuevo medio (MEM) para generar una solución celular mediante técnica *up and down*, para llevarla a una placa de cultivo celular que se dejó en incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## 5.7. Inmunocitoquímica e Inmunofluorescencia

- a) Se sembraron las células en cultivo en cubreobjetos con el fin de que se adhieran y crezcan en la superficie del vidrio. Posteriormente se lavaron las células adheridas al cubreobjeto con solución *buffer* fosfato-salina (PBS) tres veces.
- b) Se fijaron las células, agregando 5 ml de PBS 1X con 4% de Paraformaldehído, dejando a temperatura ambiente por 30 minutos.
- c) Se eliminó la solución fijadora y se lavó con PBS 1X dos veces, agregando volúmenes de 5 ml. Se eliminó la PBS 1X de la placa con cubreobjeto y se

permeabilizaron las células, agregando PBS 1X con 1% Tritón X-100 cubriendo completamente la superficie de los cubreobjetos, manteniendo a temperatura ambiente por 30 minutos.

- d) Se eliminó la solución permeabilizadora y se reemplazó por una solución de bloqueo, consistente en solución permeabilizadora con 2% de suero normal de cabra (SNC) y se mantuvo a temperatura ambiente 30 minutos. Se procedió a incubar los cubreobjetos con los anticuerpos primarios deseados (Tabla II), diluidos en la solución de bloqueo, en una cámara húmeda toda la noche a 4°C.
- e) Se retiraron los cubreobjetos de la cámara húmeda y se depositaron en un *Multiwell* (cubre objeto por pocillo). Se procedió al lavado con 2 ml PBS Tritón 1X seis veces por 5 minutos cada vez, removiendo el exceso de anticuerpo que estaba adherido a las células.
- f) Luego se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos indicados en la Tabla III, en cámara húmeda por una hora a temperatura ambiente y en oscuridad.
- g) Posteriormente se realizó el lavado de los cubreobjetos con PBS Tritón 1X seis veces por 5 minutos cada vez.
- h) Luego se montaron los cubreobjetos sobre un portaobjeto de vidrio, agregando 5 µl de medio de montaje (BSA (albúmina sérica bovina) 2% en PBS).

Se realizó la observación de este procedimiento bajo un microscopio de fluorescencia, equipado con los filtros adecuados para los fluoróforos utilizados, en la sala de Microscopía con Focal en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso.

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución para Inmunocitoquímica</b>	<b>Dilución para Western Blot</b>
<i>Mouse Anti Cx26</i>	<i>Invitrogen®</i>	1:100	1:1000
<i>Rabbit Anti Cx43</i>	<i>Invitrogen®</i>	1:200	1:500
<i>Rabbit Anti CD146</i>	<i>Thermo Fisher®</i>	1:1000	-
<i>Mouse Anti STRO-1</i>	<i>Thermo Fisher®</i>	1:100	-

**Tabla II:** Anticuerpo Primario.

<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Marca</b>	<b>Dilución para Inmunocitoquímica</b>	<b>Dilución para Western Blot</b>
<i>Anti Rabbit IgG-HRP</i>	<i>Jackson</i>	1:500	1:5000
<i>Anti Mouse IgG-HRP</i>	<i>Immunoresearch®</i>		
	<i>Jackson</i>	1:500	1:5000
	<i>Immunoresearch®</i>		

**Tabla III:** Anticuerpo Secundario.

## 5.8. Western Blot

### 5.8.1. Preparación de la Muestra

Las muestras se prepararon cosechando las células adheridas a las placas de cultivo, generando un lisado celular para su cuantificación y su posterior separación de proteínas por peso molecular mediante electroforesis.

Primero se eliminó el medio de cultivo y se lavó a las células con 5 ml de PBS. Se agregó una solución con 1 ml de PBS y 2  $\mu$ l de inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

Posteriormente se desprendió el mayor número de células raspando suavemente la superficie con un rastrillo de goma de borde liso, obteniendo una suspensión de células más la solución con inhibidor de proteasas. La suspensión de células se transfirió a un tubo *Eppendorf* de 1,6 ml y se centrifugó a 12.000rpm en una centrífuga para estos tubos (*DLab*<sup>TM</sup>, modelo DM0412).

Se eliminó la suspensión y se obtuvo un “pellet” de células que se mantuvo en hielo. Posteriormente se agregó una solución de inhibidores de proteasas y fosfatasas con un volumen aproximadamente al doble del “pellet” y se procedió a lisar las células por sonificación.

Para medir la concentración de proteínas se utilizó el método de *Bradford* y un espectrofotómetro (*Thermo Fisher*<sup>TM</sup>, modelo *Nanodrop 2000*). Finalmente se transfiere 100  $\mu$ g de proteína total de cada muestra a los tubos *Eppendorf* de 0,6  $\mu$ l, diluyendo la muestra en buffer de carga (2-Betamercaptoetanol y Azul de bromofenol). Al momento de realizar la electroforesis, se transfirió 50  $\mu$ g de proteína total cada muestra, se agregó 13  $\mu$ l de buffer de carga y finalmente se agregó agua destilada hasta obtener 50  $\mu$ l de muestra.

### 5.8.2. Electroforesis

La separación de proteínas se realizó mediante un gel discontinuo denaturante de poliacrilamida con 1,5 mm de grosor (utilizando el sistema de geles y electroforesis *Bio-Rad, Mini Protean, Tetra System*), que consiste en un gel preparado en dos fases, un gel separador en los dos tercios inferiores y otro concentrador en el tercio superior, con diferente pH y concentración de sus componentes especificados en la Tabla IV.

Componente	Gel Separador (5 ml)	Gel Concentrador (3 ml)
H <sub>2</sub> O	1,9 ml	2,1ml
30% Acrilamida	1,7 ml	500 µl
TRIS pH (Trisaminometano) (8,8 en separador y 6,8 en concentrador)	1,3 ml	380 µl
SDS 10% (Dodecilsulfato sódico)	50 µl	30 µl
PSA 10% (Persulfato de amonio)	50 µl	30 µl
TEMED (Tetrametiletiléndiamina)	2 µl	3 µl

**Tabla IV:** Compuestos de geles para electroforesis.

El gel preparado se montó en una base de electroforesis, se introdujo en una cubeta de electroforesis y se agregó *buffer* de transferencia. En cada bolsillo del gel se agregan las muestras preparadas previamente y también se agregó un patrón de peso molecular (SMO 671 Fermentas) como referencia. Una vez agregadas las muestras al gel, se conectó la cubeta de electroforesis a la fuente de energía, manteniendo un voltaje constante de 90 Volts, por 3 horas para separar las proteínas. Finalmente se obtuvo un gel con proteínas separadas por peso molecular, que para ser detectadas con anticuerpos deben ser traspasadas a una membrana.

### 5.8.3. Transferencia

La transferencia de las proteínas se hace desde el gel de poliacrilamida hacia una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, marca *Amersham*<sup>TM</sup>), en una cámara para transferencia húmeda (*Bio-Rad*<sup>TM</sup>).

Primero se acondicionó la membrana de PVDF con metanol por 30 segundos, luego con agua destilada por 5 minutos y finalmente con *buffer* de transferencia por 5 minutos.

Luego se posicionó en la cámara de transferencia, en el siguiente orden; una almohadilla y dos papel filtro (*Whatman*<sup>TM</sup> *Filter Paper*) humedecidos en *buffer* de transferencia, el gel de poliacrilamida, la membrana de PVDF y otros dos papel filtro y una almohadilla también humedecidos. Posteriormente se cerró la cámara de transferencia, se introduce a una cubeta de transferencia con *buffer* de transferencia y refrigeración, se conectó a una fuente de energía y se mantuvo a 300 mA por 2 horas. Finalmente obteniendo la membrana de PVDF con las proteínas transferidas.

#### 5.8.4. Bloqueo

Para evitar la unión inespecífica de anticuerpos a la membrana de PVDF en los sitios libre de proteína, se bloquea la membrana con 50 ml de solución bloqueadora (TBS con 0,1% *Tween* 20 y 4% leche descremada) por una hora con agitación constante.

#### 5.8.5. Detección

Después del bloqueo de la membrana de PVDF, se incubó el anticuerpo primario diluido en la solución bloqueadora durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó la membrana con *buffer* TBS con 0,1% *Tween* 20, cinco veces por 5 minutos. Posteriormente se incubó la membrana de PVDF con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*Jackson ImmunoResearch*<sup>™</sup>) diluido en solución bloqueadora. Luego se lavó nuevamente con *buffer* TBS con 0,1% *Tween* 20, seis veces por 5 minutos.

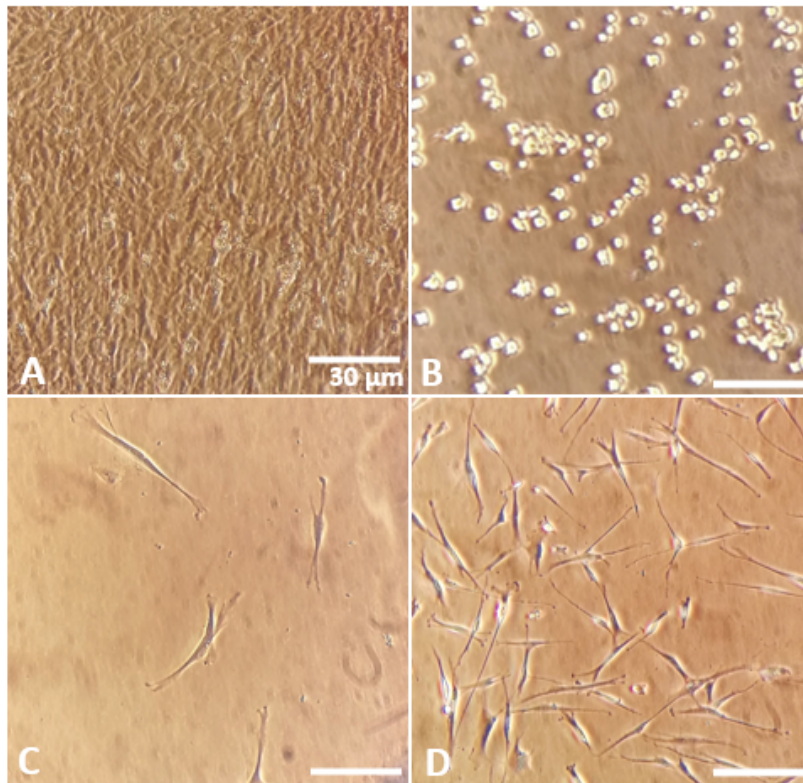
Finalmente, para la detección de los anticuerpos se incubó la membrana de PVDF con 2 ml de reactivo quimioluminiscente (*ECL Plus, Amersham*<sup>™</sup>).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Cultivo Celular

Uno de los objetivos del presente estudio era poder realizar un cultivo celular primario de células madres de la papila apical, controlar su crecimiento y poder realizar pasajes celulares a través del tiempo, manteniendo un cultivo celular propio de células madres humanas con las cuales poder realizar los trabajos experimentales de inmunocitoquímica y *Western Blot*. Se logró mantener el cultivo celular en condiciones apropiadas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, Medio MEM) en el tiempo, pudiendo realizar más de un pasaje celular. Éste, se realizó una vez conseguida una confluencia aproximada mayor al 70 % de la placa de 90 mm.

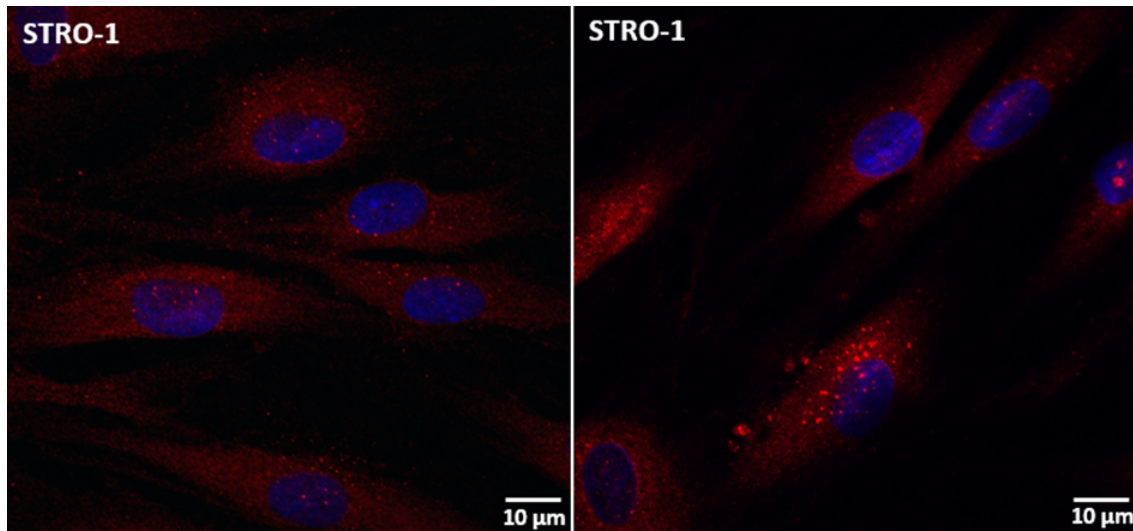
Además, se logró observar directamente la gran velocidad de crecimiento descrito para este tipo celular. En una semana (Figura 4C, 4D), ya se presentaba un gran crecimiento, teniendo que estar constantemente controlando su estado para no generar mayor estrés en el cultivo.



**Figura 4:** Cultivo de células madres de la papila apical humana, placas de 90 mm. Conservadas en medio (MEM) en incubadora a 37°C, 5% Co<sub>2</sub>. A) Cultivo primario celular con gran confluencia, adecuado para realizar pasaje celular. B) Células disgregadas por proceso de tripsinización para subcultivo. C) Día 1 posterior a pasaje celular, se observan células en crecimiento, núcleo central y prolongaciones alargadas. D) Día 7 posterior a pasaje celular, mayor confluencia celular en la placa, células en estrecha comunicación. Las imágenes fueron obtenidas usando objetivos 10x y 20x. (Barra: 30 μm.)

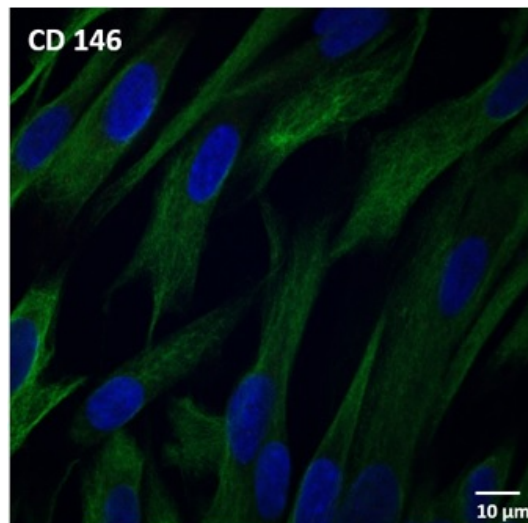
## 6.2. Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia

En la microscopía confocal, el inmunomarcaje para STRO-1 (Figura 5) se observa que las muestras *in vitro* expresan este marcador temprano de células madre de origen mesenquimático. Lo cual confirma la expresión fenotípica de este marcador de superficie para células de origen embrionario.



**Figura 5:** Inmunomarcaje para células madre de origen mesenquimático (STRO-1, rojo), marcaje de núcleos celulares (DAPI, azul). Se observan células alargadas longitudinalmente con una expresión uniforme en cuerpo celular. Anticuerpo: *Mouse Anti STRO-1*. (Barra: 10 µm).

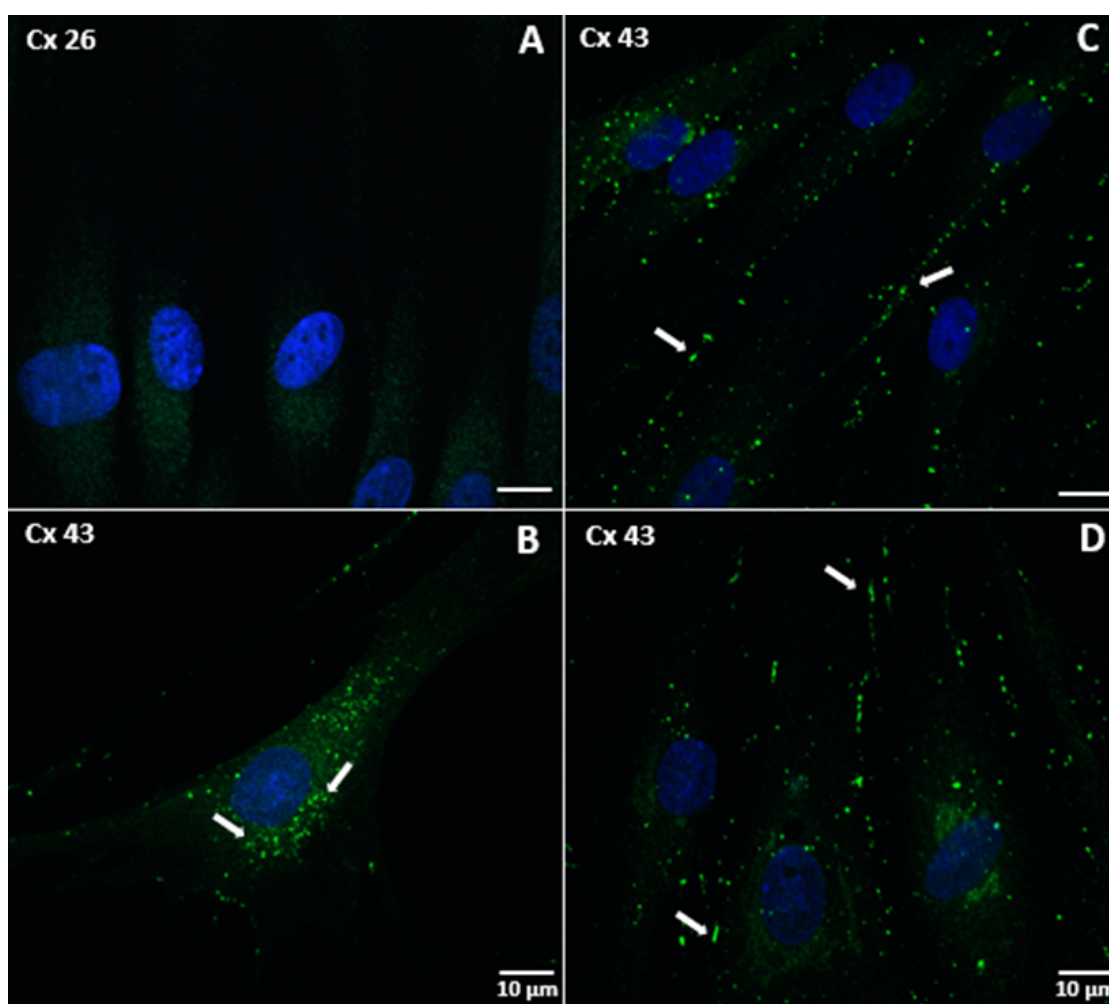
En relación a la muestra con anticuerpo Anti CD146 (Fig. 6), se observa la expresión de esta proteína de membrana, presente en células madre de la papila apical. Indicando que efectivamente trabajamos con un cultivo de células madre de origen dental humano.



**Fig 6.** Microscopía con focal mediante inmunomarcaje para SCAP cells con Anti CD146 (verde) y marcaje de núcleo celular (DAPI, azul). Se observan células alargadas longitudinalmente con expresión uniforme en su cuerpo celular de Anti CD145. (Barra 10 µm)

La caracterización de la expresión de Cx mediante microscopía confocal no indica la presencia de Cx26 al inmunomarcaje con anticuerpo Anti Cx26 (Figura 7A), lo cual coincide con lo que esperábamos encontrar, ya que no estamos trabajando con células expuestas a un ambiente patológico.

El inmunomarcaje para Cx43 muestra una expresión de esta proteína tanto a nivel intracelular, localización perinuclear y en el citoplasma, como a nivel de la membrana celular. La expresión de Cx43 perinuclear se observa en células aisladas (Figura 7B), mientras que la expresión a nivel de la membrana se observa cuando se encuentran células adyacentes contactando, mostrándose como bandas que indican la presencia GJ, generados por los hemicanales aportados por cada célula (Figura 7C y 7D).



**Figura 7:** Microscopía confocal mediante inmunomarcaje para proteínas de unión, Cx26 (*Mouse Anti Cx26*) y Cx43 (*Mouse Anti Cx43*). A) Marcaje para Cx26, no se observa expresión, ya sea intracelular o en su membrana. B) Expresión de Cx43 (Verde) en célula aislada, localizada de forma perinuclear en el citoplasma celular (flechas blancas). C y D) Se observan células en directa relación de forma longitudinal con expresión de Cx43, mayormente expresadas en zonas intercelulares. Flechas blancas indican placas de GJ. DAPI (Azul). Anti STRO-1. (Barra: 10  $\mu$ m).

### 6.3. Western Blot

Para comprobar si se expresa Cx43 en las células madre de la papila apical humana, se utilizó el análisis *Western Blot* empleando anticuerpo primario específico para la proteína a identificar. Observamos la expresión de Cx43 (Fig. 8), con una masa relativa molecular de 43 KDa, sin exposición a LPS. Además, como se muestra en la figura, su expresión aumenta ante la presencia de LPS, aunque este factor no fue considerado dentro de los parámetros a investigar en el presente estudio.

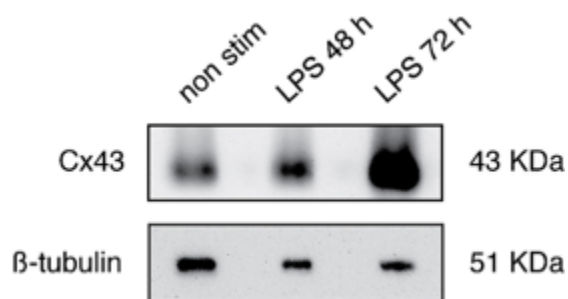


Fig 8: Expresión de Cx43 en células madres de la papila apical sin exposición a LPS, a las 48 h y 72 h de exposición ante LPS. Se presenta  $\beta$ -tubulina como proteína control. Anticuerpo primario: *Rabbit Anti Cx43, Invitrogen®*. Anticuerpo secundario: *Anti Rabbit, Jackson ImmunoResearch™*.

## 7. DISCUSIÓN

El principal hallazgo de esta investigación consiste en determinar la presencia de Cx, específicamente la Cx43, en las células madre de la papila apical, lo que es de gran importancia considerando que esta proteína tiene un rol principal en la comunicación intercelular y ha sido caracterizada y estudiada en gran cantidad de tejidos, incluidos el sistema nervioso central, hígado, pulmón y piel entre otros. Otorgándole un papel fundamental en la homeostasis y la reparación de estos tejidos tanto en condiciones normales como patológicas<sup>58, 59, 60</sup>.

La literatura que involucra el estudio de Cx en tejidos dentales ha descrito la expresión de estas proteínas durante la odontogénesis, dentinogénesis y en procesos reparativos, apoyando la idea de que las Cx, permitiendo la comunicación celular formando GJ y hemicanales a través de pequeñas moléculas moduladoras, permiten controlar el crecimiento, desarrollo y diferenciación en estos tejidos<sup>61, 62</sup>.

En relación a la existencia de Cx en otras células madre dentales, hasta el momento se ha descrito la presencia de Cx43 en células madre de la pulpa dental, atribuyéndose un rol importante en la diferenciación de estas células a odontoblastos frente al aumento de calcio extracelular<sup>63</sup>.

Este trabajo describe por primera vez la expresión de Cx en células madre de la papila apical.

Desde el descubrimiento de estas células, se han caracterizados varios marcadores de superficie (entre los que se encuentran el STRO-1 y CD146) y se ha estudiado su capacidad de diferenciación<sup>49, 50</sup>. Esta investigación utiliza los marcadores descritos anteriormente para asegurar que la caracterización de las Cx se realiza efectivamente en células madre de la papila apical, pudiendo entregar garantías del tipo celular en estudio, como muestran los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

En el presente estudio detectamos la expresión intracelular de Cx43 en células aisladas. Lo anterior podría suponer la presencia de proteínas en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi, por lo tanto parte de la maquinaria proteica que estaría generando proteínas que actúan en la comunicación celular. Sin embargo, para tener certeza de su ubicación se deben utilizar otros marcadores específicos en conjunto, ya que también podrían encontrar en lisosomas intracelulares (degradación celular), lo cual constituye un trabajo en progreso en el laboratorio.

En relación a Cx26, podemos observar que no se encuentra expresada en la inmunofluorescencia, teniendo relación con lo descrito por *Farahani* en el 2010, al trabajar con Cx32 y Cx26 en células de dientes sanos. A diferencia de lo que ocurre en un diente con proceso de caries donde sí se expresaba Cx26, nuestro cultivo celular no fue expuesto a ningún estímulo bacteriano, por lo que podríamos asociarlo con sus observaciones en diente sano con cortes de células odontoblásticas humanas, donde señala que no hubo expresión

## 8. CONCLUSIÓN

La caracterización, expresión y cuantificación de Cx43 a nivel subcelular, mediante los métodos de inmunofluorescencia y *Western Blot*, nos permiten señalar que esta proteína de unión se encuentra presente en células madres de origen dental humano, generando *GJ* que permiten la comunicación celular. Por lo tanto, podrían estar involucradas en el intercambio celular, y por ende, en la nocicepción dental, permitiendo generar modelos a futuro en cultivos de células madres diferenciadas a odontoblastos humanos, para una mejor comprensión de su posible papel en la mecánica del dolor dental.

## 9. SUGERENCIAS

En relación a los marcadores de superficies utilizados para corroborar la procedencia de las células cultivadas, se sugiere para estudios posteriores el uso anticuerpos para la proteína de superficie CD24, marcador específico para células madre de la papila apical dental humana y que no ha sido detectado en otras células madre de origen mesenquimático, incluyendo a las células madre de la pulpa dental, lo que sería relevante por la cercanía entre ambos tejidos a pesar de sus evidentes diferencias anatómicas e histológicas.

Se sugiere que, para estudios futuros, utilizar marcadores de membrana celular y organelos celulares (aparato de Golgi y retículo endoplasmático) para especificar la distribución física de Cx intracelularmente.

Así también, ampliar el protocolo hacia la diferenciación celular de las células madre de la papila apical a odontoblastos, para caracterizar las Cx en el tejido dentario adulto.

## 10. RESUMEN

**Introducción:** El dolor dental es una de las causas más comunes de atención odontológica y generalmente está asociada a la caries dental y exposición dentinaria. Los mecanismos moleculares específicos de la nocicepción dental no se conocen con claridad, principalmente por la escasa literatura disponible y la dificultad de obtener modelos celulares apropiados para investigación, aunque se reconoce el posible rol del odontoblasto y sus mecanismos de comunicación por GJ en la nocicepción dental. El descubrimiento de células madre en la papila apical (SCAP) y el estudio de sus características como su alta tasa de proliferación, adherencia al plástico y capacidad de diferenciación a odontoblastos, abre una oportunidad de obtener modelos celulares humanos para estudiar la nocicepción dental. El objetivo de esta investigación es cultivar, determinar la expresión y localización de determinadas Cx en las SCAP.

**Material y método:** Se realizó cultivos celulares de muestras de papila apical dental humana, se realizaron técnicas de inmunocitoquímica y *Western Blot* para determinar la expresión y localización subcelular de Cx43.

**Resultados:** Se logró detectar la expresión de Cx43 en SCAP y su localización a nivel perinuclear, citoplasmático y en la membrana plasmática formando GJ.

**Discusión:** Este trabajo describe por primera vez la expresión de Cx en SCAP, encontrando Cx43, hasta el momento sólo se había descrito la expresión de Cx en células madre de la pulpa.

**Conclusión:** Las SCAP expresan Cx43, generando GJ permitiendo la comunicación celular, siendo candidatos para diferenciarlos a odontoblastos para estudiar la nocicepción dental.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salinas S, Flores López A, Delgado Pérez E, García Pantoja J, Merina Díaz R, Pérez Román M. Alternativas de uso y Eficacia Analgésica en el Dolor de Origen Dental en un Servicio de Urgencias de Atención Primaria. 2019.
2. Kassebaum, N.J.; Bernabe, E.; Dahiya, M.; Bhandari, B.; Murray, C.J.; Marcenes, W. Global burden of untreated caries: A systematic review and metaregression. *J. Dent. Res.* 2015, 94, 650–658.
3. Sole-Magdalena, A.; Martínez-Alonso, M.; Coronado, C.A.; Junquera, L.M.; Cobo, J.; Vega, J.A. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. *Ann. Anat.* 2018, 215, 20–29.
4. Hossain M, Bakri M, Yahya F, Ando H, Unno S, Kitagawa J. The Role of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in the Transduction of Dental Pain. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(3):526.
5. Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, Elde R, McCleskey EW (1997). Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. *Nature* 387:505-508. Dhaka A, Murray AN, Mathu
6. W.S. Brown, W.A. Dewey and H.R. Jacobs. Thermal Properties of Teeth, *J DENT RES* 1970 49: 752
7. Chung G, Jung S, Oh S. Cellular and Molecular Mechanisms of Dental Nociception. *Journal of Dental Research.* 2013;92(11):948-955.
8. Brannström M. Sensitivity of dentin. *Oral Sug* 1966;21:517-26.
9. Rapp R, Avery JK, Strachen DS. Possible role of the acetylcholinesterase in neural conduction within the dental pulp. In: Finn SB, editor. *Biology of dental pulp organ.* Birmingham: University of Alabama Press; 1968. p. 309
10. Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto).* 2016; 56:144-53.
11. Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, Berdal A, Smith G, Finney S, Cooper PR. Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone* 2009; 45: 693-703.
12. Sole-Magdalena, A. Martínez-Alonso, M., Coronado, C.A., Junquera, L.M., Cobo, J., Vega, J.A., MOLECULAR BASIS OF DENTAL SENSITIVITY: THE ODONTOBLASTS ARE MULTISENSORY CELLS AND EXPRESS MULTIFUNCTIONAL ION CHANNELS)
13. Delmas P, Coste B. Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell* 2013; 155:278-84.
14. Egbuniwe O, Grover S, Duggal AK, Mavroudis A, Yazdi M, Renton T, Di Silvio L, Grant AD. TRPA1 and TRPV4 activation in human odontoblasts stimulates ATP release. *J Dent Res.* 2014; 93: 911-7.
15. Egbuniwe O, Grover S, Duggal A, Mavroudis A, Yazdi M, Renton T et al. TRPA1 and TRPV4 Activation in Human Odontoblasts Stimulates ATP Release. *Journal of Dental Research.* 2014;93(9):911-917.
16. Johnsen, D.; Johns, S. Quantitation of nerve fibres in the primary and permanent canine and incisor teeth in man. *Arch. Oral Biol.* 1978, 23, 825–829.

17. Nair, P.N. Neural elements in dental pulp and dentin. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 1995, 80, 710–719.
18. Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem.* 2006; 281: 29002-10.
19. Chung G, Oh SB (2013). TRP channels in dental pain. *The Open Pain Journal* 6:31-36.
20. McKemy DD (2005). How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain* 1:16.
21. Tominaga M, Caterina MJ (2004). Thermosensation and pain. *J Neurobiol* 61:3-12.
22. Park CK, Kim MS, Fang Z, Li HY, Jung SJ, Choi SY, et al. (2006). Functional expression of thermo-transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons: implication for tooth pain. *J Biol Chem* 281:17304-17311.
23. Heyeraas KJ, Berggreen E (1999). Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 10:328-336.
24. Iman Z. Oskui, MSc, Mohammed N. Ashtiani, MSc, Ata Hashemi, PhD, PEng, and Hamid Jafarzadeh, DDS, MSc, *Effect of Thermal Stresses on the Mechanism of Tooth Pain*, 2014.
25. Lin M, Luo ZY, Bai BF, Xu F, Lu TJ (2011). Fluid mechanics in dentinal microtubules provides mechanistic insights into the difference between hot and cold dental pain. *PLoS ONE* 6:e18068.
26. Yeon KY, Chung G, Shin MS, Jung SJ, Kim JS, Oh SB (2009). Adult rat odontoblasts lack noxious thermal sensitivity. *J Dent Res* 88:328-332.
27. El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, et al. (2011). Human odontoblasts express functional thermo-sensitive TRP channels: implications for dentin sensitivity. *Pain* 152:2211-2223.
28. Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B, et al. (2010). Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J Orofac Pain* 24:335-349.
29. Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, et al. (2009). The mechano-activated K<sup>+</sup> channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28:1308-1318.
30. Ramin M. Farahani, Ky-Anh Nguyen, Mary Simonian, and Neil Hunter, *Adaptive Calcified Matrix Response of Dental Pulp to Bacterial Invasion Is Associated with Establishment of a Network of Glial Fibrillary Acidic Protein /Glutamine Synthetase Cells*, *The American Journal of Pathology*, Vol. 177, No. 4, October 2010
31. Kolling A, Rask-Andersen H: Membrane junctions in the sub odontoblastic region: a freeze-fracture study of the human dental pulp. *Acta Odontol Scand* 1983, 41:99–109
32. Shibukawa Y. et al. Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction, 2014, *Eur J Physiol*,;467(4):843-6
33. Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol.* 2009; 217: 144-60.

34. Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cell from mouse fibroblasts by four transcriptions factors. *Cell Prolif.* 2008; 41: 51-6
35. Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-156.
36. Martin G. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1981;78(12):7634-7638.
37. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145–7.
38. Doss M, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med.* 2004; 8: 465-73
39. Hug K. Sources of human embryos for stem cell research: ethical problems and their possible solution. *Medicine (Kaunas).* 2005;41(12):1002-10.
40. Johnson, T. A., & Singla, D. K. (2017). Therapeutic Application of Adult Stem Cells in the Heart. *Methods in Molecular Biology*, 249–264.
41. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad Res* 1961;14:213–222.
42. Muschler GF, Midura RJ, Nakamoto C. Practical modeling concepts for connective tissue stem cell and progenitor compartment kinetics. *J Biomed Biotechnol* 2003;3:170–193.
43. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4:267–274.
44. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, 25(11), 2739–2749.
45. Orbay, H., Tobita, M., & Mizuno, H. (2012). Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications. *Stem Cells International*, 2012, 1–9.
46. Javazon, E. H., Beggs, K. J., & Flake, A. W. (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Experimental Hematology*, 32(5), 414–425.
47. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000;97(25):13625-13630.
48. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher L, Robey P et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2003;100(10):5807-5812.
49. Aydin S, Şahin F. Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2019;:123-132.
50. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B, Zhang C et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE.* 2006;1(1):e79.
51. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan R, Wang S, Shi S et al. Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics.* 2008;34(2):166-171.

52. Kang J, Fan W, Deng Q, He H, Huang F. Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source for Stem Cell-Based Therapy. *BioMed Research International*. 2019;2019:1-8.
53. Schadzek P, Sthal Y, Preller M, Ngezahayo A. Analysis of the dominant mutation N188T of human connexin46 (hCx46) using concatenation and molecular dynamics simulation 2019
54. Mulkearns-Hubert E, Torre-Healy L, Silver D, Eurich J, Bayik D. Development of a Cx46 Targeting Strategy for Cancer Stem Cells. 2019
55. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Conexinas, conexiones y comunicación intercelular. *Annu Rev Biochem*. 1996; 65:1, 475-502
56. Ghasemi F, Gupta M, Myers V, Gordon J, Cheung J, Feldman A, Khalili K. Role of Bcl2-associated Athanogene 3 in Turnover of Gap Junction Protein, Connexin 43, in Neonatal Cardiomyocytes. 2019; 9(7658)
57. Tabernero A. Conexinas. 2013 DOI: [http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_ANC.2013.07.1](http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2013.07.1)
58. Barrio L, Gonzalez-Nieto D. Conectados por conexinas: "Comunicación interceclular mediada por canales de conexinas y enfermedades asociadas a mutaciones en los genes de conexina". The Spanishion channel iniciative. 2012.
59. Wang M, Qin C, Luo X, Wang J, Wang X, Xie M et al. Astrocytic connexin 43 potentiates myelin injury in ischemic white matter disease. *Theranostics*. 2019;9(15):4474-4493.
60. Zhang X, Cui X. Connexin 43: Key roles in the skin. *Biomedical Reports*. 2017;6(6):605-611.
61. Zhou J, Jiang J. Gap junction and hemichannel-independent actions of connexins on cell and tissue functions - An update. *FEBS Letters*. 2014;588(8):1186-1192.
62. Fried K, Mitsiadis T, Guerrier A, Haegerstrand A, Meister B. Combinatorial expression patterns of the connexins 26, 32, and 43 during development, homeostasis, and regeneration of rat teeth. *Int J De Bioi*. 1996;40:985-995.
63. About I, Proust J, Raffo S, Mitsiadis T, Franquin J. In Vivo and In Vitro Expression of Connexin 43 in Human Teeth. *Connective Tissue Research*. 2002;43(2-3):232-237.