



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE PATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**“CARACTERIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS
DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS A PARTIR DE
CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL HUMANA”**

Mariam Lina Asaed Rahma Torres

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

TUTOR PRINCIPAL
PhD. Mauricio Budini

TUTOR ASOCIADO
PhD. Alfredo Criollo

TUTOR ASESOR
PhD. Fernando Ezquer
Karla Gutiérrez

Adscrito a Proyecto FIOUCh 2022

Santiago, Chile

2024



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
LABORATORIO DE PATOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**“CARACTERIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS
DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS A PARTIR DE
CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL HUMANA”**

Mariam Lina Asaed Rahma Torres

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

TUTOR PRINCIPAL
PhD. Mauricio Budini

TUTOR ASOCIADO
PhD. Alfredo Criollo

TUTOR ASESOR
PhD. Fernando Ezquer
Karla Gutiérrez

Adscrito a Proyecto FIOUCh 2022

Santiago, Chile

2024

*Dedicado al pueblo palestino y a mi familia en Gaza.
De Palestina saqué las fuerzas y la convicción para avanzar,
nadie es libre hasta que todos lo seamos
y mientras exista ocupación y genocidio, habrá resistencia,
Palestina fue, es y siempre será.*

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Mauricio Budini, por guiarme en este desafiante y largo, pero apasionante proceso que comencé en segundo año como ayudante en el laboratorio. Gracias por confiar en mí y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo.

Al equipo del laboratorio del profesor Mauricio, especialmente a Karla, mi guía y apoyo desde el inicio hasta el fin de esta tesis, por todo lo que me enseñaste.

A mamá y papá, Alina y Asaed, que con amor y mucho esfuerzo me entregaron las herramientas para alcanzar mis sueños. Gracias por apoyarme incondicionalmente en los mejores y peores momentos, por creer en mí, por ser inspiración, mis logros son por ustedes y gracias a ustedes.

A mi hermana, Nour, por acompañarme siempre desde la pieza de al lado, mis logros también son por ti, para que te sientas orgullosa de ser mi hermana.

A mi abuela, Lina, por estar presente en cada paso que doy, a pesar de la distancia.

A mi pareja, Gonzalo, por todas las veces que me escuchaste y abrazaste, por ser contención, por tu motivación y apoyo constante. Gracias por tu amor sincero.

A las amigas y amigos que me dio este camino, en especial a Constanza B., Isidora, Leidy, Catalina, Constanza Y., Daniela, Fernanda, Rodrigo, Andrés, Leonardo y Rafael, simplemente por estar, por las palabras de aliento cuando las cosas no salían como esperaba, por hacer que los días malos se convirtieran en buenos, por las risas y los lindos recuerdos, no tengo dudas de que crearemos más.

A Constanza B., por haber empezado y terminado este camino juntas. Gracias por estar en cada etapa, por ser parte de mis logros y por hacerme parte de los tuyos, por todos los momentos vividos dentro y fuera de la universidad, por tu amistad.

A mis amigas del colegio, por tantos años de amistad, por ser familia.

A mis tutores, compañeros de clínica y todo quien aportó algo en este camino.

A todo quien me quiere, a todo quien me cuida, a todo quien me abraza.

ÍNDICE GENERAL

DEDICADO A	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
1. RESUMEN.....	viii
2. MARCO TEÓRICO	1
2.1. DENTINOGENESIS Y ODONTOBLASTOS	1
2.2. ETAPAS DE LA DENTINOGENESIS Y DIFERENCIACIÓN DE LOS ODONTOBLASTOS.....	2
2.3. MOLÉCULAS DE MATRIZ IMPLICADAS EN LA DENTINOGENESIS: PROTEÍNAS NO COLAGENASAS.....	5
2.3.1. SIALOFOSFOPROTEÍNA DENTINARIA	6
2.3.2. PROTEÍNA 1 DE LA MATRIZ DE LA DENTINA.....	6
2.4. ACTIVIDAD DEFENSIVA Y CAPACIDAD REPARATIVA DE LOS ODONTOBLASTOS.....	7
2.5. AUTOFAGIA: VÍA IMPLICADA EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE	9
2.6. AUTOFAGIA: DEFINICIÓN Y TIPOS	10
2.6.1. MACROAUTOFAGIA	11
2.6.2. MICROAUTOFAGIA.....	11
2.6.3. AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS	11
2.7. ROL DE LA AUTOFAGIA EN LA DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS.....	14
2.7.1. MACROAUTOFAGIA Y DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS	

2.7.2.	CMA Y DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS.....	14
2.8.	NOVEDAD CIENTÍFICA DE LA PROPUESTA.....	16
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	17
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4.1.	Caracterización de la diferenciación de odontoblastos a partir hDPSCs.	18
4.1.1.	Caracterización cualitativa de la diferenciación de hDPSCs mediante tinción con alizarin red.....	21
4.1.2.	Ensayo de western blot.....	22
4.2.	Reducción de la expresión de proteína LAMP2A en hDPSCs.	25
4.2.1.	Caracterización cualitativa de la diferenciación de la línea celular con baja expresión de la proteína LAMP2A mediante tinción con alizarin red.....	27
4.3.	Sobreexpresión de la proteína LAMP2A en hDPSCs.	28
5.	RESULTADOS.....	31
5.1.	Caracterización de la diferenciación de odontoblastos a partir de hDPSCs.	31
5.2.	Evaluación de los niveles de expresión de la proteína LAMP2A durante el proceso de diferenciación de hDPSCs a odontoblastos.	37
5.3.	Impacto de la reducción de la expresión de la proteína LAMP2A en el proceso de diferenciación de hDPSCs.	39
5.3.1.	Caracterización cualitativa de la diferenciación de la línea celular con baja expresión de la proteína LAMP2A.	42
5.4.	Impacto de la sobreexpresión de la proteína LAMP2A en el proceso de diferenciación de hDPSCs.....	43
6.	DISCUSIÓN.....	47
6.1.	RELEVANCIA CLÍNICA.....	54
6.2.	PROYECCIONES.....	55

7. CONCLUSIONES	56
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
9. ANEXOS.....	64
9.1. Anexo I: Aislamiento y caracterización de células madre de hDPSC.	64
9.2. Anexo II: Sobreexpresión de la proteína LAMP2A en hDPSCs.....	66
9.3. Anexo III: Supuestas proteínas sustrato de CMA que se espera que estén reguladas por la actividad de CMA durante la diferenciación de odontoblastos.	68
9.4. Anexo IV: Abreviaturas	69
9.5. Anexo V: Reactivos y soluciones	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios de diferenciación de los odontoblastos	2
Figura 2. Representación de la organización estructural de los odontoblastos	3
Figura 3. Estructura de la dentina reparativa en un diente cariado	8
Figura 4. Tejidos dentales humanos desde los que se pueden aislar MSC	9
Figura 5. Vías autofágicas	13
Figura 6. Aislamiento de hDPSCs.....	18
Figura 7. Siembra y cultivo de hDPSCs	19
Figura 8. Día 1 de diferenciación	20
Figura 9. Siembra de línea celular con niveles reducidos de LAMP2A	28
Figura 10. Evaluación de la deposición de calcio mediante tinción con alizarin red en hDPSCs.....	33
Figura 11. Niveles de expresión de DMP1	34
Figura 12. Niveles de expresión de DSPP	35
Figura 13. Niveles de expresión de DMP1 en tiempos tempranos	36
Figura 14. Niveles de expresión de DSPP en tiempos tempranos	37
Figura 15. Niveles de expresión de LAMP2A.....	38
Figura 16. Niveles de expresión de LAMP2A en tiempos tempranos	39
Figura 17. Epifluorescencia de línea celular hDPSCs y hDPSCs-shlamp2a	40
Figura 18. Caracterización de la eficacia de shRNA contra LAMP2A en hDPSCs	41
Figura 19. Evaluación de la deposición de calcio mediante tinción con alizarin red en línea celular con niveles reducidos de la proteína LAMP2A	43
Figura 20. Microscopía fluorescente de células hDPSCs.....	45
Figura 21. Imágenes representativas de placas de cultivo observadas al microscopio óptico	46
Figura 22. Aislamiento y caracterización preliminar de hDPSCs.....	65
Figura 23. Epifluorescencia de línea celular hDPSCs tras la incorporación lentiviral del plásmido pLVX-LAMP2A-IRES-ZsGreen	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos utilizados	25
Tabla 2. Componentes transfección con Lipofectamina	29
Tabla 3. Medios de cultivo de hDPSCs	31
Tabla 4. Supuestas proteínas sustrato de CMA que se espera que estén reguladas por la actividad de CMA	68
Tabla 5. Reactivos y soluciones	72

1. RESUMEN

Introducción: La dentinogénesis es el mecanismo donde la papila dental elabora una matriz orgánica para formar dentina a través de células especializadas llamadas odontoblastos. La autofagia mediada por chaperonas (CMA) es un proceso celular catabólico en el que proteínas citoplasmáticas son reconocidas a través de la secuencia aminoacídica KFERQ mediante la proteína chaperona HSC70, que permite la interacción con la proteína LAMP2A en la membrana lisosomal para su translocación y degradación. Se sabe que la macroautofagia está involucrada en la diferenciación de odontoblastos, pero no hay evidencia de otras vías como la CMA.

Objetivos: Determinar si la actividad de CMA regula el proceso de diferenciación de células mesenquimáticas aisladas desde pulpa dental humana (hDPSCs) hacia odontoblastos.

Metodología: Se obtuvieron hDPSCs a partir de terceros molares de adultos sanos. Para la diferenciación de hDPSCs a odontoblastos se caracterizaron tres diferentes medios de cultivo: i) medio de diferenciación (α -MEM suplementado al 5% con suero fetal bovino (FBS), ácido ascórbico (50 μ g/mL) y β -glicerofosfato (10 mM)), ii) medio de diferenciación suplementado con dexametasona (0,1 μ M), iii) medio de diferenciación suplementado con dexametasona (0,1 μ M) y TGF- β (10 ng/mL). Como control se utilizó medio α -MEM suplementado con 10% FBS. La mineralización, en diferentes etapas de diferenciación, se evaluó con tinción alizarin red. Paralelamente, se evaluaron los niveles de expresión de DMP1 y DSPP (marcadores de diferenciación odontoblástica) mediante western blot. Por otro lado, para evaluar la participación de CMA durante la diferenciación, se evaluaron los niveles de expresión de la proteína LAMP2A durante el proceso de diferenciación de hDPSCs, tanto en células control como en líneas celulares con actividad aumentada y disminuida de LAMP2A y por consecuencia, CMA.

Resultados: Los niveles de actividad de CMA aumentan al inicio de la diferenciación para luego disminuir a medida que continúa el proceso. Además, la inhibición de CMA retarda dicho proceso, mientras que su sobre expresión lo acelera.

Conclusión: Este trabajo caracteriza por primera vez, el papel de la actividad de CMA en la diferenciación de odontoblastos a partir de hDPSCs. Al estar relacionada con la diferenciación, CMA se proyecta como un nuevo hito en el estudio del desarrollo de la dentinogénesis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. DENTINOGENESIS Y ODONTOBLASTOS

Dentro de los tejidos que conforman el diente, la dentina es el tejido mineralizado que abarca el mayor volumen de este. Entre otros procesos de diferenciación celular, el diente se forma mediante la dentinogénesis, que es el conjunto de mecanismos mediante los cuales la papila dental elabora una matriz orgánica que más tarde se calcifica para formar la dentina, por medio de sus células especializadas, los odontoblastos (Gómez de Ferraris y cols., 2002).

Los odontoblastos son células altamente diferenciadas (especializadas) que se originan a partir de la diferenciación de las células madre de la cresta neural y que se organizan en la periferia de la pulpa (Bleicher y cols., 2015). Son responsables de la producción de la matriz dentinaria de los dientes, pues sintetizan los componentes de la predentina y son responsables de su mineralización (Bleicher y cols., 2015). Tienen funciones preponderantes como: i) la producción de dentina primaria durante el desarrollo del diente, ii) el mantenimiento de la dentina durante la vida útil del diente, produciendo dentina secundaria, iii) proteger la pulpa dental, iv) producir nueva dentina o dentina terciaria en respuesta a estímulos patológicos en el diente, como por ejemplo, la lesión de caries dental, v) desencadenar una alerta inmunológica frente a una noxa y vi) detectar la temperatura y el estímulo mecánico (Simancas-Escorcía, 2019; Bleicher y cols., 2015). Por lo tanto, los odontoblastos son esenciales para la formación de dientes y el mantenimiento de la salud dental.

2.2. ETAPAS DE LA DENTINOGENESIS Y DIFERENCIACION DE LOS ODONTOBLASTOS

La dentinogénesis se divide en 3 etapas: i) elaboración de la matriz orgánica, ii) maduración de la matriz y iii) precipitación de sales minerales (calcificación o mineralización). Durante el proceso de mineralización (Figura 1) los odontoblastos se diferencian a partir de células ectomesenquimales, pasando por diferentes estados: preodontoblastos, odontoblastos jóvenes, odontoblastos secretores y odontoblastos secretores maduros. En este contexto, el odontoblasto secretor permite la formación de predentina, mientras que el odontoblasto secretor maduro contribuye a la formación de predentina y dentina (Gómez de Ferraris y cols., 2002).

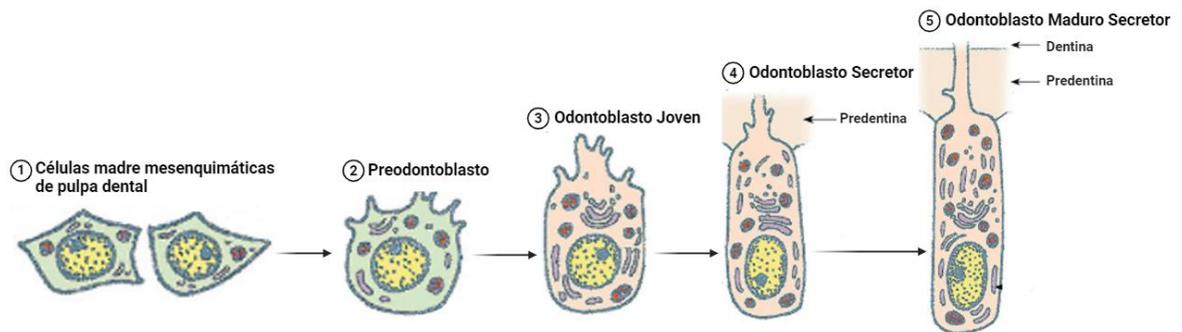


Figura 1. Estadios de diferenciación de los odontoblastos. La diferenciación de odontoblastos se realiza a partir de células ectomesenquimáticas indiferenciadas que evolucionan transformándose primero en preodontoblastos, luego en odontoblastos jóvenes y, por último, en odontoblastos secretores y maduros (Gómez de Ferraris y cols., 2002). Figura elaborada con Biorender.

Para diferenciarse en odontoblastos funcionales, los preodontoblastos comienzan a polarizarse (Bleicher y cols., 2015). La polarización de los odontoblastos es un paso crítico tanto en la formación de dentina primaria como en la regeneración del tejido dentinario (Chang y cols., 2019). Cuando el odontoblasto alcanza la etapa secretora, se encuentra en una disposición de epitelio cilíndrico simple y en su extremo proximal o libre (futuro polo secretor) se diferencia una prolongación citoplasmática única llamada prolongación principal, proceso odontoblástico o prolongación odontoblástica, que quedará localizada en plena matriz dentinaria y que tiene actividad secretora (Gómez de Ferraris y cols., 2002).

La polarización de los odontoblastos marca el cambio morfológico desde una célula mesenquimática simétrica hasta un odontoblasto asimétrico, con un cuerpo celular columnar alineado en una sola capa y un proceso citoplasmático que se extiende desde el cuerpo celular hasta la predentina (Figura 2) (Chang y cols., 2019).

El factor de crecimiento transformante-beta 1, 2 y 3 (de aquí en adelante TGF- β por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor- β*) y la proteína morfogenética ósea (BMP) 2, 4 y 6 desempeñan un papel en la diferenciación de los odontoblastos (Begue-Kirn y cols., 1994; Bleicher y cols., 2015). Algunos resultados obtenidos de experimentos *in vivo* sugieren que un miembro de la familia TGF- β derivado del epitelio es atrapado por componentes asociados a la membrana basal y promueve la polarización de preodontoblastos (Bleicher y cols., 2015).

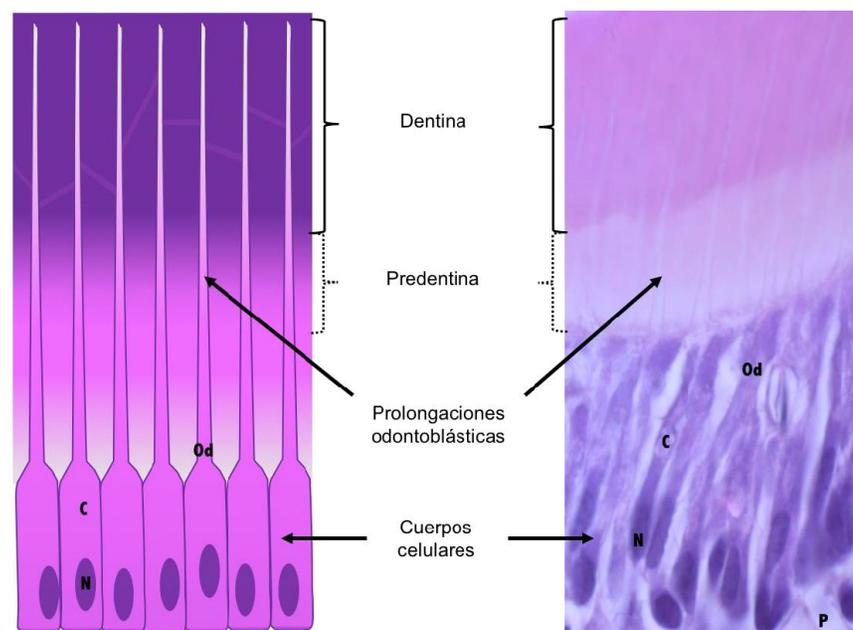


Figura 2. Representación esquemática (izquierda) y fotomicrografía (derecha) de la organización estructural de los odontoblastos. Figura extraída de Simancas-Escorcía, 2019. Los Odontoblastos (Od) exhiben una forma columnar con un núcleo (N) y citoplasma (C) localizado en la periferia de la pulpa dental (P), y prolongaciones odontoblásticas que se extienden hacia la matriz mineralizada (dentina), atravesando una capa de matriz recién formada denominada predentina. En la imagen de la derecha se observa la coloración hematoxilina-eosina de un primer molar mandibular de un ratón de siete días de desarrollo posnatal (Simancas-Escorcía, 2019).

En primera instancia, los odontoblastos secretan predentina, la que ocupa el espacio existente entre el órgano del esmalte y los odontoblastos. La predentina contiene colágeno tipo I, V y VI, proteoglicanos, proteínas y algunas sustancias no colágenas (Gómez de Ferraris y cols., 2002). Se dispone en gruesas fibras colágenas paralelas entre sí y perpendiculares a la lámina basal, incluidas en una sustancia fundamental amorfa, que al llegar a un espesor de 6 μm comienza un proceso de mineralización que culminará en lo que se conoce como la dentina del manto (Gómez de Ferraris y cols., 2002). En las etapas previas a la mineralización, los odontoblastos secretan metaloproteinasas que se encargan de organizar la matriz orgánica de la dentina (Gómez de Ferraris y cols., 2002).

Durante el proceso de mineralización, el calcio (Ca^{2+}) del medio extracelular se transfiere desde la red vascular en el área subodontoblástica hasta el extremo proximal de los odontoblastos, para incorporarse a la fase mineral en la interfaz entre la predentina no mineralizada y la dentina mineralizada, en el frente de mineralización. Las uniones intercelulares entre los odontoblastos no permiten la difusión de iones de Ca^{2+} hacia la capa de predentina, por lo que los iones de Ca^{2+} se transportan activamente por vías intracelulares en el citoplasma funcional de los odontoblastos (Nanci, 2007; Lacruz y cols., 2012). El odontoblasto secretor capta Ca^{2+} desde el medio extracelular y lo almacena, elevando también la concentración local de iones fosfatos (PO_3^{4-}) y formando vesículas matriciales en las cuales precipitan ambos iones, lo que permite la formación de cristales de hidroxiapatita, una forma de fosfato de Ca^{2+} altamente mineralizado que es el principal componente mineral de la dentina (Gómez de Ferraris y cols., 2002).

Cuando la prolongación odontoblástica queda incluida en el túbulo dentinario de la matriz dentinaria calcificada, el odontoblasto pasa a llamarse odontoblasto maduro (Gómez de Ferraris y cols., 2002). Posterior a la mineralización de la dentina del manto y mediante el proceso odontoblástico, el odontoblasto continúa secretando colágenos, proteoglicanos y fosfoproteína dentinaria (DPP), para la formación de la dentina circumpulpar (Gómez de Ferraris y cols., 2002). La diferencia entre la dentina del manto y la circumpulpar, es que la matriz de la dentina

circumpulpar posee fibras colágenas más finas que se ubican irregularmente formando una red, y su sustancia amorfa se secreta exclusivamente por los odontoblastos. El odontoblasto maduro, que induce la mineralización de la dentina circumpulpar, tendrá una forma cilíndrica de 40 μm de alto y un diámetro medio de 4 a 8 μm , con el núcleo polarizado hacia la región distal de la célula (Gómez de Ferraris y cols., 2002).

Finalmente, dentro de la caracterización biológica de los odontoblastos, se pueden encontrar aquellos envejecidos, que son odontoblastos secretores cuyas capacidades sintéticas y secretoras han disminuido (Bleicher y cols., 2015). Sin embargo, la actividad secretora de estas células puede reactivarse frente a estimulaciones patológicas como la lesión de caries dental (Pashley y cols., 1996; Bleicher y cols., 2015).

2.3. MOLÉCULAS DE MATRIZ IMPLICADAS EN LA DENTINOGENESIS: PROTEÍNAS NO COLAGENASAS

Las proteínas no colagenasas de la matriz extracelular desempeñan funciones importantes en el proceso de mineralización de los tejidos duros, como la inducción y regulación de la formación de minerales. Estas proteínas se secretan en el frente de mineralización y están implicadas en la nucleación y crecimiento de la fase mineral. Entre ellas se incluye la osteopontina (OPN), la sialoproteína ósea (BSP), la proteína 1 de la matriz dentinaria (DMP1 por sus siglas en inglés *Dentin Matrix Protein 1*), la sialofosfoproteína dentinaria (DSPP por sus siglas en inglés *Dentin Sialophosphoprotein*) y la fosfoglicoproteína extracelular de la matriz (MEPE) (Bleicher y cols., 2015).

La matriz orgánica de la dentina contiene 3 proteínas que se localizan únicamente en la dentina, la fosfoproteína dentaria (DPP), que tras el colágeno es el componente más abundante de la dentina, la DMP1 y la sialoproteína dentinaria (DSP). Las dos primeras, segregadas por los odontoblastos, participarían en el proceso de mineralización y la última, segregada por odontoblastos jóvenes y preameloblastos, participarían en el proceso de interrelación epitelio-mesénquima,

que acompaña el desarrollo de las piezas dentarias (Gómez de Ferraris y cols., 2002).

2.3.1. SIALOFOSFOPROTEÍNA DENTINARIA

La DSPP se escinde inmediatamente después de su secreción en DPP y DSP. La DPP está altamente fosforilada y se une a los iones de Ca^{2+} con alta afinidad, a PO_3^{4-} y al colágeno para inducir la mineralización durante la formación de dentina, promoviendo la nucleación y el crecimiento de los cristales de hidroxiapatita (Prasad y cols., 2010). La DSP es una molécula menos fosforilada, rica en ácido aspártico, ácido glutámico, glicina y serina, relacionada con las sialoproteínas y participa en la organización de la matriz extracelular de la dentina (Narayanan & Ramachandran, 2006).

2.3.2. PROTEÍNA 1 DE LA MATRIZ DE LA DENTINA

La DMP1 es una proteína ácida altamente fosforilada que está potencialmente glicosilada (Babaki & Matin, 2020). Estudios funcionales han demostrado que DMP1 es esencial en la maduración de odontoblastos, desempeña un papel importante en la formación de tejido mineralizado mediante la iniciación de la nucleación y la modulación de la morfología de la fase mineral (Qin y col., 2007). Una escisión proteolítica postraducciona l conduce a dos fragmentos: un N-terminal que se encuentra en la pre dentina no mineralizada, y un C-terminal que se encuentra en el frente de mineralización y en la dentina mineralizada y que tiene un efecto directo sobre la formación de minerales y el crecimiento de cristales. DMP1 contiene dominios ricos en serina, glutamato y aspartato, y es altamente ácida, lo que le da a la molécula un fuerte potencial de unión al Ca^{2+} y proporciona un microambiente apropiado para la precipitación mineral (Macdougall, 2003; Qin y cols., 2007).

Estudios han revelado que DMP1, DSPP y la osteocalcina (OCN) se expresan significativamente en odontoblastos maduros durante la etapa de

mineralización (D'souza y cols., 1997; Papagerakis y cols., 2002; Feng y cols., 2003; Babaki & Matin, 2020).

2.4. ACTIVIDAD DEFENSIVA Y CAPACIDAD REPARATIVA DE LOS ODONTOBLASTOS

A diferencia de los ameloblastos y cementoblastos, los odontoblastos permanecen vivos durante toda la vida del diente (Bleicher y cols., 2015; Simancas-Escorcia, 2019) y pueden reactivarse frente a agentes irritantes como la caries dental para sintetizar una nueva capa de dentina (Pashley y cols., 1996; Bleicher y cols., 2015). Este proceso, conocido como "dentinogénesis terciaria", protege la pulpa de la progresión de la lesión, donde, en primera instancia, odontoblastos primarios que originalmente se diferenciaron durante el desarrollo del germen del diente producen dentina reaccionaria en la interfaz dentina-pulpa adyacente a la lesión. Sin embargo, la lesión cariosa puede avanzar comprometiendo la dentina profunda y afectando a los odontoblastos hasta su muerte, principalmente por apoptosis (Mitsiadis y cols., 2008; Bleicher y cols., 2015). La depleción de odontoblastos puede comprometer la salud pulpar y consecuentemente la integridad dentaria, conduciendo finalmente a su pérdida (Bleicher y cols., 2015). Tras la apoptosis de los odontoblastos primarios se puede activar un "mecanismo de protección" mediado por fibrodentinoblastos, células similares a los odontoblastos que derivan de la diferenciación de un conjunto de células pulpares mesenquimales (Smith y cols., 1995; Simon y cols., 2011; Bleicher y cols., 2015) y producen la llamada dentina reparadora, una subclase de dentina terciaria que protege aún más la pulpa contra la lesión (Bleicher y cols., 2015). Muchas veces, este mecanismo protector no es suficiente para evitar el acceso de la caries profunda a la pulpa, afectándola y pudiendo provocar la pérdida del diente (Figura 3) (Bleicher y cols., 2015).

Como se mencionó en el punto 2.2., TGF- β es un factor de crecimiento que favorece la diferenciación de odontoblastos y su comportamiento secretor (Begue-Kirn y cols., 1994; Bleicher y cols., 2015). Durante el proceso de caries dental, la

dentínogenesis reaccionaria resulta de la solubilización de factores de crecimiento, particularmente TGF- β de la matriz dentinaria, el cual es responsable de iniciar el efecto estimulador sobre los odontoblastos. (Smith y cols., 1995; Bleicher y cols., 2015).

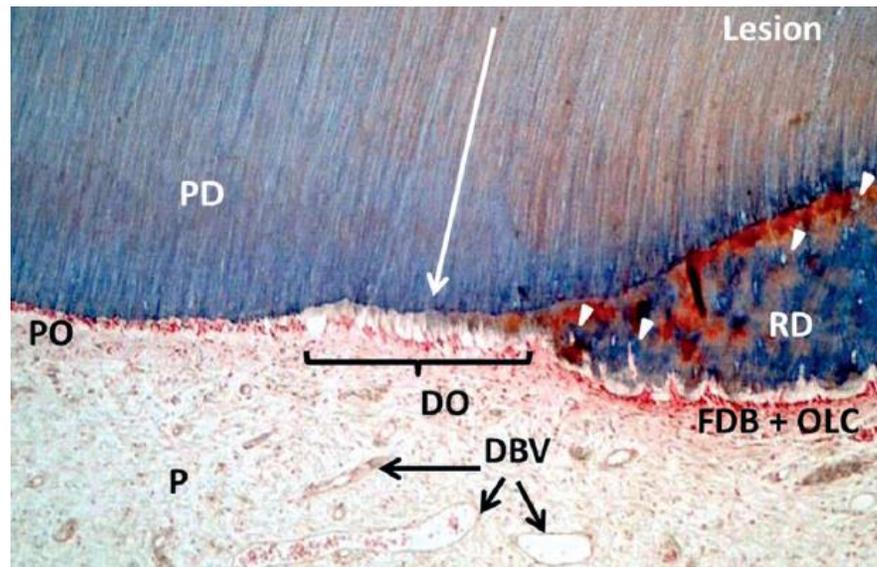


Figura 3. Estructura de la dentina reparativa en un diente cariado. Figura extraída de Bleicher y cols., 2015. Tinción tricrómica de Masson. Cuando el tejido pulpar (P) se lesiona por una lesión de caries dentinaria, los odontoblastos primarios (PO) en contacto directo con la lesión a través de los túbulos dentinarios (flecha blanca) pueden morir (DO) y ser reemplazados por fibroodontoblastos (FDB), células similares a odontoblastos (OLC), o ambas, que depositan dentina reparativa (RD). En todos los casos, la estructura de la RD difiere de la de la dentina primaria (PD), pues la RD está menos organizada y puede contener células atrapadas (puntas de flecha blancas). Los vasos sanguíneos dilatados (DBV) están presentes debajo de los odontoblastos moribundos y reflejan el estado inflamatorio de la pulpa y la activación del sistema inmunológico local (Bleicher y cols., 2015).

El número de células madre disminuye con la edad, lo que trae consigo una reducción en la capacidad de autodefensa de la pulpa (Gómez de Ferraris y cols., 2002). Por esta razón, se han propuesto estrategias destinadas a recuperar un diente cariado y/o dañado mediante el tratamiento de la lesión con células madre capaces de diferenciarse en odontoblastos (Marei & El Backly, 2018; Koh y cols., 2021). Para ello, se utilizan células madre mesenquimales (de aquí en adelante MSC por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*) que se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y diferenciación multilineaje, que pueden diferenciarse

a odontoblastos (Salemi y cols., 2012) y actualmente se utilizan para estrategias de reparación dentinopulpar (Marei & El Backly, 2018; Koh y cols., 2021). Las MSC se pueden aislar de tejidos dentales humanos como pulpa dental (hDPSC), pulpa de dientes deciduos exfoliados (SHED), ligamento periodontal (PDLSC), papila apical (SCAP), hueso alveolar (AB-MSc), encía (GMSC) y folículo dental (DFSC) (Huang y cols., 2009; Chen y cols., 2012; Brizuela y cols., 2013; Babaki & Matin, 2020) (Figura 4). En cuanto a las células madre de la pulpa dental, estas poseen células mesenquimáticas con capacidad de diferenciarse a fibroblastos, odontoblastos, cementoblastos, osteoblastos, según el estímulo que actúe sobre ellas (Gómez de Ferraris y cols., 2002; Murray y cols., 2008; Yen & Yelick, 2011).

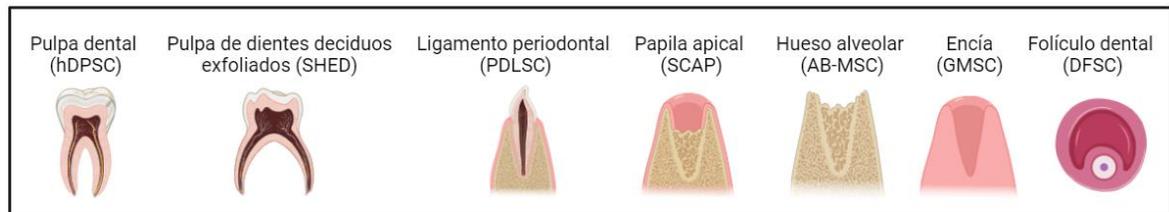


Figura 4. Tejidos dentales humanos desde los que se pueden aislar MSC. Las MSC se pueden aislar de tejidos dentales humanos como pulpa dental, pulpa de dientes deciduos exfoliados, ligamento periodontal, papila apical, hueso alveolar, encía y folículo dental (Huang y cols., 2009; Chen y cols., 2012; Brizuela y cols., 2013; Babaki & Matin, 2020). Figura elaborada con Biorender.

2.5. AUTOFAGIA: VÍA IMPLICADA EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE

Las células madre son una herramienta útil para la obtención de células con funciones especializadas como los odontoblastos. Sin embargo, el proceso de diferenciación es complejo y está regulado por múltiples vías. Por lo tanto, cobra relevancia el estudio de nuevos mecanismos moleculares que participen en la diferenciación de odontoblastos. Una de las vías que participa en la diferenciación de células madre, es la autofagia, un proceso intracelular altamente conservado en eucariotas (Dice, 2007; Patel & Cuervo, 2015) en el que diversos componentes celulares como proteínas, orgánulos o componentes citoplasmáticos son degradados por el lisosoma (Ravikumar y cols., 2010; Bhat y cols., 2017). Se ha

observado que la autofagia regula tanto la autorrenovación, como la diferenciación de células madre (Chen y cols., 2018; Vessoni y cols., 2012; Phadwal y cols., 2013). En cuanto a la diferenciación y vida de los odontoblastos, se ha descrito que la actividad de la autofagia tendría una relación con la diferenciación, el envejecimiento, la actividad secretora y la formación de dentina. A pesar de estos estudios, aún queda mucho por comprender respecto a la función que tiene la autofagia en la diferenciación de odontoblastos. En gran parte, esto se debe a que existen distintos tipos de autofagia y no todos ellos han sido estudiados en este proceso de diferenciación.

2.6. AUTOFAGIA: DEFINICIÓN Y TIPOS

La autofagia es un proceso mediante el cual la célula degrada material intracelular a través del lisosoma (Ravikumar y cols., 2010; Bhat y cols., 2017). Se manifiesta en situaciones de estrés celular como la ausencia de nutrientes, factores de crecimiento, oxígeno o cambios en las condiciones ambientales (Mizushima y cols., 2004). Su actividad también es importante para la regulación de procesos fisiológicos, como la remodelación celular durante el desarrollo del organismo o la senescencia celular (Ravikumar y cols., 2010; Bhat y cols., 2017). También, se ha considerado como un evento celular fundamental para la protección de las células madre contra los daños causados por factores extrínsecos (Salemi y cols., 2012; Bhat y cols., 2017).

Se han descrito tres tipos diferentes de vías autofágicas, las cuales se diferencian en la manera en que el material intracelular (sustrato) que será degradado, llega al lisosoma: i) Macroautofagia (principalmente conocida como autofagia), ii) Autofagia mediada por chaperonas (desde ahora CMA por sus siglas en inglés *Chaperone Mediated Autophagy*) y iii) Microautofagia endosomal (eMi, del inglés *Endosomal Microautophagy*) (Kaushik & Cuervo, 2018) (Figura 5).

2.6.1. MACROAUTOFAGIA

La macroautofagia (Figura 5A) es la forma de autofagia más estudiada. Se caracteriza por la formación de una doble capa lipídica estructural, llamada “omegasoma”, que nace a partir de dominios membranosos intracelulares y se expande hasta formar un organelo llamado autofagosoma, que secuestra la carga a degradar. Luego, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma y esta fusión da origen a otra estructura denominada autofagolisosoma, que es el organelo que promueve la degradación de la carga. La degradación de la carga, especialmente proteínas, genera nuevos metabolitos que regresan al medio citosólico y pueden ser reutilizados por la célula (Tooze & Dikic, 2016; Kaushik & Cuervo, 2018).

2.6.2. MICROAUTOFAGIA

La microautofagia se caracteriza por el comportamiento dinámico que presenta la membrana lisosomal, la cual se invagina, envolviendo y transportando directamente los componentes citosólicos al interior del lumen del lisosoma. Se han descrito 3 tipos de microautofagia. Tipo 1, microautofagia con protrusión lisosomal; Tipo 2, microautofagia con invaginación lisosomal y Tipo 3, microautofagia con invaginación endosomal (Oku & Sakai, 2018).

En la microautofagia, la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones para captar los elementos del citoplasma, que serán introducidos en su interior para su posterior degradación. En mamíferos, la microautofagia, también está dada por la degradación de dichas proteínas lisosomales, a través de la fusión de endosomas tardíos (LEs) a los lisosomas, este proceso se denomina eMi (Figura 5B) (Tooze & Dikic, 2016; Kaushik & Cuervo, 2018).

2.6.3. AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS

La CMA (Figura 5C) tiene como característica distintiva, que requiere la participación de dos proteínas principales, la proteína chaperona HSC70 (proteína de choque térmico relacionada a proteínas de 70 kDa) y la proteína de membrana

tipo 2A asociada a lisosomas (LAMP2A), junto con otros cofactores (Dice, 2007; Patel & Cuervo, 2015; Kaushik & Cuervo, 2018). A diferencia de la macroautofagia, la CMA solo degrada proteínas, no degrada orgánulos ni complejos proteicos mal plegados (agregados o inclusiones) y no requiere de la formación de vesículas intermedias para entregar la carga al lisosoma (Cuervo y cols., 1998). CMA solo degrada proteínas que contienen uno o más motivos relacionados con la secuencia de aminoácidos 'KFERQ' (Dice, 1990; Dice, 2007).

Es así, como el motivo KFERQ (o uno similar) contenido en la proteína diana es reconocido por la chaperona HSC70 para formar un complejo. El complejo HSC70-proteína diana interactúa con LAMP2A en la membrana lisosomal para impulsar la internalización de la proteína diana en el lumen lisosomal (Dice, 2007).

El papel de LAMP2A en la actividad de CMA es crucial, ya que la ausencia de LAMP2A perjudica la internalización lisosomal de la proteína objetivo y, por lo tanto, su degradación (Dice, 2007; Patel & Cuervo, 2015). Debido a esto, se dice que “LAMP2A es el paso limitante del flujo de CMA”, pues elevados niveles de proteína LAMP2A están asociados con una alta actividad de CMA y bajos niveles de proteína LAMP2A con una baja actividad de CMA (Patel & Cuervo, 2015).

Todas las células poseen una actividad basal de CMA, sin embargo, el proceso puede ser activado bajo distintas condiciones, tales como, estrés oxidativo, privación de nutrientes, exposición a compuestos tóxicos, entre otros. Una activación de la CMA puede ser evidenciada por un aumento en los niveles totales de LAMP2A y/o HSC70, o por una relocalización de lisosomas positivos para LAMP2A en el perinúcleo celular (Cuervo & Dice, 2000; Kaushik & Cuervo, 2018).

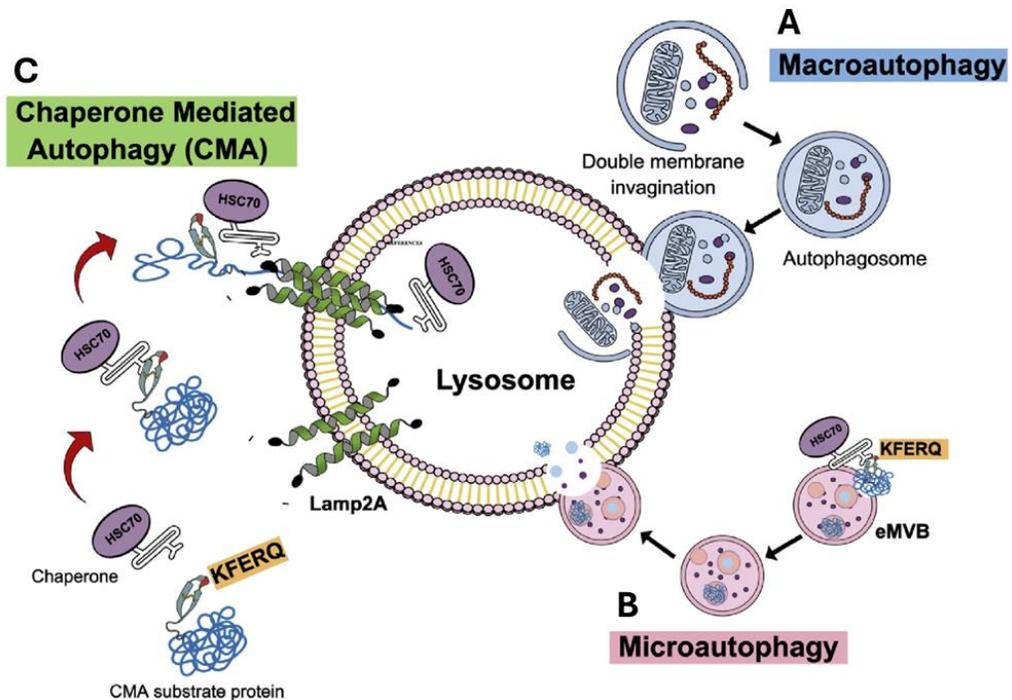


Figura 5. Vías autofágicas. Esquema básico de los tres diferentes tipos de autofagia de mamíferos. Figura extraída de Albornoz y cols., 2022. (A) La macroautofagia es una vía de varios pasos que comienza con la formación de un autophagosoma, una estructura vesicular de doble membrana que contiene la carga a degradar. El autophagosoma se fusiona con el lisosoma para formar un autofagolisosoma, estructura que se fusiona posteriormente con el lisosoma, para finalmente degradar el contenido (carga), completando el proceso. **(B)** La microautofagia, en los mamíferos, es impulsada a través de la fusión de los endosomas tardíos (LEs) con los lisosomas, recibiendo el nombre de microautofagia endosomal (eMi). Ocurre por medio de invaginación lisosomal o por fusión endosomal. **(C)** La autofagia mediada por chaperonas (CMA) no requiere la formación de una estructura de autophagosoma para entregar la carga al lisosoma. Entre otros cofactores, CMA requiere la participación de dos proteínas principales, la proteína chaperona HSC70 y la proteína lisosomal LAMP2A. CMA solo degrada proteínas citosólicas que incluyen uno o más motivos relacionados con la secuencia de aminoácidos KFERQ. La secuencia (o motivo) similar a KFERQ es reconocida por la proteína chaperona Hsc70 que impulsa su translocación a través de la membrana lisosomal asistida por el receptor de membrana LAMP2A (Patel & Cuervo, 2015). En eMi, algunas proteínas se incorporan a LEs a través de una forma “en bloque”, pero en CMA, necesitan el reconocimiento del motivo KFERQ por parte de la chaperona HSC70. CMA y eMi tienen diversos mecanismos para la entrega de sustrato lisosomal, y la principal diferencia es que CMA requiere de la proteína LAMP2A para internalizar la proteína de carga en el lisosoma, mientras que eMi no (Albornoz y cols., 2022).

2.7. ROL DE LA AUTOFAGIA EN LA DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS

2.7.1. MACROAUTOFAGIA Y DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS

Las diferentes vías autofágicas, regulan múltiples procesos celulares fisiológicos y patológicos. Varios estudios indican que la macroautofagia puede estar involucrada en la diferenciación, funciones y supervivencia de los odontoblastos (Bhat y cols., 2017). Al respecto, Couve y cols. demostraron marcadores de macroautofagia en odontoblastos, en un patrón relacionado con la edad y sugirieron que la macroautofagia puede ser importante para la viabilidad y la función secretora del odontoblasto maduro (Couve & Schmachtenberg, 2011). Estos resultados fueron confirmados por otros informes que muestran una alta actividad de macroautofagia en células de pulpa dental humana senescentes (Li y cols., 2012). Otros informes demostraron que la macroautofagia puede cumplir diferentes funciones en las células odontoblásticas, entre ellas i) el reciclaje de mitocondrias a través de los lisosomas (mitofagia) bajo estrés celular como la hipoxia (Yang y cols., 2019; Liu y cols., 2022), ii) en la diferenciación de odontoblastos (Pei y cols., 2016; Park y cols., 2022) y iii) en la formación de dentina (Park y cols., 2020; Guo, 2019).

2.7.2. CMA Y DIFERENCIACIÓN DE ODONTOBLASTOS

A pesar de los avances sobre el papel que cumple la macroautofagia en la regulación de la diferenciación y las funciones de los odontoblastos, se desconoce si la función de la CMA está involucrada en algún aspecto fisiológico o patológico de los odontoblastos. Este es uno de los motivos por los cuales este proyecto propone investigar el papel de CMA en la diferenciación de odontoblastos.

Aunque no hay evidencia directa que conecte la CMA con la diferenciación y función de los odontoblastos, algunos estudios han demostrado la relación entre la CMA y la diferenciación de células madre. Por ejemplo, Dong y cols. encontraron que la actividad de CMA está involucrada en la función de las células madre hematopoyéticas (HSC, del inglés *Hematopoietic Stem Cells*) de ratones adultos.

Estos autores demostraron que la actividad de CMA disminuye con la edad en HSC y que la regulación positiva de CMA recupera su función hematopoyética. Además, encontraron que la actividad elevada de CMA, es necesaria para desencadenar la diferenciación de HSC en diferentes linajes y para mantener un conjunto de HSC, destinadas a adquirir pluripotencia después de un estímulo activador (Dong y cols., 2021). Resultados similares fueron mostrados por Xu y cols. utilizando células madre embrionarias tridimensionales (ES 3D), donde describen que el estímulo de diferenciación de las células 3D regula al alza los niveles de proteína y RNA mensajero (mRNA) de LAMP2A. En consecuencia, los autores proponen que la regulación genética de LAMP2A suprime la pluripotencia de la línea celular 3D, concluyendo que la alta actividad de CMA perjudica la autorrenovación de ES 3D y promueve su diferenciación. Por el contrario, una baja actividad de CMA promueve la pluripotencialidad de ES 3D, evitando su transición a un estado diferenciado (Xu y cols., 2020).

Por lo tanto, si una elevada actividad de CMA es necesaria para la diferenciación de HSC y ES 3D, entonces, **una alta actividad de CMA también podría ser necesaria para desencadenar la diferenciación de odontoblastos a partir de células pulpares mesenquimáticas.**

Este proyecto busca estudiar si es necesaria la actividad de CMA para la diferenciación de células mesenquimales aisladas desde pulpa dental humana (hDPSCs) en odontoblastos funcionales.

2.8. NOVEDAD CIENTÍFICA DE LA PROPUESTA

A pesar de que la autofagia es de consideración en varios *clinical trials* de biomedicina, esta ha sido poco estudiada en aspectos dentales (Bhat y cols., 2017), como en el proceso de reparación dentinopulpar y diferenciación de odontoblastos. Adicionalmente, aunque algunos grupos de investigación han logrado avances en comprender el papel de la macroautofagia en la diferenciación de odontoblastos, aun no se sabe nada sobre las implicaciones de la CMA en este proceso de diferenciación. Por lo tanto, la caracterización de CMA en la diferenciación de odontoblastos contribuye a una mayor comprensión del mecanismo molecular de este proceso biológico. En un futuro, estos avances podrían contribuir al desarrollo de tratamientos de aspectos dentales relacionados con la diferenciación de odontoblastos como, por ejemplo, inducción de la reparación dentinopulpar para evitar la pérdida dentaria producto de la actividad de caries e incluso para evitar tratamientos invasivos como la endodoncia ante un compromiso pulpar.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La autofagia mediada por chaperonas (CMA) favorece la diferenciación de odontoblastos a partir de células mesenquimáticas aisladas desde pulpa dental humana.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la actividad de la autofagia mediada por chaperonas (CMA) regula el proceso de diferenciación de células mesenquimáticas aisladas desde pulpa dental humana hacia odontoblastos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la diferenciación de odontoblastos a partir de células mesenquimáticas de la pulpa dental humana.
2. Evaluar los niveles de expresión de la proteína LAMP2A durante el proceso de diferenciación de células mesenquimáticas de la pulpa dental humana.
3. Evaluar cómo influye la actividad de CMA en el proceso de diferenciación de células mesenquimáticas de la pulpa dental humana hacia odontoblastos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de hDPSCs

El aislamiento fue realizado previamente en el Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Se aislaron y caracterizaron hDPSCs de terceros molares de donantes adultos sanos (Figura 6) siguiendo el protocolo de Karamzadeh y cols. (Karamzadeh y cols., 2012) (Anexo 1) y bajo protocolo de bioética aprobado en el proyecto FIOUCh 2022/05.

Las células se encontraban congeladas y almacenadas en crioviales a -80°C , a una concentración de $1 \times 10^6/\text{mL}$ en suero fetal bovino inactivado (FBS por sus siglas en inglés *Fetal Bovin Serum*) (Gibco 10437-028) suplementado con 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) (Winkler BM-0660). Para descongelar la línea celular, los crioviales se pasaron rápidamente de -80°C al baño termostático a 37°C .

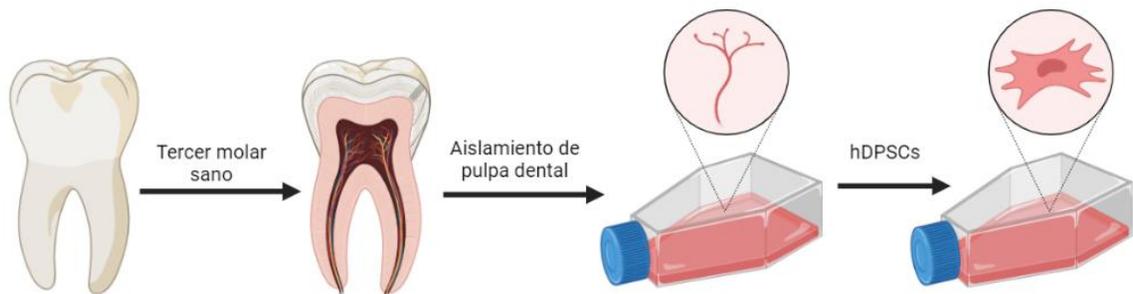


Figura 6. Aislamiento de hDPSCs. El aislamiento de hDPSCs se realizó desde terceros molares de donantes humanos, adultos, sanos. Figura elaborada con Biorender.

4.1. Caracterización de la diferenciación de odontoblastos a partir hDPSCs.

En primer lugar, se evaluaron distintas condiciones de cultivo para optimizar la diferenciación de hDPSCs hacia odontoblastos.

Se prepararon 3 medios de diferenciación suplementados con diferentes inductores odontogénicos y 1 medio sin inductores de diferenciación, como control.

Como medio basal (control) se utilizó Medio Mínimo Esencial Eagle modificación Alfa (Gibco 12000-0222) (α -MEM) con Pen-Strep (Biological Industries

03-031-1B) (Penicilina 10,000 U/mL y Estreptomina 10 mg/mL) suplementado con 10% (v/v) de FBS.

Para preparar los tres diferentes medios de diferenciación, el medio α -MEM se suplementó con FBS al 5% y diferentes inductores odontogénicos. Medio de diferenciación DIF (α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico (Sigma-Aldrich A8960-5G) y 10 mM β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich G9422-50G)), medio de diferenciación DIF+ (α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato y 0,1 μ M dexametasona (Tocris Bioscience 50-02-2)) y medio de diferenciación DIF++ (α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato, 0,1 μ M dexametasona y 10 ng/mL TGF- β (R&D Systems 240-B)).

Cultivo y diferenciación de hDPSCs

Las células previamente descongeladas, en pasaje entre 3 y 7, con una confluencia del 80% aproximadamente, fueron sembradas en 4 placas (para los días 0, 7, 14 y 21, denominados T0, T7, T14 y T21 respectivamente). En placas Falcon® de 12 pocillos, en una densidad de 100.000 células para T0 y 20.000 células por pocillo de para T7, T14 y T21, en un volumen de 1 mL de medio basal (Figura 7). Se incubaron en la estufa a 37°C con atmósfera humidificada y al 5% en dióxido de carbono (CO₂) las primeras 24 horas.

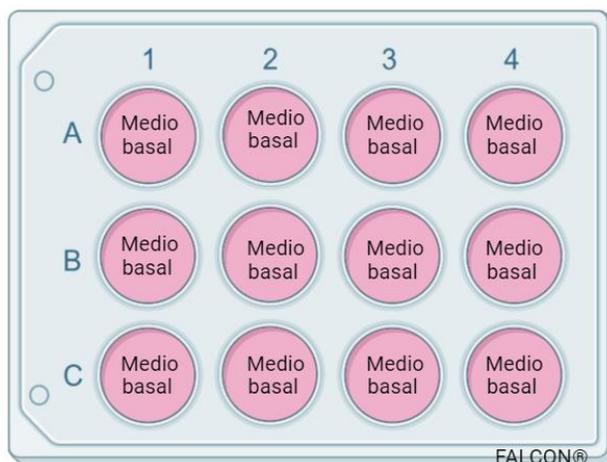


Figura 7. Siembra y cultivo de hDPSCs.

Siembra de hDPSCs en placas Falcon® de 12 pocillos, en una densidad de 100.000 células para T0 y 20.000 células por pocillo para T7, T14 y T21. Las placas se mantuvieron incubadas en estufa a 37°C con atmósfera humidificada y al 5% en CO₂, durante todo el proceso de diferenciación y se realizaron cambios de medio fresco cada 48 horas. Figura elaborada con Biorender.

Al día siguiente (día 1), se observaron las células al microscopio óptico y fueron lavadas con buffer amortiguador fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) (Corning 46-013-CM) (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4) para realizar el cambio del medio basal por los medios de diferenciación en los pocillos que correspondientes (Figura 8). La diferenciación de las hDPSCs a odontoblastos se realizó por 21 días según Park y cols. (Park y cols., 2021) utilizando las distintas condiciones de diferenciación (Figura 8). Se agregó 1 mL de medio de cultivo a cada pocillo. Las células se mantuvieron en estufa a 37°C con 5% de CO₂ durante todo el proceso de diferenciación según los tiempos establecidos (T0, T7, T14 y T21), realizando cambios de medio fresco cada 48 horas.

En los días 0, 7, 14 y 21 se fijaron las células (Figura 8, pocillos A) de cada condición para caracterizar cualitativamente el proceso de diferenciación a través de tinción con solución alizarin red (Sigma-Aldrich 104K2507), y se recolectaron muestras (Figura 8, pocillos B y C) para evaluar mediante western blot la expresión de los marcadores de formación de dentina, DSPP y DMP1 (K. Sagomonya y cols., 2015).

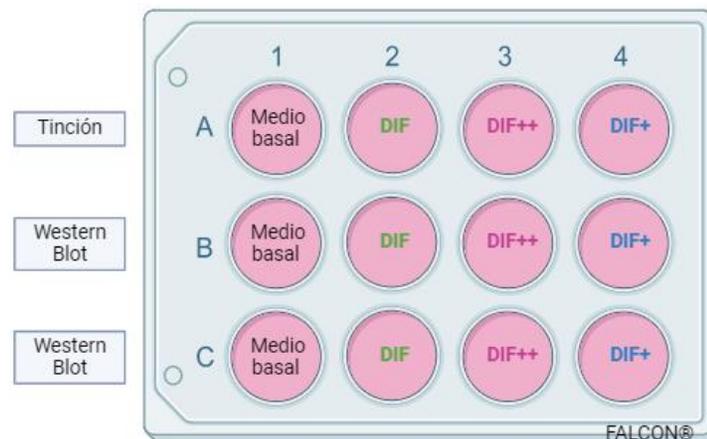


Figura 8. Día 1 de diferenciación. 24 horas después de sembradas las células, se indujo la diferenciación de hDPSCs, agregando los medios de diferenciación DIF, DIF++ y DIF en las columnas 2, 3 y 4 respectivamente, mientras la columna 1 se mantuvo con medio basal como control. El pocillo A de cada condición para fijación y posterior tinción con alizarin red y los pocillos B y C para recolectar muestras para ensayo de western blot a lo largo de la diferenciación. Figura elaborada con Biorender.

4.1.1. Caracterización cualitativa de la diferenciación de hDPSCs mediante tinción con alizarin red.

La tinción con alizarin red es un método comúnmente utilizado para evaluar la formación de sales de Ca^{2+} en células en cultivo (Gregory y cols., 2004). La solución es un colorante aniónico (negativamente cargado) que pertenece a la familia de los colorantes de antraquinona. Su estructura química contiene grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) que son los responsables de su capacidad de unión al Ca^{2+} en los depósitos de fosfato de Ca^{2+} celular (Gregory y cols., 2004). Por lo tanto, la tinción con alizarin red permite la visualización clara y precisa de las áreas de mineralización.

Fijación de las células a la placa

Se realizaron 3 lavados con 1 mL de PBS cada uno, para luego retirar la placa de la campana de cultivo y trasladarla hacia la campana de extracción. Las células fueron fijadas con 600 μL de Paraformaldehído (PFA) (Thermo Scientific 28908) al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS.

Tinción

Se agregaron 600 μL de solución alizarin red (Sigma-Aldrich 104K2507) (2% (p/v); pH 4.3) y se incubó 1 hora en agitación y oscuridad. A continuación, se realizaron 3 lavados con 1 mL de agua destilada por pocillo, durante 5 minutos cada uno, también en agitación. Se dejaron secar las placas, se sellaron con papel Parafilm y fueron guardadas a 4°C hasta realizar registro fotográfico de cada uno de los pocillos con cámara profesional (Cannon PowerShot SX60 HS) y trípode. Este procedimiento se llevó a cabo completados cada uno de los tiempos, es decir T0, T7, T14 y T21.

Es de importancia destacar que los resultados de tinción con alizarin red se obtenían inmediatamente a medida que avanzaba la diferenciación (tiempos 0, 7, 14 y 21), mientras que los ensayos de western blot se realizaron al terminar el proceso de diferenciación, cuando todas las muestras habían sido recolectadas.

4.1.2. Ensayo de western blot

Preparación de Gel de Poliacrilamida

Se preparó a temperatura ambiente, un gel de separación de proteínas al 10% acrilamida (v/v) con agua destilada, acrilamida (Bio-Rad 1610156) al 30%, Tris (Winkler BM-2000) 1.5 M pH 8.8, Dodecil Sulfato de Sodio (SDS por sus siglas en inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*) (Winkler BM-1650) al 10%, persulfato de amonio (Sigma-Aldrich A3678-25G) al 10% y TEMED (Thermo Scientific 28656355) y sobre él se preparó un gel de apilamiento al 5% acrilamida (v/v) con agua destilada, acrilamida al 30%, Tris 1.0 M pH 6.8, SDS 10%, persulfato de amonio al 10% y TEMED.

Extracción de proteínas

Se agregó un volumen de 70 μ l de Buffer RIPA 1X (tampón de ensayo de radio inmunoprecipitación) que contiene inhibidor de proteasas 1% (Thermo Scientific A32963). Se incubó durante 30 minutos en hielo y se centrifugó a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) por 15 minutos para luego recuperar el sobrenadante y almacenar a -20°C.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó a través del Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific 23225). Para ello, se utilizó una placa de 96 pocillos de fondo plano, en donde se realizó una curva de calibración en triplicado con diluciones de una ampolla de albumina de suero bovino 2 mg/mL en agua destilada. Luego, se agregó por triplicado 1 μ L por muestra de interés diluida en 24 μ l de agua destilada. Finalmente, se agregaron 200 μ L por pocillo del mix de reactivos del kit

(Reactivo B / Reactivo A 1:50) y se incubó por 30 minutos a 37°C en oscuridad. Posterior a la incubación se realizó la medición de absorbancia en espectrofotómetro a 560 nm. Se analizaron los datos y se extrapolaron las concentraciones de proteínas por muestra según la curva de absorbancia de concentraciones conocidas.

Denaturación de proteínas

Se denaturaron las proteínas a 95°C por 5 minutos en solución de carga SDS-PAGE 4X (Tris-HCl 25 mM pH 7.5; glicerol 32% (v/v); 2 mercaptoetanol 20%; SDS 9,2%; azul de bromofenol 0,02%) y agua destilada según correspondía.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

La separación de las proteínas según su masa relativa se realizó en los geles de poliacrilamida al 10% (v/v) previamente descritos. Se cargó la misma cantidad total de proteínas (25-30 µg por carril) y la electroforesis se realizó en solución de electroforesis 1X (Tris-Base 0.3% (p/v); glicina 1.44% (p/v); SDS 0.1% (p/v); pH 8.6) a 80 Voltios (V) durante los primeros 15 minutos y luego a 120 V hasta la caída del frente de corrida (1 hora y 20 minutos aproximadamente).

Electrotransferencia de proteínas

Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad BR20220520) a través de transferencia semi seca o húmeda. Para la transferencia semi seca se usó el equipo de transferencia electroforética Trans-Blot® Turbo™ Transfer System semi seco (Bio-Rad, USA), en solución de transferencia durante 10 minutos. En caso de transferencia húmeda, el gel y la membrana se colocaron en forma de sándwich entre esponja y papel del kit (esponja/papel filtro/membrana/gel/papel filtro/esponja), asegurándose de que no quedaran burbujas de aire entre el gel y la membrana y cerrando el sándwich firmemente. El sándwich se sumergió en la solución de transferencia húmeda (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20%). Se le aplicó un campo eléctrico y se dejó toda la noche, a 30 V por 960 minutos (16 horas) a 4°C.

Completado el proceso de transferencia, se tiñó la membrana con Rojo Ponceau al 5% (v/v) por 5 minutos para verificar la transferencia de las proteínas. Luego se eliminó el Rojo Ponceau y se bloqueó la membrana con solución de bloqueo al 5% Albúmina de Suero Bovino (BSA por sus siglas en inglés *Bovin Serum Albumin*) (Winkler BM-0150) en TBS-Tween20 (Sigma-Aldrich P1379-250mL) 0.1%, por 1 hora con agitación suave, para bloquear los sitios de unión no específicos.

Incubación de anticuerpos y revelado

Las proteínas cuya expresión fue analizada mediante western blot fueron DSPP, DMP1 y LAMP2A. La expresión relativa de estas proteínas fue analizada en comparación con la expresión del anticuerpo primario β -Actina, usado como control de carga o *housekeeping*, que no requiere de anticuerpo secundario (Tabla 1).

Las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas durante toda la noche, a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla 1), según correspondía, preparados en solución BSA al 3% (p/v).

Al día siguiente, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween20 0,1%, para luego incubar el anticuerpo secundario, en todos los casos, anti-Rabbit-HRP, preparado en TBS-Tween20 0,1%, durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. La membrana se lavó 3 veces, 5 minutos cada vez.

Las membranas con sustrato Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad 170-5061) fueron expuestas en el sistema de adquisición y análisis de imágenes fotodocumentador Li-Cor modelo Odyssey FC, para revelar la señal semicuantitativa de expresión de proteínas. Para revelar β -Actina, se utilizó el sustrato EZ-ECL (Biological Industries 20-500-1000A/B).

Para incubar distintos anticuerpos, de peso semejante, se realizó stripping con solución Mild Stripping (glicerina 15 gr; SDS 1 gr; Tween20 10 μ L, pH 2.2) para eliminar anticuerpos anteriores de la membrana.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Tipo	Dilución	Marca	Cat #	kDa
DSPP Rabbit	Primario	1:2.000	Novus	NBP2-92546	130kDa
DMP1 Rabbit	Primario	1:2.000	Invitrogen	PA5-103323	57kDa
LAMP2A Rabbit	Primario	1:1.000	Abcam	18528	105kDa
β-Actina Rabbit	Primario	1:25.000	Sigma-Aldrich	A3854	43kDa
anti-Rabbit-HRP	Secundario	1:10.000	Rockland	611-1322	-
Alexa Fluor® 586 Anti-Rabbit	Secundario	1:500	Life Technologies	A11036	-

Cuantificación de bandas

Para la cuantificación relativa de proteínas, la intensidad de las bandas de proteínas fueron calculadas mediante densitometría utilizando el programa ImageJ (Software).

Análisis estadísticos

Los resultados fueron evaluados utilizando el software GraphPad Prism 8 (Software, La Jolla, CA, EE. UU.). Se analizó la distribución de los datos y se realizaron pruebas de ANOVA de una y dos vías, con las prueba de comparaciones múltiples de Dunnet y Tukey respectivamente, así como test de Student pareado. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con $p < 0.05$. Los datos fueron expresados como promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes ($n \geq 3$). Para el caso de las fotografías, éstas son imágenes representativas de al menos 3 experimentos independientes ($n \geq 3$).

4.2. Reducción de la expresión de la proteína LAMP2A en hDPSCs.

Actualmente no existen métodos químicos adecuados para bloquear selectivamente la CMA (Patel & Cuervo, 2015). La única forma selectiva y eficaz de inhibir la CMA es disminuyendo o eliminando los niveles intracelulares de la proteína LAMP2A, el receptor de CMA. La disminución o eliminación de LAMP2A reduce o impide la translocación del sustrato CMA al interior del lisosoma (Schneider y cols., 2014; Patel & Cuervo, 2015). Para esta tesis se planteó disminuir los niveles de

expresión de la proteína LAMP2A mediante la incorporación lentiviral de un *short hairpin* RNA específico para el mRNA de lamp2a (shRNA lamp2a).

Infección lentiviral de células hDPSCs con shRNA para lamp2a

La infección de las células mesenquimáticas hDPSCs se realizó con partículas lentivirales de segunda generación que habían sido previamente producidas en nuestro Laboratorio de Patología Celular y Molecular. Dichas partículas expresan un shRNA contra el RNA mensajero lamp2a humano, lo que permite la disminución de la expresión de la proteína LAMP2A.

Para la generación de las partículas lentivirales, se sembraron en una placa de 6 pocillos y se mantuvieron con 2 mL de medio basal, hasta alcanzar una confluencia del 70%. Posteriormente se procedió a agregar 8 µg/mL de Polibreno (Bromuro de Hexadimetrina) (Sigma-Aldrich H9268-5G) y 200 µL de partículas lentivirales conteniendo el plásmido pLVX shRNA lamp2a humana que permite la expresión del shRNA contra lamp2a, además este vector expresa una proteína fluorescente verde (GFP por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) que emite fluorescencia en la zona verde del espectro visible. Las células se mantuvieron en la estufa por 24 horas. Pasadas las 24 horas se observó la placa directamente en un microscopio de fluorescencia, donde una alta fluorescencia (GFP) es indicativo de una transducción eficiente. Se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS. Para que las células continuasen dividiéndose, fueron removidas con 1X Tripsina-EDTA (Gibco 15400-054) y se traspasaron a una placa de 100 mm² con 10 mL de medio basal y se dejaron crecer hasta una confluencia de 90% antes de ser removidas nuevamente para ser utilizadas y congeladas a -80°C.

Epifluorescencia de células transducidas

Las células se fijaron con PFA durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 minutos. Para la tinción de núcleos celulares se utilizó Hoechst (Invitrogen, USA 33342) en dilución 1:5000 (color azul) en solución de Bloqueo (PBS + BSA al 2%) por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X. Los vidrios de 18 mm fueron

montados en portaobjetos utilizando medio DAKO como montaje. Las fotos fueron tomadas con microscopio de epifluorescencia invertido Eclipse Ti-s (Nikon Instrument).

Una vez obtenida la línea celular, se evaluó en microscopio de EPI fluorescencia, la expresión de la proteína fluorescente GFP de las células hDPSCs-shlamp2a comparado con su control hDPSCs. Se calculó el porcentaje de infección de la línea shlamp2a con el programa ImageJ (Software).

Caracterización de la eficacia de shRNA contra LAMP2A mediante western blot

Luego, se realizó la caracterización de la eficiencia de shRNA contra LAMP2A respecto de su control hDPSCs, mediante western blot según punto 4.1.2. (descripción del procedimiento de western blot).

4.2.1. Caracterización cualitativa de la diferenciación de la línea celular con baja expresión de la proteína LAMP2A mediante tinción con alizarin red.

Cultivo y diferenciación de hDPSCs y hDPSCs-shlamp2a

Se inició el proceso de diferenciación de hDPSCs en células control (hDPSCs) y en células con niveles reducidos de la proteína LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a) para caracterizar cualitativamente la diferenciación en la línea celular hDPSCs-shlamp2a a través de tinción con alizarin red según punto 4.1.1.

Con una confluencia del 80% aproximadamente, en 4 placas Falcon® de 12 pocillos, se sembraron células hDPSCs y hDPSCs-shlamp2a (Figura 9) a una densidad de 100.000 células para T0, y 20.000 células por pocillo para T7, T14 y T21, en un volumen de 1 mL de medio basal por pocillo.

Al día siguiente (día 1), las células fueron lavadas una vez con PBS para posteriormente inducir la diferenciación por 21 días. Para este experimento se utilizó medio basal y medio de diferenciación DIF++ (Figura 9). Se agregó 1 mL de cada uno de los medios por pocillo, y las células se mantuvieron incubadas en estufa

durante todo el proceso de diferenciación. Se realizaron cambios de medio fresco cada 48 horas.

Tinción con alizarin red

Los días 0, 7, 14 y 21 se fijaron las células del pocillo A de cada condición y se tomaron muestras de los pocillos B y C para evaluar mediante western blot los marcadores de formación de dentina, DSPP y DMP1 según punto 4.1.2. (descripción del procedimiento de western blot) (Figura 9).

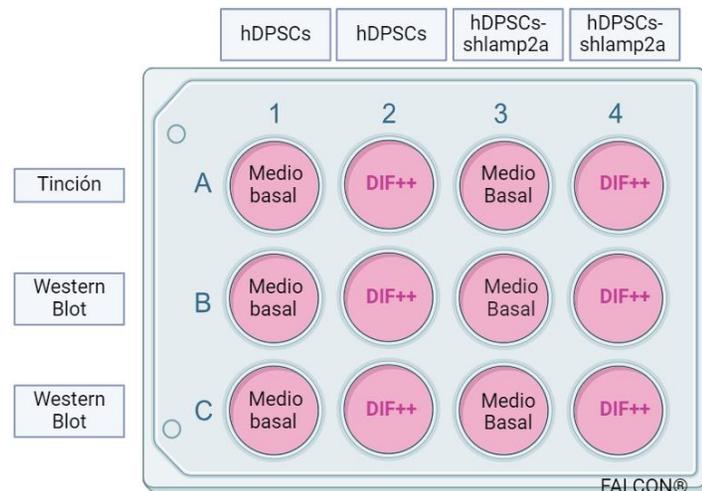


Figura 9. Siembra de línea celular con niveles reducidos de la proteína LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a) y control (hDPSCs). Se sembraron Las columnas 1 y 2 con hDPSCs y las columnas 3 y 4 con hDPSCs-shlamp2a, en 4 placas Falcon® de 12 pocillos, en una densidad de 100.000 células para T0 y 20.000 células por pocillo para T7, T14 y T21. 24 horas tras la siembra (día 1), se indujo la diferenciación, agregando medio DIF++ en columnas 2 y 4. El pocillo A de cada condición para fijación y posterior tinción con alizarin red y los pocillos B y C para recolectar muestras para ensayo de western blot a lo largo de la diferenciación. Figura elaborada con Biorender.

4.3. Sobreexpresión de la proteína LAMP2A en hDPSCs.

La técnica de transducción a través de partículas lentivirales no fue efectiva para la sobreexpresión de los niveles de la proteína LAMP2A (Anexo 2). Por este motivo, se realizó a través de un método diferente al utilizado para disminuir sus niveles.

Transfección con plásmido mediante el reactivo de transfección Lipofectamina™ 2000

Se procedió a crear otra línea que sobreexpresa la proteína LAMP2A, a través de la transfección de un plásmido pCMVG Entry MyC flag lamp2a humana, que contiene un gen de resistencia al antibiótico gentamicina (G418) (InvivoGen ant-gn-1). Esto se llevó a cabo con un kit de Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen 11668-027), un reactivo de transfección basado en liposomas catiónicos para preparar complejos autoensamblados con ADN plasmídico que contenía el gen de interés. Lipofectamina™ 2000 ha demostrado transfectar eficazmente una amplia variedad de líneas de células en suspensión y adherentes.

Para llevar a cabo este procedimiento se sembraron 100.000 células en una placa de 12 pocillos. Luego de 24 horas, las células alcanzaron una confluencia entre el 80% y 90%, necesaria para comenzar la transfección, luego se preparó el complejo DNA-liposoma. Se utilizaron dos tubos eppendorf denominados como tubo A, que contenía el DNA plasmídico más medio Opti-Mem™ (Gibco 31985-070) sin FBS y tubo B, que contenía la Lipofectamina™ 2000 más medio Opti-Mem sin suero y se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el tubo A se incubó en el tubo B por 30 minutos. Además, se utilizó un control que contenía solamente Lipofectamina. Finalmente, el complejo y el control se agregaron directamente al medio de cultivo celular y se incubó a 37°C.

Las concentraciones finales por pocillo de cada componente se reflejan en la siguiente tabla (Tabla 2).

Tabla 2. Componentes transfección con Lipofectamina.

Superficie de área por pocillo	DNA final por pocillo	Lipofectamina final por pocillo	Volumen final Opti-Mem por tubo
4 cm ²	1 µg	2 µL	100 µL

Posterior a las 24 horas de la transfección, el medio de cultivo se cambió dos veces por semana por medio fresco suplementado con G418 a una concentración de 200 µg/mL para seleccionar las colonias que expresan el gen de interés y

provocar la muerte celular de las que no presentan esta resistencia. La línea fue denominada MyC Entry lamp2a.

Inmunofluorescencia indirecta

Para determinar aproximadamente los niveles de LAMP2A, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia con la línea control (hDPSCs), la línea estable con actividad disminuida de LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a) y la línea con actividad aumentada de LAMP2A (hDPSCs-MyC Entry lamp2a), incubando el anticuerpo primario para LAMP2A (Tabla 1).

Las líneas celulares fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una concentración de 1×10^5 células sobre vidrios de 15 mm previamente tratados con poly-L-lisina (PLL) (Sigma-Aldrich P4832-50mL). Se mantuvieron los pocillos con medio basal. Las células fueron fijadas con PFA al 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% (v/v) por 5 minutos en hielo. Las uniones no específicas fueron bloqueadas con BSA al 2% (p/v) en PBS filtrado, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-LAMP2A y posteriormente fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor® 568 anti-Rabbit (Life Technologies A11036) (Tabla 1) utilizado en dilución 1:500, en oscuridad durante 2 horas. Para la tinción de núcleos celulares se utilizó Hoechst. Finalmente, los vidrios de 15 mm fueron montados en portaobjetos utilizando medio DAKO como montaje. Las fotos fueron tomadas con microscopio de epifluorescencia invertido Eclipse Ti-s.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de la diferenciación de odontoblastos a partir de hDPSCs.

Para determinar la combinación óptima (o más eficaz) de inductores de diferenciación odontoblástica a partir de hDPSCs, se probaron distintos medios de diferenciación (DIF, DIF+, DIF++) (Tabla 3) durante 7, 14 y 21 días de cultivo celular. En cada uno de estos días, las distintas condiciones de diferenciación fueron evaluadas a través de la tinción de alizarin red (Figura 10) o mediante western blot (Figura 11, Figura 12, Figura 13 y Figura 14).

Tabla 3. Medios de cultivo de hDPSCs.

Medio	Composición
Medio Basal (Control)	Medio α -MEM 10X con Pen-Strep (Biological Industries 03-031-1B) (Penicilina 10,000 U/mL y Estreptomicina 10 mg/mL) suplementado con: <ul style="list-style-type: none"> - FBS al 10%.
Medio de diferenciación DIF	Medio basal suplementado con: <ul style="list-style-type: none"> - FBS al 5%. - Ácido ascórbico 50 μg/mL. - β-glicerofosfato 10 mM.
Medio de diferenciación DIF+	Medio basal suplementado con: <ul style="list-style-type: none"> - FBS al 5%. - Ácido ascórbico 50 μg/mL. - β-glicerofosfato 10 mM. - Dexametasona 0,1 μM.
Medio de diferenciación DIF++	Medio basal suplementado con: <ul style="list-style-type: none"> - FBS al 5%. - Ácido ascórbico 50 μg/mL. - β-glicerofosfato 10 mM. - Dexametasona 0,1 μm. - Factor de Crecimiento Transformante-beta (TGF-β) 10 ng/mL.

Caracterización de la diferenciación de hDPSCs mediante tinción con alizarin red a lo largo del proceso de diferenciación

La tinción con alizarin red es un método comúnmente utilizado para evaluar la formación de sales de Ca^{2+} de células en cultivo (Gregory y cols., 2004). Alizarin red específicamente se une a los iones de Ca^{2+} en forma de complejos químicos, formando un complejo alizarin red- Ca^{2+} , que permite la visualización de áreas ricas en Ca^{2+} a través de depósitos de color rojo/café que contrastan con el color de los tejidos circundantes, lo que facilita la observación de la formación y cantidad de mineralización en las muestras.

La deposición de Ca^{2+} fue observable claramente después de 14 días de la inducción de la diferenciación y aumentó aún más a los 21 días de inducción odontogénica. Al comparar la condición en medio basal respecto a las condiciones de diferenciación, se observa un aumento en cuanto a la deposición mineral en las condiciones DIF, DIF++ y DIF+. Al comparar las condiciones de diferenciación entre sí, se observa una mayor cantidad de depósitos de Ca^{2+} en el medio DIF++ (suplementado con TGF- β) a lo largo de todo el proceso (Figura 10).

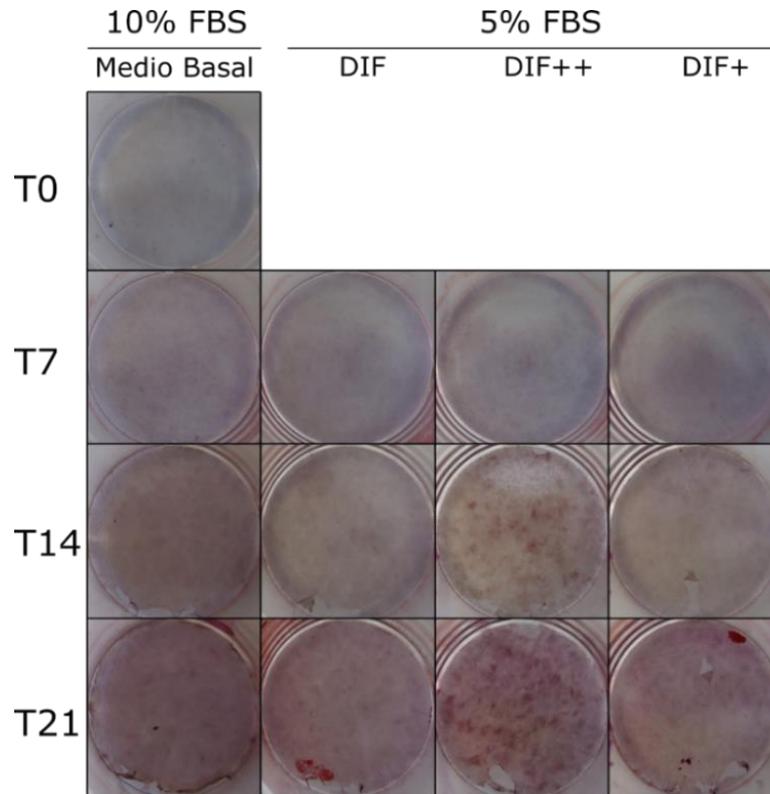


Figura 10. Evaluación de la deposición de calcio mediante tinción con alizarin red. hDPSCs fueron incubadas por 7, 14 o 21 días (T7, T14, T21) con medio basal (α -MEM suplementado con 10% v/v FBS) o tres diferentes medios de diferenciación (DIF: α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico y 10 mM β -glicerofosfato. DIF+: α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato y 0,1 μ M dexametasona. DIF++: α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato y 0,1 μ M dexametasona y 10 ng/mL TGF- β). Posteriormente, las células fueron teñidas con alizarin red. Se observan depósitos ricos en Ca^{2+} (rojo) en las condiciones DIF, DIF+ y DIF++, los cuales van en aumento a lo largo del proceso de diferenciación. Imagen representativa de un n=3. Figura elaborada con Inkscape.

En base a este resultado, en donde la mayor cantidad de depósito mineral se observa con el medio de diferenciación suplementado con dexametasona y TGF- β (DIF++), se tomó la decisión de realizar las siguientes diferenciaciones con la condición de diferenciación DIF++.

Evaluación de los niveles proteicos de los marcadores odontogénicos DMP1 y DSPP durante el proceso de diferenciación de hDPSCs mediante western blot

Posterior a la evaluación colorimétrica de la diferenciación mediante alizarin red, se procedió a caracterizar, mediante western blot, los niveles proteicos de dos marcadores clásicos de diferenciación odontoblástica, las proteínas DMP1 y DSPP.

Tanto en la evaluación de la expresión de DMP1 (Figura 11), como de DSPP (Figura 12), al comparar la expresión relativa de la proteína entre los distintos medios de diferenciación, esta fue mayor en la condición de diferenciación sin suplemento de dexametasona y TGF- β (DIF), y la menor expresión proteica se da en el medio de diferenciación suplementado con dexametasona y TGF- β (DIF++). Esto indicaría que, evaluado mediante western blot, DIF es la condición más eficaz en la diferenciación de hDPSCs (T7, T14, 21). Por lo tanto, al evaluar los niveles de expresión de las proteínas marcadoras de diferenciación odontoblástica, DMP1 y DSPP a lo largo del proceso de diferenciación, se obtuvieron resultados que difieren a los obtenidos en la evaluación cualitativa.

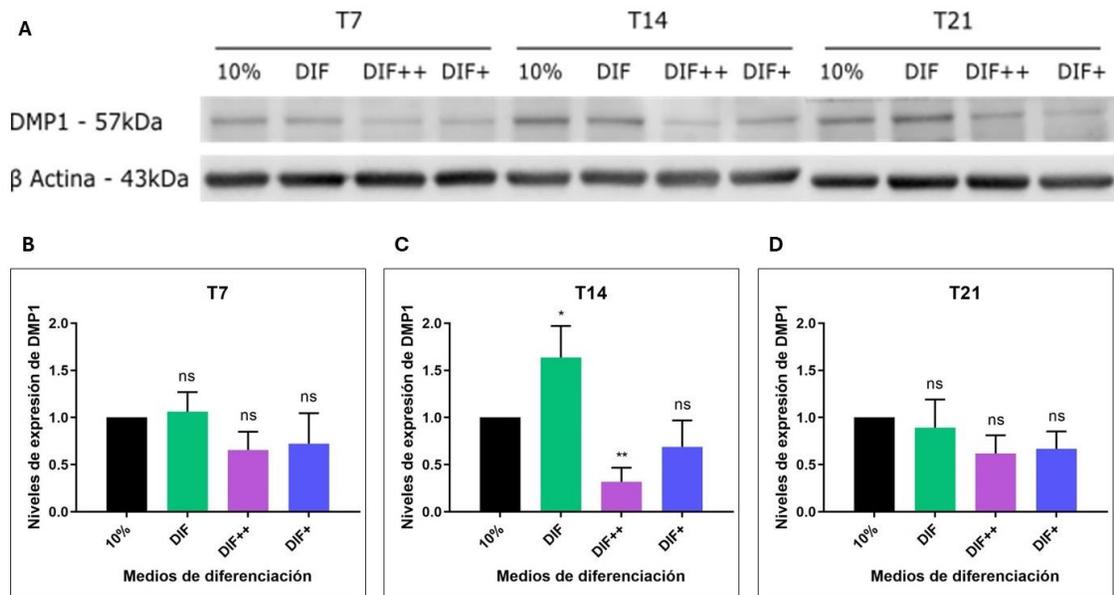


Figura 11. Niveles de expresión de DMP1. (A) Imagen representativa de western blot que muestra los niveles de expresión de la proteína DMP1 a lo largo del proceso de diferenciación de hDPSCs. Se observa una banda de aproximadamente 57kDa que corresponde al fragmento C-terminal de

DMP1, el cual es el dominio funcional esencial de dicha proteína. **(B), (C) y (D)** Cuantificación de la expresión relativa de la proteína DMP1 en los días 7, 14 y 21 (T7, T14 y T21 respectivamente). Los resultados corresponden a un n=4 en T7 y T21 y n=5 en T14. Se utilizó test de ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de múltiples comparaciones de Dunnet para determinar la significancia estadística. ns: no significativo; *: p<0,05; **: p<0,005.

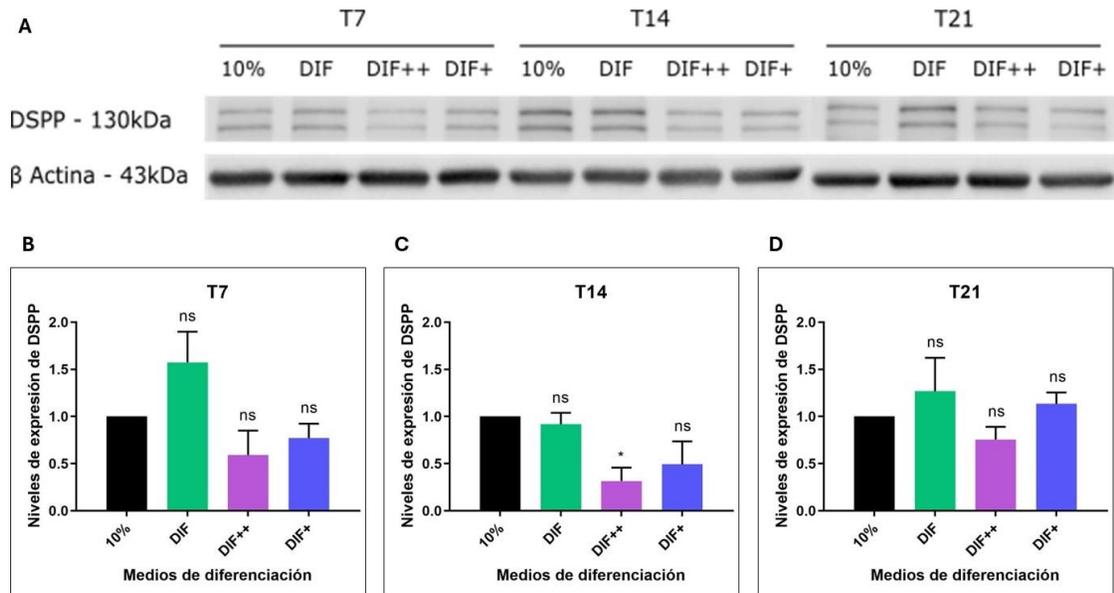


Figura 12. Niveles de expresión de DSPP. **(A)** Imagen representativa de western blot que muestra los niveles de expresión de la proteína DSPP a lo largo del proceso de diferenciación de hDPSCs. Se observa la presencia de una doble banda, de aproximadamente 130kDa que corresponde a DSPP, antes de su escisión N-terminal en DSP de 37kDa. **(B), (C) y (D)** Cuantificación de la expresión relativa de la proteína DSPP en los días 7, 14 y 21 (T7, T14 y T21 respectivamente). Los resultados corresponden a un n=3 en T7 y T14 y n=4 en T21. Se utilizó test de ANOVA de 1 vía seguido de la prueba de múltiples comparaciones de Dunnet para determinar la significancia estadística. ns: no significativo; *: p<0,05.

Dada la no concordancia entre los resultados de la evaluación cualitativa (alizarin red), donde se obtuvo una diferenciación más eficaz tras la suplementación con TGF- β (DIF++) y la evaluación cuantitativa (western blot), donde por el contrario los mejores resultados de diferenciación se obtuvieron sin suplemento de TGF- β (DIF), nos planteamos evaluar si la condición DIF++ podría estar induciendo la diferenciación de las células hDPSCs en tiempos más tempranos a los 7 días. Para ello, se evaluaron, mediante western blot, los niveles de expresión de DMP1 y DSPP

en los días 1, 2, 4 y 7 post diferenciación con la condición DIF++. Interesantemente, se evidenció un aumento significativo en los niveles de expresión de las proteínas DMP1 (Figura 13) y DSPP (Figura 14) en los días 1 y 2 de diferenciación. Específicamente, para el caso de DMP1 (Figura 13), sus niveles aumentaron el día 1 pero inmediatamente disminuyeron en el día 2, 3 y 4. En cuanto a DSPP (Figura 14), en el día 2 se observa el mayor aumento de los niveles proteicos, los cuales descienden a partir del día 4. Estos resultados indican que, en las condiciones experimentales evaluadas, el agregado de TGF- β (DIF++) induce una diferenciación de células hDPSCs a partir entre el día 1 y 2 de la inducción del estímulo.

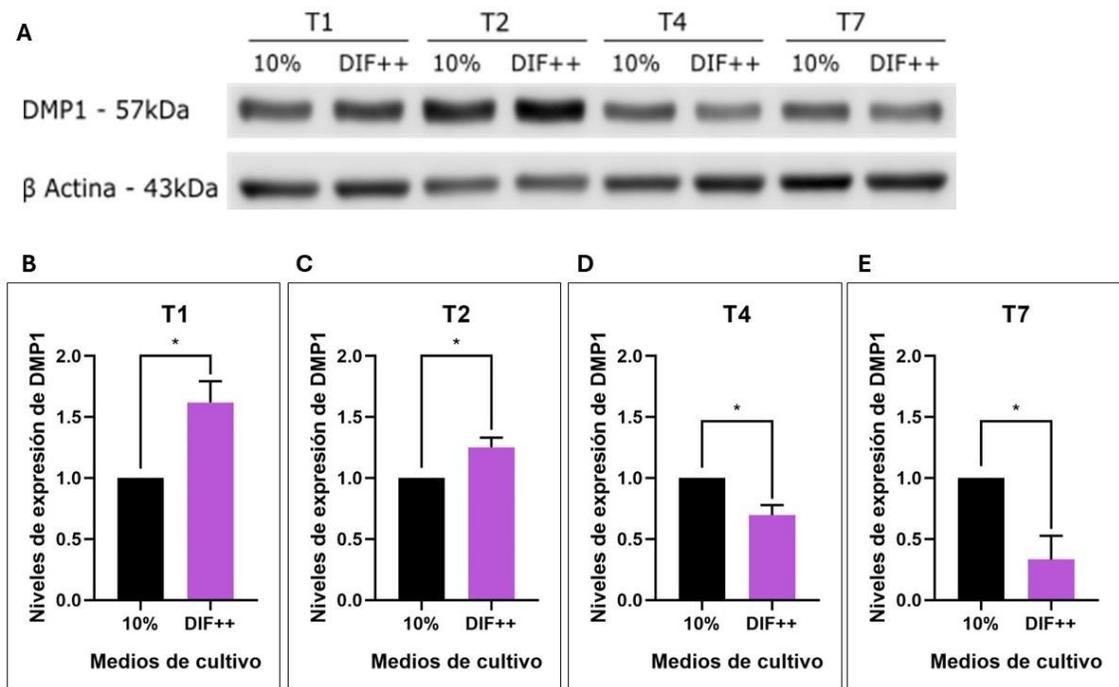


Figura 13. Niveles de expresión de DMP1 en tiempos tempranos. (A) Imagen representativa de western blot que muestra los niveles de expresión de la proteína DMP1 en los primeros 7 días de diferenciación de hDPSCs. (B), (C), (D) y (E) Cuantificación de la expresión relativa de la proteína DMP1 en los días 1, 2, 4 y 7 (T1, T2, T4 y T7 respectivamente). Los resultados corresponden a un n=4. Se utilizó test de student pareado. *: p<0,05.

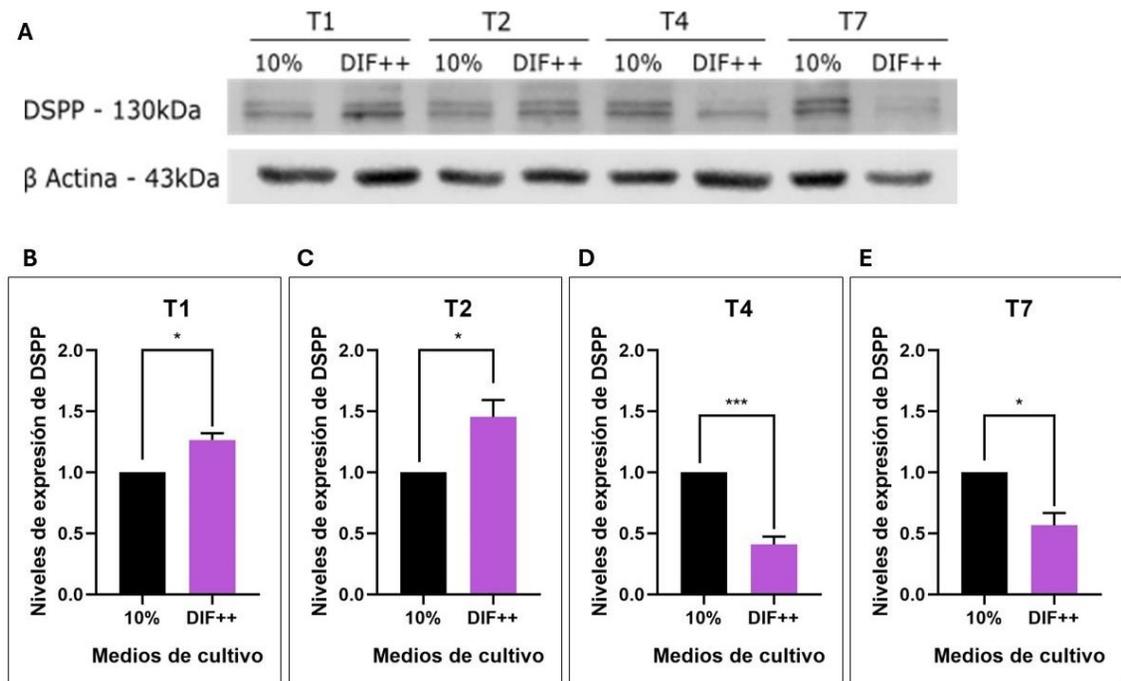


Figura 14. Niveles de expresión de DSPP en tiempos tempranos. (A) Imagen representativa de western blot que muestra los niveles de expresión de la proteína DSPP en los primeros 7 días de diferenciación de hDPSCs. (B), (C), (D) y (E) Cuantificación de la expresión relativa de la proteína DSPP en los días 1, 2, 4 y 7 (T1, T2, T4 y T7 respectivamente). Los resultados corresponden a un $n=5$. Se utilizó test de student pareado. *: $p<0,05$; ***: $p<0,0005$.

5.2. Evaluación de los niveles de expresión de la proteína LAMP2A durante el proceso de diferenciación de hDPSCs a odontoblastos.

Es importante recalcar que la componente limitante de la vía autofágica CMA es la proteína LAMP2A (Patel & Cuervo, 2015). Por lo tanto, altos niveles de LAMP2A se relacionan con una elevada actividad de CMA y viceversa. Basados en esta evidencia, para estudiar si la actividad de CMA está involucrada en el proceso de diferenciación de hDPSCs hacia odontoblastos, se evaluaron los niveles de LAMP2A mediante western blot a tiempos largos (T7, T14 y T21) y cortos (T1, T2, T4 y T7) del proceso de diferenciación. En la Figura 15 se observan los niveles de LAMP2A a tiempos largos, con los diferentes medios de diferenciación, mientras que en la Figura 16 se observan los niveles de LAMP2A a tiempos tempranos, utilizando el medio completo de diferenciación que contiene TGF- β (DIF++).

En la Figura 15 se evidencia que los niveles de expresión de la proteína LAMP2A disminuyen con el estímulo de diferenciación, siendo esto significativo al día 14. Dichos niveles tienden a recuperarse al día 21. Por otro lado, en la Figura 16 se observa un peak en los niveles de expresión de la proteína LAMP2A en los días 1 y 2. Posteriormente, los niveles disminuyen al día 4 y 7.

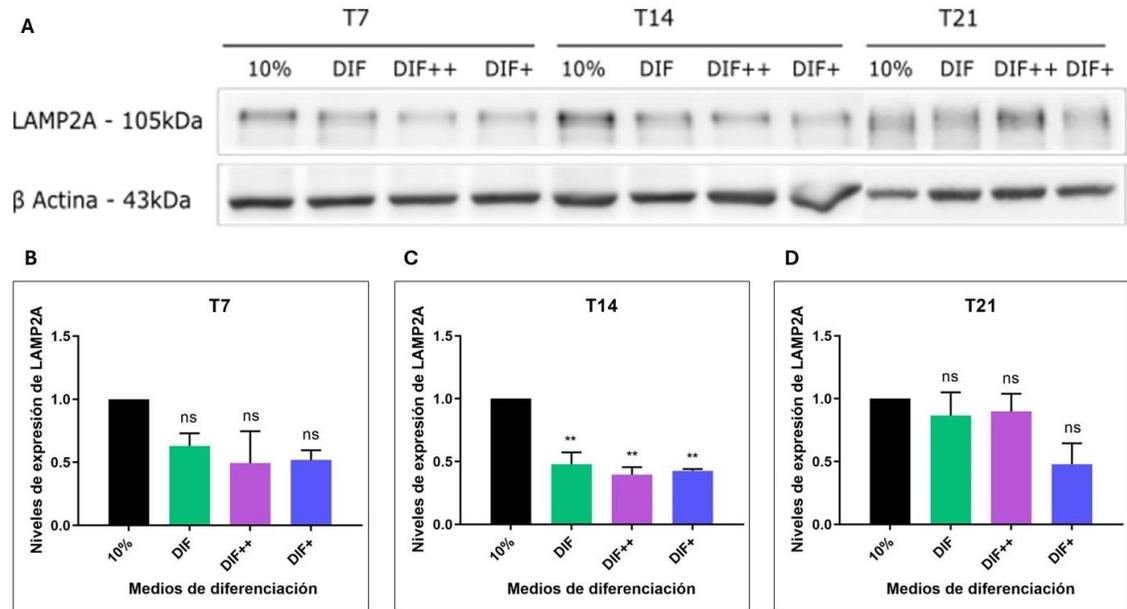


Figura 15. Niveles de expresión de LAMP2A. (A) Imagen representativa de western blot que muestra los niveles de expresión de la proteína LAMP2A a lo largo del proceso de diferenciación de hDPSCs. (B), (C) y (D) Cuantificación de la expresión relativa de la proteína LAMP2A en los días 7, 14 y 21 (T7, T14 y T21 respectivamente). Los resultados corresponden a un n=3. Se utilizó test de ANOVA de 1 vía con la prueba de múltiples comparaciones de Dunnet. ns: no significativo, **: p<0,005.

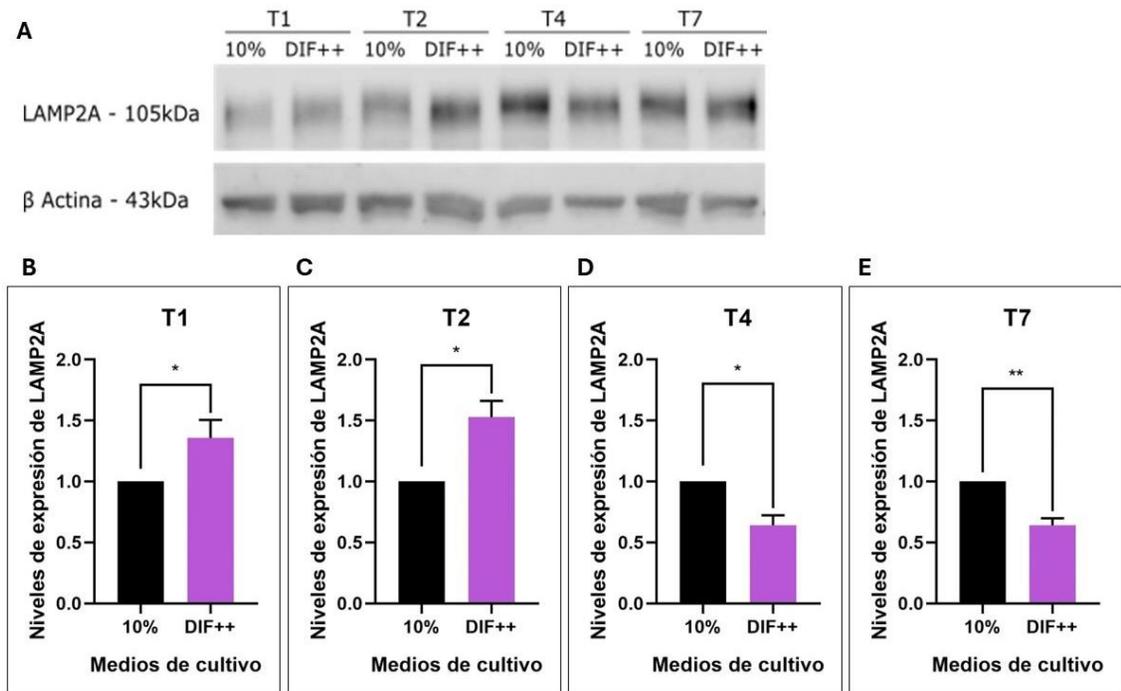


Figura 16. Niveles de expresión de LAMP2A en tiempos tempranos de la diferenciación de hDPSCs. (A) Imagen representativa de western blot que muestra los niveles de expresión de la proteína LAMP2A en los primeros 7 días de diferenciación de hDPSCs. (B), (C), (D) y (E) Cuantificación de la expresión relativa de la proteína LAMP2A en los días 1, 2, 4 y 7 (T1, T2, T4 y T7 respectivamente). Los resultados corresponden a un n=5. Se utilizó test de student pareado. ns: no significativo; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$.

5.3. Impacto de la reducción de la expresión de la proteína LAMP2A en el proceso de diferenciación de hDPSCs.

Está descrito que la reducción de los niveles de la proteína LAMP2A, disminuye la actividad de CMA (Patel & Cuervo, 2015). Por lo tanto, para estudiar si la actividad de CMA es necesaria para la diferenciación de hDPSCs hacia odontoblastos, se propuso crear una línea celular de hDPSCs que tuviese bajos niveles de LAMP2A. Para ello, se produjeron partículas lentivirales que permiten la expresión de un shRNA específico para el mRNA humano del gen *lamp2a*.

Infección lentiviral de células hDPSCs con shRNA para LAMP2A

En el laboratorio se generaron las partículas lentivirales conteniendo el plásmido pLVX shRNA lamp2a. Este plásmido, además del shRNA lamp2a, expresa la proteína fluorescente verde GFP. Por lo tanto, las células infectadas pueden ser fácilmente evidenciadas al microscopio de fluorescencia. Al evaluar en microscopio de epifluorescencia las células transducidas (Figura 17), se determinó que fue posible obtener una línea celular hDPSCs que exprese establemente la proteína fluorescente GFP (Figura 17B). Al evaluar la eficiencia de transducción, contando las células positivas para GFP respecto de las células totales, se determinó que la nueva línea creada (hDPSCs-shlamp2a) expresa la proteína fluorescente GFP en un porcentaje >90%. Posteriormente, se procedió a evaluar si la línea hDPSCs-shlamp2a, además de expresar la proteína GFP, tenía niveles reducidos de la proteína LAMP2A.

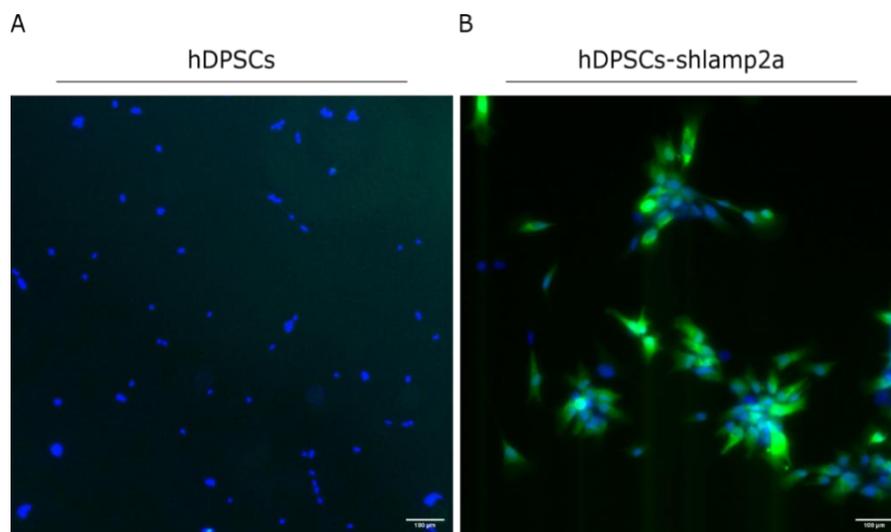


Figura 17. Epifluorescencia de línea celular. (A) hDPSCs y (B) hDPSCs-shlamp2a. Microscopía fluorescente de células hDPSCs control (hDPSCs) y con niveles reducidos de la proteína LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a), que expresan la proteína fluorescente GFP (verde). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Fotografías tomadas en 40X, microscopio de epifluorescencia invertido Eclipse Ti-s. Barra de escala = 100 μ m.

Caracterización de la eficiencia de shRNA contra lamp2a en la línea hDPSCs-shlamp2a.

Para comprobar la eficiencia del shRNA lamp2a que expresa la línea hDPSCs-shlamp2a, se realizó un western blot utilizando un anticuerpo específico para LAMP2A (Figura 17A). Pudo determinarse que el shRNA lamp2a funcionó correctamente ya que la línea hDPSCs-shlamp2a posee al menos un 50% de reducción en la expresión de LAMP2A respecto de la línea control (hDPSCs) (Figura 17B). Por lo tanto, la línea hDPSCs-shlamp2a puede ser considerada como una línea que posee baja actividad de CMA.

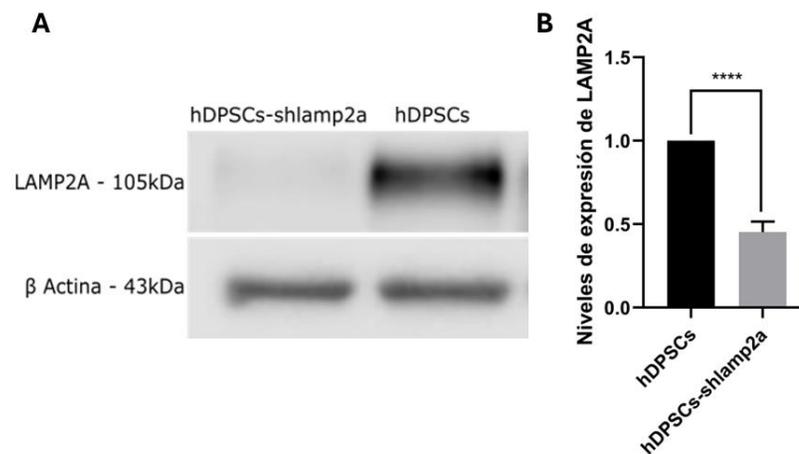


Figura 18. Caracterización de la eficacia de shRNA contra LAMP2A en hDPSCs. Células transducidas con lentivirus que porta un vector que expresa un shRNA contra mRNA de hDPSCs. **(A)** Imagen representativa de western blot que muestra los niveles de expresión de la proteína LAMP2A en la línea celular con disminución de la expresión de la proteína LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a) y en control (hDPSCs). **(B)** Cuantificación de la expresión relativa de la proteína LAMP2A. Los resultados corresponden a un n=5. Se utilizó test de ANOVA de 2 vías con la prueba de múltiples comparaciones de Tukey. ****: p<0,0001.

5.3.1. Caracterización cualitativa de la diferenciación de la línea celular con baja expresión de la proteína LAMP2A.

Cultivo y diferenciación de hDPSCs y hDPSCs-shlamp2a

Una vez confirmado que los shRNA efectivamente reducen los niveles proteicos de la proteína LAMP2A, se indujo el proceso de diferenciación a tiempos T7, T14 y T21 de células hDPSCs control y de células hDPSCs-shlamp2a utilizando el medio de diferenciación completo (DIF++). Posteriormente se procedió a analizar los depósitos de Ca^{2+} de cada línea mediante la tinción alizarin red. Para este experimento se lograron obtener dos replicados independientes, uno cuyo proceso de diferenciación estaba completo (T7, T14 y T21) y otro más corto, hasta el día 14 (T7, T14). Esto último debido a que las células perdieron la adherencia producto de la mala calidad de las placas de cultivo utilizadas en ese experimento. Como resultado de estos resultados independientes se obtuvo que la deposición de Ca^{2+} fue menor en las células hDPSCs con niveles reducidos de la proteína LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a), comparado con células hDPSCs control. Se puede ver cómo, a través de los días, a lo largo del proceso de diferenciación, la tinción demuestra la formación de mayor cantidad de nódulos de calcificación en las muestras de la línea control, respecto a la línea hDPSCs-shlamp2a diferenciada (Figura 19A y Figura 19B).

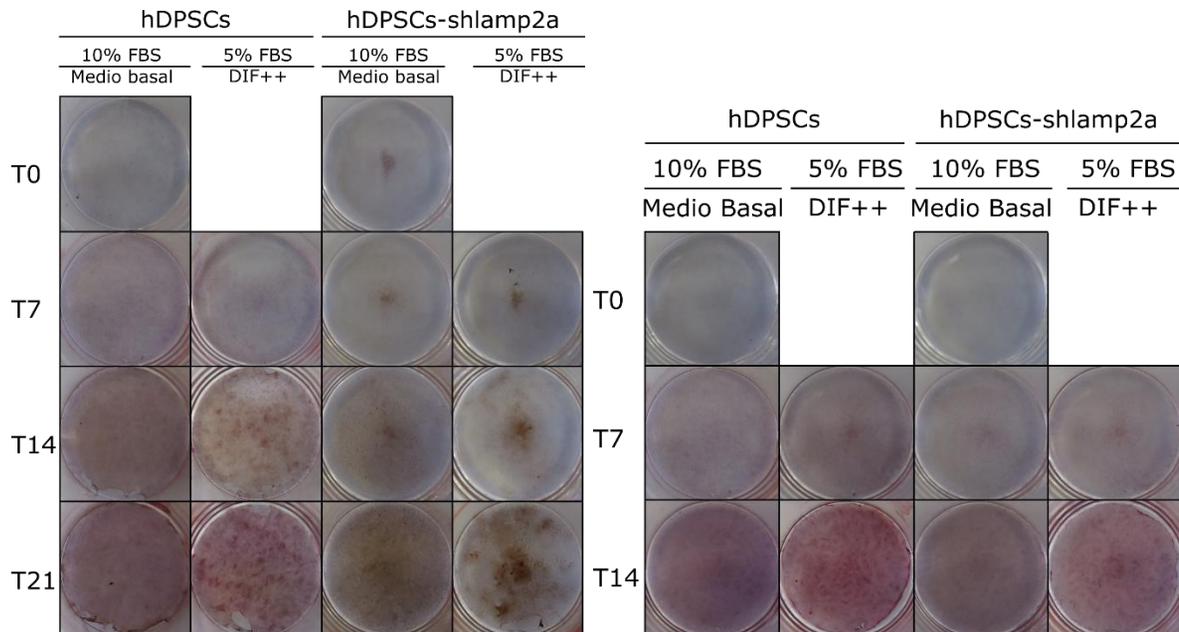


Figura 19. Evaluación de la deposición de calcio mediante tinción con alizarin red en línea celular con niveles reducidos de la proteína LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a) y línea hDPSCs control. (A) en 21 días de diferenciación y (B) en 14 días de diferenciación en dos medios de cultivo i) como control, medio α -MEM suplementado con 10% v/v FBS (Medio basal) y ii) medio de diferenciación (α -MEM suplementado al 5% v/v FBS, ácido ascórbico (50 μ g/mL), β -glicerofosfato (10mM), dexametasona (0,1 μ M) y TGF- β (10 ng/mL)) (DIF++). Mediante tinción con alizarin red, se observan los depósitos ricos en Ca^{2+} de la línea hDPSCs-shlamp2a y el línea control a lo largo del proceso de diferenciación (T0, T7, T14 T21 correspondientes a los días 0, 7, 14 y 21 respectivamente). La tinción demuestra la menor cantidad de nódulos de calcificación en las muestras diferenciadas. n=3. Figura elaborada con Inkscape.

5.4. Impacto de la sobreexpresión de la proteína LAMP2A en el proceso de diferenciación de hDPSCs.

La regulación positiva de CMA se puede lograr genéticamente mediante la sobreexpresión de LAMP2A (Patel & Cuervo, 2015). Por lo tanto, el objetivo fue crear una línea celular hDPSCs que exprese altos niveles de la proteína LAMP2A mediante la transfección con el plásmido pCMVG Entry MyC flag lamp2a humana que permite la sobreexpresión la proteína LAMP2A.

Transfección de células hDPSCs con plásmido pCMVG Entry MyC flag lamp2a humana utilizando el reactivo Lipofectamina™ 2000

La transfección con Lipofectamina 2000 es un método utilizado en biología molecular y celular para introducir moléculas de ácidos nucleicos (como ADN plasmídico, RNA mensajero, RNA interferente, etc.) en células vivas. Lipofectamina 2000 es un agente de transfección basado en liposomas catiónicos para preparar complejos autoensamblados con ADN plasmídico que contenía el gen de interés.

Después de realizar la transfección con el plásmido pCMVG Entry MyC flag lamp2a humana, las células fueron incubadas con G418 hasta que la mayoría de ellas (no transfectadas) murieron producto del antibiótico. Algunas células sobrevivieron (las transfectadas), lograron generar colonias, y crecer. La línea celular obtenida se denominó hDPSCs-MyC Entry lamp2a. Sin embargo, esta línea celular no sobrevivió a tiempos largos de cultivo. Este experimento fue realizado en 2 ocasiones y en ambos replicados ocurrió lo mismo. Por esta razón, no se logró realizar experimentos concluyentes. A pesar de ello, pudieron realizarse algunos experimentos preliminares de inmunofluorescencia y algunas observaciones. En primer lugar, pudo determinarse cualitativamente que las células hDPSCs-MyC Entry lamp2a poseían mayor intensidad de fluorescencia, al utilizar un anticuerpo anti LAMP2A, que las células control y las células hDPSCs-shlamp2a. Esto último sería un indicativo de que la línea creada efectivamente tenía una mayor expresión de LAMP2A. Además, se observó que la línea hDPSCs-MyC Entry lamp2a poseía una forma más alargada que las células control y las células con expresión disminuida de LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a).

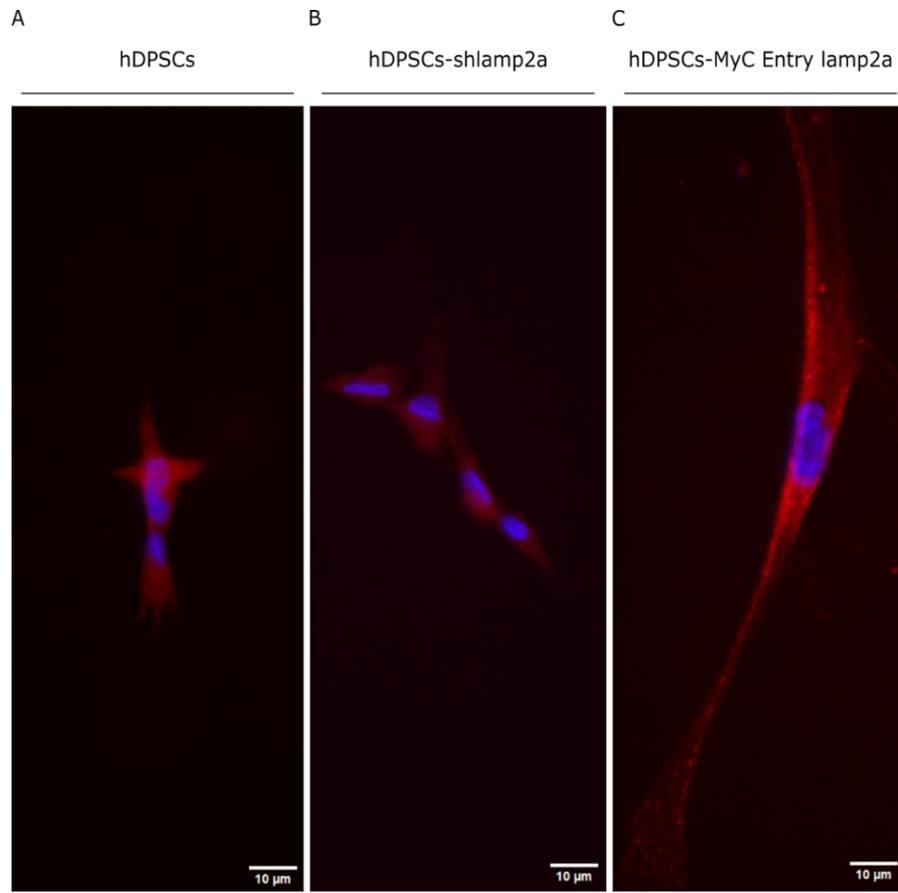


Figura 20. Microscopía fluorescente de células hDPSCs. (A) control (hDPSCs), (B) con niveles disminuidos de proteína LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a) y (C) con sobreexpresión de proteína LAMP2A (hDPSCs-MyC Entry lamp2a). La proteína LAMP2A fue visualizada utilizando un anticuerpo anti LAMP2A. Las tres líneas fueron sembradas bajo las mismas condiciones. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Fotografías tomadas al 40X. Barra de escala = 10 μ M. n=1.

Debido a que una célula con morfología más alargada puede representar un odontoblasto con un proceso odontoblástico bien definido (Gómez de Ferraris y cols., 2002; Bleicher y cols., 2015; Park y cols., 2021), se procedió a cuantificar la cantidad de células con fenotipo alargado tanto en las líneas control, hDPSCs-shlamp2a y hDPSCs-MyC Entry lamp2a.

En la evaluación cualitativa y cuantitativa de las tres líneas celulares se determinó que línea que sobreexpresa la proteína LAMP2A (hDPSCs-MyC Entry lamp2a) presentó prolongaciones significativamente más largas, comparada con las células control y las shlamp2a.

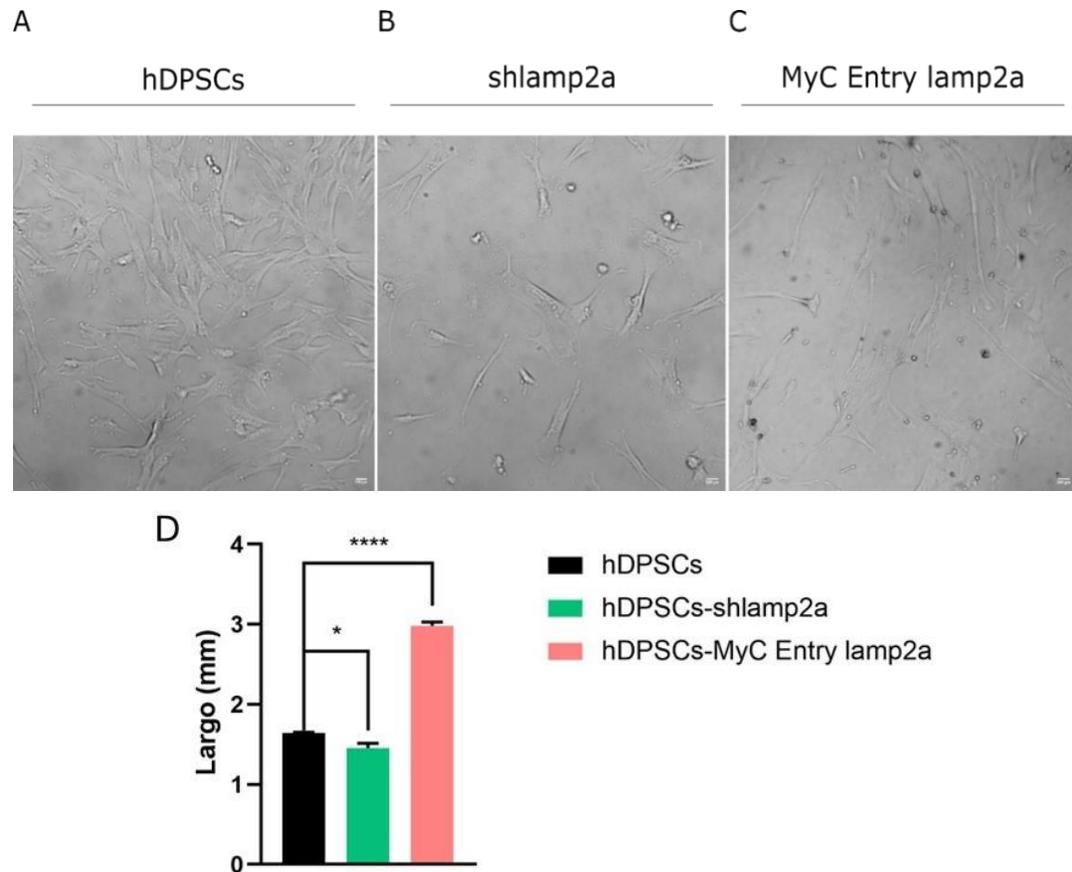


Figura 21. Imágenes representativas de placas de cultivo observadas al microscopio óptico. Veinte mil (20.000) células sembradas en medio basal 10% FBS, a los 7 días. **(A)** hDPSCs (control), **(B)** hDPSCs con niveles disminuidos de proteína LAMP2A (shlamp2a) y **(C)** hDPSCs con sobreexpresión de los niveles proteicos de LAMP2A (MyC Entry lamp2a). **(D)** Cuantificación del largo celular en mm² utilizando el programa ImageJ (Software). Los resultados corresponden a la cuantificación del largo celular de 6 campos ópticos de un n=2. Se utilizó test de ANOVA de 1 vía con la prueba de múltiples comparaciones de Dunnet. *: p<0,05; ****: p<0,0001. Se utilizó un microscopio óptico conectado a una computadora y una cámara de dispositivo de carga acoplada para tomar imágenes de las muestras, en 100X. Barra de escala = 200 μm.

6. DISCUSIÓN

Células altamente especializadas como los ameloblastos, cementoblastos y odontoblastos, son responsables de la creación de tres tejidos mineralizados: esmalte, cemento y la dentina, respectivamente (Simancas-Escorcía, 2019). Sin embargo, únicamente las células odontoblásticas son capaces de mantenerse vivas durante la vida dental y de regenerarse a partir de células madre localizadas en la pulpa dental (Bleicher y cols., 2015; Simancas-Escorcía, 2019). Estas características le conceden a los odontoblastos un interés particular en la dentinogénesis (Simancas-Escorcía, 2019) y hacen que su proceso de diferenciación sea objeto de estudio.

Por otro lado, la autofagia es un proceso intracelular altamente conservado en eucariotas (Dice, 2007; Patel & Cuervo, 2015) en el que diversos componentes celulares como proteínas, orgánulos o componentes citoplasmáticos son degradados por el lisosoma (Ravikumar y cols., 2010; Bhat y cols., 2017). Ha sido involucrada en la diferenciación de odontoblastos y la morfogénesis de los dientes durante el desarrollo (Park y cols., 2020). Se han descrito tres tipos diferentes de vías autofágicas, que se diferencian en la manera en que el material intracelular (sustrato) que será degradado, llega al lisosoma: i) macroautofagia, ii) CMA y iii) eMi (Kaushik & Cuervo, 2018) (Figura 5). De estos tres tipos de autofagia, solo la macroautofagia ha sido estudiada durante el proceso de diferenciación de odontoblastos (Couve & Schmachtenberg, 2011). Por otro lado, si bien se ha observado que la actividad de CMA está involucrada en el proceso de diferenciación de algunos linajes de células madre (HSC y ES 3D) (Xu y cols., 2020; Dong y cols., 2021), no existe evidencia respecto de si la CMA participa en la regulación del proceso de diferenciación de los odontoblastos. Por lo tanto, para ampliar el conocimiento en el proceso de diferenciación de los odontoblastos, en esta tesis se estudió si la actividad de la CMA tiene participación en el control de este proceso.

En condiciones de cultivo, la diferenciación de MSC hacia linaje osteogénico ha sido ampliamente probada. Los suplementos más comunes incluyen, ácido

ascórbico (requerido para la hidroxilación de residuos de lisina y prolina del colágeno y los b-gli-cerofosfatos), β -glicerofosfato y dexametasona (glucocorticoide sintético que induce efectos transcripcionales de la BMP) (Carrillo y cols., 2015). El ácido ascórbico facilita la diferenciación osteogénica al aumentar la secreción de colágeno tipo 1, mientras que el β -glicerofosfato facilita la diferenciación osteogénica al actuar como sustrato de fosfato orgánico para la formación de hidroxiapatita (Lee y cols., 2003; Langenbach & Handschel, 2013) y favorecer la fosforilación de quinasas reguladas por señales extracelulares 1, 2 (ERK por sus siglas en inglés *Extracellular signal-Regulated Kinases*) (Langenbach & Handschel, 2013). En cuanto a la dexametasona, esta regula la diferenciación osteoblástica mediante el reclutamiento de componentes centrales de la maquinaria transcripcional (Langenbach & Handschel, 2013).

En la literatura existe variabilidad en cuanto las condiciones de cultivo y administración de factores que permiten inducir la diferenciación hacia la línea odontoblástica (Carrillo y cols., 2015). En este sentido, se ha reportado que variaciones en la concentración de dexametasona pueden afectar negativamente la diferenciación de las células madre, y que el ácido ascórbico puede arrojar resultados diversos producto de su inestabilidad en condiciones estándar de cultivo (Carrillo y cols., 2015). Además, la liberación controlada de dexametasona da como resultado un potencial inductor de diferenciación odontogénica de células madre de la papila apical (SCAP) (Shrestha y cols., 2016).

Adicionalmente, según Couble y cols., la adición de β -glicerofosfato a medios de cultivo induce características de odontoblastos en células pulpares de explantes de dientes humanos (Couble y cols., 2000).

Finalmente, otros estudios han demostrado que TGF- β 1 influye en la diferenciación y en el comportamiento secretor de odontoblastos (Smith y cols., 1995). Además, que TGF- β 1 es capaz de promover la diferenciación de células similares a odontoblastos en papilas dentales de ratón aisladas cultivadas *in vitro*

(Begue-Kirn y cols., 1994), induciendo la polarización y/o diferenciación funcional de preodontoblastos (Unda y cols., 2001).

Para realizar esta tesis, se procedió a caracterizar distintos medios de diferenciación de odontoblastos (Tabla 3). En primera instancia, se encontró que la diferenciación más eficaz, definida por tinción con alizarin red, se obtuvo con el medio de diferenciación suplementado con TGF- β (medio de diferenciación DIF++) (Tabla 3 y Figura 10). En cambio, en cuanto a la expresión de proteínas características de diferenciación odontoblástica, DMP1 y DSPP, la diferenciación más eficaz se obtuvo con medio de diferenciación sin suplemento de dexametasona y TGF- β (medio DIF) (Figura 11 y Figura 12).

Nuestros resultados señalan una disminución de la expresión de estos marcadores en la etapa tardía del proceso de diferenciación (tiempos largos) (Figura 11 y Figura 12), lo que no concuerda con Babaki y Matin, que plantean que DSPP y DMP1 se expresan significativamente en odontoblastos maduros durante la etapa de mineralización (Badaki & Matin, 2020). En base a esto, nos planteamos evaluar la expresión de los marcadores DMP1 y DSPP, en la etapa temprana del proceso de diferenciación (tiempos cortos). En nuestro estudio DMP1 y DSPP aumentaron en los tiempos tempranos (T1 y T2) (Figura 13 y Figura 14), por lo que estos resultados obtenidos en cuanto a los tiempos cortos y largos del proceso de diferenciación, concuerdan con lo evidenciado por Park y cols., que demostraron que la DSP, marcador representativo de diferenciación y mineralización de odontoblastos, aumenta desde el día 0 al 7 (etapa temprana de diferenciación) y luego disminuye progresivamente hasta el día 21 (etapa tardía de diferenciación), debilitándose significativamente su expresión alrededor del día 21 (Park y cols., 2021).

Por otro lado, TGF- β influye en la diferenciación y en el comportamiento secretor de odontoblastos (Smith y cols., 1995). Algunos investigadores han sugerido que la transcripción de TGF- β 1 solo puede detectarse en odontoblastos diferenciados y no en progenitores de odontoblastos (Babaki & Matin, 2020). Por

tanto, podríamos pensar que el peak de diferenciación que se observa en los marcadores de etapas tempranas del proceso, podría estar relacionado con la suplementación anticipada (desde tiempos tempranos) de este factor, que como plantean Babaki y Matin, las células expresan por sí solas en odontoblastos ya diferenciados (Babaki & Matin, 2020). De modo que la suplementación anticipada, provocaría una inducción temprana del proceso, para luego disminuir, lo que creemos puede atribuirse a algún mecanismo celular contraproducente que estaría afectando el comportamiento secretor de los preodontoblastos.

Posteriormente, para estudiar si la actividad de CMA está involucrada en el proceso de diferenciación de hDPSCs hacia odontoblastos, se evaluaron los niveles de expresión de la proteína LAMP2A en etapas iniciales y tardías del proceso. Los resultados mostraron un peak en los niveles de expresión de la proteína LAMP2A en los días 1 y 2 (Figura 16), seguidos de una disminución al día 4 y 7 del estímulo de diferenciación, que se recupera al día 21, cuando el odontoblasto estaría maduro (Figura 15). Interesantemente, el incremento de LAMP2A a tiempos tempranos, coincide con el aumento en los niveles proteicos de DMP1 y DSPP, también a tiempos cortos de la diferenciación (Figura 13 y Figura 14).

En la actividad de CMA, la proteína LAMP2A es el componente limitante, por lo que altos niveles de LAMP2A se relacionan con una elevada actividad de CMA y viceversa (Patel & Cuervo, 2015). Por otro lado, Park y cols. evaluaron los niveles de expresión de DSP y DMP1, y concluyeron que al inhibir la actividad macroautofagia en estado de diferenciación, los niveles de expresión de DSP y DMP1 disminuyen (Park y cols., 2021).

En base a lo mencionado previamente, planteamos que CMA estaría aumentando al inicio de la diferenciación, teniendo su peak en las etapas tempranas de la diferenciación, específicamente las primeras 48 horas (T1 y T2) (Figura 16) y posteriormente, esta actividad tiende a disminuir al pasar los días desde la inducción, sin embargo, esto último no es concluyente dado que no fue estadísticamente significativo (Figura 15).

Tras evidenciar que la actividad de CMA está involucrada en el proceso de diferenciación de hDPSCs hacia odontoblastos, quisimos estudiar el comportamiento de CMA en dicho proceso, por lo que se crearon dos líneas celulares, una con niveles disminuidos de la proteína LAMP2A (hDPSCs-shlamp2a) y la otra, con sobreexpresión de los niveles de LAMP2A (hDPSCs-Entry MyC lamp2a), pues está descrito que la sobreexpresión y la reducción de los niveles de la proteína LAMP2A aumenta y disminuye, respectivamente, la actividad de CMA (Patel & Cuervo, 2015).

Luego del análisis cualitativo de la diferenciación de la línea hDPSCs-shlamp2a, se evidenció menor deposición mineral en esta línea respecto al control hDPSCs (Figura 19), por tanto, obtuvimos que una reducción de los niveles de expresión de la proteína LAMP2A condujo a una disminución y retardo del proceso de diferenciación, lo que se asemeja al estudio en macroautofagia de Park y cols., 2020, donde la inhibición de esta en gérmenes de dientes de ratón contribuye a la pérdida de la polarización de los odontoblastos y a una mala diferenciación, lo que eventualmente conduce a una morfología dental alterada (Park y cols., 2020). Además, concuerda con los hallazgos de Xu y cols., 2020, que demostraron que una baja actividad de CMA mantiene la pluripotencialidad de células ES 3D y evita su transición a un estado diferenciado (Xu y cols., 2020). En resumen, al disminuir la actividad de CMA, aparentemente hay un retraso en la diferenciación, al menos evidenciado por los depósitos de Ca^{2+} .

Varios tipos de células se someten a un proceso de polarización permanente para lograr sus destinos celulares previstos, incluidos los odontoblastos, que se polarizan para cumplir sus funciones destinadas (Chang y cols., 2019). La polarización de los odontoblastos es un requisito previo y un paso fundamental para el desarrollo dental, la formación de dentina y la regeneración del tejido dentario (Chang y cols., 2019). A medida que se diferencian del mesénquima dental, los preodontoblastos se polarizan y forman un alargamiento citoplasmático llamado proceso odontoblástico (Couple y cols., 2000; Park y cols., 2021). A pesar de las dificultades presentadas en la creación de una línea estable que sobreexpresara la

proteína LAMP2A, los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia y microscopía de campo claro indicarían que la sobreexpresión de LAMP2A podría desencadenar una diferenciación temprana, es por esto, que incluso sin estímulo de diferenciación, a los 7 días de cultivo, las células exhibieron una extensión celular, encontrándose muy alargadas con su proceso odontoblástico formado. Estos resultados, nuevamente se relacionan con el estudio de Xu y cols., en el que la regulación genética de LAMP2A parece suprimir la pluripotencia de la línea celular ES 3D, promoviendo su diferenciación (Xu y cols., 2020).

Park y cols., plantearon que CPNE7, un factor derivado del epitelio dental, que se ha informado que promueve la diferenciación odontogénica y la formación fisiológica de dentina (Oh y cols., 2015), podría estar relacionado con el alargamiento del proceso de odontoblastos mediado por autofagia y la formación fisiológica de dentina (Park y cols., 2021). Se ha reportado que CPNE7 se transloca al núcleo, donde regula la expresión de DSPP (Seo y cols., 2017; Park y cols., 2019). Además, Park y cols. demostraron que, CPNE7 mejora el potencial de mineralización de los odontoblastos maduros al inducir la macroautofagia (Park y cols., 2019). Dado lo expuesto, al consultar el sitio web KFERQ *finder* V0.8 (Anexo 3) que analiza diferentes proteínas que se espera que sean reguladas por CMA durante la diferenciación de odontoblastos, encontramos que CPNE7 posee motivos similares a KFERQ, lo que impulsaría la degradación de la proteína a través de CMA, por lo que CPNE7 también podría inducir la diferenciación mediante CMA.

La formación y elongación del proceso odontoblástico son esenciales para la formación fisiológica de la dentina e indicadores de que el odontoblasto se encuentra en estado maduro (Chang y cols., 2019; Park y cols., 2021). Por lo tanto, el mecanismo de polarización de los odontoblastos es fundamental para la regeneración funcional de la dentina. Sin embargo, aparte de las descripciones de la morfología celular, existen pocas publicaciones sobre la polaridad de los odontoblastos (Chang y cols., 2019).

En resumen, nuestros resultados sugieren que la disminución de los niveles de expresión de la proteína LAMP2A (reducida actividad de CMA) retarda el proceso de diferenciación y odontogénesis, mientras que la sobreexpresión de los niveles de esta (elevada actividad de CMA) podría desencadenar una diferenciación temprana.

Finalmente, basados en los datos expuestos, planteamos que i) los niveles de actividad de CMA aumentan al inicio de la diferenciación, para luego disminuir a medida que avanza el proceso, ii) una inhibición de CMA retarda el proceso de diferenciación, mientras que iii) su sobreexpresión lo aceleraría.

Aunque nuestros resultados deben ser confirmados con otras técnicas, lo estudiado en este trabajo es avance en caracterizar el papel de la CMA en el proceso de diferenciación de hDPSCs hacia odontoblastos. Aunque se necesita más investigación para comprender completamente la interacción entre la autofagia y la diferenciación de odontoblastos, existe un potencial significativo para que la autofagia influya en este proceso crucial para el desarrollo y la salud dental.

Por tanto, la modulación adecuada de la actividad autofágica es esencial para la diferenciación de odontoblastos y la formación fisiológica de dentina (Park y cols., 2021).

6.1. RELEVANCIA CLÍNICA

Existen 84 ensayos clínicos donde se estudia la autofagia como diana terapéutica (Home-Clinicaltrials.gov), para, el cáncer (71,22%), trastornos metabólicos y cardiovasculares (12,95%), envejecimiento y trastornos neuromusculares (5,76 %), inflamación y enfermedades virales (3,6%), y otros (6,47%). A pesar de que la autofagia es de consideración en la literatura biomédica, ha sido poco estudiada en aspectos dentales (Bhat y cols., 2017), como en el proceso de reparación dentinopulpar y diferenciación de odontoblastos. Adicionalmente, aunque algunos grupos de investigación han logrado avances en comprender el papel de la macroautofagia en la diferenciación de odontoblastos, aun no se sabe nada sobre las implicaciones de la CMA en este proceso de diferenciación. Actualmente, al igual que la macroautofagia, la CMA se encuentra en el centro de los enfoques terapéuticos. Se están aplicando estrategias basadas en modificaciones genéticas o en el uso de compuestos químicos, para inhibir o potenciar la actividad de la CMA, con el fin de corregir o mejorar un problema biomédico. Por lo tanto, la caracterización de CMA en la diferenciación de odontoblastos contribuye a una mayor comprensión del mecanismo molecular de este proceso biológico y, en consecuencia, con miras al futuro, al tratamiento de los aspectos dentales relacionados con la diferenciación de odontoblastos.

Nuestros resultados contribuirían, entre otras cosas, a crear nuevas estrategias de reparación dentinopulpar basadas en el uso de células madre para la recuperación de un diente lesionado, pudiendo evitar la pérdida dentaria producto de la actividad de caries, e incluso tratamientos invasivos como el tratamiento endodóntico frente al compromiso pulpar. En otras palabras, CMA, al estar relacionada con la diferenciación, se proyecta como un nuevo hito en el estudio del desarrollo de la dentinogénesis.

6.2. PROYECCIONES

En cuanto a los mecanismos moleculares a través de los cuales CMA pudiese regular la diferenciación de odontoblastos, se conoce que una regulación cruzada entre el metabolismo de la glucosa y el metabolismo de los ácidos grasos es necesaria para mantener un estado de pluripotencia o transitar hacia un fenotipo de diferenciación en las células madre (Tasset & Cuervo, 2016).

Informes conectan la CMA con las enzimas isocitrato deshidrogenasas 1 y 2 (IDH1, IDH2) (Xu y cols., 2020). Estudios previos han propuesto que una actividad de CMA elevada induce la diferenciación de las células pluripotentes HSC y ES 3D, en parte, al degradar las enzimas IDH1 e IDH2. En este sentido, se demostró que la diferenciación de HSC y ES 3D estaba finalmente controlada por una regulación del metabolismo de ácidos grasos dependiente de CMA. Específicamente, para permitir un estado diferenciado de las células ES 3D, se requirió de la actividad de CMA para degradar IDH1 e IDH2, manteniendo así niveles bajos de alfa-KG (alfa cetoglutarico) (Xu y cols., 2020).

Nosotros encontramos motivos KFERQ en la secuencia de aminoácidos de las enzimas IDH1, IDH2 y CPNE7 (Anexo 3), confirmando que estas enzimas podrían degradarse a través de CMA. Por lo tanto, la actividad de CMA podría regular los niveles de IDH1 e IDH2 y en consecuencia la diferenciación de odontoblastos y la formación de dentina.

A futuro debemos estudiar si es necesaria la actividad de CMA para la diferenciación de hDPSCs en odontoblastos funcionales, a través de la regulación de los niveles de proteínas que sean sustrato de CMA, como IDH1 e IDH2. De ser así CMA controlaría la diferenciación hacia odontoblastos regulando los niveles de proteínas como las IDH1 e IDH2.

7. CONCLUSIONES

La caracterización de la diferenciación de las células mesenquimáticas de pulpa dental humana mostró que la CMA es importante para este proceso, siendo la proteína LAMP2A un factor limitante. Nuestros resultados indican que la actividad de CMA debe ser cuidadosamente modulada, pues su inhibición retrasa la diferenciación, mientras que su sobreexpresión puede acelerarla, potencialmente conduciendo a la muerte celular.

En resumen, la CMA es necesaria para la correcta diferenciación de los odontoblastos y, por ende, para la formación de la dentina. Sin embargo, se requiere más investigación para comprender completamente la interacción entre la autofagia y la diferenciación de odontoblastos. La posibilidad de regular la CMA ofrece un potencial significativo para influir en este proceso, lo que podría tener importantes implicaciones para la formación de dentina frente a condiciones patológicas, como por ejemplo una lesión cariosa.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albornoz A, Sequeida A, Rodríguez C, Budini M. Chaperone-mediated autophagy-mechanisms and disease role. Rothermel BA, Diwan A, editores. *Autophagy in Health and Disease*. San Diego, CA, Estados Unidos de América: Elsevier. 2022;p.399–412.
- Atari M, Caballe-Serrano J, Recio C, Giner-Delgado C, Martinez Sarra E y cols. The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D. *Bone*. 2012;50(4):930-941.
- Babaki D, Matin MM. Odontoblast-like cytodifferentiation of dental stem cells: A review. *Iranian Endodontic Journal*. 2020;15(2):79.
- Begue-Kirn C, Smith AJ, Loriot M, Kupferle C, Ruch JV y cols. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1994;38(3).
- Bhat S, Babu SG, Madi M, Bhat SK, Madiyal A y cols. Autophagy in dentistry: A review article. *Gulhane Medical Journal*. 2017;59:p.60-62.
- Bleicher F, Richard B, Thivichon-Prince B, Farges J-C, Carrouel F. Odontoblasts and Dentin Formation. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, S.S. Ajaykumar Vishwakarma, Paul Sharpe, Murugan Ramalingam, editores. Elsevier. 2015;p.379–95.
- Brizuela C, Galleguillos S, Carrión F, Cabrera C, Luz P y cols. Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano. *Int J Morphol*. 2013;31(2):739–46.
- Carrillo-Mendigaño N, García-Robayo DA, Otero-Mendoza LM. Aislamiento y capacidad de osteodiferenciación de las células madre provenientes del ligamento periodontal y pulpa dental. *CES Odontol*. 2015;28(2):20–34.
- Chang B, Svoboda KKH, Liu X. Cell polarization: From epithelial cells to odontoblasts. *Eur J Cell Biol*. 2019;98(1):1–11.
- Chen F-M, Sun H-H, Lu H y Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*. 2012;33(27):6320-44.

- Chen X, He Y, Lu F. Autophagy in stem cell biology: A perspective on stem cell self-renewal and differentiation. *Stem Cells Int.* 2018;2018:1–12.
- Couble M-L, Farges J-C, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M y cols. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int.* 2000;66(2):129–38.
- Couve E, Schmachtenberg O. Autophagic activity and aging in human odontoblasts. *J Dent Res.* 2011;90(4):p.523-8.
- Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The Amazing Odontoblast. *J Dent Res.* 2013;92:765–772.
- Cuervo AM, Hu W, Lim B, Dice JF. IκB is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. *Mol Biol Cell.* 1998;9(8):1995–2010.
- Cuervo AM, Dice JF. Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic.* 2000;1(7):570–83.
- Dice JF. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(8):305–9.
- Dice JF. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy.* 2007;3(4):p.295-9.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F y cols. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315–7.
- Dong S, Wang Q, Kao Y-R, Diaz A, Tasset I y cols. Chaperone-mediated autophagy sustains haematopoietic stem-cell function. *Nature.* 2021;591(7848):p.117-123.
- D'souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T y cols. Gene expression patterns of Murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res.* 1997;12(12):2040–9.
- Felthaus O, Viale-Bouroncle S, Driemel O, Reichert T, Schmalz G y cols. Transcription factors TP53 and SP1 and the osteogenic differentiation of dental stem cells. *Differentiation.* 2012;83(1):10-16.

- Feng JQ, Huang H, Lu Y, Ye L, Xie Y y cols. The Dentin Matrix Protein 1 (Dmp1) is Specifically Expressed in Mineralized, but not Soft, Tissues during Development. *J Dent Res*. 2003;82(10):776–80.
- Finn PF, Mesires NT, Vine M, Dice JF. Effects of small molecules on chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 2005;1(3):141–5.
- Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A, Sánchez Quevedo MDC, Carranza M, Arriaga A. Histología y embriología bucodental. *Journal of Chemical Information and Modeling*. Editorial Médica Panamericana. 2002;p482.
- Gregory CA, Grady Gunn W, Peister A, Prockop DJ. Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004;329(1):77–84.
- Guo T, Cao G, Liu B, Li Z, Chen W. Cbfa1 hinders autophagy by DSPP upregulation in odontoblast differentiation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019;115(105578):105578.
- Home - Clinicaltrials.gov (internet). Clinicaltrials.gov. Disponible en <https://clinicaltrials.gov>
- Huang G, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
- Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp*. 2012;(69).
- Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(6):p.365-381.
- KFERQ finder V0.8 (internet). Einsteinmed.edu. Disponible en <https://rshine.einsteinmed.edu>
- Koh B, Sulaiman N, Ismadi SNSW, Ramli R, Yunus SSM y cols. Mesenchymal stem cells: A comprehensive methods for odontoblastic induction. *Biol Proced Online*. 2021;23(1):p.18.
- Lacruz RS, Nanci A, White SN. Biological controls of dentin mineralization and dentinogenesis. *Journal of Cellular Physiology*. 2012;227(2):709–17.

- Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(5).
- Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J y cols. Biological alchemy: Engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 2003;50(6):610–7.
- Li L, Zhu Y-Q, Jiang L, Peng W. Increased autophagic activity in senescent human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2012;45(12):p.1074-9.
- Liu Y, Chen L, Gong Q, Jiang H, Huang Y. Hypoxia-induced mitophagy regulates proliferation, migration and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells through FUN14 domain-containing 1. *Int J Mol Med.* 2022;49(5).
- Macdougall M. Reflections on dentin matrix protein 1 (DMP1). *European Journal of Oral Sciences.* 2003;111(3):233–7.
- Marei MK, El Backly RM. Dental Mesenchymal Stem Cell-Based Translational Regenerative Dentistry: From Artificial to Biological Replacement. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6:p.49.
- Mitsiadis TA, De Bari C, About I. Apoptosis in developmental and repair-related human tooth remodeling: A view from the inside. *Exp Cell Res.* 2008;314(4):869–77.
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* 2004;15(3):1101–11.
- Murray PE, Smith AJ, Garcia-Godoy F, Lumley PJ. Comparison of operative procedure variables on pulpal viability in an ex vivo model. *Int Endod J.* 2008;41(5):389–400.
- Nanci A. Ten cate's oral histology - Pageburst on VitalSource: Development, structure, and function. Elsevier Health Sciences. 2007.
- Narayanan K, Ramachandran A. Dentin sialoprotein (DSP) and dentin phosphoprotein (DPP) in dentinogenesis. *Connective Tissue Research.* 2006;47(3):141–5.

- Oku M, Sakai Y. Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *Bioessays*. 2018;40(6).
- Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L y cols. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone*. 2002;30(2):377–85.
- Park SY, Cho HS, Chung KH, Lee BN, Kim SH y cols. Inactivation of PI3K/Akt promotes the odontoblastic differentiation and suppresses the stemness with autophagic flux in dental pulp cells. *J Dent Sci*. 2022;17(1):p.145-154.
- Park YH, Lee YS, Seo YM, Seo H, Park JS y cols. Midkine Promotes Odontoblast-like Differentiation and Tertiary Dentin Formation. *J Dent Res*. 2020;99(9):p.1082-1091.
- Park YH, Son C, Seo Y-M, Lee YS, Har A y cols. CPNE7-Induced Autophagy Restores the Physiological Function of Mature Odontoblasts. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:p.655498.
- Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(2):104–33.
- Patel B, Cuervo AM. Methods to study chaperone-mediated autophagy. *Methods*. 2015;75:p.133-40.
- Pei F, Wang HS, Chen Z, Zhang L. Autophagy regulates odontoblast differentiation by suppressing NF- κ B activation in an inflammatory environment. *Cell Death Dis*. 2016;7(3):e2122.
- Phadwal K, Watson A, Simon A. Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(1):89–103.
- Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res*. 2010;51(5):404–17.
- Qin C, D'Souza R, Feng JQ. Dentin matrix protein 1 (DMP1): New and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis. *J Dent Res*. 2007;86(12):1134–41.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M. y cols. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2010;90(4):p.1383-435.

- Salemi S, Yousefi S, Constantinescu MA, Fey MF, Simon H-U. Autophagy is required for self-renewal and differentiation of adult human stem cells. *Cell Res.* 2012;22(2):432–5.
- Salinas CN, Anseth KS. Mesenchymal stem cells for craniofacial tissue regeneration: Designing hydrogel delivery vehicles. *J Dent Res.* 2009;88(8):681–92.
- Schneider JL, Suh Y, Cuervo AM. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab.* 2014;20(3):417–32.
- Shrestha S, Torneck CD, Kishen A. Dentin Conditioning with bioactive molecule releasing nanoparticle system enhances adherence, viability, and differentiation of stem cells from apical papilla. *J Endod.* 2016;42(5):717–23.
- Simancas-Escorcia VH. Fisiopatología de los odontoblastos: una revisión. *Duazary.* 2019;16(3):87-103.
- Simon SRJ, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL y cols. Dentin-pulp complex regeneration: From lab to clinic. *Adv Dent Res.* 2011;23(3):340–5.
- Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV y cols. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1).
- Tasset I, Cuervo AM. Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *FEBS J.* 2016;283(13):p.2403-13.
- Unda FJ, Martin A, Hernandez C, Perez-Nanclares G, Hilario E y cols. FGFs-1 and -2, and TGF beta 1 as inductive signals modulating in vitro odontoblast differentiation. *Adv Dent Res.* 2001;15:34–7.
- Vessoni A, Muotri A, Okamoto O. Autophagy in stem cell maintenance and differentiation. *Stem Cells Dev.* 2012;21(4):513–20.
- Xu Y, Zhang Y, García-Cañaveras JC, Guo L, Kan M y cols. Chaperone-mediated autophagy regulates the pluripotency of embryonic stem cells. *Science.* 2020;369(6502):p.397-403.
- Yang Fuhua, Li Y, Duan H, Wang H, Pei F y cols. Activation of mitophagy in inflamed odontoblasts. *Oral Dis.* 2019;25(6):p.1581-1588.
- Yen A, Yelick P. Dental Tissue Regeneration - A Mini-Review. *Review Gerontol.* 2011;57(1):85–94.

- Zhou Q, Zhao Z, Cheng J, Zhang B, Xu J Huang F y cols. Ibandronato promotes osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells by regulating the expression of microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;404(1):127-132.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I: Aislamiento y caracterización de células madre de hDPSC

Existen criterios mínimos para definir células madre mesenquimales humanas, tanto para investigaciones científicas basadas en experimentación *in vitro*, como para estudios pre-clínicos según The International Society for Cellular Therapy position statement (Dominici y cols., 2006; Salinas & Anseth, 2009; Brizuela y cols., 2013). Dentro de estos criterios podemos mencionar: i) adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo; ii) morfología celular fibroblastoide; iii) expresión de antígenos (marcadores) de superficie específicos, que comprende que más de un 95% de la población celular exprese fenotipo positivo para CD73, CD90 y CD105 y menos de un 3% de la población exprese fenotipo negativo para CD34 (marcador de célula endotelial), CD45 (leucocitario), CD14 y CD11 (marcadores de macrófagos y monocitos), CD79 y CD19 (marcadores de células B) y HLA-DR; iv) capacidad multipotencial de diferenciación hacia linaje osteogénico, condrogénico y odontogénico, bajo condiciones *in vitro* estándar y demostradas con tinción específica (Brizuela y cols., 2013).

En colaboración con el Dr. Fernando Ezquer (Centro de Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina Clínica Alemana Universidad del Desarrollo) quien tiene amplia experiencia en el aislamiento y caracterización de células madre de diferentes tejidos, se obtuvieron terceros molares sanos, de individuos humanos, adultos, bajo consentimiento informado. El aislamiento y cultivo de las células madre de la pulpa dental se realizó siguiendo el protocolo publicado en Karamzadeh y cols., 2012. Luego, se caracterizaron preliminarmente las propiedades de las células hDPSC obtenidas: i) diferentes días después de sembrar las células en plástico adherente ii) vista representativa de la diferenciación indiferenciada, osteogénica o adipogénica de las hDPSC aisladas iii) caracterización inmunofenotípica de las hDPSC mediante citometría de flujo utilizando los marcadores positivos y negativos. n=1 (Figura 22.).

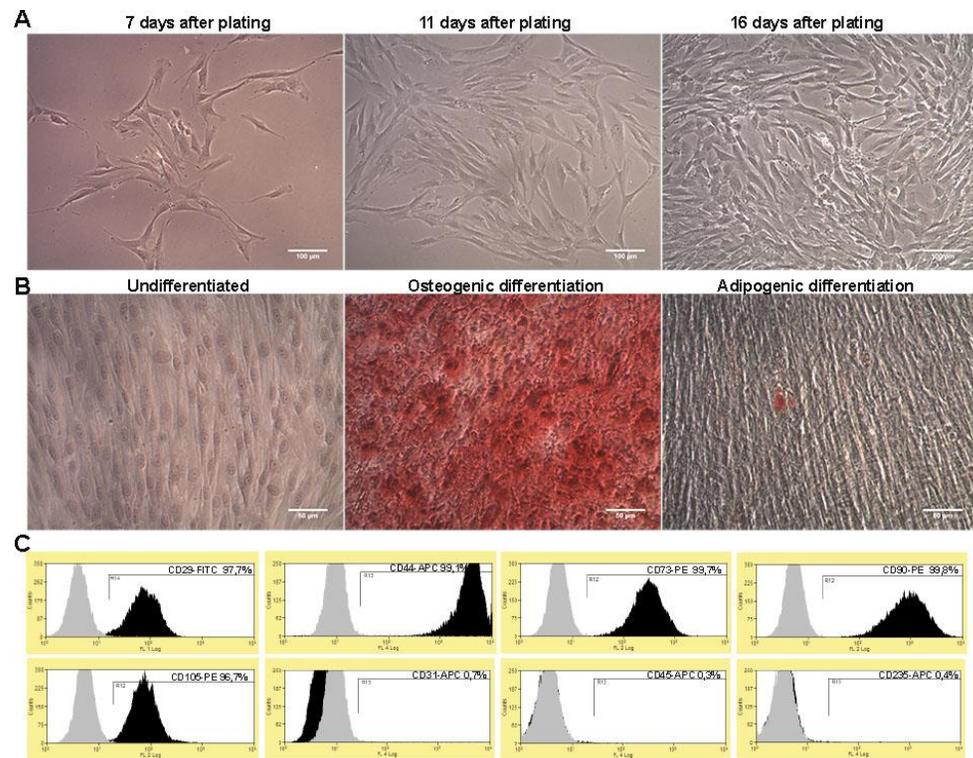


Figura 22. Aislamiento y caracterización preliminar de células madre de hDPSCs. (A) Adherencia al plástico y proliferación de hDPSCs. **(B)** Diferenciación de hDPSCs hacia líneas osteogénica y adipogénica. **(C)** Inmunofenotipo de hDPSCs mediante citometría de flujo utilizando CD29, CD44, CD37, CD90 y CD105 como marcadores positivos, y CD31, CD45 y CD235 como marcadores negativos.

9.2. Anexo II: Sobreexpresión de la proteína LAMP2A en hDPSCs

Infección lentiviral de células hDPSCs

La infección de las células mesenquimáticas hDPSCs se realizó con partículas lentivirales de segunda generación previamente producidas en nuestro Laboratorio de Patología Celular y Molecular, conteniendo el vector pLVX-LAMP2A-IRES-ZsGreen. Dichas partículas incorporan en su genoma una secuencia de DNA que permite la sobre expresión de la proteína ZsGreen, y de la proteína LAMP2A humana.

Para la infección viral, las células se sembraron en una placa de 6 pocillos y se mantuvieron con 2 mL de medio basal, hasta alcanzar una confluencia del 70%. Se procedió a agregar 8 µg/mL de Polibreno y 200 µL del plásmido pLVX-LAMP2A-IRES-ZsGreen que permite la coexpresión de la sobreexpresión de LAMP2A y ZsGreen, esta última es una proteína fluorescente verde de *Zoanthus* sp. (494 nm de excitación y 503 nm de emisión). Se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS. Para que las células continuasen dividiéndose, fueron removidas con 1X Tripsina-EDTA y llevadas a una placa de 100 mm² con 10 mL de medio basal y se dejaron crecer hasta una confluencia de 90% antes de ser removidas nuevamente para ser utilizadas y congeladas a -80°C.

Epifluorescencia

Las células se fijaron con PFA durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS 1X por 5 minutos. Para la tinción de núcleos celulares se utilizó Hoechst 33342 (Invitrogen, USA) 1:5000 (color azul) en solución de Bloqueo (PBS + BSA al 2%) por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS. Los vidrios de 18 mm fueron montados en portaobjetos utilizando medio DAKO como montaje. Las fotos fueron tomadas con microscopio de epifluorescencia invertido Eclipse Ti-s.

Luego de la transducción de estas células y su posterior fijación y montaje en portaobjetos para ser visualizadas en el microscopio, se observó que esta técnica

de infección con partículas lentivirales, no dio resultado, debido a que no se observó fluorescencia verde, lo que indicaría una deficiente transducción.

Luego de la transducción de las células hDPSCs con los lentivirus, no se pudo observar expresión de la proteína ZsGreen en el microscopio de epifluorescencia. De haberse producido la integración de los lentivirus en el genoma celular, se habría evidenciado la expresión de la proteína ZsGreen. Sin embargo, esto no ocurrió, lo que indicó una deficiente transducción. Por esta razón, se concluyó que las células no tendrían una expresión aumentada de la proteína LAMP2A, y se procedió a crear otra línea que sobreexpresa la proteína LAMP2A. Esto último se estableció mediante la transfección de un plásmido que sobreexpresa la proteína LAMP2A humana (pCMVG Entry MyC flag lamp2a humana), el cual contiene un gen de resistencia al antibiótico G418 y permite una transfección estable de la línea celular.

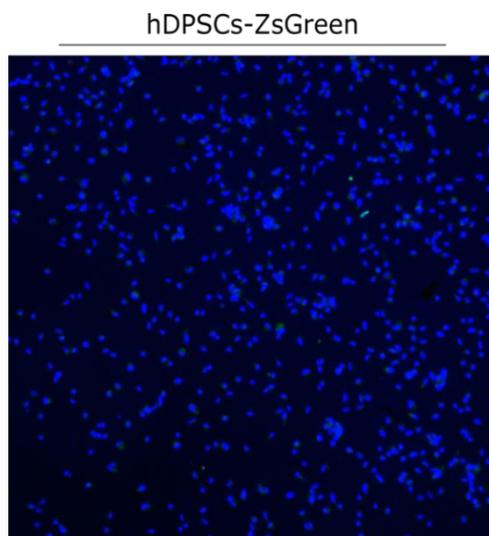


Figura 23. Epifluorescencia de línea celular hDPSCs tras la incorporación lentiviral del plásmido pLVX-LAMP2A-IRES-ZsGreen (hDPSCs-ZsGreen).

Microscopía fluorescente de células hDPSCs con sobreexpresión de la proteína LAMP2A (hDPSCs-ZsGreen), en donde no se observa infección, evidenciado por la ausencia de fluorescencia verde. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Fotografía tomada en 20X, microscopio Eclipse Ti-s. Barra de escala = 100 μ m.

9.3. Anexo III: Supuestas proteínas sustrato de CMA que se espera que estén reguladas por la actividad de CMA durante la diferenciación de odontoblastos

Tabla 4. Supuestas proteínas sustrato de CMA que se espera que estén reguladas por la actividad de CMA.

<i>Uniprot ID</i>	<i>gene_names</i>	<i>motif</i>	<i>motif_start</i>
Q9HCE7	SMURF1 KIAA1625	QRLDL	114
Q9HCE7	SMURF1 KIAA1625	RDLVQ	376
Q53GL0	PLEKHO1 CKIP1 OC120 HQ0024c	<u>QLSRI</u>	304
Q53GL0	PLEKHO1 CKIP1 OC120 HQ0024c	<u>LSRIQ</u>	305
P29373	CRABP2	VEIKQ	42
O75874	IDH1 PICD	KDIFQ	224
P48735	IDH2	QFIKE	64
P48735	IDH2	QLKYF	78
P48735	IDH2	KDIFQ	263
P48735	IDH2	<u>QVLKS</u>	296
P48735	IDH2	QDLIR	389
Q9UBL6	CPNE7	<u>QKKVT</u>	198
Q9UBL6	CPNE7	<u>QLVYR</u>	266

El sitio web KFERQ *finder* V0.8 analizó diferentes proteínas que se espera que sean reguladas por CMA durante la diferenciación de odontoblastos de hDPSC (<https://rshine.einsteinmed.edu>) para encontrar motivos similares a KFERQ, que impulsan la degradación de la proteína a través de CMA. En el caso de IDH1 e IDH2, su degradación a través de CMA ya fue demostrada en células madre ES 3D (Xu cols., 2020). Las otras proteínas, SMURF1, CKIP-1, CRABP-II y CPNE7 contienen motivos similares a KFERQ, pero su degradación a través de CMA no se ha estudiado aún. El buscador KFERQ V0.8 detecta motivos clásicos similares a KFERQ o "motivos activados" (necesitan modificaciones como la fosforilación o acetilación para activarse). Aquí se han considerado sólo motivos clásicos o motivos fosfoactivados (subrayados). Tener en cuenta que algunas proteínas tienen más de un motivo similar a KFERQ.

9.4. Anexo IV: Abreviaturas

AB-MSC	Células madre mesenquimales de hueso alveolar
ANOVA	Análisis de varianza
BMP	Proteína morfogenética ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
BSP	Sialoproteína ósea
Ca ²⁺	Calcio
CMA	Autofagia mediada por chaperonas
CO ₂	Dióxido de carbono
DFSC	Células madre mesenquimales de folículo dental
DIF	Medio de diferenciación (α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico y 10 mM β -glicerofosfato).
DIF+	Medio de diferenciación (α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato y 0,1 μ M dexametasona
DIF++	Medio de diferenciación (α -MEM, 5% FBS, 50 μ g/mL ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato, 0,1 μ M dexametasona y 10 ng/mL TGF- β .
DMP1	Proteína 1 de la matriz dentinaria
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP	Fosfoproteína dentaria
DSP	Sialoproteína dentinaria
DSPP	Sialofosfoproteína dentinaria
ECL	Potenciador de quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
eMi	Microautofagia endosomal
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares

ES 3D	Células madre embrionarias tridimensionales
FBS	Suero fetal bovino
GFP	Proteína fluorescente verde
GMSC	Células madre mesenquimales de encía
G418	Gentamicina
hDPSC	Células madre mesenquimales de pulpa dental humana
hDPSCs-shlamp2a	Células madre mesenquimales de pulpa dental humana con niveles reducidos de la proteína LAMP2A
HSC	Células madre hematopoyéticas
HSC70	Proteína de choque térmico relacionada a proteínas de 70 kilo Dalton.
kDa	kilo Dalton
KFERQ	Motivo de reconocimiento (Lys;Phe;Glu;Arg;Gln)
LAMP2A	Proteína de membrana tipo 2A asociada a lisosomas
LEs	Endosomas tardíos
MEPE	Fosfoglicoproteína extracelular de la matriz
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
MSC	Células madre mesenquimales
MyC Entry lamp2a	Células madre mesenquimales de pulpa dental humana con niveles aumentados de la proteína LAMP2A
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
Opti-MEM™	Medio mínimo esencial de suero reducido
PBS	Buffer amortiguador fosfato salino
PDLSC	Células madre mesenquimales de ligamento periodontal
PFA	Paraformaldehído

PLL	poly-L-lisina
PO_3^{4-}	Fosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SCAP	Células madre mesenquimales de papila apical
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SHED	Células madre mesenquimales de pulpa de dientes deciduos exfoliados
shRNA	Ácido ribonucleico short hairpin
TBS-Tween20	Buffer amortiguador salino con Tween20
TEMED	Tetrametiletildiamina
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Tween20	Polisorbato20
V	Voltios
α -MEM	Medio Mínimo Esencial modificación Alfa
μ g	Microgramo
ng	Nanogramo
gr	Gramos
μ m	Micrómetro
nm	Nanómetro
μ L	Microlitro
mL	Mililitro
μ M	Micromolar
mM	Milimolar

9.5. Anexo V: Reactivos y soluciones

Tabla 5. Reactivos y soluciones.

Reactivo/Solución	Marca	Cat #
Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich	A8960-5G
Acrilamida	Bio-Rad	1610156
Alizarin red	Sigma-Aldrich	104K2507
BCA Protein Assay	Thermo Scientific	23225
BSA	Winkler	BM-0150
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad	170-5061
Dexametasona	Tocris Bioscience	50-02-2
DMSO	Winkler	BM-0660
EZ-ECL	Biological Industries	20-500-1000A/B
FBS	Gibco	10437-028
G418	InvivoGen	ant-gn-1
Hoechst	Invitrogen, USA	33342
Inhibidor de proteasas	Thermo Scientific	A32963
Lipofectamina™ 2000	Invitrogen	11668-027
Membrana de nitrocelulosa	Bio-Rad	BR20220520
Opti-MEM	Gibco	31985-070
PBS	Corning	46-013-CM
Pen-Strep (Penicilina/Estreptomina)	Biological Industries	03-031-1B
Persulfato de amonio	Sigma-Aldrich	A3678-25G
PFA	Thermo Scientific	28908
PLL	Sigma-Aldrich	P4832-50mL
Polibreno (Bromuro de Hexadimetrina)	Sigma-Aldrich	H9268-5G
SDS	Winkler	BM-1650
TEMED	Thermo Scientific	28656355
TGF-β1	R&D Systems	240-B
Tripsina-EDTA	Gibco	15400-054
Tris	Winkler	BM-2000
Tween20	Sigma-Aldrich	P1379-250mL
α-MEM	Gibco	12000-0222
β-Glicerofosfato	Sigma-Aldrich	G9422-50G