



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**“Efecto de Histatina-1 en la diferenciación de células  
mesenquimales de la papila apical: implicancias en el desarrollo  
del odontoblasto.”**

**Jorge Ignacio Segura Olivares**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE**

**CIRUJANO - DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Vicente Torres Gómez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Mónica Cáceres**

**Dr. Mauricio Garrido**

**Adscrito a:  
Proyecto FONDECYT 1220517  
Iniciativa Científica Milenio ICN09\_016/ICN 2021\_045  
Santiago – Chile  
2024**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**“Efecto de Histatina-1 en la diferenciación de células  
mesenquimales de la papila apical: implicancias en el desarrollo  
del odontoblasto.”**

**Jorge Ignacio Segura Olivares**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Vicente Torres Gómez**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Dra. Mónica Cáceres**

**Dr. Mauricio Garrido**

**Adscrito a:  
Proyecto FONDECYT 1220517  
Iniciativa Científica Milenio ICN09\_016/ICN 2021\_045  
Santiago – Chile  
2024**



## **AGRADECIMIENTOS**

Este texto es la culminación de un proceso y trabajo enorme, no solo desde el punto de vista científico, ni tampoco desde un punto de vista académico. Esta es la culminación de un crecimiento personal que me ha traído a experimentar muchos de los momentos más memorables de mi vida. Desde participar en voluntariados, concursos científicos, a vivir la política universitaria de primera mano. Haciendo un recuento es agradable ver que he hecho muchas cosas en la universidad.

Estos años los llevaré con mucho cariño en mi memoria, ya que han sido unos de los más esforzados y agotadores de los que he vivido ... <<*hasta ahora*>>. Y estos años de estudio no podrían haber sido posibles de llevar si no fuera por el incansable apoyo de mi familia, Jorge, mi papá y Paula, mi mamá, que desde siempre han trabajado por cuidarnos, darnos la mejor educación y entregarnos los mejores valores que han cultivado en mí y mis hermanos, para convertirnos en personas de bien, ellos son mis referentes en la vida. Especial mención a mis hermanitos, Tomás y Borja, ya que verlos crecer a ustedes me ayuda a recordar los procesos que han pasado y lo lejos que he llegado.

Agradecer a mi polola Antonia que me ha acompañado por gran parte de este proceso y ha logrado levantarme mi ánimo en las situaciones más agotadoras y es con quien hemos compartido momentos hermosos. Muchas gracias, por tanto, te amo.

Agradecer a mis amigos de toda la vida Fer, Ignacio, Marco, Vicente y Gustavo, con quienes hemos compartido una vida de historias y espero que siga siendo así, además de mantenerme siempre a mi lado y nunca fallar.

A mis amigos de la universidad y todos sus apañes, en todos los momentos, tanto en las clase, los eternos preclínicos y las más aun eternas atenciones clínicas, que como siempre hemos dicho, costó ... pero se logró y espero celebrar con ustedes todas sus titulaciones.

A todos ustedes personitas bellas que han compartido conmigo a lo largo de estos años, muchas gracias porque todas aportaron su granito de arena para ayudarme a ser los que soy hoy.

Muchas gracias a todos.



## ÍNDICE

<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>9</b>
1.1 HISTATINAS.....	9
1.2 EFECTO DE LA HISTATINA-1 EN LA REPARACIÓN TISULAR.....	10
1.3 HISTATINA-1 EN LA DIFERENCIACIÓN ÓSEA.....	12
1.4 CÉLULAS MESENQUIMALES ORALES .....	13
1.5 DIFERENCIACIÓN A ODONTOBLASTOS Y SUS MARCADORES.....	15
1.6 VEGF (vascular endothelial growth factor) .....	19
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>21</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>22</b>
5.1 CÉLULAS.....	22
5.2 ANTICUERPOS.....	22
5.3 HISTATINA-1 .....	23
5.4 INCUBACIÓN DE CÉLULAS.....	23
5.5 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT .....	23
5.6 ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	24
5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>26</b>
6.1 Histatina-1 induce la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas.....	26
6.2 Efecto de la inhibición del receptor VEGFR-2 en la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas.....	30
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>36</b>
8.1 Histatina-1 induce la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas.....	36
8.2 Efecto de la inhibición de VEGFR-2 en la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas, inducida por Histatina-1. ....	36
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>38</b>
<b>10. ANEXO .....</b>	<b>45</b>

## INTRODUCCIÓN

La reparación de los tejidos orales lleva consigo una gran diferencia respecto de otros sectores del organismo, esto debido a la presencia de múltiples factores protectores asociados a la saliva, como mucinas, peroxidasa, factores de crecimiento e Histatinas, entre otros. Estos factores entregan a la mucosa oral una ventaja a la hora de reparar tejidos dañados, al ser comparado, por ejemplo, con el epitelio cutáneo, demostrando tener una reparación más rápida, eficiente y con cicatrices mínimas (**Toma y cols., 2021**). Es en particular un péptido el que llama la atención por sus propiedades pro-reparativas, **la Histatina-1**, molécula que ha demostrado tener distintos atributos que la hacen propicia para poder mejorar la reparación tisular en distintos tejidos (**Oudhoff y cols., 2009**) como, por ejemplo, **promover la adhesión, la migración e incluso la diferenciación celular** en células de linaje óseo (**Torres y cols., 2021**). Lo anterior se suma a la capacidad de promover la adhesión, migración y **angiogénesis en células endoteliales** (**Torres y cols., 2017**). Por lo que resulta una molécula que promueve varios procesos necesarios para generar una correcta reparación de tejidos.

El diente es un órgano que posee distintos tejidos como el esmalte, la dentina, cemento y la pulpa dental. Este último es un tejido conectivo estéril protegido por los tejidos duros del diente, es decir, esmalte, dentina y cemento. Una noxa que dañe el tejido pulpar induce una respuesta inmunoinflamatoria. De no ser eliminada la noxa, la pulpa se puede necrosar y dar paso a una patología periapical de origen endodóntico. (**Karamifar y cols., 2020**). Esta patología genera resorción ósea, seguido de la disposición de un tejido granulomatoso. La mayoría de las patologías pulpares sanan posterior a un tratamiento endodóntico no quirúrgico, tardando de 6 a 12 meses, pero las lesiones periapicales pueden llegar a tardar hasta 4 años en mostrar signos de reparación (**Karamifar y cols., 2020**). Es por esto que se torna relevante evaluar distintos métodos que favorezcan la reparación de heridas en estos tejidos en un menor período de tiempo. En este contexto, surge el potencial uso de Histatina-1, dado



que se ha demostrado que esta molécula es posible de ser utilizada por células mesenquimales de la papila y pulpa dental (**Torres y cols., 2021**), ambos tipos celulares implicados en la reparación de estos tejidos.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 HISTATINAS

Las Histatinas son proteínas de bajo peso molecular ricas en histidina, y dentro de esta familia existen 12 Histatinas distintas. La Histatina-1 y la Histatina-3 son codificadas por genes distintos (HIS1 y HIS2, respectivamente), mientras que el resto de las Histatinas provienen de los clivajes proteolíticos de las anteriormente mencionadas (**Figura 1**) (*Messana y cols., 2015*). Presentes en la saliva de humanos y de varios primates de alto orden, tienen varias funciones en la cavidad oral, como formar parte de la película salival adquirida, siendo un factor importante a la hora de permitir la homeostasis del intercambio mineral entre el medio oral y el diente. Clásicamente se han estudiado en el contexto de sus propiedades antimicrobianas, protegiendo de la actividad fúngica y bacteriana (*Torres y cols., 2018*).

Peptide	Amino acid sequence
Histatin-1	DpSHEKRHHGYYRRKFHEKHHSHPFPFYGDYGSNYLYDN
Histatin-2	RKFHEKHHSHPFPFYGDYGSNYLYDN
Histatin-3	DSHAKRHHGYYKRFHEKHHSHPGYRSNYLDYN
Histatin-5	DSHAKRHHGYYKRFHEKHHSHPGY

**Figura 1.** Representación de las secuencias de aminoácidos de los péptidos de Histatina-1 y la Histatina-3, además de la Histatina-2 y la Histatina-5, donde se observa que son clivajes de las anteriores (*modificado de Torres y cols., 2017*).

En el último tiempo, un sub-grupo de Histatinas ha demostrado poseer otras propiedades, como favorecer la migración y adhesión de células endoteliales, ambos procesos fundamentales durante la angiogénesis (*Torres y cols., 2017*). Siendo la angiogénesis uno de los hechos importantes dentro de la reparación tisular, resulta muy favorable

contar con esta característica para realizar terapias de reparación con células mesenquimales. Interesantemente, el espectro de células diana sobre las cuales Histatina-1 ha mostrado tener actividad biológica, ha sido ampliado en los últimos años, llamando la atención el conjunto de efectos que tiene esta proteína sobre células de linaje mesenquimal y osteoblástico (**Torres y cols., 2021; Castro y cols., 2019**). Específicamente, en células preosteoblásticas se ha observado que Histatina-1 promueve la adhesión, migración y diferenciación celular, además de favorecer la expresión de genes osteogénicos, como fosfatasa alcalina, osteocalcina y Runx2, y estimular la mineralización *in vitro* (**Torres y cols., 2021**). Interesantemente, en este mismo estudio se observó que Histatina-1 actúa sobre células mesenquimales derivadas de la papila apical y de la pulpa dental, induciendo la migración celular, la formación de depósitos de calcio y la expresión de los genes Runx2 y osteopontina (**Torres y cols., 2021**). Pese a que en este estudio se concluye en que habría una potencial diferenciación a linaje osteoblástico por parte de estas células, queda la duda acerca de una potencial diferenciación hacia otros fenotipos de carácter mineralizante, por ejemplo, de tipo odontoblástico, dado a que cada una de las características observadas en dicho estudio se superponen en ambos linajes (**Castro y cols., 2019; Torres y cols., 2021**). Lo anterior cobra relevancia, teniendo en cuenta la capacidad inherente de las **células troncales mesenquimales de la papila apical** de diferenciarse hacia odontoblastos.

## **1.2 EFECTO DE LA HISTATINA-1 EN LA REPARACIÓN TISULAR**

Histatina-1, tiene varios roles clave en la reparación tisular, como promover la adhesión celular, migración y angiogénesis. A continuación, se detallan los principales efectos de la Histatina-1 en la reparación tisular:

### **1.2.1 Promoción de la adhesión y migración celular.**

**Histatina-1 mejora la adhesión y migración celular** en varios tipos de células, incluyendo queratinocitos orales, fibroblastos gingivales

y dérmicos, células epiteliales no orales y células endoteliales (**revisado en Torres y cols., 2018**). En células óseas como las SAOS-2 de osteosarcoma y pre-osteoblastos MC3T3-E1, Histatina-1 aumenta la adhesión celular y migración, lo cual es crucial para las respuestas osteoconductoras necesarias para el proceso de reparación ósea (**Torres y cols., 2021**). Además, se ha demostrado su capacidad de generar adhesión incluso en superficies como el titanio (**van Dijk y cols., 2017**).

### **1.2.2 Angiogénesis.**

**Histatina-1 promueve la angiogénesis**, que es esencial para suministrar nutrientes y oxígeno al tejido en proceso de cicatrización. Esto lo logra al promover la migración de células endoteliales y reorganización en estructuras vasculares funcionales. Esto se demostró tanto *in vivo* utilizando el modelo de membrana corioalantoídea de embrión de pollo, como *in vitro* en ensayos de cicatrización de heridas y de cámara de Boyden (**Torres y cols., 2017**). De hecho, estudios más recientes por nuestro grupo de investigación permitieron identificar el receptor molecular implicado en la acción de Histatina-1 en células endoteliales, siendo éste el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2), a través del cual Histatina-1 ejerce sus efectos promigratorios y pro-angiogénicos (**Mateluna y cols., 2022**). La relevancia que pudiese tener este hallazgo y el rol que cumpliría este receptor en otros tipos celulares, son aspectos no abordados aún.

### **1.2.3 Re-epitelización.**

Al igual que en los otros tipos celulares mencionados, Histatina-1 promueve la migración de queratinocitos orales y de piel, permitiendo de esta forma la re-epitelización *in vitro* en un modelo de tejido reconstruido (**Oudhoff y cols., 2008; Oudhoff y cols., 2009**), así como en modelos *in vivo* de reparación de heridas (**Lei y cols., 2020; Chang y cols., 2021**).

### **1.2.4 Actividad en ambientes proinflamatorios.**

Se ha determinado que Histatina-1 en sus formas lineal completa, cíclica y dominio mínimo activo logra mantener y generar el efecto estimulador de migración en bajas concentraciones, incluso en estados proinflamatorios (**Boink y cols., 2016**).

Se ha demostrado además, la capacidad de la Histatina-1 de contrarrestar los efectos anti-migratorios y citotóxicos del ácido zoledrónico en células endoteliales EA.hy926 y de linaje osteoblástico, restaurando la capacidad angiogénica en el primer caso (**Castro y cols., 2019**)

### 1.3 HISTATINA-1 EN LA DIFERENCIACIÓN ÓSEA

En el contexto de la diferenciación ósea, se ha demostrado la acción de Histatina-1, tanto sobre células de **osteosarcoma humano SAOS2**, como en **pre-osteoblastos murinos MC3T3-E1** (**Castro y cols., 2019; Torres y cols., 2021**). Específicamente, el tratamiento de células SAOS2 y MC3T3-E1 lleva a un aumento significativo en la actividad de la enzima **fosfatasa alcalina (ALP)**, un marcador enzimático clave de la diferenciación osteogénica (**Torres y cols., 2021**). Además, se ha observado que Histatina-1 induce la expresión de genes osteogénicos, como la osteocalcina, Runx2 y ALP en ambos tipos celulares (**Torres y cols., 2021**). Estos genes son esenciales para la formación y mineralización ósea, y su expresión incrementada sugiere que Histatina-1 puede acelerar el proceso de diferenciación osteogénica, lo que podría representar una opción terapéutica beneficiosa para la medicina óseo-regenerativa y la integración de implantes (**Torres y cols., 2021**). En este mismo contexto, estudios más recientes de nuestro laboratorio han demostrado que Histatina-1 es capaz de promover la reparación ósea *in vivo*, en un modelo de defecto óseo murino de tamaño no crítico (**Torres y cols., 2023**).

Aunque el mecanismo exacto por el cual Histatina-1 promueve la diferenciación osteogénica aún no se comprende completamente, se cree que Histatina-1 puede actuar como un intermediario que mejora la interacción entre las células y el sustrato, promoviendo así una respuesta celular favorable para la diferenciación (**Torres y cols., 2021**). Interesantemente, en este mismo estudio, se demostró que Histatina-1 promueve un fenotipo mineralizante en células mesenquimales orales, en donde se observó un incremento de la expresión de Runx2 y otros marcadores de diferenciación, así como también en la migración de estas células. Lo anterior, no tan sólo podría tomar relevancia en el campo de la diferenciación ósea, sino además en el contexto de otros modelos celulares mineralizantes, como los odontoblastos.

## **1.4 CÉLULAS MESENQUIMALES ORALES**

### **1.4.1 Células troncales**

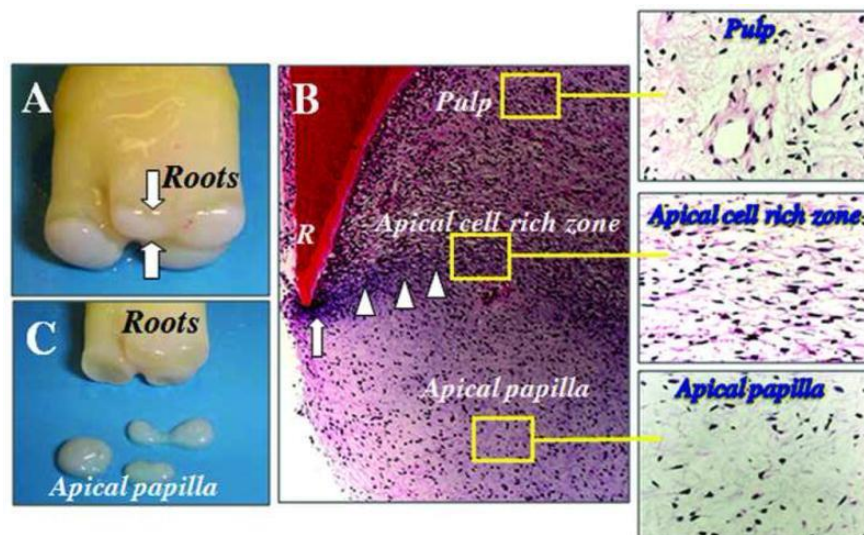
Las células troncales tienen el potencial de autorrenovarse y producir tejidos funcionales. Existen células troncales **pluripotentes**, como las células troncales embrionarias y las células troncales **no embrionarias**, o **somáticas** (también llamadas células troncales adultas). Se pueden encontrar tanto en el blastocisto durante la etapa embrionaria, como en el humano adulto (**National Institutes of Health, n.d.**). Las **células troncales mesenquimales son parte del estroma celular**, estas células troncales mesenquimales son multipotenciales, es decir, pueden diferenciarse en varios tipos de linaje celular. Estas pueden ser obtenidas de diversos tejidos como el cordón umbilical, médula ósea, tejido adiposo y tejidos orales (**Ding y cols., 2011**) entre otros.

### **1.4.2 Células troncales mesenquimales de la papila apical (SCAP's)**

La papila apical es una unidad morfofuncional presente en los dientes permanentes inmaduros (DPI), ubicada por debajo del diafragma epitelial y de la zona rica en células que separa el tejido pulpar de la papila

apical. Los DPI se caracterizan por presentar su formación radicular incompleta. Se ha demostrado que la población de células mesenquimales de la papila apical posee la facultad de dar origen a distintos tipos celulares incluyendo células epiteliales, **odontoblastos** y osteoblastos, entre otros; contribuyendo de esta manera a la formación de los tejidos que conforman la raíz de este DPI (**Kang y cols., 2019**).

Es así que, durante la formación radicular, las células mesenquimales de la papila apical migran a la zona de la pulpa diferenciándose en odontoblastos (**Figura2**) (**Sonoyama y cols., 2008**). Es por esto que adquieren gran relevancia a la hora de pensar en la reparación tisular puesto que aportan una gran variedad de linajes celulares que podrían participar en este proceso.

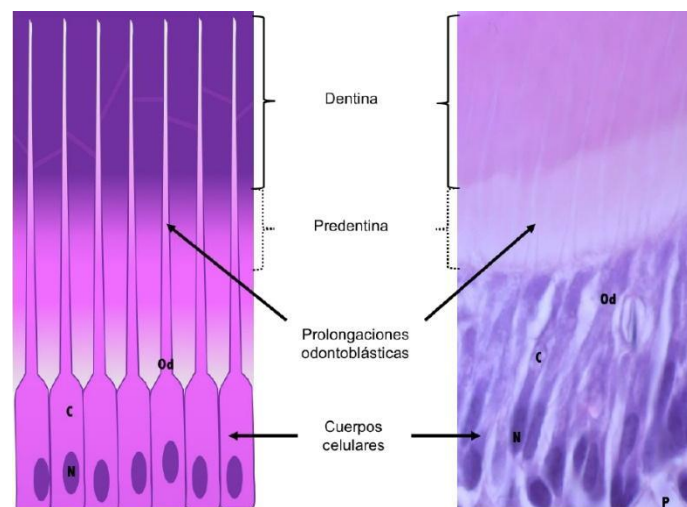


**Figura 2. Anatomía de la papila apical.** (A) Tercer molar humano donde se señala a la papila apical unida a la raíz dental en desarrollo. (B) Tinción con hematoxilina y eosina de una raíz humana en desarrollo (R) que representa el diafragma epitelial (flechas) y la zona rica en células apicales (triángulos blancos). (C) Recolección de la papila apical de la raíz dental para aislamiento de células troncales mesenquimales (**modificado de Sonoyama y cols., 2008**).

## 1.5 DIFERENCIACIÓN A ODONTOBLASTOS Y SUS MARCADORES

### 1.5.1 Odontoblastos

Los odontoblastos son células polarizadas y postmitóticas que se originan a partir de células troncales mesenquimales (*revisado en Kawashima & Okiji, 2016*). La anatomía celular de estas células se observa en esquema y corte histológico en la **Figura 3**. Estas células son responsables de producir una parte fundamental del tejido duro dental, específicamente la dentina. Los odontoblastos presentan extensiones citoplasmáticas conocidas como procesos odontoblásticos, que se introducen en los túbulos dentinarios y desde allí desempeñan su función mineralizadora. Estas células se encuentran situadas en la periferia de la pulpa dental, donde están estrechamente relacionadas con las demás células presentes en esa región, formando conjuntamente el complejo pulpo-dentinario (*revisado en Kawashima & Okiji, 2016*). Dada su elevada diferenciación, es de suma importancia desarrollar métodos que permitan la reparación del tejido dental utilizando los mismos tipos celulares. Esto es crucial para lograr un tejido que sea lo más similar posible al que se perdió debido a una determinada lesión.



**Figura 3.** Representación esquemática (izquierda) y fotomicrografía (derecha) de la organización estructural de los odontoblastos (Od). Estos 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 primer molar mandibular de un ratón de siete días de desarrollo posnatal.<sup>91</sup> (**modificado de Simancas, 2019**).

La comprensión de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la diferenciación de odontoblastos ha presentado varios desafíos, principalmente debido a las dificultades metodológicas para estudiar este tipo celular. **Así, una de las primeras etapas para evaluar el proceso de diferenciación de los odontoblastos es la selección de marcadores moleculares adecuados, entre los cuales encontramos las proteínas DMP1, DSPP y ALP (Simancas, 2019).**

### **1.5.2 Fosfoproteína ácida 1 de la matriz dentinaria (DMP-1)**

Dentro de los distintos procesos de mineralización realizados en la osteogénesis y dentinogénesis, los osteoblastos y odontoblastos secretan un set único de proteínas no colagenasas en la matriz extracelular, reciben el nombre de familia SIBLING, por sus siglas en inglés (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) e incluyen la sialoproteína ósea (BSP), la osteopontina (OPN), la **sialofosfoproteína dentinaria (DSPP)**, la **fosfoproteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1)** y la fosfoglicoproteína extracelular de la matriz (*Qin y cols., 2003*).

La proteína de la matriz dentinaria-1 (DMP1) se presenta en diferentes formas dentro de los tejidos mineralizados, cada una de las cuales desempeña roles distintos en la mineralización debido a su **interacción con la hidroxiapatita (HA)**.

Según el estudio de *Gericke y cols. (2010)* donde se analizaron las funciones estructurales de las distintas formas de DMP-1, existen **4 formas de la proteína DMP-1:**

**Fragmento N-terminal de 37 kDa:** El fragmento N-terminal de 37 kDa es una de las formas más pequeñas de DMP-1. **Promueve la formación y el crecimiento de cristales de HA.** En un sistema de gelatina-gel, se

observó que este fragmento facilita la nucleación y proliferación de cristales de HA (**Gericke y cols., 2010**).

**Fragmento C-terminal de 57 kDa:** El fragmento C-terminal de 57 kDa es el más grande de los dos. Al igual que el fragmento de 37 kDa, el fragmento de 57 kDa también **promueve la formación y el crecimiento de cristales de HA**. Sin embargo, en términos de efectividad en la nucleación de HA, el fragmento de 57 kDa es ligeramente más efectivo que el de 37 kDa (**Gericke y cols., 2010**).

**Proteoglicano DMP1 (DMP1-PG):** Esta forma contiene un fragmento N-terminal unido a una cadena de condroitina sulfato (CS), conocido como DMP1-PG. A diferencia de los otros fragmentos, **DMP1-PG actúa como un inhibidor de la mineralización**. En un sistema de gelatina-gel, DMP1-PG inhibe significativamente la acumulación de minerales y el crecimiento de cristales de HA de manera dependiente de la dosis (**Gericke y cols., 2010**).

**Proteína de longitud completa de 106 kDa:** La proteína DMP1 de longitud completa se encuentra en menor cantidad en los tejidos mineralizados. **Inhibe la formación y el crecimiento de HA**. La proteína de longitud completa se une a HA y bloquea el acceso a los cristales de HA, impidiendo su proliferación y crecimiento (**Gericke y cols., 2010**).

### **1.5.3 Sialo fosfoproteína dentinaria (DSPP de 130-kDa)**

Es otra de las proteínas importantes presentes en la matriz extracelular importante para la formación y mineralización de la dentina, es parte de la familia SIBLING. Inicialmente es sintetizada como una única cadena polipeptídica que sufre un procesamiento proteolítico para dar lugar a productos: **sialoproteína dentinaria (DSP)** y el otro fragmento **fosfoproteína dentinaria (DPP o PP)** (**Prasad, Butler & Qin, 2010**), donde cada uno adquiere un rol distinto dentro de la mineralización, sobre

todo en la dentinogénesis, donde se ha demostrado existir una expresión de hasta 400 veces más que en hueso (*Qin y cols., 2003*).

**Sialoproteína dentinaria (DSP de 95 kDa):** Es una glicoproteína y uno de los fragmentos encontrados al escindir la DSPP. Ayuda con la regulación génica para inducir la diferenciación de células madre y primarias dentales, a través de una señalización propiciada principalmente por la proteína Ocludina (*Li et al., 2017*).

**Fosfoproteína dentinaria (DPP o PP de ~47 kDa):** La DPP es una inusual proteína polianiónica, que cumple distintas funciones como la de promover la diferenciación celular y la mineralización de células (visto en células osteoblásticas de ratón y células fibroblásticas de ratón) (*Jadlowiec y cols., 2004*), DPP se une al ion de calcio y al colágeno tipo I, actuando como un inductor de la mineralización en las matrices extracelulares e induciendo la deposición y el crecimiento de cristales de hidroxiapatita en los huesos y dientes de vertebrados (*Hey cols., 2005*).

La determinación de estos marcadores moleculares por técnicas de rutina, como Western blot (para proteína) o RT-qPCR (para mRNA), constituye una herramienta fundamental a la hora de caracterizar la presencia y comportamiento de esta población celular altamente diferenciada. Por lo tanto, este conjunto de aproximaciones será de vital importancia en el planteamiento de este trabajo de investigación, el cual determinará si Histatina-1 induce la diferenciación de células mesenquimales de la papila apical hacia linaje odontoblástico.

En cuanto a los factores que inducen la diferenciación odontoblástica, se han descrito diversos mediadores moleculares, que incluyen proteínas de señalización intracelular y factores secretados al medio, como los fragmentos de DMP-1, de DSPP además de ALP, entre otros. Destaca el

papel que cumple el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), que en el artículo de **Janebodin y cols. (2022)**, demostró que al silenciar la expresión VEGFR-2 (receptor de VEGF-A) en células troncales mesenquimales de la pulpa dental, disminuye la expresión de proteínas de la matriz dentinaria (DMP-1, DSPP, BSP), además de que aquellas células silenciadas no lograban generar nódulos de mineralización. Lo anterior cobra particular relevancia, pues se ha demostrado que este receptor es capaz de unir a Histatina-1 en células endoteliales (**Mateluna y cols., 2022**). Esto nos lleva a proponer una interesante vía a evaluar para la acción de Histatina-1.

#### **1.6 VEGF (vascular endothelial growth factor)**

La familia de VEGF cuenta con al menos 6 integrantes: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y factor de crecimiento placentario (**Cross y cols., 2003**), se ha descrito como un factor importante para promover la angiogénesis en conjunto con el receptor VEGFR-2 siendo este el mayor mediador de la mejora de efectos angiogénicos (**Ferrara y cols., 2003**). En uno de los últimos estudios realizados por nuestro grupo se ha descrito a VEGFR-2 como el receptor de Histatina-1 para promover la angiogénesis y la migración celular endotelial (**Mateluna y cols., 2022**). Intrigantemente, otro estudio ha descrito que este receptor es esencial durante el proceso de diferenciación de osteoblastos (**Hu y Olsen., 2016**) una línea celular proveniente de las mismas células troncales mesenquimales de la papila apical. Recientemente se ha descrito a VEGFR-2 como un factor importante durante la señalización en la diferenciación odontoblástica (**Janebodin y cols., 2022**). Lo anterior abre la posibilidad que Histatina-1 podría promover la diferenciación de células odontoblásticas por medio de la señalización de VEGFR-2.

En base a los antecedentes expuestos, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Histatina-1 promueve la expresión de marcadores de diferenciación celular odontoblásticos a través de VEGFR-2?

En resumen, tenemos los siguientes antecedentes:

- 1. Histatina-1, promueve la expresión de marcadores de diferenciación en células preosteoblásticas.**
- 2. Histatina-1, promueve la migración y adhesión en distintos tipos celulares, incluyendo células de linaje óseo y células de cultivos primarios de papila apical y pulpa dental.**
- 3. Las células troncales mesenquimales de la papila dental tienen el potencial de diferenciarse en células odontoblásticas.**
- 4. Histatina-1 comparte receptor con VEGF, un factor que promueve la diferenciación a células osteoblásticas, linaje que puede provenir de las SCAPs, al igual que los odontoblastos.**

## 2. HIPÓTESIS

*“Histatina-1 promueve la expresión de marcadores de diferenciación odontoblástica en células mesenquimales de la papila apical, de manera dependiente del receptor VEGFR-2”.*

## 3. OBJETIVO GENERAL

Determinar si **Histatina-1** induce la **diferenciación** de células mesenquimales de la papila apical en células con características de **linaje odontoblástico, de manera dependiente del receptor VEGFR-2.**

## 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si Histatina-1 induce la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas en células mesenquimales de papila apical.
2. Determinar si la inhibición del receptor VEGFR-2 en células mesenquimales de papila apical reduce la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas.

## 5. METODOLOGÍA

Este será un estudio experimental, de tipo transversal.

### 5.1 CÉLULAS

Células mesenquimales de papila apical fueron obtenidas del laboratorio de Envejecimiento y Reparación Tisular, dirigido por la Dra. Mónica Cáceres (ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile), a través del Proyecto de investigación ***“TMPRSS11A as novel ageing-related marker involved in senescence during wound healing”*** (ANEXO). Específicamente, los explantes de papila apical fueron obtenidos, siguiendo el protocolo de ***Garrido y cols. (2021)*** a partir de premolares permanentes inmaduros con indicación de exodoncia por motivos de ortodoncia (n=3, etapa 8 de Nolla).

### 5.2 ANTICUERPOS

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

1. Anticuerpo policlonal anti-DSPP (ab272929). Abcam
2. Anticuerpo monoclonal anti-DMP-1 (LFMb-31): sc-73633. Santa Cruz biotechnology, inc.
3. Anticuerpo monoclonal anti-Actina (C4): sc-47778. Santa Cruz biotechnology, inc.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

1. Anticuerpo anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L). Jackson Inmuno Research laboratories, inc.
2. Anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L). Jackson Inmuno Research laboratories, inc.

### 5.3 HISTATINA-1

Para todos los experimentos, Histatina-1 utilizada posee la secuencia DpSHEKRHHGYRRKFHEKHHSHREFPFYGDYGSNYLYDN, que corresponde a un fosfopéptido de 38 aminoácidos, fosforilado en la Serina2 (*Oppenheim y cols., 1988*), obtenido mediante síntesis química, según lo descrito por nuestro grupo (*Torres y cols., 2021*).

### 5.4 INCUBACIÓN DE CÉLULAS

Las **células mesenquimales de la papila apical** fueron incubadas en placas de 12 pocillos a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) alto en glucosa (4,5 g/L), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, que además está tratado con penicilina (10.000 U/mL) y estreptomycinina (10 µg/mL). Un grupo recibió estímulo con Histatina-1 (concentración 10 µM).

### 5.5 ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Luego de cada tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y se les aplicó directamente buffer Laemmli, para lisis y homogeneización de las muestras. Las muestras fueron sonicadas, hervidas y posteriormente cargadas en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), para luego ser transferida a una membrana de nitrocelulosa.

Esta membrana fue incubada con los anticuerpos primarios:

- Anticuerpo policlonal DSPP.
- Anticuerpo monoclonal DMP-1.
- Anticuerpo monoclonal Actina.

Luego los anticuerpos primarios que se hayan unido a la membrana fueron detectados mediante anticuerpos secundarios:

- Anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP)



- Anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP)

En la siguiente etapa las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con el reactivo de quimioluminiscencia EZ-ECL (Cellseco Ltd) y posteriormente fotografiadas en un equipo fotodocumentador Amersham AI600 (GE HealthCare).

## 5.6 ANÁLISIS DE IMÁGENES

Posteriormente las imágenes fueron procesadas y analizadas mediante el programa de análisis de imágenes computarizado *Image J*. En éste se analizaron 24 imágenes de Western blot digitalizadas por el fotodocumentador Amersham AI600 (GE HealthCare).

Las bandas de interés fueron 130 kDa, para DSPP, 57 y 37 kDa para los fragmentos de DMP-1 y 42 kDa para la actina.

**Metodología de objetivo específico: “Determinar si Histatina-1 induce la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas”.**

Para este objetivo se realizaron análisis de Western blot de extractos obtenidos de células mesenquimales de la papila apical, las que previamente fueron cultivadas en placas de 12 pocillos y agrupadas según las condiciones: a) Sin tratamiento, b) Tratamiento con Histatina-1. El tratamiento fue realizado por 3 días.

**Metodología de objetivo específico: “Determinar si la inhibición del receptor VEGFR-2 reduce la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas.”**

Para efectuar este objetivo, se realizaron ensayos de Western blot a partir de extractos de células mesenquimales de la papila apical según las siguientes condiciones experimentales: a) **Sin tratamiento de Histatina-1** en presencia del vehículo DMSO, que es un solvente orgánico

utilizado para solubilizar el inhibidor de VEGFR-2, sin el inhibidor, b) Tratamiento **con Histatina-1**, en presencia del vehículo DMSO, c) **Sin tratamiento de Histatina-1** en presencia del inhibidor de VEGFR-2 ZM 323881 (1 $\mu$ M), que es un inhibidor específico del receptor VEGFR-2 (se une al dominio de la tirosina quinasa), d) **Tratamiento con Histatina-1**, en presencia del inhibidor de VEGFR-2. De esta manera se podrá saber si al verse inhibido este receptor se expresan marcadores odontoblásticos a nivel de proteínas. Todos incubados durante 3 días.

## 5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos fueron realizados de manera independiente, al menos 3 veces. Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  el error estándar del número de experimentos independientes indicados (n). Para comprobar la normalidad de la distribución de los datos, se aplicó el test de *Kolmogorov*, en donde todos los datos se distribuyeron de manera normal. Además, se aplicó un test de determinación de *outliers*, obtenido a partir del programa GaphPad v 6.01.

Las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante *t test* no pareado o *Kruskal-Wallis*, según corresponda (software GraphPad Prism). Se consideró un valor de  $P > 0,05$  como estadísticamente significativo.

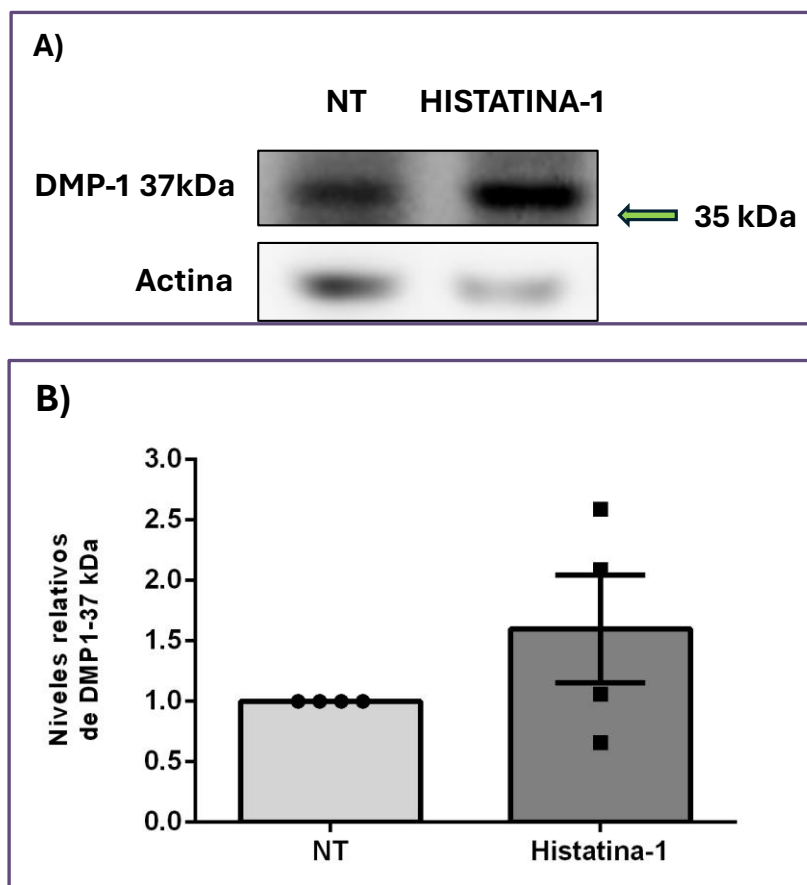
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Histatina-1 induce la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas.

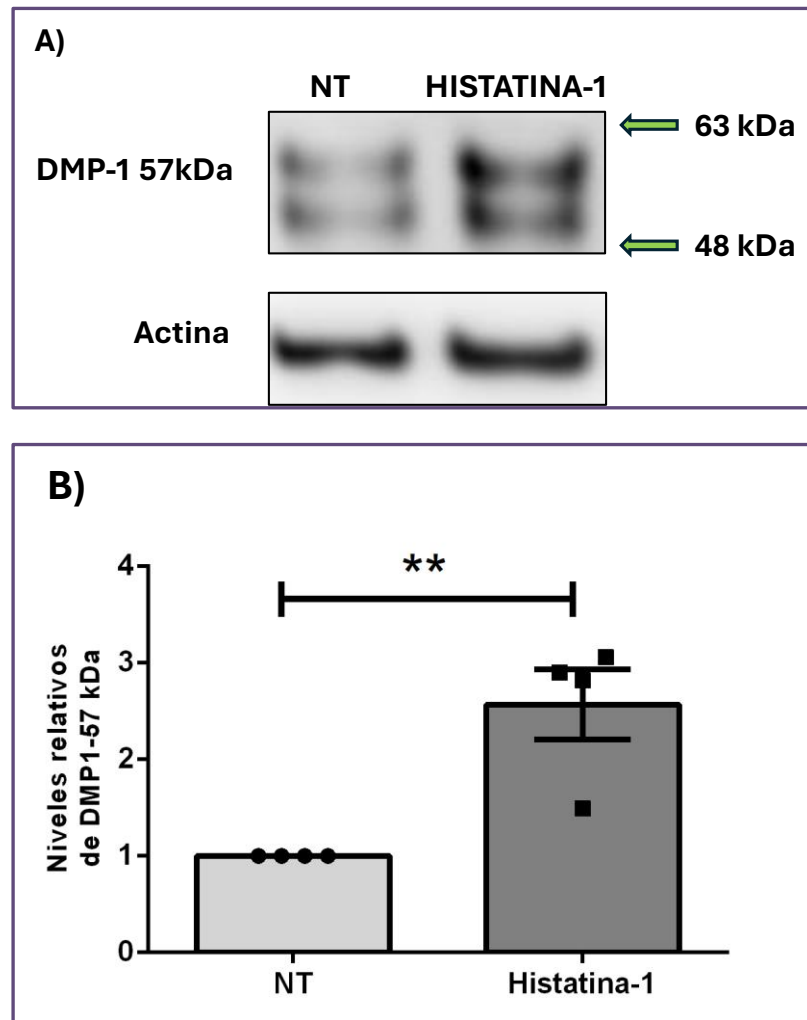
El hecho de que **Histatina-1** sea una proteína que promueve la expresión de marcadores de diferenciación de osteoblastos (**Torres y cols., 2021**) llevó a plantear la hipótesis de que también podría ejercer un efecto similar en células mesenquimales de la papila apical, para promover la expresión de marcadores de diferenciación hacia un tipo odontoblasto.

Para esto se realizó el análisis de Western blot, utilizando 2 anticuerpos, uno anti **DMP-1** (figura 4 y 5) y otro anti **DSPP** (figura 6), ambos en condiciones de control y con tratamiento de Histatina-1 (10µM). Como se mencionó anteriormente DMP-1 es una proteína que intracelularmente se escinde para generar 2 fragmentos; un fragmento de la **región NH<sub>2</sub>-terminal (37 kDa)** y otro fragmento de la **región COOH-terminal (57 kDa)**.

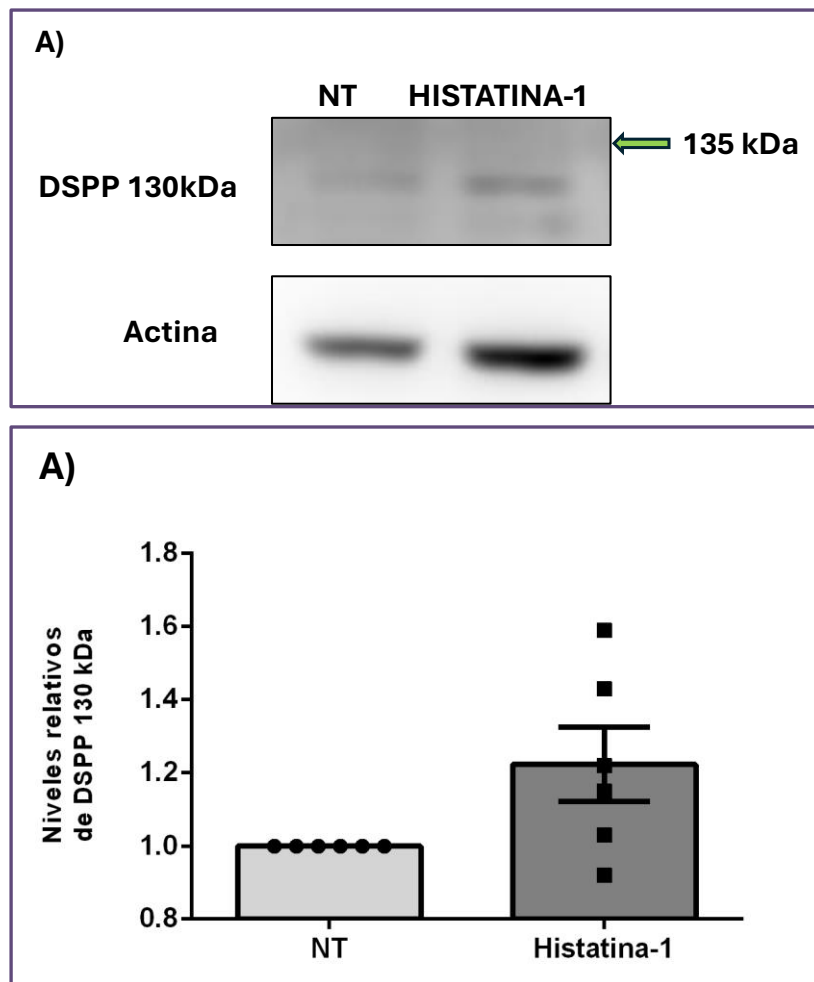
A continuación, se observan los resultados obtenidos de estos experimentos:



**Figura 4.** Efecto de Histatina-1 en la expresión de DMP-1 37 kDa. Células de la papila apical, fueron incubadas por 3 días, un grupo no tratado de control (**NT**) y otro grupo tratadas con Histatina-1, a concentración 10  $\mu$ M (**H1**) se sacaron extractos y se analizaron por Western Blot. **A)** imagen representativa de Western blot obtenidas con los anticuerpos antiDMP-1 (Mouse, monoclonal) donde se observa la porción de 37 kDa, con su respectiva Actina. **B)** cuantificación de 4 experimentos independientes, obtenidos como se describe en **A)**, mediante densitometría de escaneo (DMP-1/Actina), analizado por “*IMAGEJ*”. La gráfica corresponde al promedio de 4 experimentos independientes (promedio  $\pm$  desviación estándar) datos **no estadísticamente significativos**, obtenidos del programa “*GraphPad*”. Con un  $P < 0,05$  ( $P = 0,2279$ ), calculado mediante t test no pareado.



**Figura 5.** Efecto de Histatina-1 en la expresión de DMP-1 57 kDa. Células de la papila apical, fueron incubadas por 3 días, un grupo no tratado de control (**NT**) y otro grupo tratadas con Histatina-1, a concentración 10  $\mu$ M (**H1**) se obtuvieron extractos y se analizaron por Western Blot, **A)** imagen representativa de Western blot obtenidas con el anticuerpo antiDMP-1 (Mouse, monoclonal) donde se observa la porción de 57 kDa, con su respectiva Actina. **B)** cuantificación de 4 experimentos independientes, obtenidos del análisis ejemplificado en **A)**, mediante densitometría de escaneo (DMP-1/Actina), analizado por "IMAGEJ". La gráfica corresponde al promedio de 4 experimentos independientes (promedio  $\pm$  desviación estándar) datos **estadísticamente significativos**, obtenidos del programa "GraphPad". Con un  $P > 0,05$  ( $P = 0,0050$ ), calculado mediante el t test no pareado.

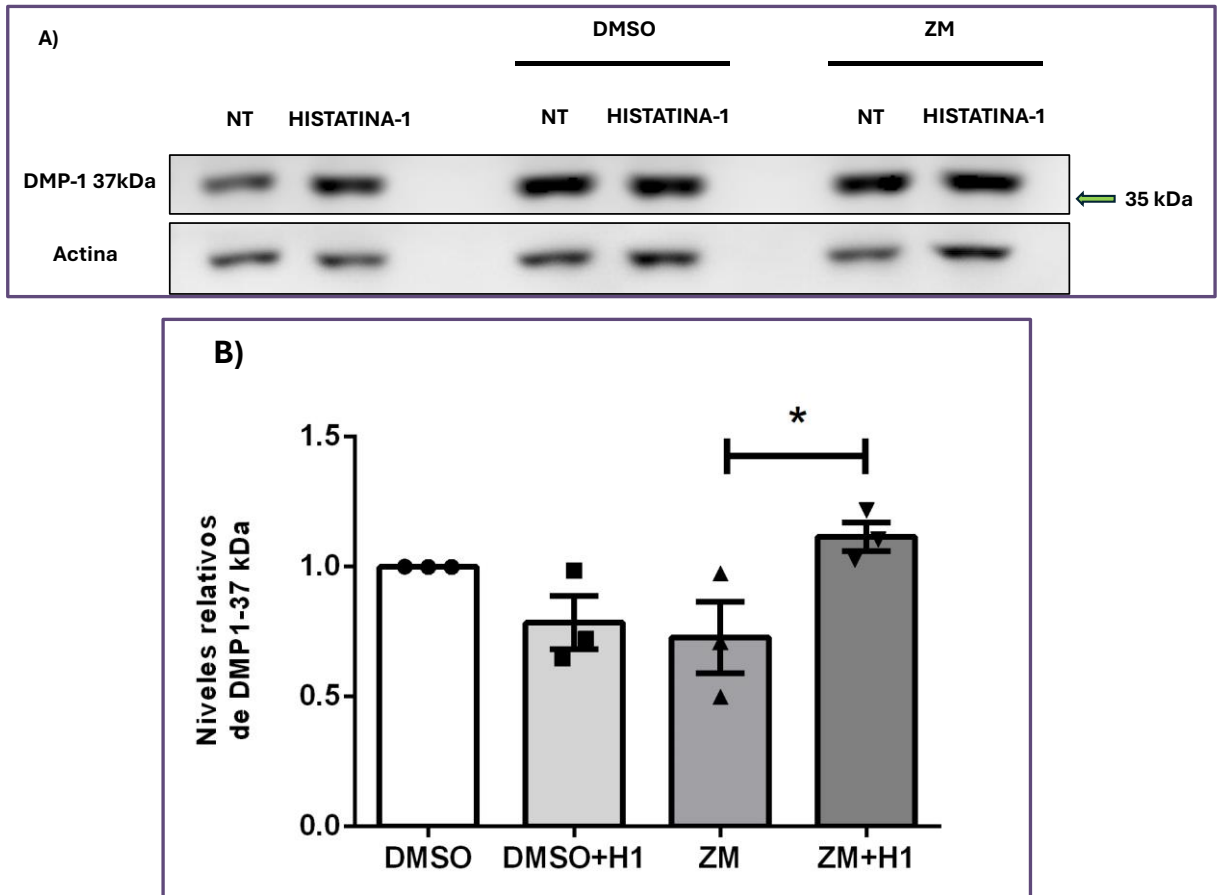


**Figura 6.** Efecto de Histatina-1 en la expresión de DSPP 130 kDa. Células de la papila apical, fueron incubadas por 3 días, un grupo no tratado de control (**NT**) y otro grupo tratadas con Histatina-1, a concentración 10  $\mu$ M (**H1**) se obtuvieron extractos y se analizaron por Western blot. **A)** Imagen representativa de 6 experimentos independientes de Western blot, obtenidas con el anticuerpo antiDSPP (rabbit, policlonal) donde se observa la proteína completa de 130 kDa, con su respectiva Actina. **B)** Cuantificación de 5 experimentos independientes, obtenidos según lo descrito en **A)**, mediante densitometría de escaneo (DSPP/Actina), analizado por "IMAGEJ". La gráfica corresponde al promedio de 6 experimentos independientes (promedio  $\pm$  desviación estándar) datos **no estadísticamente significativos**, obtenidos del programa "GraphPad". Con un  $P > 0,05$  ( $P = 0,0533$ ), calculado mediante el t test no pareado.

## **6.2 Efecto de la inhibición del receptor VEGFR-2 en la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas.**

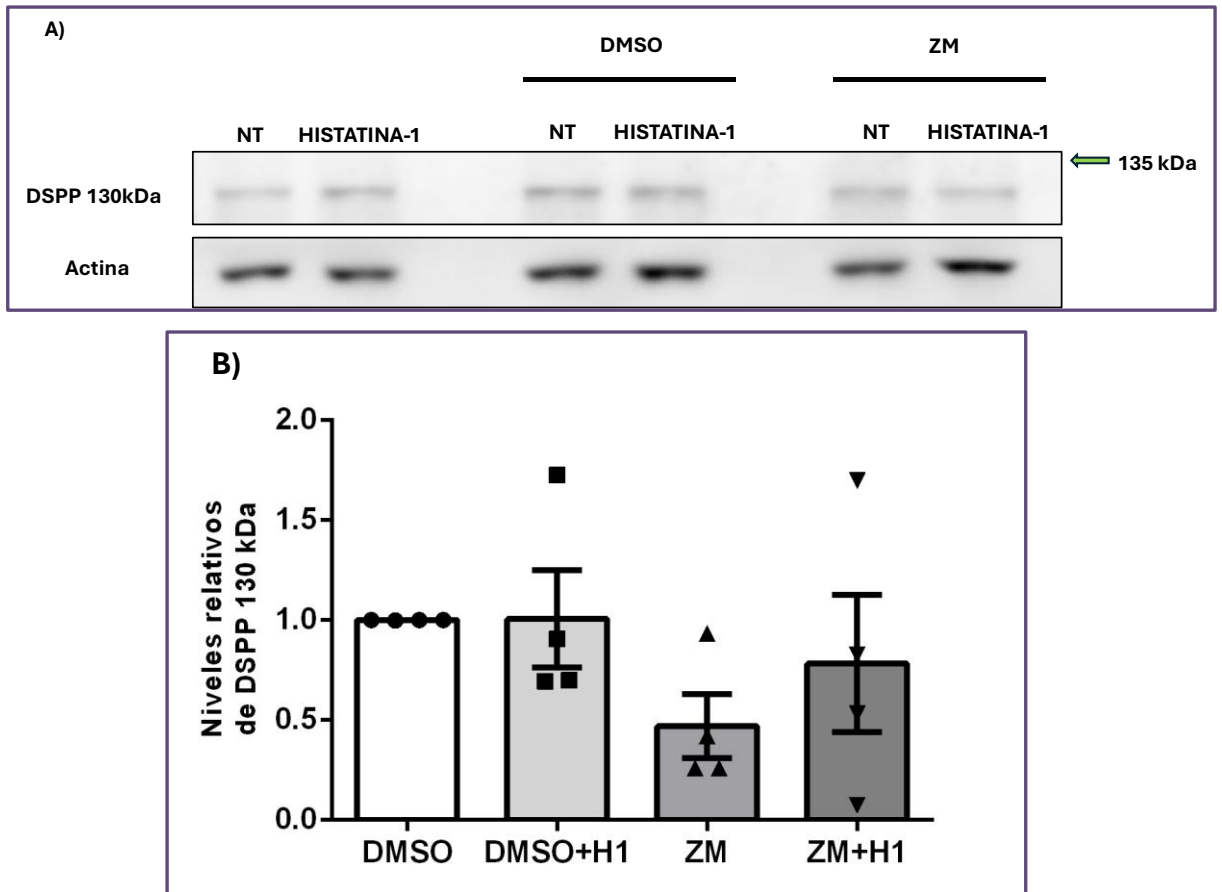
Teniendo en cuenta los antecedentes de que el receptor VEGFR-2 es el receptor de la Histatina-1 en células endoteliales (**Torres y cols., 2017**) y, por otro lado, que este receptor influye directamente en el proceso de diferenciación de los odontoblastos (**Janebodín y cols., 2022**), es que en este objetivo se evaluará si dicho receptor está involucrado en la expresión de marcadores de diferenciación de odontoblastos, por acción de Histatina-1. Es por esto, que se decide utilizar el inhibidor antes mencionado ZM 323881 (1 $\mu$ M) y evaluar de esta manera si disminuye la expresión de los marcadores de diferenciación mencionados a continuación.

Para ello, se eligió el marcador DMP-1 37 kDa (figura 7), porque fue el único obtenido con un número n de repeticiones suficientes para el análisis. Así también se eligió DSPP 130 kDa (figura 8). Lamentablemente, por razones técnicas no se logró visualizar adecuadamente el fragmento de 57 kDa en condiciones de tratamiento con vehículo o inhibidor.



**Figura 7.** Efecto de Histatina-1 bajo la acción del inhibidor del receptor VEGFR-2 (ZM) en la expresión de DMP-1 37 kDa. Células de la papila apical, fueron incubadas por 3 días bajo las siguientes condiciones: a) Sin tratamiento de Histatina-1 en presencia del vehículo DMSO, que es un solvente orgánico usado para aplicar el inhibidor de VEGFR-2, sin el inhibidor, b) Tratamiento con Histatina-1, en presencia del vehículo DMSO, c) Sin tratamiento de Histatina-1 en presencia del inhibidor de VEGFR-2 ZM 323881 (1  $\mu$ M), que es un inhibidor específico del receptor VEGFR-2 (se une al dominio de la tirosina quinasa), d) Tratamiento con Histatina-1, en presencia del inhibidor de VEGFR-2. Se obtuvieron extractos y se analizaron por Western Blot. **A)** imagen representativa de Western blot obtenidas con antiDMP-1 (Mouse, monoclonal) donde se observa la porción de 37 kDa, con su respectiva Actina. **B)** cuantificación de datos extraídos de **A)** fue obtenida por densitometría de escaneo (DMP-1/Actina), analizado por "IMAGEJ", la gráfica corresponde al promedio de 3 experimentos independientes (promedio  $\pm$  desviación estándar) datos **estadísticamente significativos**, obtenidos del programa "GraphRad". \*P > 0,05 calculado mediante el test de Kruskal-Wallis.





**Figura 8.** Efecto de Histatina-1 bajo la acción de inhibidores de receptor VEGFR-2 en la expresión de DSPP 130 kDa. Células de la papila apical, fueron incubadas por 3 días bajo las siguientes condiciones: a) Sin tratamiento de Histatina-1 en presencia del vehículo DMSO, que es un solvente orgánico usado para aplicar el inhibidor de VEGFR-2, sin el inhibidor, b) Tratamiento con Histatina-1, en presencia del vehículo DMSO, c) Sin tratamiento de Histatina-1 en presencia del inhibidor de VEGFR-2 ZM 323881 (1  $\mu$ M), que es un inhibidor específico del receptor VEGFR-2 (se une al dominio de la tirosina quinasa), d) Tratamiento con Histatina-1, en presencia del inhibidor de VEGFR-2. Se obtuvieron extractos y se analizaron por Western blot. **A)** Imagen representativa de Western blot obtenidas con antiDSPP (rabbit, policlonal) donde se observa la proteína completa de 130 kDa, con su respectiva Actina. **B)** cuantificación de datos extraídos de **A)** fue obtenida por densitometría de escaneo (DSPP/Actina), analizado por "IMAGEJ", la gráfica corresponde al promedio de 4 experimentos independientes (promedio  $\pm$  desviación estándar) donde, los datos **no son estadísticamente significativos**, obtenidos del programa "GraphPad". Con un  $P > 0,05$  calculado mediante el test de Kruskal-Wallis.

## 7. DISCUSIÓN

En base a los datos obtenidos, podemos aseverar que Histatina-1 promueve el incremento de 3 marcadores de diferenciación al tipo odontoblasto en células mesenquimales de la papila apical, ya que por un lado encontramos un aumento de DMP-1 en su porción de 57 kDa y 37 kDa, que como se ha dicho anteriormente es un marcador de la diferenciación y mineralización tanto en células osteoblásticas como de células odontoblásticas. Así también, se observó el aumento de DSPP, otro marcador de diferenciación importante de las células odontoblásticas, una de las proteínas más abundantes en la matriz extracelular durante la dentinogénesis, que también se encuentra presente en células osteoblásticas, con la única diferencia de que en los odontoblastos puede llegar a presentarse 400 veces más que en los osteoblastos, si bien DSPP luego se escinde para dar paso a DSP y DPP, ambas son importantes para la diferenciación hacia células odontoblásticas. Más aún, es importante recalcar el hecho de que ambos marcadores (DMP-1 Y DSPP) son relevantes no solo en el proceso de diferenciación, sino que también, ambos con sus fragmentos, son importantes para el proceso de mineralización tanto al actuar como núcleos de cristales como de promover la mineralización de estos cristales.

El hecho de que los resultados del segundo objetivo de la tesis no fueran concluyentes no determina que los experimentos no hayan funcionado y esto se hace notar al observar las condiciones de control (**no tratado versus Histatina-1, sin DMSO, ni ZM**), en donde al observar todos los gráficos e imágenes de los Western blots, estos indican un aumento en los marcadores de DMP-1 y DSPP. Al parecer DMSO genera alguna interferencia sobre el efecto de Histatina-1, porque es en presencia del vehículo que se pierde la inducción de los marcadores de Histatina-1. Es por esto que no se puede concluir la dependencia del receptor VEGFR-2, pero sí una tendencia, ya que al observar los resultados obtenidos notamos que existe variación al utilizar ZM con Histatina-1, lo cual sería

indicativo de cierta relación entre el receptor VEGFR-2 y la Histatina-1 en este contexto. Otra limitante fue no obtener la expresión basal de VEGFR-2 en las células mesenquimales de la papila apical.

Un aspecto que cabe destacar de los resultados obtenidos en los experimentos fue la detección de los marcadores de la proteína DMP-1 en sus fragmentos de 37 y 57 kDa. Como se mencionó anteriormente, estos fragmentos son conocidos **por promover los procesos de mineralización de los cristales de hidroxapatita**, haciendo las veces de nucleadores de estos cristales. Y a su vez, la ausencia de DMP-1 en su forma completa, que inhibe la formación y crecimiento de la hidroxapatita, sugiere que efectivamente podría estar ocurriendo un proceso de mineralización.

Cabe destacar que son necesarios más experimentos para determinar que efectivamente la Histatina-1 es una proteína que induce la diferenciación de las células troncales de la papila apical hacia células odontoblasticas. Una opción sería realizar los mismos experimentos de estimulación con Histatina-1 pero con un medio de incubación distinto, tal que promueva más aún la diferenciación hacia el tipo celular odontoblastico.

Nuestros resultados nos entregan un novedoso posible uso de la Histatina-1, ya que al promover la diferenciación de células mesenquimales de papila apical a un tipo odontoblastico, abre todo un abanico de posibles usos de esta proteína. De especial interés, sería su uso en dientes permanentes inmaduros que han sufrido un traumatismo dentoalveolar o presentan lesión de caries. A lo anterior hay que agregar que en nuestro grupo de estudio ya hemos evidenciado que Histatina-1 tiene un rol importante en la reparación tisular al estimular la migración celular, re-epitelización, adhesión, promover la diferenciación en células preosteoblasticas, y promover la angiogénesis.

Así también, sería interesante estudiar como Histatina-1 modula el patrón de reparación de un grupo celular fundamental en la mantención

de la homeostasis de los dientes permanentes inmaduros como es el tejido del ligamento periodontal.

## 8. CONCLUSIONES

### 8.1 Histatina-1 induce la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas.

En base a lo observado en nuestros experimentos, se puede confirmar que la proteína Histatina-1 induce la expresión de marcadores de diferenciación a odontoblastos a nivel de proteínas en células mesenquimales de la papila apical, para la proteína DMP-1 (57 kDa) en su porción C- terminal de una manera estadísticamente significativa. En tanto que, su fragmento DMP-1 (37 kDa) que es la porción N- terminal, también presenta un aumento respecto de la condición no tratada, la que si bien, no alcanza a ser significativa estadísticamente, corresponde a un dato *borderline* con una tendencia al incremento

La proteína DSPP no se encuentra en un alza significativa estadísticamente, pero, si representa un incremento en comparación con los niveles de los marcadores de los no tratados.

Esto nos da a entender que en células de la papila apical al ser tratados con el péptido Histatina-1 en una concentración de 10  $\mu$ M, todos los marcadores presentaron un aumento de los marcadores de diferenciación respecto de su condición no tratada.

### 8.2 Efecto de la inhibición de VEGFR-2 en la expresión de marcadores de odontoblastos a nivel de proteínas, inducida por Histatina-1.

Lo primero que se observa, a partir, de los resultados es la alteración que ocurre al evaluar **DMSO + Histatina-1**, en donde, en esta condición se genera una disminución de los niveles de los marcadores contrario a lo que se esperaba. Lo anterior nos lleva a pensar que el vehículo puede estar alterando la acción de Histatina-1, ya que al observar

el gráfico de **ZM** (el inhibidor con su vehículo), se observa la disminución esperada de los marcadores al inhibir los receptores. Pero es respecto al marcador de **DMP-1 37 kDa** que se observa en la gráfica del inhibidor **ZM + Histatina-1** un aumento significativo. Sugiriendo así que VEGFR-2 podría estar involucrado en la regulación de los niveles de DMP-1 37 kDa.

Es así, que los resultados obtenidos no son concluyentes y no nos permiten determinar fehacientemente si el receptor VEGFR-2 es requerido para que Histatina-1 produzca algún efecto en las células mesenquimales de la papila apical, ya que no hay inducción de los marcadores en la condición control, donde solo se evalúa el vehículo del inhibidor.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Boink, M. A., Roffel, S., Nazmi, K., van Montfrans, C., Bolscher, J. G. M., Gefen, A., Veerman, E. C. I., & Gibbs, S. (2016). The influence of chronic wound extracts on inflammatory cytokine and histatin stability. *\*PLOS ONE*, 11\*(3), e0152613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152613>
2. Broughton, G., 2nd, Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery*, 117(7 Suppl), 12S–34S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>
3. Castro, M., Torres, P., Solano, L., Córdova, L. A., & Torres, V. A. (2019). Histatin-1 counteracts the cytotoxic and antimigratory effects of zoledronic acid in endothelial and osteoblast-like cells. *Journal of periodontology*, 90(7), 766–774. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0644>
4. Cheng, L., Lei, X., Yang, Z., Kong, Y., Xu, P., Peng, S., Wang, J., Chen, C., Dong, Y., Hu, X., Zhang, X., Forouzanfar, T., Wu, G., & Fu, X. (2021). Histatin 1 enhanced the speed and quality of wound healing through regulating the behaviour of fibroblast. *Cell proliferation*, 54(8), e13087. <https://doi.org/10.1111/cpr.13087>
5. Chopra, V., Davis, G., & Baysan, A. (2022). Clinical and Radiographic Outcome of Non-Surgical Endodontic Treatment Using Calcium Silicate-Based Versus Resin-Based Sealers-A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Studies. *Journal of functional biomaterials*, 13(2), 38. <https://doi.org/10.3390/jfb13020038>
6. Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T., & Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends in biochemical sciences*, 28(9), 488–494. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00193-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00193-2)

7. Ding, D. C., Shyu, W. C., & Lin, S. Z. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell transplantation*, 20(1), 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>
8. Elangwe, C. N., Morozkina, S. N., Olekhovich, R. O., Krasichkov, A., Polyakova, V. O., & Uspenskaya, M. V. (2022). A Review on Chitosan and Cellulose Hydrogels for Wound Dressings. *Polymers*, 14(23), 5163. <https://doi.org/10.3390/polym14235163>
9. Ferrara, N., Gerber, H. P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*, 9(6), 669–676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>
10. Garrido, M., Morales, D., Saldías, M. P., Fernández, C., Villalobos, V., Cerda, O., & Cáceres, M. (2021). Cellular response of human apical papilla cells to calcium hydroxide and tricalcium silicate-based cements. *BMC oral health*, 21(1), 106. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01467-6>
11. Gericke, A., Qin, C., Sun, Y., Redfern, R., Redfern, D., Fujimoto, Y., Taleb, H., Butler, W. T., & Boskey, A. L. (2010). Different forms of DMP1 play distinct roles in mineralization. *Journal of dental research*, 89(4), 355–359. <https://doi.org/10.1177/0022034510363250>
12. Gómez, Ma. E., Campos, A. (2002). *Histología y Embriología Bucodental*. Editorial Médica Panamericana S.A.
13. Gomez-Sosa, J. F., Diaz-Solano, D., Wittig, O., & Cardier, J. E. (2022). Dental Pulp Regeneration Induced by Allogenic Mesenchymal Stromal Cell Transplantation in a Mature Tooth: A Case Report. *Journal of endodontics*, 48(6), 736–740. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2022.03.002>
14. Güiza-Argüello, V. R., Solarte-David, V. A., Pinzón-Mora, A. V., Ávila-Quiroga, J. E., & Becerra-Bayona, S. M. (2022). Current Advances in the Development of Hydrogel-Based Wound Dressings for Diabetic Foot Ulcer Treatment. *Polymers*, 14(14), 2764. <https://doi.org/10.3390/polym14142764>
15. Hu, K., & Olsen, B. R. (2017). Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair. *Developmental*



- dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 246(4), 227–234. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24463>
16. Jadlowiec, J., Koch, H., Zhang, X., Campbell, P. G., Seyedain, M., & Sfeir, C. (2004). Phosphorylation regulates the gene expression and differentiation of NIH3T3, MC3T3-E1, and human mesenchymal stem cells via the integrin/MAPK signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 53323-53330. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407060200>
  17. Janebodin, K., Chavanachat, R., Hays, A., & Reyes Gil, M. (2021). Silencing VEGFR-2 Hampers Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 665886. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.665886>
  18. Kang, J., Fan, W., Deng, Q., He, H., & Huang, F. (2019). Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source for Stem Cell-Based Therapy. *BioMed research international*, 2019, 6104738. <https://doi.org/10.1155/2019/6104738>
  19. Karamifar, K., Tondari, A., & Saghiri, M. A. (2020). Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *European endodontic journal*, 5(2), 54–67. <https://doi.org/10.14744/ej.2020.42714>
  20. Kawashima, N., & Okiji, T. (2016). Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenital anomalies*, 56(4), 144–153. <https://doi.org/10.1111/cga.12169>
  21. Lei, X., Cheng, L., Lin, H., Pang, M., Yao, Z., Chen, C., Forouzanfar, T., Bikker, F. J., Wu, G., & Cheng, B. (2020). Human Salivary Histatin-1 Is More Efficacious in Promoting Acute Skin Wound Healing Than Acellular Dermal Matrix Paste. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 999. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00999>
  22. Li, W., Chen, L., Chen, Z., Wu, L., Feng, J., Wang, F., Shoff, L., Li, X., Donly, K. J., MacDougall, M., & Chen, S. (2017). Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation. *Scientific Reports*, 7(1), 300. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00339-w>

23. MacDougall, M., Simmons, D., Luan, X., Nydegger, J., Feng, J., & Gu, T. T. (1997). Dentin matrix protein-1, dentin sialophosphoprotein, and dentin sialoprotein are distinct gene products. *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 835-842. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.15.835>
24. Maher, A., Núñez-Toldrà, R., Carrio, N., Ferres-Padro, E., Ali, H., Montori, S., & Al Madhoun, A. (2018). The Effect of Commercially Available Endodontic Cements and Biomaterials on Osteogenic Differentiation of Dental Pulp Pluripotent-Like Stem Cells. *Dentistry journal*, 6(4), 48. <https://doi.org/10.3390/dj6040048>
25. Mahmoud, T. & Walton, R. (6 Ed.) (2021). *Endodoncia: Principios y práctica*. Elsevier.
26. Mateluna, C., Torres, P., Rodriguez-Peña, M., Silva, P., Matthies, D. J., Criollo, A., Bikker, F. J., Bolscher, J. G. M., Wilson, C. A. M., Zapata-Torres, G., & Torres, V. A. (2022). Identification of VEGFR2 as the Histatin-1 receptor in endothelial cells. *Biochemical pharmacology*, 201, 115079. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115079>
27. Morotomi, T., Washio, A., & Kitamura, C. (2019). Current and future options for dental pulp therapy. *The Japanese dental science review*, 55(1), 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.001>
28. National Institutes of Health. (n.d.). Stem cell basics. Retrieved July 12, 2024, from <https://stemcells.nih.gov/info/basics/stc-basics>
29. Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian, F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D., Offner, G. D., & Troxler, R. F. (1988). Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *The Journal of biological chemistry*, 263(16), 7472–7477.
30. Oudhoff, M. J., Bolscher, J. G., Nazmi, K., Kalay, H., van 't Hof, W., Amerongen, A. V., & Veerman, E. C. (2008). Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. *FASEB journal : official publication of the*

- Federation of American Societies for Experimental Biology, 22(11), 3805–3812. <https://doi.org/10.1096/fj.08-112003>
31. Oudhoff, M. J., Kroeze, K. L., Nazmi, K., van den Keijbus, P. A., van 't Hof, W., Fernandez-Borja, M., Hordijk, P. L., Gibbs, S., Bolscher, J. G., & Veerman, E. C. (2009). Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1,000-fold. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), 3928–3935. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137588>
32. Oudhoff, M. J., Kroeze, K. L., Nazmi, K., van den Keijbus, P. A., van 't Hof, W., Fernandez-Borja, M., Hordijk, P. L., Gibbs, S., Bolscher, J. G., & Veerman, E. C. (2009). Structure-activity analysis of histatin, a potent wound healing peptide from human saliva: cyclization of histatin potentiates molar activity 1,000-fold. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(11), 3928–3935. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137588>
33. Prasad, M., Butler, W. T., & Qin, C. (2010). Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) in Biomineralization. *Connective Tissue Research*, 51(5), 404–417. <https://doi.org/10.3109/03008200903329789>
34. Qin, C., Brunn, J. C., Cadena, E., Ridall, A., & Butler, W. T. (2003). Dentin Sialoprotein in Bone and Dentin Sialophosphoprotein Gene Expressed by Osteoblasts. *Connective Tissue Research*, 44(Suppl. 1), 179-183. <https://doi.org/10.1080/03008200390152296>
35. Qin, C., Brunn, J. C., Cook, R. G., Orkiszewski, R. S., Malone, J. P., Veis, A., & Butler, W. T. (2003). Evidence for the proteolytic processing of dentin matrix protein 1: Identification and characterization of processed fragments and cleavage sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34700-34708. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305315200>
36. Sanz, J. L., Rodríguez-Lozano, F. J., Llena, C., Sauro, S., & Forner, L. (2019). Bioactivity of Bioceramic Materials Used in the Dentin-

- Pulp Complex Therapy: A Systematic Review. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1015. <https://doi.org/10.3390/ma12071015>
37. Simancas-Escorcia, V. H. (2019). Fisiopatología de los odontoblastos: una revisión. *Duazary*, 16(3), 87–103. <https://doi.org/10.21676/2389783X.2971>
38. Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics*, 34(2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
39. Toma, A. I., Fuller, J. M., Willett, N. J., & Goudy, S. L. (2021). Oral wound healing models and emerging regenerative therapies. *Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine*, 236, 17–34. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.06.003>
40. Torres, P., Castro, M., Reyes, M., & Torres, V. A. (2018). Histatins, wound healing, and cell migration. *Oral diseases*, 24(7), 1150–1160. <https://doi.org/10.1111/odi.12816>
41. Torres, P., Díaz, J., Arce, M., Silva, P., Mendoza, P., Lois, P., Molina-Berríos, A., Owen, G. I., Palma, V., & Torres, V. A. (2017). The salivary peptide histatin-1 promotes endothelial cell adhesion, migration, and angiogenesis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(11), 4946–4958. <https://doi.org/10.1096/fj.201700085R>
42. Torres, P., Hernández, N., Mateluna, C., Silva, P., Reyes, M., Solano, L., Venegas, S., Criollo, A., Nazmi, K., Bikker, F. J., Bolscher, J., Garrido, M., Cáceres, M., & Torres, V. A. (2021). Histatin-1 is a novel osteogenic factor that promotes bone cell adhesion, migration, and differentiation. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 15(4), 336–346. <https://doi.org/10.1002/term.3177>
43. van Dijk, I. A., Beker, A. F., Jellema, W., Nazmi, K., Wu, G., Wismeijer, D., Krawczyk, P. M., Bolscher, J. G. M., Veerman, E. C. I., & Stap, J. (2017). Histatin 1 enhances cell adhesion to titanium

in an implant integration model. *Journal of Dental Research*, 96(4), 430-436. <https://doi.org/10.1177/0022034516681761>

44. Wu, A., Bao, Y., Yu, H., Zhou, Y., & Lu, Q. (2019). Berberine accelerates odontoblast differentiation by Wnt/ $\beta$ -catenin activation. *Cellular Reprogramming*, 21(2), 108-114. <https://doi.org/10.1089/cell.2018.0060>

## 10. ANEXO



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA  
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

1/2

### ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

Con fecha 13 de Abril de 2018, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Prof. Gina Raineri B., Abogado y Enfermera-Matrona, Mg. Bioética, Secretaria Ejecutiva  
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública  
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista  
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad.  
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra  
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular  
Dra. María Angela Delucchi Bicocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.  
Dr. Miguel O'Ryan, Médico Infectólogo  
Prof.ª Maria Luz Bascuñán Psicóloga PhD, Prof. Asociado.

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado "**TMPRSS11A AS NOVEL AGEING-RELATED MARKER INVOLVED IN SENESCENCE DURING WOUND HEALING**". Y cuyo investigador responsable es la Dra. Monica Caceres Lluch, quien desempeña funciones en Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

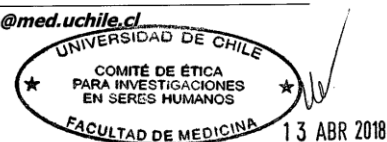
- Proyecto de investigación in extenso.
- CV del investigador responsable y de los Co-investigadores.
- Carta de aceptación de las autoridades de las instituciones en que se realizará el estudio
- Consentimiento Informado.
- Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: No cautiva
- b) Utilidad del Proyecto: Genera conocimiento nuevo en relación a la senescencia celular
- c) Riesgos y Beneficios: No hay riesgos ni beneficios directos para los pacientes del estudio
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): Si, están protegidos
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: Si, está considerado
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto: Si, hay compromiso
- g) Requiere seguimiento Site Visit: Si  No  Tiempo estimado\_Nº de visitas

Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl





**UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA**  
**COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

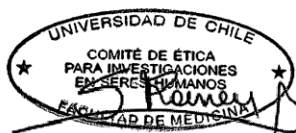
Este comité también analizó y aprobó los correspondientes documentos de Consentimiento Informado en su versión modificada recibida el 13 de Abril de 2018, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por este CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

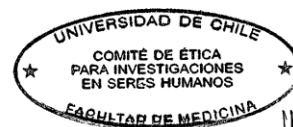
Lugar de realización del estudio: Programa de Biología celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Santiago, 13 de Abril de 2018.



**Sra. Gina Raineri B.**  
**Secretaria Ejecutiva CEISH**

Archivo Proyecto N° 011-2018  
Acta N°005



**Teléfono: 29789536 - Email: comiteceish@med.uchile.cl**

13-ABR 2018