



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TRPV1 EN
CÉLULAS SIMILARES A ODONTOBLASTOS
HUMANOS: UNA ALTERNATIVA
TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL
DOLOR Y LA SENSIBILIDAD DENTINAL**

Karen Lorena Latorre Mora

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2020

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TRPV1 EN CÉLULAS SIMILARES
A ODONTOBLASTOS HUMANOS: UNA ALTERNATIVA
TERAPÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL DOLOR Y LA
SENSIBILIDAD DENTINAL**

Karen Lorena Latorre Mora

Tesis o trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ciencias - Farmacología

Directora:

Dra. Paula Alejandra Baldión Elorza, Ph.D.
OD, MSc Rehabilitación Oral, Ph.D. en Ingeniería - Ciencia y Tecnología de Materiales

Línea de Investigación:

Medicina Oral

Grupo de Investigación:

Investigación Básica y Aplicada en Odontología (IBAPO)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2020

A mis padres y a mi hermana, mi familia, que estuvo presente alentándome en todo este proceso.

A la Universidad Nacional de Colombia, mi segundo hogar.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Karen Lorena Latorre Mora

Fecha 18/08/2020

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos

A la Dra. Paula Baldión, quien me acompañó en todo este proceso y fue, tanto en el ámbito académico como en el personal, un pilar fundamental en el desarrollo de este trabajo; sin su apoyo y comprensión no habría podido culminarlo.

A la Dra. Myriam Velandia y al Dr. Jaime Castellanos, que nos recibieron con la mejor disposición en el Laboratorio de Virología de la Universidad El Bosque y nos prestaron siempre todo su apoyo. Hago extensivo este agradecimiento a todos los miembros del grupo de investigación IBAPO y a los compañeros de laboratorio.

A la Universidad Nacional de Colombia, mi alma máter, que me acogió por segunda vez y a la cual me siento muy orgullosa de pertenecer.

Al Departamento de Farmacia, y a los docentes y compañeros de la maestría, que siempre estuvieron prestos a ayudarme, aconsejarme y enseñarme. De todos ellos aprendí mucho y los recordaré siempre con mucho cariño.

A la Facultad de Odontología, al Comité de Ética y al Servicio de Apoyo Estadístico.

Al Servicio de Patología de la Fundación Santa Fe.

A mis amigos, que siempre estuvieron ahí para mí, animándome en este camino. Mil gracias.

Resumen

La hipersensibilidad dentinal y el dolor dental son motivo de consulta frecuente en odontología; sin embargo, aún no se ha esclarecido totalmente su fisiopatología. Hallazgos previos han permitido relacionar la capacidad sensitiva celular con la activación del receptor polimodal TRPV1, responsable de la respuesta nociceptiva y cuya desensibilización podría provocar analgesia.

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue determinar la expresión, localización y actividad funcional de TRPV1 en células similares a odontoblastos humanos (hOLCs). Se obtuvieron células madre mesenquimales (hDPSCs) que fueron caracterizadas y sometidas a diferenciación odontogénica por 7, 14 y 21 días; y se evaluó su fenotipo mediante inmunofluorescencia para los marcadores odontogénicos proteína de matriz dentinal 1 (DMP-1) y sialoproteína dentinal (DSP). Se estimó la expresión génica de TRPV1 mediante RT-qPCR y la localización del mismo se estableció mediante inmunofluorescencia. Se determinó la CE50 de Eugenol (EUG) y Capsaicina (CAP) y se evaluó la activación del receptor ante estimulación química, térmica y bajo exposición a distintos pH. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía con una prueba *post hoc* de Tukey ($p < 0.05$).

Tras establecer en hOLCs la expresión y localización membranal de TRPV1, se demostró su activación química con EUG y CAP, su activación térmica a ≥ 43 °C, y su activación con pH ácidos < 6 o básicos —entre 9 y 12—. La desensibilización del receptor se logró tras una exposición de 20 min a concentraciones de 603,5 y 1000 μM de EUG. Estos hallazgos representan un aporte para la construcción de un modelo de estudio del dolor pulpar orientado a ofrecer alternativas terapéuticas para estas patologías.

Palabras clave: odontoblasto, hipersensibilidad dentinal, receptor TRP, receptor TRPV1.

Abstract

Dentin hypersensitivity and dental pain are a frequent reason for consultation in dentistry; however, its pathophysiology has not yet been fully clarified. Previous findings have made it possible to relate the cellular sensory capacity with the activation of the polymodal receptor TRPV1, responsible for the nociceptive response and whose desensitization could cause analgesia.

For this reason, the objective of this was to determine the expression, localization and functional activity of TRPV1 in human odontoblast-like cells (hOLCs). The human dental pulp stem cells (hDPSCs) were obtained and characterized and subjected to odontogenic differentiation for 7, 14 and 21 days; and its phenotype was evaluated by immunofluorescence for the odontogenic markers dentinal matrix protein 1 (DMP-1) and dentin sialoprotein (DSP). TRPV1 gene expression was estimated by RT-qPCR and its location was established by immunofluorescence. The EC50 of Eugenol (EUG) and Capsaicin (CAP) was determined and the activation of the receptor was evaluated under chemical, thermal and under changes in pH stimulation. For the statistical analysis, a one-way ANOVA was used with a Tukey *post hoc* test ($p < 0.05$).

After establishing the expression and membrane localization of TRPV1 in hOLCs, its chemical activation with EUG and CAP, its thermal at ≥ 43 °C and its activation with acidic pH < 6 or basic —between 9 and 12— were demonstrated. Receptor desensitization was achieved after 20 min exposure to concentrations of 603.5 and 1000 μM of EUG. These findings represent a contribution to the construction of a pulp pain study model aimed at offering therapeutic alternatives for these pathologies.

Keywords: Odontoblasts, Toothache, Transient Receptor Potential Channels, TRPV Cation Channels, TRPV1 receptor.

Contenido

Resumen	IX
Abstract	XI
Lista de figuras	XV
Lista de tablas	XVII
Lista de símbolos y abreviaturas	19
Introducción	21
1. Marco teórico	24
1.1 Sistema estomatognático.....	24
1.1.1 Sensibilidad dentinal.....	24
1.1.2 Anatomía dental	24
1.1.3 Odontoblastos	25
1.1.4 Inervación pulpar.....	33
1.1.5 Teorías del dolor dental.....	34
1.2 Receptores TRP	36
1.2.1 Clasificación	36
1.2.2 Descubrimiento y diversidad funcional.....	37
1.2.3 Estructura.....	37
1.2.4 Expresión de los receptores TRP	39
1.2.5 Receptor TRPV1	40
1.2.6 Pruebas funcionales en receptores TRPV1	42
2.Objetivos y metodología	44
2.1 Objetivo general.....	44
2.2 Objetivos específicos	44
2.3 Metodología	44
2.3.1 Obtención de hDPSCs	44
2.3.2 Diferenciación de hDPSCs a hOLCs	45
2.3.3 Detección del receptor TRVP1 en células hOLCs.	46
2.3.3.1 Evaluación de la expresión de mensajeros del receptor TRPV1	46
2.3.3.2 Determinación de la presencia del receptor TRPV1	47
2.3.4 Evaluación Funcional Receptor TRPV1.....	47
2.3.4.1. Agonistas y antagonistas del receptor TRPV1	47
2.3.4.2 Determinación de la viabilidad celular con resazurina para establecer la CE50 de EUG y CAP	47
2.3.4.2.1 Ensayo de resazurina.....	47
2.3.4.2.2 Determinación CE50 de EUG y CAP	49

2.3.4.3 Ensayos de estimulación polimodal.....	49
2.3.4.3.1 Ensayo de estimulación química.....	50
2.3.4.3.2 Ensayo estimulación térmica.....	50
2.3.4.3.3 Ensayo estimulación con exposición a distintos pH.....	51
2.4 Consideraciones éticas.....	53
3. Resultados.....	55
3.1 Obtención de hDPSCs.....	55
3.2 Diferenciación de hDPSCs a hOLCs	57
3.3.1 Evaluación de la expresión de mensajeros del receptor TRPV1	60
3.3.2 Determinación de la presencia del receptor TRPV1	61
3.4 Evaluación funcional del receptor TRPV1.....	63
3.4.1 Determinación de la viabilidad celular con resazurina para establecer la CE50 de EUG y CAP	63
3.4.2 Ensayos de estimulación polimodal	63
3.4.2.1 Ensayo de estimulación química	64
3.4.2.2 Ensayo de estimulación térmica.....	65
3.4.2.3 Ensayo de estimulación con exposición a distintos pH.....	65
4. Discusión.....	67
5. Conclusiones y recomendaciones	78
5.1 Conclusiones.....	78
5.2 Recomendaciones.....	79
Bibliografía	81

Lista de figuras

Figura 1-1: Representación esquemática del complejo pulpo dentinal.	25
Figura 1-2: Representación esquemática de las fases de la diferenciación odontoblástica.	28
Figura 1-3: Esquema de las vías de señalización importantes para la diferenciación odontoblástica y la dentinogénesis.	32
Figura 1-4: Representación esquemática de las teorías sobre dolor y sensibilidad dental.	35
Figura 1-5: Clasificación de los receptores TRP.	36
Figura 1-6: Esquema de la diversidad estructural de los receptores TRP.	38
Figura 1-7: Esquema de la estructura química de la CAP.	41
Figura 1-8: Esquema de la estructura química del EUG.	42
Figura 2-1: Representación del ensayo de resazurina para determinar la CE50 del EUG.	47
Figura 2-2: Representación del ensayo de resazurina para determinar la CE50 de la CAP.	48
Figura 2-3: Representación del fundamento de la prueba Fluo-4 AM.	49
Figura 2-4: Representación del ensayo de estimulación química empleando prueba Fluo-4 AM.	50
Figura 2-5: Representación del ensayo de estimulación térmica empleando prueba Fluo-4 AM.	50
Figura 2-6: Representación del ensayo de estimulación con exposición a distintos pH empleando prueba Fluo-4 AM.	51
Figura 3-1: Tiempo de doblaje poblacional en hDPSCs.	55
Figura 3-2: Panel de resultados de citometría de flujo para caracterización de las hDPSCs.	56
Figura 3-3: Evaluación del potencial de diferenciación de hDPSCs a los linajes osteoblástico, condroblástico y adipoblástico.	57
Figura 3-4: Caracterización morfológica del cultivo en el proceso de diferenciación celular.	58

Figura 3-5: Detección inmunocitoquímica de los marcadores odontogénico DMP-1 (A) y DSP (B) en hOLCs.....	58
Figura 3-6: Cuantificación relativa de TRPV1 en hOLCs a diferentes tiempos de diferenciación por técnica de RT-qPCR.	60
Figura 3-7: Detección inmunocitoquímica del receptor TRPV1 en células hOLCs.....	61
Figura 3-8: Cálculo de la CE50 de EUG y CAP en las hOLCs mediante técnica de resazurina	63
Figura 3-9: Estimulación química del receptor TRPV1 en hOLCs.....	64
Figura 3-10: Estimulación térmica del receptor TRPV1 en hOLCs.	65
Figura 3-11: Estimulación del receptor TRPV1 en hOLCs mediante exposición a distintos pH.....	66
Figura 4-1: Mecanismo propuesto para la activación del receptor TRPV1 con CAP.....	68
Figura 4-2: Esquema propuesto de los aminoácidos implicados en la activación del receptor TRPV1 por exposición a distintos pH.	69
Figura 4-3: Modelo propuesto por Okumura <i>et al.</i> (2005) para explicar el mecanismo de transducción de señal mediado por la activación TRPV1 en los OD.	70
Figura 4-4: Modelo propuesto por Shibukawa <i>et al.</i> (2015) para explicar los mecanismos de transducción de señal interodontoblástica y neuro-odontoblástica mediados por activación de TRPV1 en los OD.....	71
Figura 4-5: Representación del modelo propuesto por Tsumura <i>et al.</i> (2012) para explicar el acoplamiento funcional de los receptores TRPV1, CB1 y NCX en OD.	72

Lista de tablas

Tabla 1-1: Características de las fibras sensoriales de la pulpa dental.	34
Tabla 1-2: Diversidad de localización de receptores TRP.	39
Tabla 1-3: Resumen de las pruebas funcionales en receptores TRPV1.....	42
Tabla 2-1: Primers utilizados en el estudio.....	46
Tabla 2-2: Resumen variables estudiadas.	52
Tabla 3-1: Criterios para identificar células madre mesenquimales (MSC).	56

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
AA	Aminoácidos
ALP	Fosfatasa alcalina
ASIC	Canales iónicos sensibles al ácido (Acid-sensing ion channels)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
β -ACT	β -Actina
BMP	Proteína morfogénica ósea
BSP	Sialoproteína ósea
Ca ²⁺	Calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración intracelular de Ca ²⁺
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulina quinasa II
CaV1.2	Canales de calcio regulados por voltaje
CAP	Capsaicina
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CE50	Concentración efectiva 50
COL I	Colágeno tipo 1
CPZ	Capsazepina
DE	Desviación estándar
DEX	Dexametasona
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMP-1	Proteína de matriz dental 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP	Fosfoproteína dental
DPSC	Células madre mesenquimales de pulpa dental
DRA	Dominio de repeticiones de ankirina
DSP	Sialoproteína dental
DSPP	Sialofosfoproteína dental
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ENSAB IV	Estudio Nacional de Salud Bucal IV-2013-2014
EUG	Eugenol
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GDF11	Factor de diferenciación del crecimiento
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
GSK-3 β	Glicógeno sintasa quinasa 3 beta
GT	Ganglio trigeminal
HCl	Ácido clorhídrico
hDPSCs	Células madre mesenquimales de pulpa dental humana (<i>Human dental pulp stem cells</i>)

Abreviatura	Término
HEK-293	Células embrionarias humanas de riñón 293
hOLCs	Células similares a odontoblastos humanos (<i>human odontoblast-like cells</i>)
IGF	Factores de crecimiento similares a insulina
KCa	Canales de potasio activados por calcio
K2P	Canales de potasio de dominio poro
MEC	Matriz extracelular
MDPC-23	<i>Mouse Dental Papilla Cells-23</i>
MSC	Células madre mesenquimales
NaOH	Hidróxido de sodio
NCX	Intercambiadores Na ⁺ /Ca ²⁺
NGF	Factor de crecimiento nervioso
OCN	Osteocalcina
OD	Odontoblasto
OLCs	Células similares a odontoblastos
OPN	Osteopontina
PANX-1	Panexina 1
PC	Par craneano
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
Pi	Fosfato inorgánico
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinasa A
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
SFB	Suero fetal bovino
SIBLING	<i>Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins</i>
SNC	Sistema nervioso central
TA	Temperatura ambiente
TDP	Tiempo de doblaje poblacional
TGF	Factores de crecimiento transformante beta
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante beta1
TRP	Receptores de potencial catiónico transitorio (<i>Transient receptor potential cation channel</i>)
URF	Unidades relativas de fluorescencia

Introducción

La cavidad oral está expuesta a estímulos térmicos, mecánicos y químicos asociados a las funciones del sistema estomatognático (actividad masticatoria, deglución, fonación, etc.) que, en ciertos casos, pueden inducir respuestas nociceptivas, es decir, sensibilidad dentinal o dolor dental, ya sea este agudo o crónico (G. Chung & Oh, 2013; El Karim *et al.*, 2011; Y. S. Kim *et al.*, 2012; Okumura *et al.*, 2005; Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

Específicamente, la sensibilidad o hipersensibilidad dentinal sigue siendo un motivo de consulta frecuente en odontología. Esta patología se presenta como un dolor corto, transitorio y agudo, y afecta a la población adulta en un porcentaje que oscila entre el 8% y el 57%. Aunque aún no se conoce su fisiopatología, se presume que su aparición puede deberse a la exposición directa de los túbulos dentinales al medio oral. Las afectaciones producidas por este padecimiento han impulsado la concepción e implementación de estrategias terapéuticas variadas, tales como la aplicación de fluoruro tópico, de cremas dentales “desensibilizantes”, de geles y de barnices, o como la realización de restauraciones en resina compuesta. No obstante, debido a su elevada frecuencia de falla terapéutica, estas alternativas no han logrado consolidarse como una verdadera solución al problema (Cohen, 2011; J. Kim & Park, 2017).

Según el último Estudio Nacional de Salud Bucal IV-2013-2014 (ENSAB IV), de entre los encuestados, el 5% de la población adulta entre 20 y 79 años definió la salud oral como ausencia de dolor, y el 19.3% refirió haber presentado dolor en la boca o maxilares con una duración superior a una semana. El 70.9% de esta población indicó que dicha condición afectó, en su momento, la ingesta de alimentos; mientras que el 36% declaró que la misma derivó en afectación de sus labores diarias. Por ello, la asociación de las condiciones de sensibilidad dentinal y dolor dental con la disminución de la calidad de vida de los pacientes resulta legítima y plantea desafíos apremiantes (Bekes *et al.*, 2009; Ministerio de Salud y Protección Social, 2014).

Hallazgos previos han permitido relacionar la fisiopatología del dolor dental de tipo agudo o crónico con un proceso inflamatorio. Sin embargo, para el caso de la sensibilidad, los mecanismos moleculares de la percepción dolorosa momentánea no se han dilucidado completamente, es decir, no ha sido posible establecer una asociación directa entre la sensación transitoria percibida por el paciente ante un estímulo térmico, mecánico o químico y un proceso inflamatorio instaurado. Algunos estudios sobre el llamado “complejo pulpo-dentinal” —interfase que comunica a la pulpa (tejido vital del diente) con la dentina (tejido mineralizado)— han permitido caracterizarlo como un sistema sensorial especial capaz de detectar y transmitir estímulos mecánicos, térmicos y químicos. La transducción

de estas señales desencadena finalmente una respuesta patológica enmarcada en determinadas manifestaciones celulares, tisulares y, posteriormente, clínicas (Couve *et al.*, 2013; Yu & Abbott, 2007).

Sin embargo, en el caso de la sensibilidad dentinal, su fisiopatogenia permanece inexplicada. Por ello, se han propuesto tres hipótesis que pretenden dar cuenta del origen de esta patología: una primera, llamada “Teoría del nervio”, explica la sensibilidad como resultado de la estimulación directa de las fibras nerviosas aferentes, responsables de la transmisión del impulso nervioso; una segunda, llamada “Teoría hidrodinámica”, atribuye esta sensibilidad a la estimulación de las terminaciones nerviosas producida por el movimiento del fluido dentinal, presente en los túbulos dentinales; y una tercera, llamada “Teoría odontoblástica”, propone al odontoblasto (OD) mismo como célula receptora y transductora de señal. En cualquier caso, es importante destacar que, de los tres planteamientos mencionados, ninguno está sustentado en una caracterización suficiente de la biología molecular inherente a las patologías pulpares; por lo que este esclarecimiento se constituye como una nueva oportunidad de investigación (Cohen, 2011; Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

Las teorías referidas no están exentas de problemas. Por una parte, aunque en la actualidad la teoría más difundida y aceptada es la hidrodinámica, esta no explica la variabilidad en la respuesta dentinal frente a estímulos de diferente naturaleza. Por otra parte, en el caso de la teoría del nervio, la sensibilidad resulta difícil de explicar en tanto la penetración de las terminaciones nerviosas parece estar limitada a la dentina profunda, lo que deja sin inervación a las superficies que podrían estar en contacto con los estímulos, es decir, a la porción superficial de la dentina y, eventualmente, a la porción media de la misma (Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

En cuanto a la viabilidad de la teoría odontoblástica, hallazgos recientes permiten vislumbrar la posibilidad de que los OD sean, de hecho, células sensoriales capaces de desencadenar respuestas moleculares intracelulares frente a estímulos externos. Esta teoría se ve respaldada por estudios recientes que han demostrado en OD la presencia de receptores específicos que podrían permitir la transducción de señales provocadas por estímulos. Entre ellos, se destacan los receptores de potencial catiónico transitorio —Transient receptor potential cation channel— (TRP), los canales iónicos sensibles al ácido —Acid-sensing ion channels— (ASIC), los receptores purinérgicos, y los canales de potasio de dominio poro (K2P). A su vez, los receptores TRP —los más estudiados hasta el momento— han sido localizados en OD animales (ratas, ratones) y humanos; y, en estos últimos, ha sido reportada la presencia de receptores de los subtipos TRPV1, TRPA1, TRPP1 y TRPM8, y se ha encontrado con mayor frecuencia la presencia del receptor vaniloide TRPV1 (Benarroch, 2015; W. B. Liedtke & Heller, 2007; Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

La activación de este receptor vaniloide se da a través de agonistas vaniloides. De ellos, para la estimulación química, el más estudiado es la capsaicina (CAP), que posee un grupo funcional vanilo (El Karim *et al.*, 2011; Okumura *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2009; Tsumura *et*

al., 2012), y con la cual, adicionalmente, se ha descrito un proceso de desensibilización del receptor, que ocasionaría un efecto analgésico (Fattori, Hohmann, Rossaneis, Pinho-Ribeiro, & Verri, 2016). Teniendo en cuenta la relación estructura-actividad, se plantea la hipótesis de que este receptor podría activarse también con otros compuestos que consten del grupo funcional vanilo, como el eugenol (EUG). El EUG es un compuesto fenólico vaniloide ampliamente usado en odontología, y ha sido descrito como activador del receptor TRPV1 en células HEK-293 transfectadas —ya que, fisiológicamente no expresan en su membrana el receptor—; sin embargo, su efecto en células con fenotipo odontoblástico aún no ha sido estudiado (B.H. Yang, 2013).

Por esta razón, se planteó como objetivo determinar la expresión, localización y actividad funcional del receptor de dolor TRPV1 en un modelo *in vitro* de células similares a odontoblastos humanos (hOLCs) —desarrollado previamente por el grupo de investigación (Baldión *et al.*, 2018)— mediante el sometimiento de las mismas a estímulos químicos con CAP y EUG, a estímulos térmicos y a exposición a distintos pH.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se estableció y caracterizó en el modelo *in vitro* de hOLCs diferenciadas a partir de células madre mesenquimales de pulpa dental humana (hDPSCs) la expresión y localización membranal del receptor TRPV1 evidenciando su activación química con EUG y CAP, térmica a temperaturas ≥ 43 °C, con pH ácidos <6 y con leve activación a pH básicos entre 9 y 12. La desensibilización del receptor se demostró con concentraciones de 603,5 y 1000 μM de EUG con una exposición durante 20 min. Estos hallazgos son importantes porque se consolidan como el paso inicial para la construcción de un modelo de estudio del dolor pulpar que aporte en el desarrollo de una alternativa terapéutica en el tratamiento de la hipersensibilidad dentinal.

Tras establecer en el modelo *in vitro* de hOLCs la expresión y localización membranal de TRPV1, se demostró su activación química con EUG y CAP, su activación térmica a ≥ 43 °C, y su activación con pH ácidos <6 o básicos —entre 9 y 12—. La desensibilización del receptor se logró tras una exposición de 20 min con concentraciones de 603,5 y 1000 μM de EUG. Se demostró, por una parte, que el receptor TRPV1 se activa mediante estímulos químicos, térmicos y exposición a distintos pH; evidencia que, en conjunto, muestra que TRPV1 funciona como integrador para una variedad de entradas sensoriales; y, por otra parte, que el mismo receptor es susceptible de desensibilización mediante estimulación con agonistas vaniloides como el EUG —de forma similar a la CAP—; lo que se perfila como un aporte fundamental para el estudio de la analgesia y el control de la hipersensibilidad dentinal. Estos hallazgos representan una contribución relevante para la construcción de un modelo de estudio del dolor pulpar orientado a ofrecer alternativas terapéuticas para estas patologías.

1. Marco teórico

1.1 Sistema estomatognático

El sistema estomatognático es una unidad morfofuncional constituida por un complejo de estructuras esqueléticas, musculares, vasculares, nerviosas y dentarias integradas para cumplir con una variedad de funciones fisiológicas como masticación, fonación, deglución, dentro de las cuales existen estímulos térmicos, mecánicos o químicos que generan respuestas, en algunos casos de carácter nociceptivo (Cohen, 2011).

1.1.1 Sensibilidad dentinal

La hipersensibilidad dentinal, se presenta como un dolor corto, transitorio y agudo producido por estímulos de diferente naturaleza (osmóticos, táctiles, térmicos, químicos, mecánicos, etc.) dependiendo del paciente, el tiempo de estimulación y el tipo de estímulo, ocurre entre el 8 al 57% de la población adulta y es un motivo de consulta frecuente en odontología. Su severidad puede aumentar en condiciones como recesiones gingivales, lesiones cervicales cariosas y no cariosas, enfermedad periodontal, entre otras. Aún no se conoce su fisiopatología, pero se enuncia que puede deberse a una exposición directa de los túbulos dentinales al medio ambiente oral; por esto, se han empleado diversas estrategias terapéuticas como la aplicación de fluoruro tópico, cremas dentales “desensibilizantes”, geles, barnices o la realización de restauraciones en resina compuesta, que tampoco, se han presentado como una verdadera solución por su alta frecuencia de fallo terapéutico (Cohen, 2011; J. Kim & Park, 2017; K.D Tripathi, 2008).

1.1.2 Anatomía dental

El diente está conformado en su parte coronal —en comunicación con el medio externo— por una matriz altamente mineralizada de esmalte, seguida de la dentina —con menor contenido mineral— y en la zona central, la pulpa dental, un tejido vital blando de origen mesenquimal con células especializadas: los OD, los cuales se encuentran en relación íntima con la dentina, formando el “complejo pulpo-dentinal”, razón por la cual la pulpa y la dentina son consideradas una unidad funcional (Bleicher, 2014; Kawashima & Okiji, 2016)

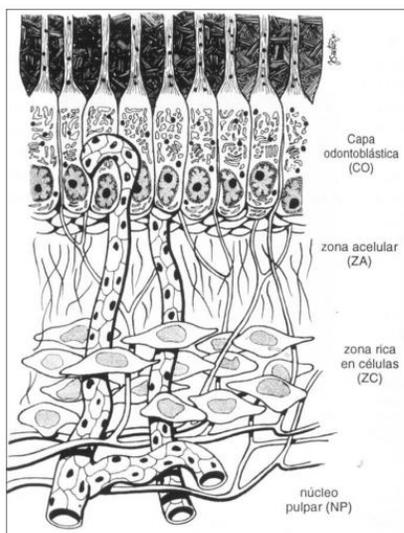
La anatomía dental es un factor determinante en la percepción de diferentes tipos de estímulos, ya que, varias propiedades exclusivas de la pulpa y características únicas de las respuestas dentales se deben a que este tejido se encuentra rodeado por la dentina mineralizada que es mucho más rígida, ocasionando un medio poco distensible que limita considerablemente la capacidad de aumentar su volumen en episodios de vasodilatación, por ejemplo, de origen inflamatorio (Cohen, 2011).

De esta manera, los componentes tisulares de la pulpa dental (axones, vasos sanguíneos, fibroblastos, células del sistema inmune, etc.) responden dinámicamente a los estímulos fisiológicos o patológicos en los que la capacidad de adaptación y respuesta caracteriza al complejo pulpo-dental como un sistema sensorial único, detectando y transmitiendo cambios térmicos, estímulos mecánicos y dolor (Couve *et al.*, 2013).

1.1.3 Odontoblastos

Son células pulpares posmitóticas fijas, diferenciadas y especializadas, reconocidas por su actividad secretora de matriz dentinal que, además, conforman la denominada empalizada odontoblástica (estrato celular más externo de la pulpa dental), en la cual se encuentran sus cuerpos celulares y un proceso o prolongación odontoblástica apical que se internaliza en los túbulos dentinales (**Figura 1-1**). Esta interacción que se genera entre la pulpa y la dentina puede tener una implicación importante en la detección de estímulos externos, considerando este, un aspecto fundamental en el proceso de transmisión de señales externas que desencadenen respuestas intra y extracelulares (Bleicher, 2014; Cohen, 2011; Couve *et al.*, 2013; Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

Figura 1-1: Representación esquemática del complejo pulpo dental.



Se observa la distribución topográfica de los odontoblastos en el complejo pulpo dental y su relación con las diferentes zonas de la pulpa dental. Tomado de Cohen, 2011.

Características

Los OD conformarían la empalizada odontoblástica, compuesta adicionalmente, por capilares, fibras nerviosas y células dendríticas subyacentes. Los OD se caracterizan por ser células cilíndricas altas, polarizadas, con núcleos prominentes localizados basalmente, pueden tener o no varios nucleolos, retículo endoplasmático rugoso altamente ordenado, aparato de Golgi bien desarrollado, gránulos secretorios, gran cantidad de ribosomas y mitocondrias, lo que indicaría gran actividad metabólica (Bleicher, 2014; Cohen, 2011; Kawashima & Okiji, 2016).

Los OD se localizan en la periferia de la pulpa con extensiones citoplasmáticas que se internalizan en la dentina (aproximadamente hasta el primer tercio) dentro de los túbulos dentinales, la prolongación odontoblástica o cilio primario, que se ha planteado como un organelo sensorial esencial al detectar estímulos mecánicos y bioquímicos del microambiente. Adicionalmente, podría participar en la regulación de la formación de dentina tanto primaria como secundaria mediante la secreción de colágeno tipo I (COL I) —principalmente— tipo III y V y, otras proteínas no colágenas (Chang *et al.*, 2019; Magloire *et al.*, 2009).

Las uniones intracelulares entre los OD son firmes, dentro de las cuales se encuentran *zónulas adherens*, *mácula adherens* o desmosomas, y *zónulas occludens* que son determinantes trascendentales de la permeabilidad de la capa odontoblástica, ya que representan una restricción al paso de moléculas, iones o fluidos entre la pulpa y la dentina, actuando como una barrera selectiva bajo condiciones, tanto fisiológicas como patológicas (Bleicher, 2014; Magloire *et al.*, 2009).

Una de las características principales de este tipo celular es su participación en la dentinogénesis, a través de la producción de matriz de fibras colágenas, COL-I principalmente, y de proteínas no colágenas como las que hacen parte de la familia "***Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins***" (SIBLING), que son: la proteína de matriz dentinal 1 (DMP-1), la sialoproteína dentinal (DSP) y la fosfoproteína dentinal o fosfoforina (DPP) productos activos derivados del clivaje de la sialofosfoproteína dentinal (DSPP), la osteopontina (OPN), y la sialoproteína ósea (BSP), que tienen un papel importante en la regulación de la mineralización de la matriz extracelular (MEC) dentinal (Bleicher, 2014; Couve *et al.*, 2013; Qin *et al.*, 2004).

Los genes de estas proteínas SIBLING están ubicados en el cromosoma 4q en humanos. En células similares a odontoblastos (OLC) de ratón se ha demostrado la sobreexpresión de DMP-1 y DSPP, importantes marcadores de diferenciación del fenotipo odontoblástico (Chen *et al.*, 2008).

DMP-1 es una fosfoproteína ácida, expresada predominantemente en dentina y hueso. Se ha descrito que las mutaciones en el gen que codifica para esta proteína generan profundos defectos en la mineralización dental y ósea. En un modelo murino se pudo establecer que DMP-1 induce la citodiferenciación de células madre pulpareas a OD,

otorgándoles la capacidad de generar una matriz extracelular mineralizada (Almushayt *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2008).

Por otro lado, la DSPP se encontraría en mayor cantidad en el tejido dentinal en comparación con el óseo, sus productos —después del procesamiento proteolítico— la DSP y la DPP tendrían diferentes papeles durante las etapas del desarrollo dental. Adicionalmente, se ha reportado que mutaciones heterogéneas en el dominio DSP en humanos se asocian con patologías como dentinogénesis imperfecta tipo II y displasia dentinal tipo II. Asimismo, se ha descrito que DSP podría facilitar la diferenciación de células madre pulpares y la formación de dentina mediante la interacción de su dominio C-Terminal con ocludina activando la vía de señalización FAK, lo cual induce tanto la diferenciación como la migración celular y la mineralización tisular (Chen *et al.*, 2008; W. Li *et al.*, 2017).

Los OD, también cumplen una función importante en el transporte de calcio (Ca^{2+}) y fosfato inorgánico (P_i) en el frente de mineralización de la dentina, siendo este un proceso activo en la dentinogénesis. Se ha demostrado que los OD pueden capturar iones de Ca^{2+} en su porción basal a través de canales de Ca^{2+} activados por voltaje, ya en el citoplasma se transportarían mediante anexinas o calbindina D28K que, posteriormente, serían liberados en su zona apical por intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) o la bomba de Ca^{2+} -ATPasa. El proceso de transporte del P_i se ha estudiado menos, pero se cree que intervendrían cotransportadores Na^+-P_i (Bleicher, 2014).

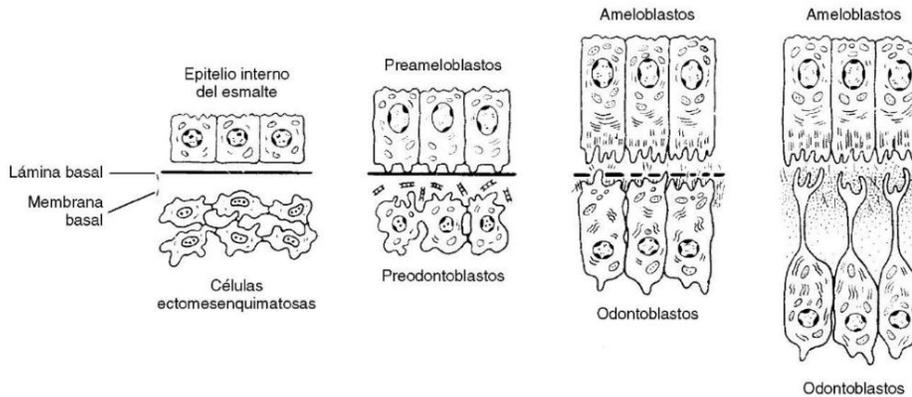
Diferenciación de los odontoblastos

El proceso de diferenciación celular y formación de dentina o dentinogénesis es fundamentalmente controlado por interacciones ecto-mesenquimales, en las que, las células epiteliales que se diferenciarán a ameloblastos forman los “preameloblastos” y estos inducen la diferenciación de las células mesenquimales a OD que, posteriormente, secretarán la matriz dentinal y, al mismo tiempo, estimularán la formación de esmalte por parte de los ameloblastos (**Figura 1-2**). Todos estos procesos están mediados por moléculas señalizadoras como las de la superfamilia de factores de crecimiento transformantes, como la proteína morfogénica ósea (BMP) y el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). (Kawashima & Okiji, 2016).

Antes de esta diferenciación hacia un fenotipo odontoblástico, en la papila dental, las células mesenquimales se organizan a lo largo de la membrana basal formando los “preodontoblastos”, dejan de dividirse y adoptan una forma cilíndrica corta con el núcleo orientado basalmente y con proyecciones citoplasmáticas hacia la lámina basal. Mientras se van diferenciando, adquieren características estructurales de células secretoras de proteínas y se convierten en células cilíndricas altas (50 μm) y de un ancho aproximado de (7 μm) dando inicio a la producción de la primera matriz de dentina con la que, concomitantemente se observa, maduración de fibras colágenas y de proteoglucanos en la MEC. Posteriormente, se va acentuando la prolongación odontoblástica y con la aposición de la dentina inter y peritubular a su alrededor se van formando los túbulos dentinales y lo cual permite adoptar la arquitectura y características propias del complejo

pulpo-dentinal. Todos estos acontecimientos tienen lugar en la etapa de campana del desarrollo dental (Cohen, 2011; Couve *et al.*, 2013).

Figura 1-2: Representación esquemática de las fases de la diferenciación odontoblástica.



Se observa la importancia de la interacción epitelio-mesenquimal en la maduración de los dos tipos celulares: ameloblástico y odontoblástico Tomado de Cohen, 2011.

Aspectos moleculares de la diferenciación odontoblástica

A lo largo de los años, la diferenciación odontoblástica ha sido un tema interesante y un reto en la investigación odontológica, se han propuesto diversos mecanismos y la participación de diversas vías de señalización que estarían implicadas en este proceso, a continuación, presentaremos algunas de ellas y se resumirán en la **Figura 1-3**.

Vía de señalización TGF- β / BMP/SMAD

La superfamilia de factores de crecimiento transformante beta (TGF- β) se compone tanto de TGF- β , como de BMP y otras proteínas relacionadas. La vía de señalización de estas proteínas está implicada en diversos procesos celulares como importantes reguladores de la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, síntesis de MEC, entre otros. Algunos estudios genéticos han descrito trastornos en los OD y en la producción de dentina cuando se altera esta vía de señalización, sugiriendo que la vía TGF- β / BMP/SMAD estaría implicada en estos procesos (T. H. Kim *et al.*, 2015).

De los factores de crecimiento más estudiados en la diferenciación —tanto odontoblástica como osteoblástica— están la familia de las BMP, entre ellas BMP2, BMP4 y BMP7, que han sido reportadas como fuertes inductoras de esta diferenciación odontoblástica y de la mineralización y, de la formación de dentina primaria y secundaria (da Rosa *et al.*, 2018; Kawashima & Okiji, 2016).

Las células madre mesenquimales de pulpa dental (DPSC) tienen el potencial de diferenciación hacia OD en respuesta a las BMP, la unión de los ligandos BMP a sus receptores fosforila y, posteriormente activa las SMAD, una serie de proteínas encargadas

de dirigir la señalización desde la membrana plasmática hasta el núcleo, en donde, generan un estímulo transcripcional que es fundamental durante el desarrollo dental, la comunicación celular, tisular y diferentes procesos fisiológicos dentales. Estas proteínas SMAD se clasifican en:

- Reguladas por receptor (R-SMAD) SMAD 1, 5 y 8 (2, 3 estimuladas por TGF- β 1)
- Mediadoras comunes (CO-SMAD) (SMAD 4 por TGF - β 1)
- Inhibidoras (I-SMAD)

Por un lado, la BMP4 se expresa en pre-odontoblastos, y a medida que va transcurriendo la diferenciación, va siendo regulada negativamente, mientras que, la expresión de BMP2 se regula positivamente en las etapas terminales de la diferenciación de los OD, al igual que el factor de diferenciación del crecimiento (GDF11) (Nie *et al.* 2006).

Por otro lado, las células DPSC en cultivo, expuestas a BMP2 experimentan un aumento de la expresión de DSP en comparación con las no expuestas, lo cual indica su importancia en la adquisición de este fenotipo mineralizante con un potencial de aplicación en ingeniería y regeneración tisular (Nie *et al.*, 2006).

Adicionalmente, se ha demostrado que la vía canónica de BMP en pre-odontoblastos — tipo *Mouse Dental Papilla Cell-23* (MDPC-23)— mediante una sobreexpresión de las SMAD R (smad1/5) activarían los factores de transcripción DLX3, DLX5 y RUNX2, lo cual estimula la expresión de DSPP o y a su vez, la diferenciación y la mineralización del tejido. Asimismo, la BMP2, también podría estimular indirectamente la expresión de DSPP por regulación de la activación de glicógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK-3 β), lo cual, estabiliza β -catenina y la acción de TCF/LEF1 (Cho *et al.*, 2010).

In vivo, en ratones knockout para BMP2 y BMP4 se evidenció una expresión reducida de DSPP, DMP1, BSP y, de forma interesante, un aumento en el COL I, esto indicaría nuevamente el papel de BMP en el fenotipo odontoblástico capaz de secretar matriz dentinal. Se ha mencionado que ambas BMP pueden activar la vía canónica, al igual que vías MAPK, como ERK/MEK, p38 MAPK y JNK para regular la expresión génica (Priyam *et al.*, 2018).

Así mismo, se incluyen otros factores estimulantes de la diferenciación odontoblástica como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), GDF11, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factores de crecimiento similares a insulina (IGF). Dentro de los factores de transcripción importantes en este proceso, algunos mencionados anteriormente, twist, factor nuclear I.C, Notch, Wnt, RUNX2, RUNX3, sp7 y DLX3 (Kawashima & Okiji, 2016).

Se ha demostrado que el factor de transcripción DLX3 es importante en la diferenciación de los OD y en la formación de dentina como regulador de la vía de señalización BMP. En OD que carecen de DLX3 se ha visto una regulación negativa de DSPP, disminución de la secreción de matriz dentinal y alteración de su polaridad (Couve *et al.*, 2013). También se menciona el papel de DLX3 y DLX5 como reguladores de RUNX2 (Chang *et al.*, 2019).

La sobreexpresión de LEF1 en las células pulpares dentales aceleran la diferenciación de OD, regulan DSP y osteocalcina (OCN) *in vitro*, (Yokose & Naka, 2010). Hallazgos que fueron confirmados posteriormente en un estudio *in vivo*, donde concluyen que LEF1 precede a la expresión de DSPP, tanto en dentinogénesis primaria como secundaria, siendo importante en la diferenciación de los OD mediante esta regulación de DSPP (Nakatomi *et al.*, 2013).

TGF- β 1

De manera interesante, en los procesos reparativos, se ha visto una nueva generación de OLC que ocurre en ausencia de epitelio dental, diferente a la dentinogénesis. Este fenómeno se ha estudiado y se ha intentado inducir en una célula progenitora pulpar en la diferenciación hacia OD. Las células pulpares dentales de rata que fueron expuestas a TGF- β 1 al compararlas con las no expuestas a este factor, tuvieron un incremento en la mineralización y la actividad de fosfatasa alcalina (ALP), tras 7 d de exposición a TGF- β 1. Adicionalmente, las células adquirieron polaridad, una forma columnar y expresaron DSP, OPN y COL I, sin afectar la tasa de proliferación celular. El fenotipo obtenido con la diferenciación *in vitro* fue similar a la obtenido *in vivo*, lo que demostró el papel del TGF- β 1 en la diferenciación de los OD y la formación de dentina, tanto *in vivo* como *in vitro* (Y. Li *et al.*, 2011).

Vía Wnt/ β -catenina

Scheller *et al.* (2008) reportaron que la vía canónica de Wnt/ β -catenina inhibía la diferenciación de DPSC hacia un fenotipo mineralizante por un mecanismo mediado por Wnt-1, mediante la inhibición de la actividad de ALP y la formación de nódulos de mineralización. De la misma manera, la sobreexpresión de β -catenina sería suficiente para suprimir la diferenciación y mineralización de las DPSC. Lo anterior, se encuentra en concordancia con Couve *et al.* (2013), quienes afirmaron que la inhibición de la señalización de Wnt/ β -catenina juega un papel importante en la diferenciación de OD y la formación de dentina (Couve *et al.*, 2013; Scheller *et al.*, 2008).

En el estudio de Kim *et al.* (2011) se determinó que la señalización vía Wnt/ β -catenina se requiere, tanto en el epitelio como en el mesénquima, para que se den estas interacciones epitelio-mesenquimales en el proceso de morfogénesis dental. Sin embargo, enuncian que no es claro su papel en la diferenciación celular y en la formación del tejido dental duro — esmalte, dentina, cemento y hueso alveolar—, por lo cual, empleando un modelo de estudio murino encontraron que esta vía de señalización estaría implicada en una diferenciación prematura de OD y cementoblastos que provocaría una excesiva producción aberrante de dentina y cemento *in vivo*, hallazgos controversiales, ya que, concluyen que la regulación negativa de esta vía puede ser importante para la formación de dentina y cemento durante el desarrollo dental (T. H. Kim *et al.*, 2011).

Por el contrario, otros autores describen que la β -catenina podría estar implicada en la diferenciación odontoblástica de las DPSCs a través de la activación del factor de transcripción RUNX2, descrito como clave en los procesos de diferenciación de los OD y

osteoblastos, activando la transcripción génica de DSPP, DMP-1, BSP y OPN. Adicionalmente, se ha observado una sobreexpresión de RUNX2 durante el proceso de diferenciación, probablemente regulado por β -catenina. Sin embargo, se requerirán más estudios para dilucidar otros posibles mecanismos reguladores de RUNX2 (Han *et al.*, 2014).

Precisamente en un estudio publicado recientemente se evidenció que la berberina, un extracto medicinal de origen chino podría favorecer la diferenciación de DPSC hacia OD mediante la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina logrando la estabilización de β -catenina y su traslocación al núcleo promoviendo la expresión de DMP-1 y DSP (Wu *et al.*, 2019).

En resumen, la evidencia más reciente apoya la teoría de la regulación positiva de la vía en la diferenciación odontoblástica, sin embargo, sería importante esclarecer aún más su papel fisiológico.

Componentes de la MEC

Además de las proteínas colágenas, otras proteínas a las cuales se les ha atribuido una función importante en este proceso son, en primer lugar, la laminina, componente principal de la membrana basal, que promueve la diferenciación de los OD por inducción de la síntesis de DSP y, en segundo lugar, la fibronectina, glicoproteína de adhesión presente en la unión epitelio-mesenquimal que interviene en la polarización de los OD (Kawashima & Okiji, 2016).

Combinación DAG

Se ha descrito un importante papel de la dexametasona (DEX), el ácido ascórbico y el β -glicerofosfato (combinación frecuentemente llamada DAG) en la diferenciación *in vitro* de células madre hacia un fenotipo osteogénico o mineralizante. La primera, DEX, en células madre de médula ósea previene la apoptosis y en células madre mesenquimales promueve la proliferación. Además, induce la expresión de RUNX2 mediada por la activación transcripcional de FHL2 y la vía de señalización wnt/ β -catenina, esto, debido presumiblemente a la unión del elemento de respuesta a glucocorticoides al promotor de FHL2 promoviendo su unión a β -catenina y transporte al núcleo donde se une a TCF/LEF-1, lo cual induce la transcripción de RUNX2. Previamente se había demostrado que la activación de la vía canónica Wnt/ β -catenina promueve la diferenciación osteo y odontoblástica, en parte, gracias a la expresión de RUNX2. Sin embargo, también se observó una sobrerregulación adicional de COL I independiente de RUNX2 posiblemente relacionada con FHL2 (Langenbach & Handschel, 2013).

RUNX2 también se podría regular positivamente a través de diferentes vías relacionadas con DEX:

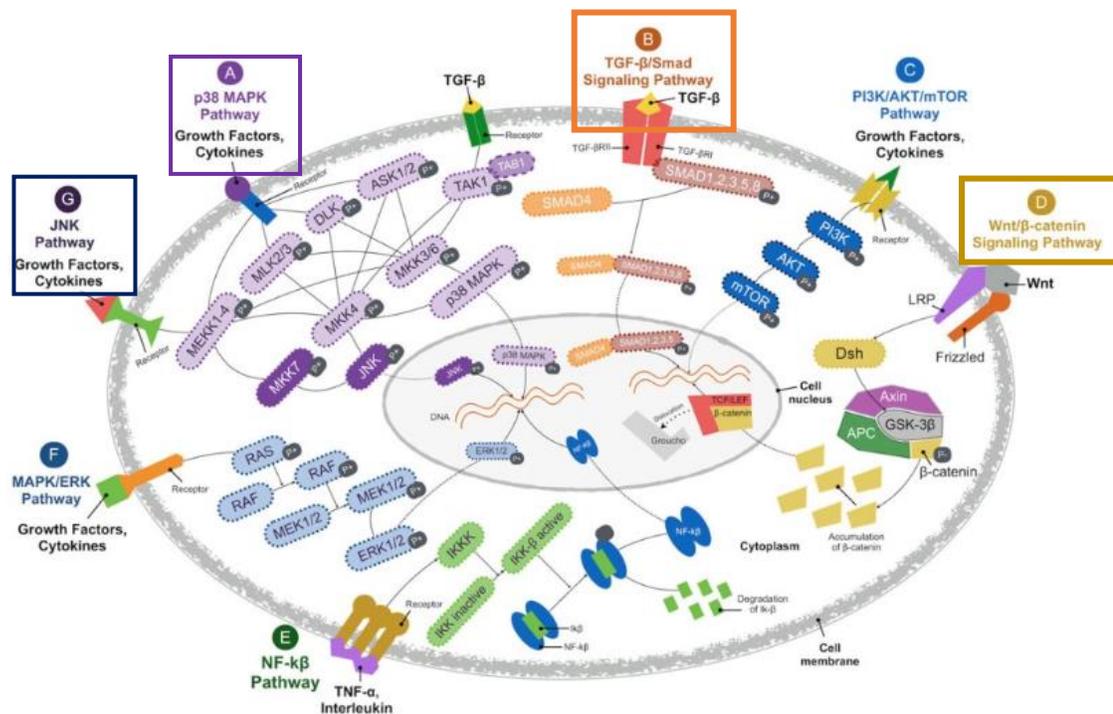
- La interacción de DEX con TAZ (un activador co-transcripcional con motivo de unión PDZ) una molécula parecida a la β -catenina.

- En la vía MAPK, específicamente DEX incrementa la expresión de MKP-1 ocasionando la desfosforilación de RUNX2 en ser-125, por ende, una mejor activación de RUNX2, siendo crucial en el proceso de diferenciación osteogénica y, posteriormente, del proceso de mineralización.
- DEX también intervendría a través de fosforilaciones, por ejemplo, en contacto con COL I o con Pi extracelulares, podría activar RUNX2 por fosforilaciones en otros sitios.
- Estimulación de las BMP descritas anteriormente (Langenbach & Handschel, 2013).

En cuanto al ácido ascórbico, se demostró que podía influir en la diferenciación osteogénica incrementando la secreción de COL I. Este actúa como cofactor de las enzimas que hidroxilan la prolina y la lisina en el procolágeno, otorgándole la capacidad de formar su estructura helicoidal de triple hélice. Además, toma relevancia la MEC como inductora de la diferenciación, ya que, en el caso de los osteoblastos deben estar en contacto con la MEC antes de que puedan diferenciarse, estas interacciones se dan entre COL I e integrinas del tipo $\alpha 2\beta 1$ que ocasionan la activación de la vía de señalización MAPK, fosforilación de RUNX2 y, por ende, incremento de la transcripción génica de marcadores como OCN y la diferenciación osteogénica (Langenbach & Handschel, 2013).

Por otro lado, el β -glicerofosfato sirve como una fuente de fosfatos. El Pi como molécula de señalización intracelular importante en la regulación de diversos genes relacionados con la osteogénesis, incrementaría el ARNm de BMP2 a través de la activación de ERK. Además, Pi aumentaría la expresión de BMP2 por medio de la activación de la vía proteínasa K/AMP cíclico, de forma atrayente se demostró que estas dos vías operarían de forma independiente (Langenbach & Handschel, 2013).

Figura 1-3: Esquema de las vías de señalización importantes para la diferenciación odontoblástica y la dentinogénesis.



*Interacción de diversas vías de señalización en la diferenciación de los OD y la formación de dentina. Se destacan las vías mencionadas anteriormente **TGF-β/ BMP/smad** y **Wnt/β-catenina**, **MAPK/ERK**, **p38 MAPK**, **JNK**. Tomado de da Rosa et al., 2018.*

En efecto, resulta interesante identificar todos los eventos moleculares envueltos en la actividad secretoria de los OD y su diferenciación, con el fin de encontrar la manera de modular esta actividad y mantener este fenotipo en el tiempo, por ejemplo, teniendo en cuenta una correlación clínica, encontrar biomateriales que puedan potenciar la respuesta biológica dentino-pulpar (da Rosa et al., 2018; Nakashima, 2005).

1.1.4 Inervación pulpar

El sistema sensitivo de la pulpa está conformado principalmente por neuronas aferentes primarias de carácter sensitivo que responden ante estímulos de diferente naturaleza, ya sean químicos, mecánicos o térmicos que, dependiendo la intensidad, pueden ser percibidos como estímulos dolorosos. Sus cuerpos neuronales se encuentran ubicados en el ganglio trigeminal (GT) —V Par craneano (PC) — se comunican con las neuronas de segundo orden del tronco encefálico y con las de tercer orden hacia el sistema nervioso central (SNC) (Cohen, 2011).

Estas fibras nerviosas sensoriales se pueden clasificar según su diámetro y velocidad de conducción del impulso nervioso. Específicamente en la pulpa y en los túbulos dentinales se pueden encontrar dos tipos: las miélicas tipo A (β o δ) y las amielínicas tipo C, siendo casi el 90% del primer tipo (**Tabla 1-1**) (Bleicher, 2014; Cohen, 2011).

Tabla 1-1: Características de las fibras sensoriales de la pulpa dental.

Fibra	Mielinización	Localización de sus terminaciones	Características del dolor	Umbral de estimulación
A δ	Si	Región pulpo-dentinaria	Agudo, punzante	Relativamente bajo
C	No	Distribuidos a través de la pulpa (región central)	Ardiente, menos soportable que el de las A δ	Relativamente alto, asociado con lesión tisular

Tomado de Cohen, 2011.

Las fibras, como se mencionó anteriormente, provienen del V PC y llegan a la pulpa a través del foramen apical, topográficamente las fibras mielínicas se agrupan en la región central hacia la periferia de la pulpa, hacia el complejo pulpo-dentinal y las fibras C en el centro pulpar. En la zona de la pulpa coronal se conforma un plexo nervioso único denominado plexo de Raschkow en donde las fibras A se desmielinizan, forman el complejo subodontoblastico y algunas fibras configuran terminaciones nerviosas libres en cercanía a los OD. Se enuncia que aproximadamente del 30 al 70% de prolongaciones odontoblasticas estarían en contacto con estas terminaciones nerviosas y que sólo entrarían en la dentina profunda (Bleicher, 2014; Cohen, 2011; Magloire *et al.*, 2009).

Algunos autores refieren, de forma interesante que esta inervación estaría dirigida por los OD, los cuales, al secretar moléculas como factor de crecimiento nervioso (NGF), Sema7A y reelina, direccionarían estas fibras nerviosas a los lugares apropiados (Bleicher, 2014).

Las glucoproteínas de la MEC podrían promover la adhesión o cercanía entre OD y fibras nerviosas, autores como Magloire *et al.* (2009) proponen que esta estrecha relación podría sugerir que los OD y las terminaciones nerviosas pueden interactuar directamente y lograr un primer paso fundamental en la transmisión del dolor dental (Magloire *et al.*, 2009).

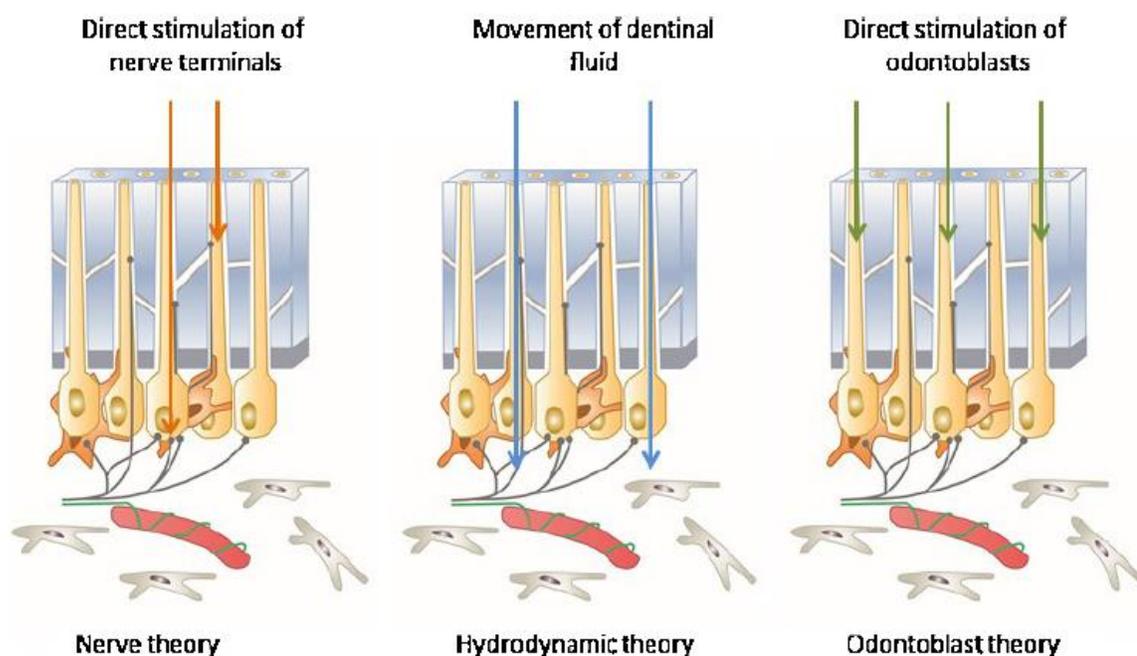
Adicionalmente, se encuentran neuronas eferentes y autónomas que permiten la modulación neurogénica y se dice que pueden tener un papel en la dentinogénesis (Cohen, 2011).

1.1.5 Teorías del dolor dental

Se han postulado principalmente tres teorías que buscan explicar la fisiopatogenia del dolor y la sensibilidad dental (**Figura 1-4**). La primera establece que mediante una estimulación directa a las fibras nerviosas aferentes se genera una respuesta mediada principalmente por la transducción de impulsos nerviosos. En la segunda, denominada “Teoría Hidrodinámica” se enuncia el papel del fluido dentinal en la estimulación nerviosa, en donde, un estímulo puede generar movimiento del fluido dentinal (de los túbulos

dentinales) aumentando la presión intratubular originando una respuesta de las fibras nerviosas aferentes. Y en la tercera teoría, la llamada odontoblástica se propone la existencia de un estímulo directo a los odontoblastos que genera una respuesta a través de la interacción de receptores membranales capaces de responder a estímulos térmicos, mecánicos y/o químicos. De las tres teorías, la más difundida y aceptada es la hidrodinámica. Sin embargo, los mecanismos responsables de la transducción sensorial dolorosa podrían no sólo estar relacionados con el movimiento del fluido dentinal, ya que, la teoría hidrodinámica no explica la variabilidad en la respuesta frente a estímulos de diferente naturaleza por lo que se ha considerado que esta respuesta nociceptiva dental podría ser explicada desde una gran teoría de sistema sensorial polimodal en el que las tres subteorías confluyan y se pueda dar una respuesta a la incógnita (Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

Figura 1-4: Representación esquemática de las teorías sobre dolor y sensibilidad dental.



Teorías (nerviosa, hidrodinámica y odontoblástica) de la fisiopatología del dolor y la sensibilidad dental. Tomado de Solé-Magdalena et al., 2018.

Con respecto a este tipo de respuesta nociceptiva, apoyando la teoría odontoblástica, se ha descrito que los OD, podrían ser células sensoriales capaces de desencadenar respuestas moleculares intracelulares frente a estos estímulos externos. Para confirmar esta teoría, estudios recientes han relatado la presencia de receptores de canales iónicos específicos que pueden tener un papel importante en la transducción de esta señal dolorosa, dentro de los más destacados se mencionan los receptores de tipo TRP, ASIC, receptores purinérgicos, K2P, entre otros (Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

También se ha señalado la presencia de otros receptores como los canales de potasio activados por Calcio (KCa), que pueden tener actividad mecano-sensitiva activándose posterior a un estiramiento de membrana, siendo importantes en la transducción de estímulos mecánicos a eléctricos, ocasionando despolarización de membranas de los OD y de las terminaciones nerviosas. Están colocalizados con los canales de calcio regulados por voltaje (CaV1.2) y participarían activamente en el transporte direccional de Ca^{2+} hacia el frente de mineralización de la dentina (Magloire *et al.*, 2009).

Adicionalmente, otro receptor, TREK-1 ha sido detectado en la membrana de los OD con actividad mecano-sensitiva, presente también, en fibras nerviosas tipo C. Junto con los canales de sodio activados por voltaje. funcionales en los OD, transducirían e integrarían señales somato-sensoriales para provocar respuestas nociceptivas e iniciar una estimulación en fibras nerviosas (Magloire *et al.*, 2009).

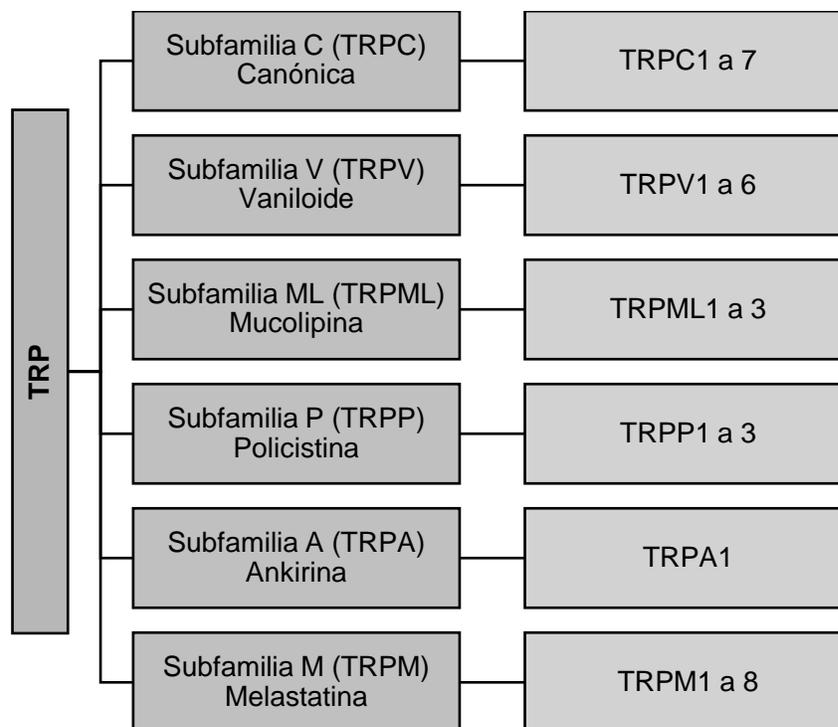
1.2 Receptores TRP

Los receptores TRP son una superfamilia conformada por seis grandes subfamilias cuya clasificación fue basada en el tipo de agonista que ocasiona su activación o características estructurales muy particulares. Por ejemplo, los TRPV se estimulan con Vaniloides, los TRPP con Policistina, los TRPM con Melastatina, los TRPML corresponden a la familia de Mucolipinas, los TRPA se relacionan por su gran cantidad de residuos de Anquirina y los TRPC, los cuales, por ser los primeros en ser descubiertos, se nombraron como “canónicos”. Cada subfamilia tiene diferente cantidad de miembros, completando en mamíferos aproximadamente un total de 28 subtipos con diversas funciones fisiológicas y amplia distribución tisular. La mayoría son descritos como receptores transmembranales y algunos polimodales (sensibles a estímulos mecánicos, químicos y térmicos) que funcionan como canales iónicos permitiendo el flujo de cationes divalentes (Ca^{2+}) y monovalentes (Na^+) generando una respuesta intracelular que varía según el subtipo. Estos receptores resultan ser elementos críticos en la transducción de señales celulares y moleculares de diversa índole (W. B. Liedtke & Heller, 2007).

1.2.1 Clasificación

Puede resumirse como se muestra en la **Figura 1-5**.

Figura 1-5: Clasificación de los receptores TRP.



Subfamilias de los receptores TRP y miembros de cada subfamilia. Elaboración propia con base en datos de: W.B Liedtke & Heller, 2007.

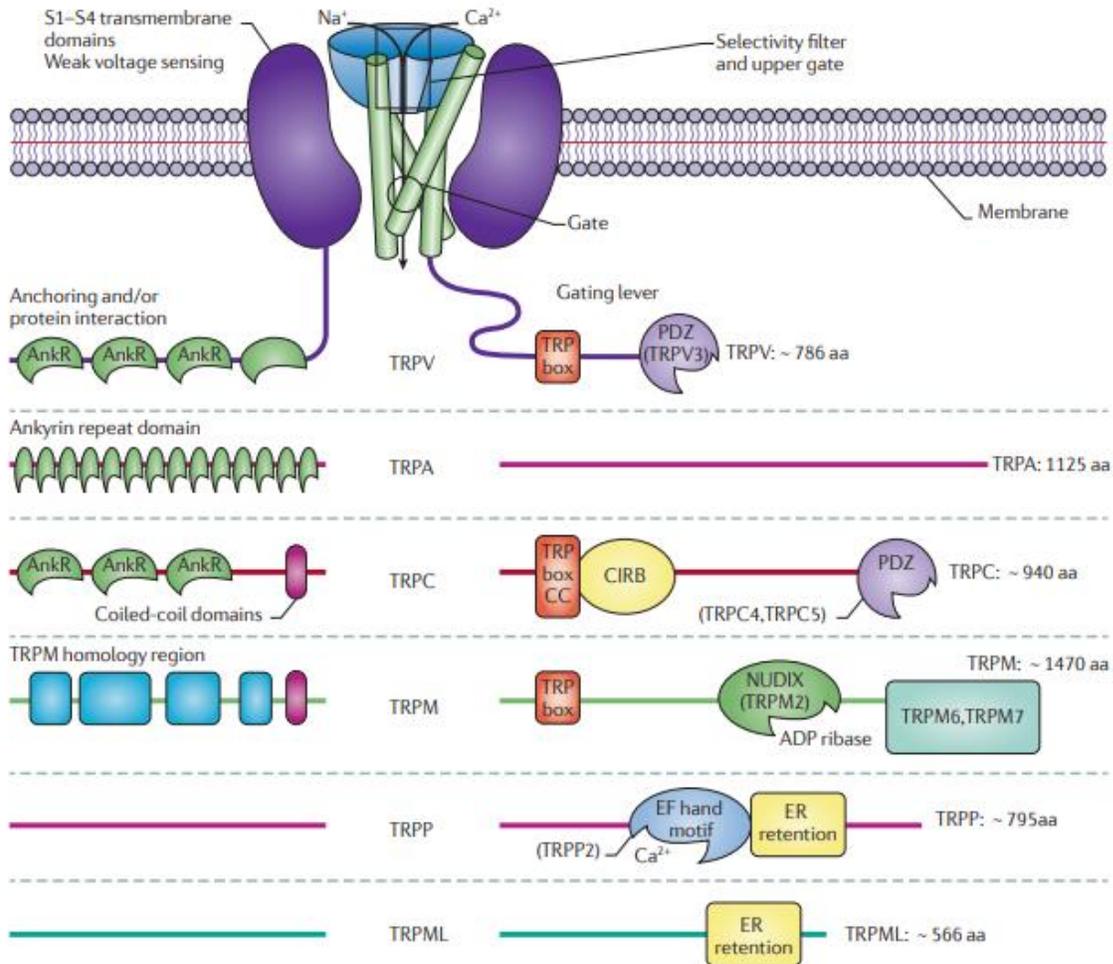
1.2.2 Descubrimiento y diversidad funcional

Fueron descritos por primera vez en *Drosophila Melanogaster* en 1969 a partir de un electroretinograma irregular en el cual se observó un aumento en el potencial retiniano y de ahí su nombre “receptor de potencial transitorio” de siglas TRP. Desde su descubrimiento han sido identificados como receptores sensoriales ya sean de tipo mecánico, osmótico, térmico, etc, atribuyéndoseles diferentes funciones fisiológicas de acuerdo a nuevos hallazgos estructurales, localizaciones en diferentes tipos celulares, mecanismos moleculares que se van dando a lo largo de los años, sin embargo, aún son desconocidas algunas características de determinados subtipos de estos receptores lo que los hace un campo interesante en la investigación científica (Islam, 2011).

1.2.3 Estructura

Estructuralmente, estos receptores TRP son homo o heteroligómeros formados por la asociación de cuatro subunidades alrededor de un eje de simetría central que coincide con el poro iónico. Cada subunidad está formada por seis segmentos transmembrana (S1-S6), un lazo hidrofílico entre el quinto y sexto segmento transmembrana que conforma el poro iónico y dos dominios intracelulares en los extremos amino (N-) y carboxi (C-) terminales que tienen determinadas características y conformaciones según el subtipo del receptor, como se muestra en la **Figura 1-6** (Moran *et al.*, 2011).

Figura 1-6: Esquema de la diversidad estructural de los receptores TRP.



Principales características estructurales de las seis subfamilias de receptores TRP. Nótese que se describe la cantidad aproximada de aminoácidos (aa) que puede variar según el subtipo del receptor y la especie. AnkR: amino terminal ankyrin repeat, RE retention: endoplasmic reticulum, retention domains, CIRB: calmodulin/inositol-1,4,5-tris-phosphate (*Ins*(1,4,5)*P*3) receptor binding domain, NUDIX: nucleoside diphosphate-linked moiety X, PDZ: acronym for postsynaptic density protein 95 (PSD95), DLGA: *Drosophila* disc large tumour suppressor, ZO1: zonula occludens protein 1. Tomado de Moran et al., 2011.

1.2.4 Expresión de los receptores TRP

Estos receptores se han localizado en células de diversas ubicaciones anatómicas de ratones, ratas y humanos como se muestra a continuación en la **Tabla 1-2** (Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

Tabla 1-2: Diversidad de localización de receptores TRP.

Receptor TRP	Localización	Especie	Referencia
TRPM3, TRPM4, TRPA1 y TRPC3	Neuronas aferentes primarias	Rata	(Park <i>et al.</i> , 2006; Story <i>et al.</i> , 2003; T.O. Hermansteyne <i>et al.</i> , 2008)
		Raton	(Vandewauw <i>et al.</i> , 2013)
TRPC1, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM3, TRPM7, TRPM8 y TRPML1	Neuronas del GT	Humanos	(Flegel <i>et al.</i> , 2015; Fu <i>et al.</i> , 2016)
TRPA1			(G. Chung & Oh 2013; Park <i>et al.</i> , 2006; Story <i>et al.</i> , 2003)
TRPV4, TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPM3, TRPP1 y TRPP2	OD	Ratón	(Sato <i>et al.</i> , 2013; Son <i>et al.</i> , 2009)
TRPM7, TRPC1, TRPC6 y TRPV4		Rata adulta	(Kwon <i>et al.</i> , , 2014a, 2014b)
TRPV1, TRPM8 y TRPA1			(Tsumura <i>et al.</i> , 2012)
TRPV1			(Okumura <i>et al.</i> , 2005)
TRPV4	OD en la base del proceso odontoblástico	Humanos	(Solé-Magdalena <i>et al.</i> , 2011)
TRPV1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4			(Palkar <i>et al.</i> , 2015)
TRPM8 y TRPA1			(El Karim <i>et al.</i> , 2011; Y. S. Kim <i>et al.</i> , 2012; Tazawa <i>et al.</i> , 2017)
TRPP1 y TRPP2			(Thivichon-Prince <i>et al.</i> , 2009)
TRPA1	Pulpa dental	Humana	(Y. S. Kim <i>et al.</i> , 2012)
	OD (cuerpo celular)	Humanos	(Y. S. Kim <i>et al.</i> , 2012)

Elaboración propia con base en datos de: Solé-Magdalena et al., 2018.

1.2.5 Receptor TRPV1

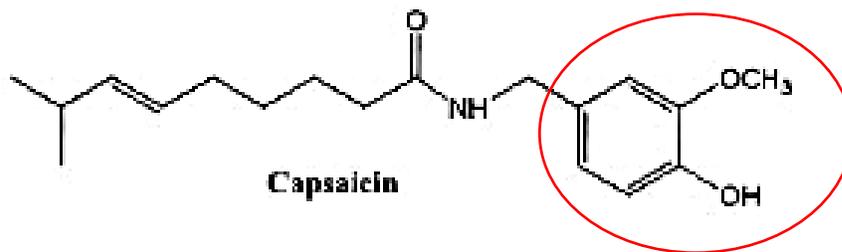
Dentro de los receptores TRP localizados en los OD humanos sobresale este subtipo TRPV1 y los TRPA1, TRPP1 y TRPM8. En 1997 fue descubierto este receptor TRPV1 en neuronas nociceptivas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) y es el miembro más estudiado de esta superfamilia, ya que, se le atribuyó un papel importante en la nocicepción, aunque los mecanismos moleculares aún no se encuentran bien establecidos. Se agrupa dentro de los denominados “Termo-TRP” puesto que, inicialmente se describió que su activación se daba a altas temperaturas ($>42^{\circ}\text{C}$), pero se ha evidenciado que también lo activan otros factores como son una disminución del pH (<5.9), algunos agentes inflamatorios (HPETE, HETE, prostaglandinas, bradiquininas, serotonina o histamina), agonistas naturales (vaniloides: CAP, resiniferatoxin, endocannabinoides como la anandamida y algunos compuestos que carecen del grupo funcional vanilo: dialdehídos insaturados, triprenilfenoles, poliaminas y toxinas animales peptídicas) que desencadenan la apertura del canal iónico y, principalmente, la entrada de Ca^{2+} intracelular por lo que se les clasifica como receptores polimodales. Se ha descrito que su inhibición con antagonistas o su sobreestimulación con moléculas agonistas pueden causar desensibilización del receptor y, así, tener un efecto terapéutico analgésico. (W. B. Liedtke & Heller, 2007; Moran *et al.*, 2011).

Agonistas del receptor TRPV1

- **Vaniloides**

Los Vaniloides, como su nombre indica, son las moléculas agonistas para el receptor vaniloide TRPV1. Se caracterizan por tener en su estructura un grupo funcional vanilo y pueden pertenecer a la clase de capsaicinoides si están estructuralmente relacionados con la CAP, o de lo contrario, a la clase de resiniferanoides, si tienen más similitud con el resiniferatoxin (Islam, 2011).

Dentro del grupo de los Capsaicinoides están más de doce miembros. La CAP (8-metil-N-vanilil-trans-6-nonenamida) (**Figura 1-7**) y la dihidrocapsaicina son los principales componentes pungentes de los pimientos picantes (ají). La sensibilidad a la CAP ha sido una característica clásica de los nociceptores, activa potentemente el receptor TRPV1 con una concentración efectiva 50 (CE50) de que en los reportes oscila entre 0.04 a 1 μM dependiendo el tipo celular. La alta lipofilia de la CAP, resiniferatoxin y otros vaniloides permiten a estos compuestos cruzar fácilmente la membrana plasmática y se cree que activan intracelularmente el sitio de unión vaniloide del receptor transmembranal (Huang *et al.*, 2002; Islam, 2011).

Figura 1-7: Esquema de la estructura química de la CAP.

Estructura química de la CAP que posee el grupo funcional vanilo. Tomado de Islam et al., 2011.

La piperina es un alcaloide estructuralmente relacionado con la CAP que se encuentra en las plantas pertenecientes a la familia de las *Piperáceas*, más notablemente en *Piper nigrum*, comúnmente conocida como pimienta negra. Se ha observado que puede activar el receptor TRPV1 en neuronas trigeminales con una CE50 de aproximadamente 38 μM , lo que lo hace menos potente que la CAP. Sin embargo, también ha inducido una desensibilización del receptor, aunque no se conoce su mecanismo de acción (Islam, 2011).

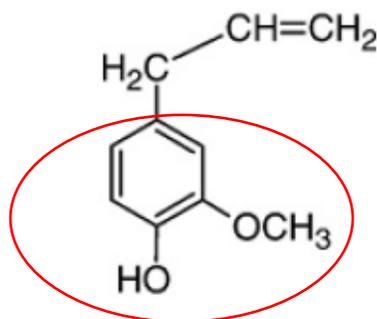
La curcumina es un componente del miembro de la familia *Zingiberaceae* y se ha propuesto para demostrar la actividad en receptores TRPV1. En un modelo de colitis en ratones, la curcumina provocó efectos protectores que revirtieron el uso del antagonista capsazepina (CPZ), lo que sugirió que actúa como un agonista de TRPV1 en tejido inflamado. También, bloquea las corrientes inducidas por CAP en neuronas trigeminales y células que expresan TRPV1, lo que sugiere que la curcumina actúa como un antagonista de TRPV1. Estas observaciones contradictorias hacen importante el estudio de su mecanismo de activación y sensibilización de TRPV1 que, aún, no se ha determinado (Huang *et al.*, 2002; Islam, 2011).

El guayacol es un vaniloide natural de los miembros del *Guaiacum* (arbustos y árboles), así como el humo de la madera y el aceite de clavo, siendo precursor del EUG y la vainilina. Se encontró que el guayacol intratecal inhibe respuestas nociceptivas inducidas por formalina y ácido acético, lo que sugiere que este compuesto actúa como agonista del receptor TRPV1 (Huang *et al.*, 2002; Islam, 2011).

Finalmente, el EUG es un compuesto fenólico vaniloide (**Figura 1-8**) encontrado en grandes cantidades en el aceite de clavo de (*Eugenia caryophyllata*), así como aceite de hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y aceite de la albahaca de clavo (*Ocimum gratissimum*). Se ha descrito como un agonista del receptor TRPV1 en células HEK-293 y neuronas trigeminales con una CE50 de 1 mM (B.H. Yang, 2013), también se ha informado que puede activar otros canales TRP incluyendo TRPV3 (3 mM) y TRPA1 (600 μM). Su acción en el receptor TRPM8 es menos claro, con activación, pero sin efecto reportado. Además, recientemente se informó que inhibe los canales de calcio y sodio, tanto regulados por voltaje como como receptores purinérgicos P2X en las neuronas del GT. Además, este compuesto ha sido ampliamente utilizado en odontología como sedante pulpar, obturador de conductos, cementante provisional, apósito quirúrgico, anestésico

tópico, protector dental, desinfectante de cavidades dentales por sus diversas propiedades analgésicas, anestésicas locales, antioxidantes, bactericidas y antivirales. Aunque, por su interferencia en la adhesión dental de resinas compuestas ha disminuido significativamente su uso, dejando de lado sus múltiples beneficios como material dental. La acción del EUG en estos receptores TRPV1 como objetivos farmacológicos podría contribuir a la actividad analgésica descrita clásicamente (B.H. Yang, 2013; Charan Raja, 2015; Islam, 2011).

Figura 1-8: Esquema de la estructura química del EUG.



Estructura química del EUG que posee el grupo funcional vanilo. Tomado de Islam et al., 2011.

▪ Resiniferanoides

Por otro lado, los resiniferanoides son análogos del vaniloide resiniferatoxin, la cual posee una estructura compleja de diterpeno a la que se unen dos grupos aromáticos, uno de los cuales es un grupo de vanilo. Se une al TRPV1 con una CE50 para la activación de aproximadamente 1 nM (Islam, 2011).

1.2.6 Pruebas funcionales en receptores TRPV1

En algunos estudios se han realizado pruebas funcionales en las cuales las células se someten a diversos estímulos térmicos, mecánicos o químicos con sustancias agonistas o antagonistas con el fin de evaluar la activación o no del receptor, cuantificando principalmente la entrada de Ca^{2+} a la célula mediante pruebas que se denominan electrofisiológicas, información que se resume a continuación en la **Tabla 1-3** para los receptores TRPV1 (El Karim *et al.*, 2011; Okumura *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2009; Tsumura *et al.*, 2012).

Tabla 1-3: Resumen de las pruebas funcionales en receptores TRPV1.

Tipo Celular	Especie	Agonista	Antagonista	Activación	Método	Referencia
OD	Humanos	CAP: 10 μ M	CPZ: 10 μ M	Calor (43°C)	Entrada de Ca ²⁺	(El Karim <i>et al.</i> , 2011)
	Ratas	CAP: 10 μ M	CPZ: 10 μ M		Cambio en el potencial de membrana	(Okumura <i>et al.</i> , 2005)
	Ratones	CAP: 10 μ M	CPZ: 10 μ M	Calor (43°C) (-100 a +100 mV)	Entrada de Ca ²⁺ Voltaje	(Son <i>et al.</i> , 2009)
	Rata	CAP: 10 μ M Anandamida: 10 μ M Resinifenato xin: 10 μ M	CPZ: 10 μ M	Solución acídica: (pH=4)	Entrada de Ca ²⁺	(Tsumura <i>et al.</i> , 2012)
Neuronas aferentes primarias	Rata	CAP: 1 μ M	CPZ: 20 μ M	Calor (43°C)	Entrada de Ca ²⁺ Cambio en el potencial de membrana	(Park <i>et al.</i> , 2006)

Elaboración propia con base en datos de: El Karim et al., 2011; Okumura et al., 2005; Son et al., 2009; Tsumura et al., 2012 y Park et al., 2006.

Por todo lo anterior, se seleccionó el receptor de tipo TRPV1, para la determinación de su expresión *in vitro* en un modelo celular de hOLCs desarrollado previamente por el grupo de investigación Baldión *et al.* (2018) y realizar la evaluación de su actividad funcional mediante su sometimiento a estímulos químicos a través del uso de moléculas como el EUG y la CAP, térmicos y con exposición a distintos pH, con el fin de brindar una aproximación a lo que podría ser una importante diana terapéutica para el dolor dental y la sensibilidad dentinal (Baldión *et al.*, 2018).

2. Objetivos y metodología

2.1 Objetivo general

Determinar la expresión, localización y actividad funcional del receptor polimodal TRPV1 en células similares a odontoblastos humanos.

2.2 Objetivos específicos

Demostrar la expresión de mensajeros y la presencia y localización del receptor TRPV1 en células similares a odontoblastos humanos.

Evaluar la actividad funcional del receptor TRPV1 en células similares a odontoblastos humanos frente a estímulos químicos, térmicos y con exposición a distintos pH.

2.3 Metodología

2.3.1 Obtención de hDPSCs

Siguiendo el protocolo propuesto por Baldión *et al.* (2018), se llevó a cabo la extracción de terceros molares humanos de pacientes sanos de un rango de edad entre 14 y 18 años, previo consentimiento/asentimiento informado y el aval del Comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia (B.CIEFO-122-18). La extracción fue realizada por indicación quirúrgica verificando que los dientes estuvieran sanos, libres de caries y restauraciones. Se descontaminaron y la pulpa fue extraída y sumergida en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) bajo en glucosa (Hyclone, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y antibióticos, en un medio de disociación con colagenasa (3 mg/ml) y dispasa (4 mg/ml) (Sigma-Aldrich; St Louis, MO, USA) por 16 horas en una incubadora con atmósfera humidificada al 5% de CO₂ a 37°C. Se centrifugó la suspensión celular y el pellet se re-suspendió para ser sembrado en frascos de 25 cm², haciendo subcultivos hasta lograr una confluencia del 70%. Para evaluar el comportamiento de la proliferación celular se realizó el cálculo del tiempo de doblaje poblacional (TDP) por técnica de conteo con hemocitómetro empleando azul de tripán aplicando la siguiente

formula: $(t_2-t_1)/3.32 \times (\log n_2 - \log n_1)$ donde t corresponde al número de días en cultivo y n el número de células, el resultado fue comprobado usando el software Doubling Time (Baldión *et al.*, 2018; Roth, 2006).

Las hDPSCs fueron caracterizadas por citometría de flujo según los criterios de la sociedad internacional para la terapia celular (Dominici *et al.*, 2006) con el uso del citómetro FACSCalibur (BD Biosciences; San José, CA, USA) y un cocktail de fenotipado (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) que incluyó anticuerpos para detectar los marcadores CD73, CD90, CD105, CD34, CD14, CD20 y CD45 (Baldión *et al.*, 2018). Con el fin de corroborar el fenotipo mesenquimal indiferenciado y su potencial de diferenciación hacia diferentes linajes. Se indujo la diferenciación hacia el fenotipo osteoblástico, condroblástico y adipoblástico por 21 días. Para la obtención del cultivo de osteoblastos se empleó el medio de diferenciación StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco, Thermo Fisher Scientific) al cual se le realizó tinción con rojo de alizarina (Sigma-Aldrich) con el fin de evaluar nódulos de calcificación y formación de matriz mineralizada. Para la obtención de condrocitos se empleó el medio de diferenciación StemPro® Chondrogenesis differentiation kit (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y se realizó la tinción Alcian Blue (Sigma-Aldrich), con el objetivo de identificar su capacidad de síntesis de proteoglicanos. Por último, para la obtención de adipocitos se empleó el medio de diferenciación StemPro® Adipogenesis differentiation kit (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) y se llevó a cabo una tinción Oil RedO (Sigma-Aldrich), con el fin de identificar lípidos neutros. Las imágenes se obtuvieron con el Microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania) (Mesentier *et al.*, 2014).

2.3.2 Diferenciación de hDPSCs a hOLCs

Para inducir la diferenciación odontoblástica se utilizó un medio DMEM, suplementado con SFB, 100 U/ml de penicilina, y 100 ug/mL de estreptomina; dexametasona al 0,1 μ M (Sigma-Aldrich), β -glicerofosfato a 5 mM (Santa Cruz, CA, USA), 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), y 10 ng/mL de TGF- β 1 (Abcam, Cambridge, MA, USA). Para esto, las hDPSCs fueron expuestas al medio de diferenciación por 7, 14 y 21 días, en una incubadora con atmósfera humidificada al 5% de CO₂ a 37° (Baldión *et al.*, 2018), y se determinó el comportamiento de la expresión del receptor TRPV1 dentro del proceso de diferenciación.

Con el fin de corroborar este fenotipo odontoblástico se realizó una técnica de inmunofluorescencia indirecta para los marcadores odontogénicos DMP-1 y DSP. Para lo cual se siguió el protocolo de Baldión *et al.* (2018). Brevemente, las laminillas de vidrio fueron pretratadas con poli-L-lisina para mejorar la adhesión celular. Se sembraron 8×10^3 células por laminilla para realizar la inmunotinción. Las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4%, y se permeabilizaron con Tritón X-100, para realizar posteriormente, bloqueo con suero de cabra al 10%. Se procedió a incubar a 37°C con anticuerpo primario policlonal humano anti-DMP-1 producido en conejo (Sigma-Aldrich),

diluido 1:50 en suero de bloqueo. Después, las muestras se incubaron con anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado a FITC producido en cabra (Thermo Fisher Scientific), diluido 1:200 en PBS a temperatura ambiente (TA). Los núcleos fueron contrañidos con Hoechst y las láminas fueron montadas con VectaShield (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, EE.UU.) para la observación bajo microscopio de fluorescencia Zeiss Axio Imager A2 microscope (Gottingen, Alemania) analizado con el software AxioVision. Se evaluó la presencia o ausencia de la proteína en las células y su localización en tres experimentos independientes (n=3) (Baldión *et al.*, 2018).

De la misma manera se llevó a cabo el procedimiento para el marcador DSP empleando el anticuerpo primario policlonal humano anti-DSPP producido en conejo (Abcam) que es específico de la porción N-Terminal que corresponde al clivaje natural de DSP (Baldión *et al.*, 2018).

2.3.3 Detección del receptor TRPV1 en células hOLCs

2.3.3.1 Evaluación de la expresión de mensajeros del receptor TRPV1

Para determinar la expresión génica de TRPV1 se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR) usando SYBR Green con el sistema Luna[®] Universal One RT-qPCR Kit (New England BioLabs; USA) y el sistema de detección CFX96 Real-Time Thermal Cyclers detection system (Bio-Rad; Hercules, CA, USA). La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: retro transcripción por 10 min a 55°C, denaturación inicial por 1 min a 95°C, 40 ciclos de amplificación con una temperatura de alineamiento de 58°C empleando los siguientes primers (Macrogen[®]):

Tabla 2-1: Primers utilizados en el estudio.

Gene Bank	Nombre	Secuencia		Tamaño
		Forward	Reverse	
NM_080706	TRPV1	5'-		118 pb
		GGCTGTCTTCATCATCCTGCTGCT-3'		
NM_000576.3	B-ACT	3'-		120 pb
		GTTCTTGCTTCTCTGTGCGATCTTGT-5'		
		5'-CGCCGCCAGCTCACCATG-3'		
		3'-CACGATGGAGGGGAAGACGG-5'		

La eficiencia de la PCR fue calculada usando LinRegPCR (Academic Medical Center, AMC, Amsterdam, Netherlands) y la cuantificación relativa de la amplificación fue realizada con el método Scheffé (Baldión *et al.*, 2018; Schefe *et al.*, 2006).

2.3.3.2 Determinación de la presencia del receptor TRPV1

Para la identificación y localización de TRPV1, se realizaron pruebas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas. Para ello, se sembraron 8×10^3 células / pozo, sobre laminillas de vidrio tratadas con poli-L-lisina en una placa de 24 pozos. Después de alcanzar el 30% de confluencia, las células se fijaron con PFA (4%), se permeabilizaron, y se incubaron con un anticuerpo policlonal primario de conejo, específico para el receptor TRPV1 humano (Thermo Fisher Scientific) en suero de bloqueo. Para la detección se usó Alexa Flúor 594 acoplado a estreptavidina (Thermo Fisher Scientific). Los núcleos se contra tiñeron con Hoechst y fueron observados en el microscopio Axio Imager A2 (Zeiss, Göttingen Alemania) y analizado con el software AxioVision. Se evaluó la presencia o ausencia de la proteína en las células y su localización en tres experimentos independientes ($n=3$) (Baldión *et al.*, 2018; El Karim *et al.*, 2011).

2.3.4 Evaluación Funcional Receptor TRPV1

2.3.4.1. Agonistas y antagonistas del receptor TRPV1

El EUG y la CAP (Sigma Aldrich), fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) para para obtener una solución stock y se mantuvieron refrigerados a -20 °C. La concentración final de DMSO fue menor a 0,1% (v/v) para no afectar los potenciales de corrientes de membrana y la concentración de Ca^{2+} intracelular (El Karim *et al.*, 2011).

2.3.4.2 Determinación de la viabilidad celular con resazurina para establecer la CE50 de EUG y CAP

2.3.4.2.1 Ensayo de resazurina

Se cultivaron 25×10^3 células/ pozo en placas de 96 pozos por 20 h. Las células se trataron durante 1 h con **EUG** a 0,1; 0,5; 1; 5 y 10 mM, después de transcurrido el tiempo se retiró, y se adicionó a cada pozo la solución de resazurina a $4,4 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich) al 10% v/v partiendo de una solución inicial de $44 \mu\text{M}$, y se incubó por 1 h en la incubadora a una atmósfera humidificada al 5% de CO_2 a 37°C . Cumplido el tiempo de incubación, las placas fueron leídas en el espectrofluorómetro Infinite M200 (Tecan; Männedorf, Suiza) a una longitud de onda de $555_{em}/595_{exc}$ nm. Con la medida de intensidad de fluorescencia se calculó el porcentaje de reducción de resazurina a resorufina de los grupos tratados con respecto al control de células sin tratar, el cual fue tomado como el 100%. Se analizaron tres experimentos independientes con 6 réplicas c/u ($n=18$) (**Figura 2-1**) (Baldión *et al.*, 2018).

Figura 2-1: Representación del ensayo de resazurina para determinar la CE50 del EUG.

	Control -	Control Veh	Control +	Eug 0,1 mM	Eug 0,5 mM	Eug 1 mM	Eug 5 mM	Eug 10 mM
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	○	○	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○	○	○
4	○	○	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○	○	○
6	○	○	○	○	○	○	○	○

Diseño del experimento para determinar la CE50 del EUG en placa de 96 pozos. Control (-): Medio DMEM, Control Veh: Control del vehículo (DMSO), Control (+): Triton 1%, Eug: Eugenol, mM: milimolar. Duración de la exposición: 1h en todos los grupos de prueba. Se realizaron tres experimentos independientes con 6 réplicas cada uno (n=18).

De la misma manera, las células fueron expuestas a CAP a 0,5; 1; 5; 10 y 50 μ M durante 1 h siguiendo el mismo protocolo (**Figura 2-2**).

Figura 2-2: Representación del ensayo de resazurina para determinar la CE50 de la CAP.

	Control -	Control Veh	Control +	Cap 0,5 μ M	Cap 1 μ M	Cap 5 μ M	Cap 10 μ M	Cap 50 μ M
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	○	○	○	○	○	○	○	○
2	○	○	○	○	○	○	○	○
3	○	○	○	○	○	○	○	○
4	○	○	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○	○	○
6	○	○	○	○	○	○	○	○

Diseño del experimento en placa de 96 pozos. Control (-): Medio DMEM, Control Veh: Control del vehículo (DMSO), Control (+): Triton 1%, Cap: Capsaicina, μ M: Micromolar. Duración de la exposición: 1h en todos los grupos de prueba. Se realizaron tres experimentos independientes con 6 réplicas cada uno (n=18).

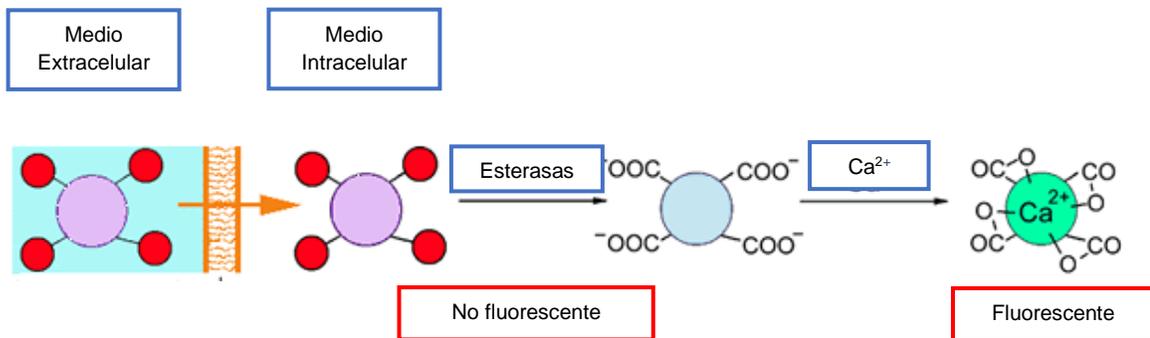
2.3.4.2 Determinación CE50 de EUG y CAP

Con los datos obtenidos del ensayo de viabilidad celular se calculó la CE50 que es la proporción de una sustancia en un medio que causa el 50% del efecto máximo bajo un conjunto de condiciones definidas. Se determinó mediante la realización de las curvas concentración-respuesta para cada concentración de EUG y CAP usadas empleando el software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2.3.4.3 Ensayos de estimulación polimodal

Se realizaron ensayos de estimulación polimodal midiendo el cambio en la concentración intracelular de Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i usando el Kit Fluo-4 AM (F14201 Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) (**Figura 2-3**) como criterio para determinar la activación de TRPV1 en hOLCs. 25 x 10³ células/pozo se sembraron en placas de 96 pozos en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 10 ng/mL de TGF-β1. El día del experimento se cargaron con 100 µL por pozo de Fluo-4AM (4 µM) a 37 °C durante 60 min en oscuridad. Transcurrido el tiempo se retiró el Fluo 4 AM y se adicionaron 100 µL de PBS IX durante 30 min para la de esterificación de los esteres AM. Posteriormente, se retiró el PBS y se agregaron 200 µL de cada sustancia de prueba (según las condiciones a evaluar como se muestra en las **Figuras 2-4, 2-5 y 2-6**) y se realizó la lectura en el espectrofluorómetro (TECAN, Infinite M200) después de 1 min y 20 min de exposición, a una longitud de onda de 494_{em} /520_{exc} nm. La diferencia entre la fluorescencia obtenida y la basal (de células sin estimular) se utilizó como una medida indirecta de los cambios en la [Ca^{2+}]_i. Cada experimento se efectuó por triplicado con 3 réplicas cada uno (n=9).

Figura 2-3: Representación del fundamento de la prueba Fluo-4 AM.



La molécula de Fluo 4 AM (no fluorescente) ingresa a la célula y las esterasas citoplasmáticas clivan los esteres AM de la molécula, dejando el Fluo 4 libre para la captación de los iones Ca^{2+} presentes intracelularmente, momento en el cual se adquiere la capacidad fluorescente y se puede cuantificar por medio de un espectrofluorómetro (TECAN, Infinite M200). Por lo tanto, el aumento de la cantidad de fluorescencia indicará un aumento de la [Ca^{2+}]_i que en este caso se relacionaría con la activación del receptor polimodal TRPV1. Imagen adaptada de la información del Kit Fluo-4 AM (F14201 Invitrogen® Thermo Fischer Scientific).

2.3.4.3.1 Ensayo de estimulación química

Las hOLCs se estimularon con EUG y CAP. Para los dos casos se usó la CE50 que se determinó en el ensayo de viabilidad celular con resazurina (**Figura 2-4**). En el caso de la CAP, la CE50 en los OD coincidió con la reportada previamente por otros autores en OD de rata y ratón (Fu *et al.*, 2016; Okumura *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2009; Tsumura *et al.*, 2012).

Figura 2-4: Representación del ensayo de estimulación química empleando prueba Fluo-4 AM.

	Control -	Control Veh	Cap 10 μ M	Eug 1000 μ M	Eug 603,5 μ M
	A	B	C	D	E
1					
2					
3					

Diseño del experimento de estimulación química en placa de 96 pozos. Grupos de prueba: Control (-): Células sin estimular, Control Veh: Control del vehículo (DMSO), Cap: capsaicina, μ M: micromolar. Eug: eugenol. Lectura en el espectrofluorómetro después de 1 min y 20 min de la exposición. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado (n=9).

2.3.4.3.2 Ensayo estimulación térmica

Las hOLCs se sometieron a medio DMEM sin rojo fenol a diferentes temperaturas en un rango de 37 a 49 °C (**Figura 2-5**). Teniendo en cuenta que en la literatura se reporta una activación del receptor TRPV1 a una temperatura mayor a los 42 °C (+/- 43°C) (El Karim *et al.*, 2011).

Figura 2-5: Representación del ensayo de estimulación térmica empleando prueba Fluo-4 AM.

	Control 37 °C	40 °C	43 °C	46 °C	49 °C
	A	B	C	D	E
1					
2					
3					

Diseño del experimento de estimulación térmica en placa de 96 pozos. Grupos de prueba: Control a temperatura basal: 37 °C, adicionalmente temperaturas de: 40 °C, 43 °C, 46 °C y 49 °C. Lectura en el espectrofluorómetro después de 1 min y 20 min de la exposición. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado (n=9).

2.3.4.3.3 Ensayo estimulación con exposición a distintos pH

Se llevó a cabo la medición del pH del medio DMEM basal en el potenciómetro (Hanna instruments HI 2210, Rhode Island, US) dando como resultado 7,4. Posteriormente, a este medio se le adicionó progresivamente ácido clorhídrico (HCl) a 1 N para acidificarlo y obtener las soluciones con pH de 4, 5 y 6. Adicionalmente, para basificarlo se agregó hidróxido de sodio (NaOH) a 5 N con el fin de obtener las soluciones con pH de 8, 9, 10, 11 y 12. Se realizó la verificación de cada uno de los pH con el mismo potenciómetro calibrado. Las hOLCs se sometieron al contacto con medio de cultivo DMEM a los diferentes pH obtenidos (**Figura 2-6**).

Figura 2-6: Representación del ensayo de estimulación con exposición a distintos pH empleando prueba Fluo-4 AM.

	Control a pH 7	pH 4	pH 5	pH 6	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11	pH 12
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1									
2									
3									

Diseño del experimento de estimulación con exposición a distintos pH en placa de 96 pozos. Grupos de prueba: Control a pH 7 adicionalmente pH 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y 12. Lectura en el espectrofluorómetro después de 1 min y 20 min de la exposición. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado (n=9).

2.3.5. Análisis de resultados

La base de datos se construyó en una hoja de cálculo del programa Excel (Microsoft Office 2010) con la codificación de las variables para cada prueba, empleando el paquete estadístico SPSS Versión 23 para el análisis de los datos.

Se realizó un análisis descriptivo, y para las variables continuas se utilizaron medidas de tendencia central y de dispersión. Para las variables con distribución normal se usó la media y la desviación estándar (DE), para aquellas con distribución no normal, la mediana y rango intercuartil. Las variables cualitativas se describieron en términos de frecuencias y proporciones. Se empleó un análisis de varianza ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey usando un valor de alfa $<0,05$ para significancia estadística.

El resumen de las variables estudiadas se resume en la **Tabla 2-2**.

Tabla 2-2: Resumen variables estudiadas.

Ensayo	Variable Independiente	Variable Dependiente	Tipo De Variable	Unidades	(n)
EVALUACIÓN FENOTIPO hOLC					
Determinación de la presencia DMP-1 y DSP	Fenotipo odontoblástico	Presencia o ausencia de marcadores odontoblásticos DMP-1 y DSP	Cualitativa ordinal	Leve Moderada Fuerte	3
DETECCIÓN DEL RECEPTOR TRPV1 EN hOLCs					
Evaluación de la expresión de mensajeros del receptor TRPV1	Fenotipo odontoblástico	Expresión relativa del receptor TRPV1	Cuantitativa continua	Nº de veces / Expresión del gen housekeeping	9
Determinación de la presencia del receptor TRPV1	Fenotipo odontoblástico	Presencia o ausencia de marcaje con el anticuerpo del receptor TRPV1	Cualitativa ordinal	Leve Moderada Fuerte	3
EVALUACIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR TRPV1 EN hOLCs					
Determinación de la CE50 EUG y CAP	Exposición a EUG y CAP	Viabilidad celular	Cuantitativa continua	(URF) Unidades relativas de fluorescencia	18
ENSAYOS DE ESTIMULACIÓN POLIMODAL: MEDICIÓN DE $[Ca^{2+}]_i$					

Ensayo de estimulación química	Estimulo químico (EUG y CAP)	[Ca ²⁺] _i	Cuantitativa continua	(URF) Unidades relativas de fluorescencia	9
Ensayo estimulación térmica	Estimulo térmico	[Ca ²⁺] _i	Cuantitativa continua	(URF) Unidades relativas de fluorescencia	9
Ensayo estimulación con exposición a distintos pH	Exposición a distintos pH	[Ca ²⁺] _i	Cuantitativa continua	(URF) Unidades relativas de fluorescencia	9

2.4 Consideraciones éticas

El proyecto de tesis de maestría fue sometido al Comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia, se obtuvo el aval ético y aprobación del consentimiento informado [Oficio B-CIEFO-122-18]. Se dio cumplimiento a los artículos 14 al 16 (Título II, capítulo 1) referentes al diligenciamiento de este consentimiento, luego de haber recibido información amplia y suficiente sobre el proyecto no se procedió a la firma de este hasta tanto no fueran aclaradas las dudas expresadas por el participante. Solo se incluyeron personas que voluntariamente aceptaron participar y que lo firmaron (Ministerio de Salud, 1993).

Durante la ejecución del proyecto se tuvieron en cuenta las Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la investigación en salud, establecidas en la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, contemplando los capítulos I y II para investigación en humanos y el capítulo de bioseguridad a los investigadores (Ministerio de Salud, 1993).

De acuerdo con esta resolución y en relación con la investigación en seres humanos (Título II, capítulo 1), esta investigación se clasificó como de riesgo mínimo (literal b del artículo 11) (Ministerio de Salud, 1993).

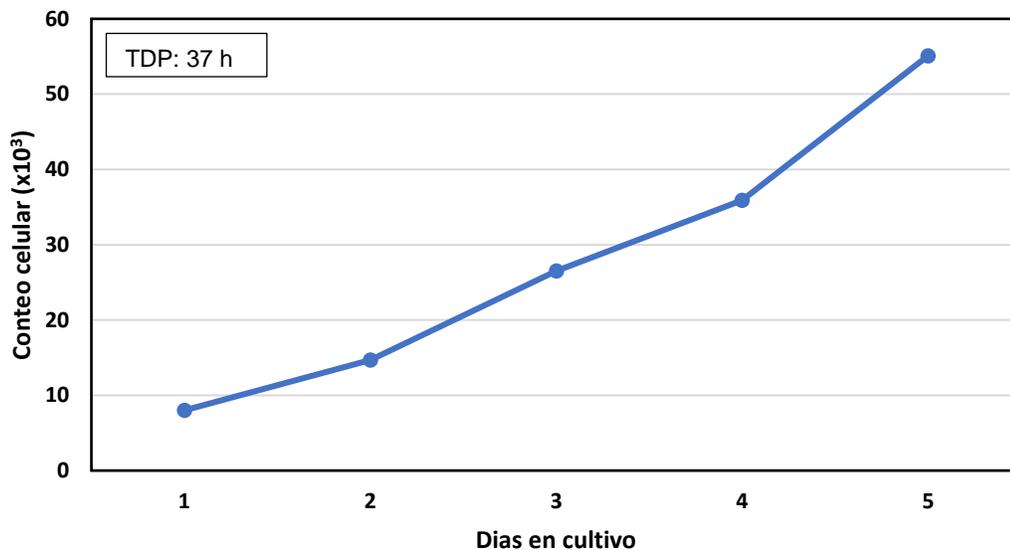
Además se tuvo en cuenta el principio de integridad científica en el manejo y protección de los datos obtenidos experimentalmente, la transparencia, imparcialidad y precisión en la presentación de los resultados.

3. Resultados

3.1 Obtención de hDPSCs

Las células hDPSCs demostraron tener adecuada adherencia en monocapa al plástico, con una morfología alargada, fibroblástica, con agrupaciones celulares en forma de “remolino” y con una buena tasa de proliferación celular con un TDP de 37 h (**Figura 3-1**).

Figura 3-1: Tiempo de doblaje poblacional en hDPSCs.

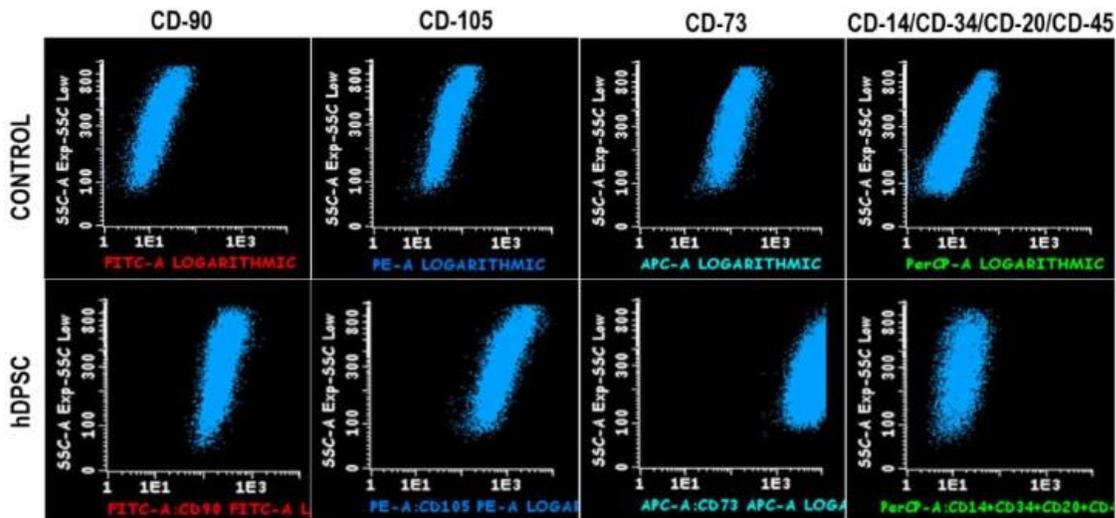


*El TDP se calculó teniendo en cuenta el conteo celular con hemocitómetro realizado en las primeras 96 h (5 d) de cultivo celular, el TDP fue **37 h**. Se muestran los resultados como promedio de tres experimentos independientes por triplicado (n=9).*

Estas células fueron caracterizadas mediante citometría de flujo para evaluar la expresión de marcadores específicos según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (Dominici *et al.*, 2006) (**Tabla 3-1**) con el uso del citómetro FACSCalibur (BD Biosciences; San José, CA, USA). Se demostró su fenotipo mesenquimal encontrando positividad para CD90, CD105 y CD73 en más del 95% de las células y negatividad en menos del 1% para los marcadores hematopoyéticos tempranos CD14, CD20, CD34 y CD45 (**Figura 3-2**). Adicionalmente se demostró su capacidad de diferenciación *in vitro* hacia los linajes osteoblástico, condroblástico y adipoblástico (**Figura 3-3**).

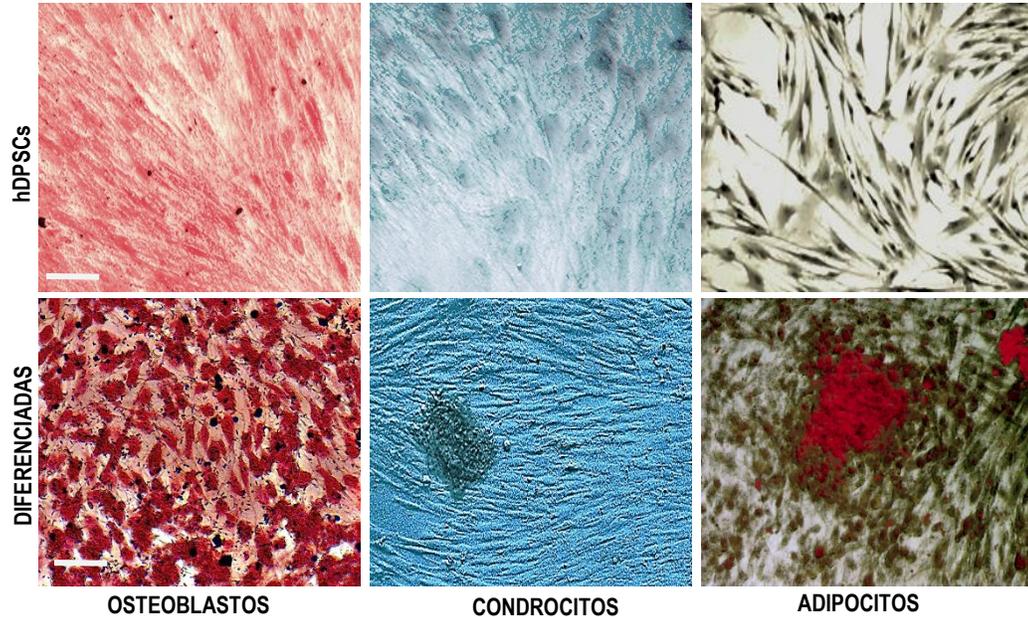
Tabla 3-1: Criterios para identificar células madre mesenquimales (MSC).

Resumen de criterios para la identificación de MSC (Dominici <i>et al.</i> , 2006).		
1. Adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo		
2. Fenotipo	Positivo ($\geq 95\%$)	Negativo ($\leq 2\%$)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 o CD 11b
		CD79 α o CD19
		HLA-DR
3. Diferenciación <i>In vitro</i> a osteoblastos, adipocitos y condrocitos (demostrada con tinciones de cultivo celular <i>In vitro</i>)		

Adaptado de Dominici *et al.*, 2006.**Figura 3-2:** Panel de resultados de citometría de flujo para caracterización de las hDPSCs.

El fenotipo mesenquimal indiferenciado fue comprobado mediante citometría de flujo utilizando el cocktail para fenotipificación de Miltenyi (Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) con el que se demostró positividad para marcadores mesenquimales CD90, CD105 y CD73 y negatividad para los marcadores hematopoyéticos tempranos CD14, CD20, CD34 y CD45, se adquirieron 100.000 eventos con el uso del FACSCalibur cytometer (BD Biosciences; San José, CA, USA) y los datos fueron analizados usando el software FCS Express software. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes por triplicado ($n=9$).

Figura 3-3: Evaluación del potencial de diferenciación de hDPSCs a los linajes osteoblástico, condroblástico y adipoblástico.

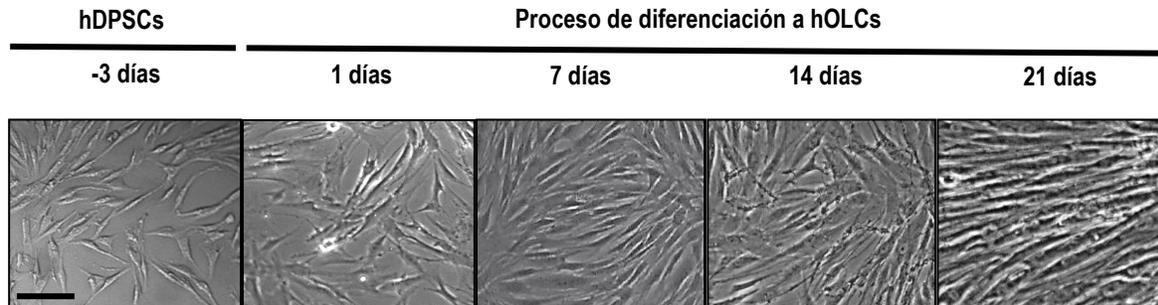


Para evaluar el potencial de diferenciación de hDPSCs se sometieron por 21 días a medios de diferenciación para los tres linajes y se realizaron las respectivas tinciones con el fin de corroborar el fenotipo adquirido. Los osteoblastos fueron teñidos con rojo de alizarina, se evidencia la formación de los nódulos de mineralización. Los condrocitos se tiñeron con Alcian blue, se evidencia un marcaje positivo de los proteoglicanos y los adipocitos fueron teñidos con red OilO, se muestra tinción positiva de los ácidos grasos. Microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania). Escala de barra: 100 μ m.

3.2 Diferenciación de hDPSCs a hOLCs

Posteriormente, estas células hDPSCs fueron sometidas a la diferenciación durante 7, 14 y 21 días en medio de inducción odontogénica para la obtención de hOLCs. No se evidenciaron cambios morfológicos aparentes durante el proceso de diferenciación, y se mantuvo una proliferación óptima (**Figura 3-4**).

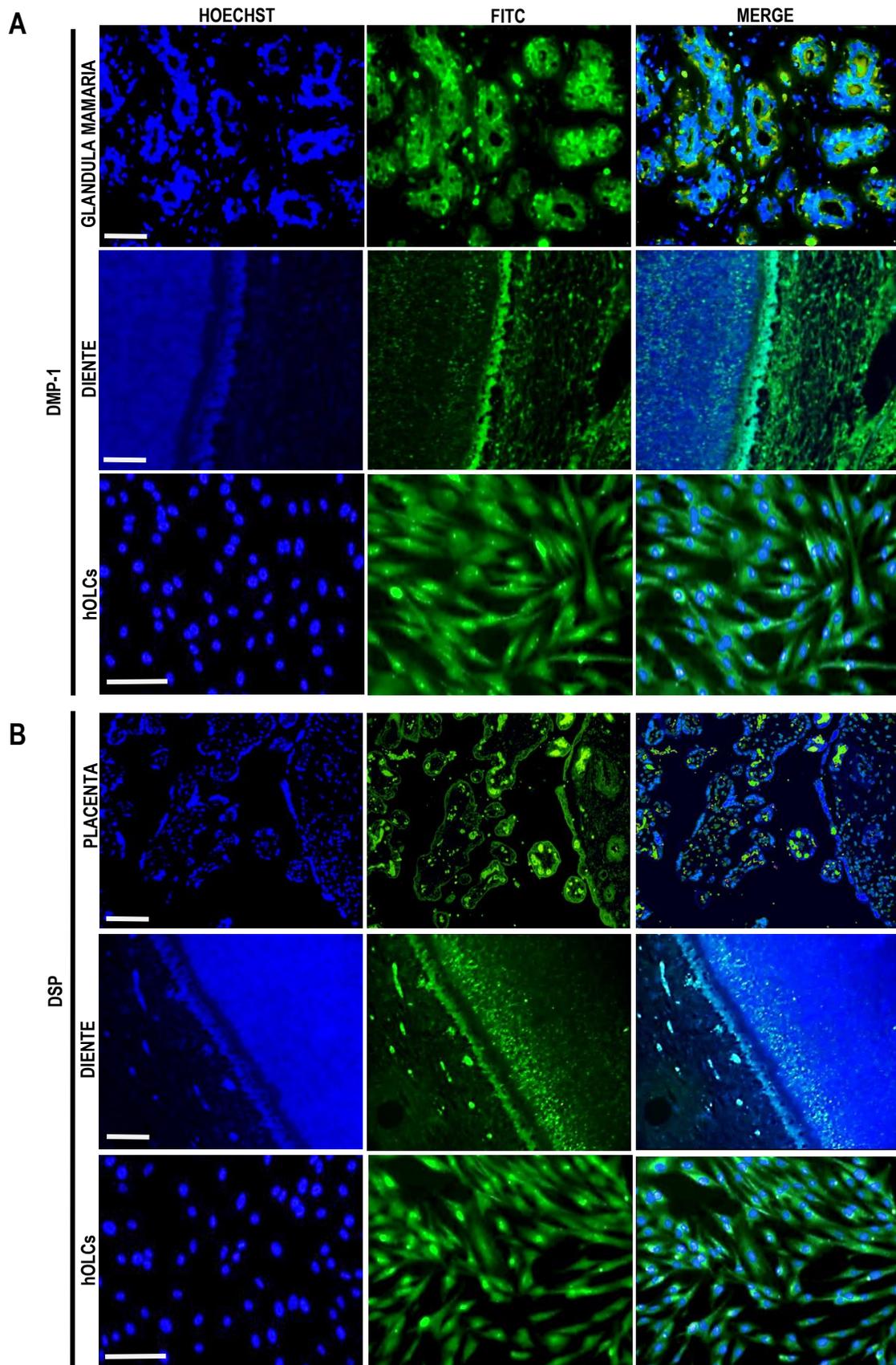
Figura 3-4: Caracterización morfológica del cultivo en el proceso de diferenciación celular.



Imágenes de microscopía de contraste de fase en donde se evidencian las células hDPSC con morfología ahusada, fibroblástica al igual que las células hOLCs durante el proceso de diferenciación a los 7, 14 y 21 días, se observó una tendencia a la formación organizada en líneas paralelas. Microscopio Leica DM2500 (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania). Escala de barra: 100 μ m.

Adicionalmente, mediante técnica de inmunofluorescencia se comprobó el fenotipo odontoblástico de las hOLC a 21 días de diferenciación identificando los marcadores odontogénicos DMP-1 y DSP, teniendo como controles de la técnica: tejidos dentales y de glándula mamaria o placenta respectivamente, como lo recomiendan los fabricantes **(Figuras 3-5)**.

Figura 3-5: Detección inmunocitoquímica de los marcadores odontogénico DMP-1 (A) y DSP (B) en hOLCs.

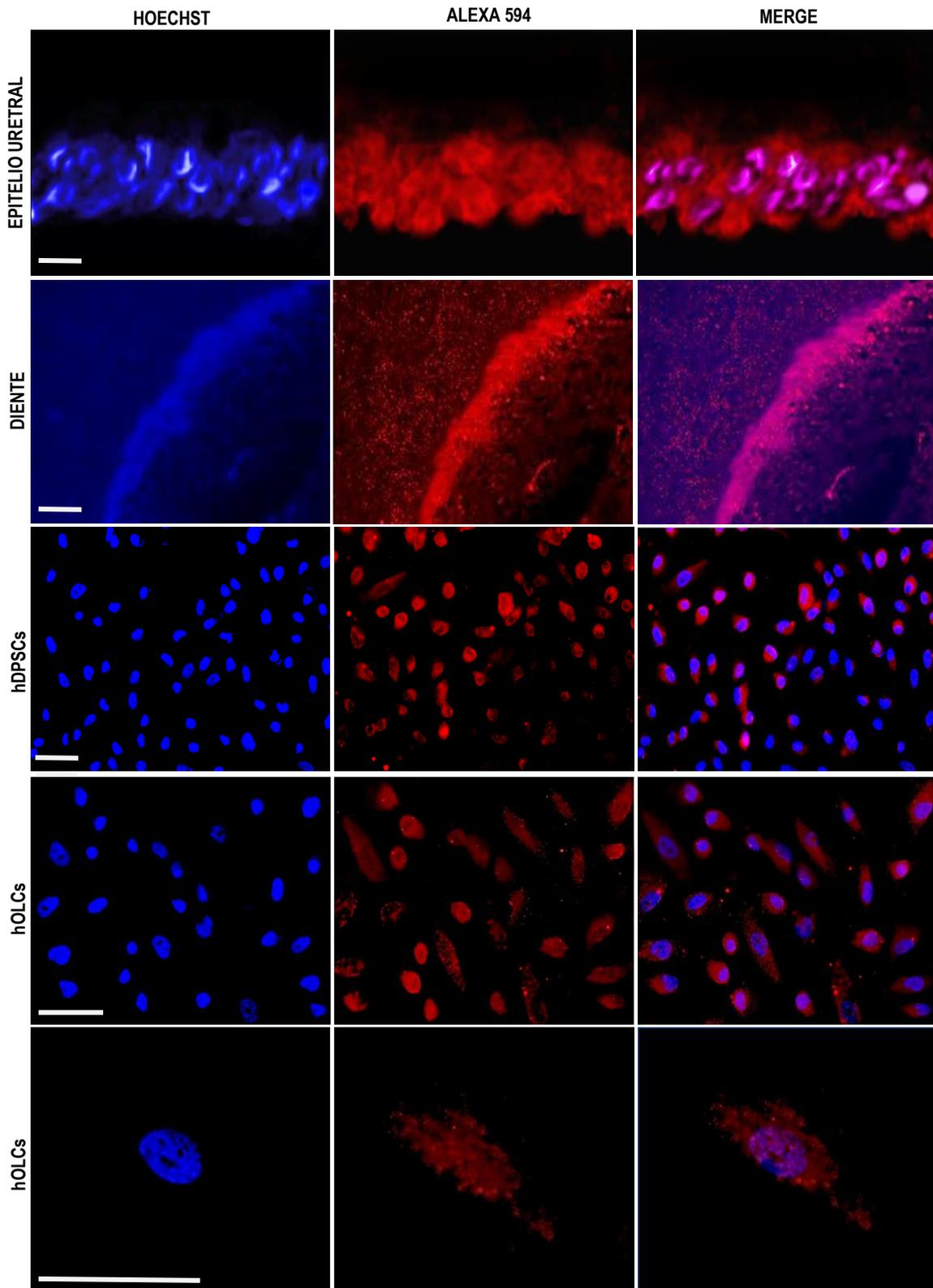


(B) Electroforesis en gel de agarosa 2%. de los productos de TRPV1 de la RT-qPCR. Se observa un aumento de la expresión de los transcritos a los 7, 14 y 21 días de diferenciación en comparación con las hDPSCs. Como gen housekeeping se usó β -actina (β -ACT). Lector GelDoc Go System (BioRad, Hercules, CA, US).

3.3.2 Determinación de la presencia del receptor TRPV1

La presencia y localización del receptor TRPV1 se determinó mediante técnica de inmunofluorescencia como se muestra en la **Figura 3-7**.

Figura 3-7: Detección inmunocitoquímica del receptor TRPV1 en células hOLCs.



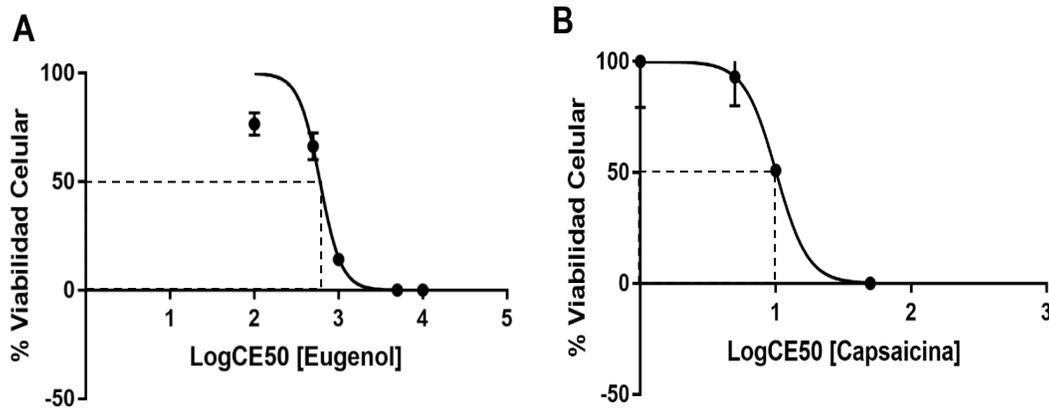
Identificación inmunocitoquímica de TRPV1 en el control de tejido epitelial uretral, en tejido dental, en células hDPSCs y en las hOLCs. Para obtener el marcaje de la proteína y determinar su localización se usó anticuerpo anti-TRPV1 conjugado con Alexa594 (rojo) y los núcleos se contratiñeron con Hoechst (azul). Nótese la positividad en el tejido dental localizado en la zona de la empalizada odontoblástica. Adicionalmente, en las células hOLCs un aumento de esta inmunotinción en comparación con las hDPSCs con localización membranaral. Microscopio Zeiss Axio Imager A2 microscope (Gottingen, Alemania). Escala de barra: 50 μm .

3.4 Evaluación funcional del receptor TRPV1

3.4.1 Determinación de la viabilidad celular con resazurina para establecer la CE50 de EUG y CAP

Se determinó la viabilidad celular con técnica de resazurina y se halló la CE50 para el EUG de **603,5 μM** (Figura 3-8A) y para la CAP **10,1 μM** (Figura 3-8B).

Figura 3-8: Cálculo de la CE50 de EUG y CAP en las hOLCs mediante técnica de resazurina.



*Fue calculada a partir del ensayo de resazurina en células hOLCs expuestas a diferentes concentraciones de los dos compuestos. (A) CE50 del EUG. Rango de concentraciones 10, 5, 1, 0,5 y 0,1 mM LogEC50: 2,781 equivalente a **603,5 μM** . (B) CE50 de CAP. Rango de concentraciones 50, 10, 5, 1 y 0,5 mM. LogCE50: 1,004 equivalente a **10,1 μM** . Se empleó el software GraphPad Prism 7.00. Las curvas representan los resultados de 3 experimentos independientes con 6 réplicas cada uno ($n=18$).*

3.4.2 Ensayos de estimulación polimodal

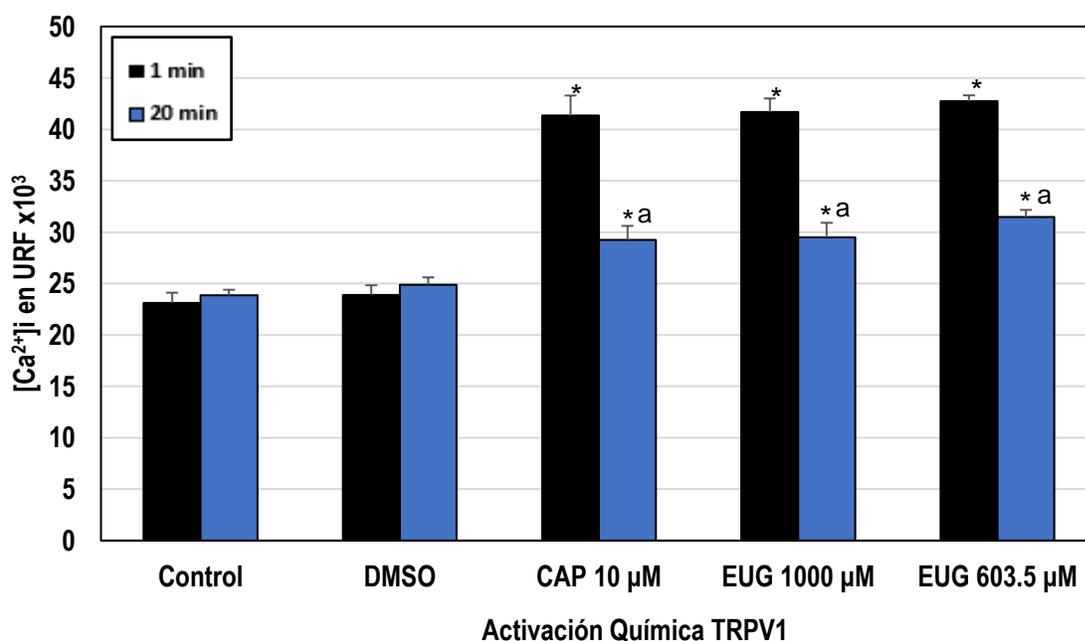
Se realizó la estimulación de las células por 1 min (simulando una exposición inmediata) y después de 20 min de exposición al estímulo (simulando una exposición crónica) y la medición de URF por espectrofluorimetría (TECAN, Infinite M200). Se muestran promedios

y DE tres experimentos independientes con tres replicas cada uno (n= 9). Análisis de varianza ANOVA de una vía y el análisis pos hoc de Tukey estableció una diferencia estadísticamente significativa si $p < 0,05$.

3.4.2.1 Ensayo de estimulación química

Las hOLCs se estimularon con CAP (10 μM) y EUG (603,5 y 1000 μM) teniendo como control las células sin estimular. Adicionalmente, se evaluó el vehículo DMSO $< 1\%$. Los resultados mostraron que las células sometidas a CAP y EUG tuvieron un aumento significativo de las RFU indicando la activación del receptor TRPV1 en comparación con los grupos control y vehículo (DMSO) para los dos tiempos evaluados (1 min y 20 min). Tomando la estimulación por 20 min como una exposición crónica al compuesto, se evidenció que hay una marcada diferencia entre estas mediciones en comparación con la exposición inmediata (1 min), lo que demostró una notoria disminución en la activación del receptor (**Figura 3-9**) que podría indicar una desensibilización del receptor.

Figura 3-9: Estimulación química del receptor TRPV1 en hOLCs.

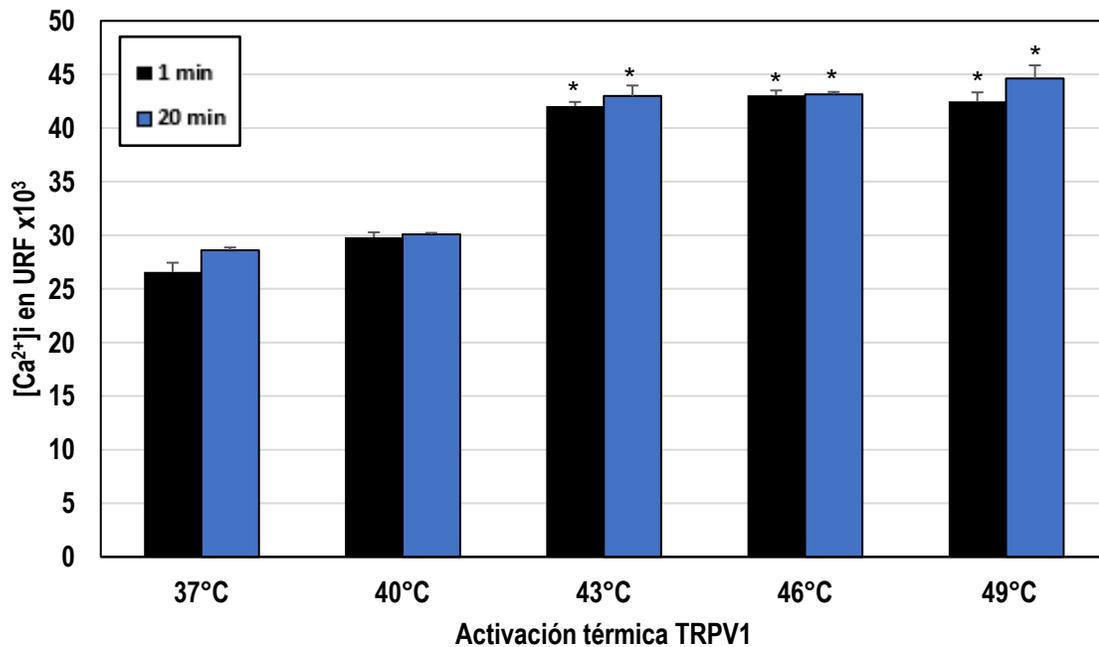


Se evaluaron 1 y 20 min de exposición al estímulo usando la prueba Fluo 4 AM (F14201 Invitrogen Thermo Fischer Scientific). Se realizó la lectura por espectrofluorometría a una longitud de onda de $494_{em}/520_{exc}$ nm en un lector TECAN (Infinite M200, Männedorf, Suiza) en unidades relativas de fluorescencia (URF). Se muestran los resultados como media \pm DE tres experimentos independientes por triplicado (n=9). Cada grupo se comparó con su respectivo control y los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0,05$). Grupos de prueba: control (células sin estimular), vehículo (DMSO $< 1\%$), CAP 10 μM , EUG a 1000 y 603,5 μM . La letra minúscula (a) muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de prueba en los diferentes tiempos evaluados (1 y 20 min) ($p < 0,05$).

3.4.2.2 Ensayo de estimulación térmica

En las hOLCs estimuladas con temperaturas $\geq 43^{\circ}\text{C}$ se observó un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y, por consiguiente, activación del receptor TRPV1 en comparación con los grupos 37°C y 40°C . No se evidenció diferencia entre las mediciones al minuto y a los 20 min (**Figura 3-10**).

Figura 3-10: Estimulación térmica del receptor TRPV1 en hOLCs.



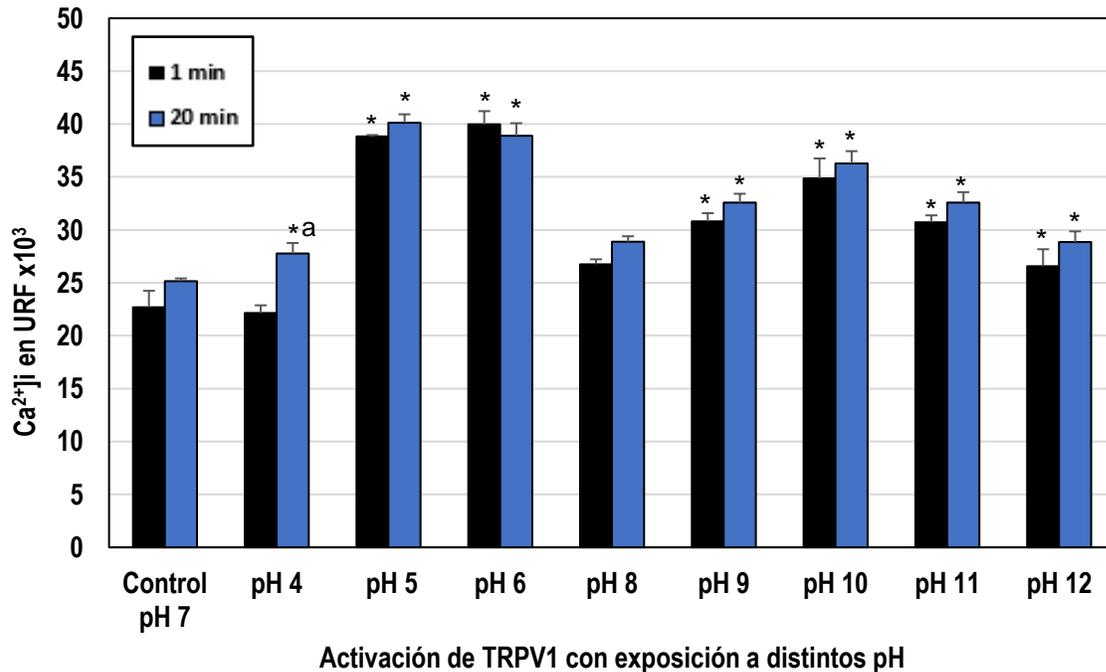
Se evaluaron 1 y 20 min de exposición al estímulo usando la prueba Fluo 4 AM (F14201 Invitrogen Thermo Fischer Scientific). Se empleó medio DMEM basal a las temperaturas de prueba 40°C , 43°C , 46°C y 49°C , considerando la temperatura de 37°C como grupo control. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de prueba a los diferentes tiempos de exposición evaluados (1 y 20 min). Se realizó la lectura por espectrofluorimetría a una longitud de onda de $494_{em}/520_{exc}$ nm en un lector TECAN (Infinite M200, Männedorf, Suiza) en unidades relativas de fluorescencia (URF). Se muestran los resultados como media \pm DE tres experimentos independientes por triplicado ($n=9$). Cada grupo se comparó con su respectivo control y los asteriscos muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0,05$).

3.4.2.3 Ensayo de estimulación con exposición a distintos pH

Tomando como punto de referencia el pH 7 (fisiológico) se observó un aumento consistente de URF, lo cual se relaciona con la activación del receptor TRPV1 desde el pH 5 en adelante. Sin embargo, esta activación fue más notoria, específicamente, a los pH 5 y 6 tanto en la exposición inmediata (1 min) como crónica (20 min). Adicionalmente, en el único

grupo en el cual se observó una diferencia entre los tiempos de exposición (1 min y 20 min) fue el estimulado con pH 4 (**Figura 3-11**).

Figura 3-11: Estimulación del receptor TRPV1 en hOLCs mediante exposición a distintos pH.



Se evaluaron 1 y 20 min de exposición al estímulo usando la prueba Fluo 4 AM (F14201 Invitrogen Thermo Fischer Scientific). Se empleó medio DMEM basal a un pH de 7, se evaluaron pH ácidos 4, 5 y 6 y pH alcalinos 8, 9, 10, 11 y 12. Los pH fueron medidos con el potenciómetro (Hanna instruments HI 2210, Rhode Island, USA). La letra minúscula (a) representa diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de prueba a los diferentes tiempos evaluados (1 min y 20 min) ($p < 0,05$) y los asteriscos diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Se realizó la lectura por espectrofluorimetría a una longitud de onda de $494_{em}/520_{exc}$ nm en un lector TECAN (Infinite M200, Männedorf, Suiza) en unidades relativas de fluorescencia (URF). Se muestran los resultados como media \pm DE tres experimentos independientes por triplicado ($n=9$).

4. Discusión

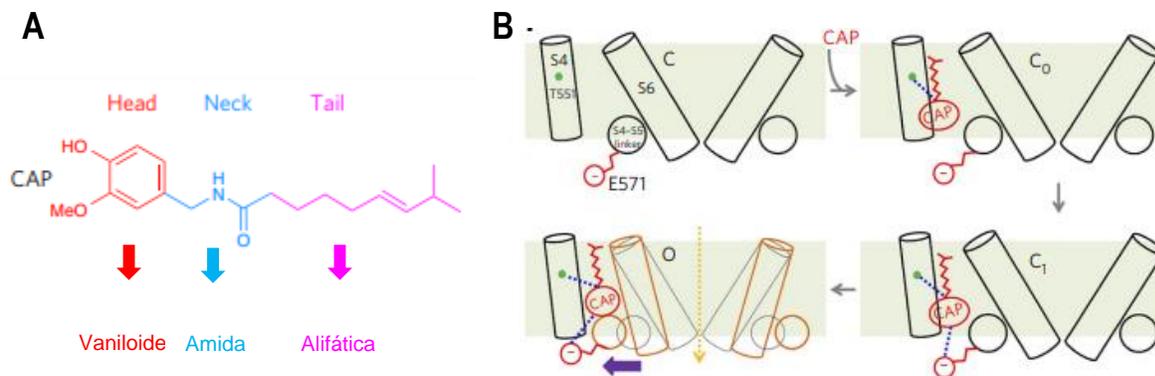
Este estudio demostró la presencia, localización y activación polimodal del receptor TRPV1 en hOLCs. En primer lugar, se logró realizar la caracterización fenotípica tanto de las hDPSCs (**Figura 3-1, 3-2 y 3-3**) como de las hOLCs obtenidas tras la diferenciación odontogénica (**Figura 3-4 y 3-5**), todo ello mediante el procedimiento descrito por (Baldión *et al.*, 2018). En segundo lugar, mediante técnica de RT-qPCR, fue posible evidenciar no sólo la expresión del receptor TRPV1 en estas hOLCs; sino también un aumento de la expresión de los transcritos de TRPV1 a los 7, 14 y 21 días de diferenciación en hOLCs con respecto a las células hDPSCs ($p < 0,05$) (**Figura 3-6**), medición periódica sin reporte previo. Este hallazgo podría estar relacionado con el hecho de que una célula sensitiva más especializada requerirá una función sensorial más desarrollada, lo que sugiere que las hOLCs podrían ser consideradas células sensitivas y que tal condición podría estar asociada con la expresión membranar del receptor TRPV1. Asimismo, se observó mediante inmunocitoquímica, en primer lugar, que, en el tejido dental, TRPV1 se localiza específicamente en la zona de la empalizada odontoblástica; y, en segundo lugar, que TRPV1 presentó una distribución membranar con mayor inmunotinción en las hOLCs en comparación a las hDPSCs (**Figura 3-7**). Estos dos hallazgos, de manera conjunta, parecen confirmar la relación entre la presencia del receptor TRPV1 y la obtención del fenotipo odontoblástico (El Karim *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2017).

La activación del receptor TRPV1 se llevó a cabo mediante tres condiciones: estimulación química, estimulación térmica y exposición a distintos pH. A continuación, se procede a discutir los resultados obtenidos en la aplicación de estas tres condiciones.

En primer lugar, en cuanto a la estimulación química, fue posible atestiguar una diferencia en la concentración necesaria para activar el receptor TRPV1 según el tipo celular: se encontró que la CE50 calculada para EUG fue de 603,5 μM en hOLCs (**Figura 3-8**), mientras que la CE50 reportada en células HEK-293 y neuronas trigeminales es de 1 mM (B.H. Yang, 2013). Esta evidencia permite apreciar una diferencia en la sensibilidad a la estimulación química que se realiza con el EUG como agonista en OD y en otros modelos celulares.

Adicionalmente, fue posible observar la activación del receptor TRPV1 con CAP a $10 \mu\text{M}$, y EUG a 1000 y $603,5 \mu\text{M}$, con un comportamiento muy similar entre los vaniloides. La activación de TRPV1 con CAP en diferentes tipos celulares, que ha sido reportada previamente (El Karim *et al.*, 2011; Okumura *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2009; Tsumura *et al.*, 2012), se fundamenta en la atribución de tal activación a la unión específica de la CAP con residuos Glu-571 y Thr-551 del receptor, lo que provoca un cambio conformacional que, a su vez, induce la apertura del canal. Algunos autores presumen que este mecanismo de activación química del receptor podría ser aplicable en todo el grupo de los capsaicinoides, entre los que se cuenta el EUG (**Figura 4-1**) (Yang *et al.*, 2015).

Figura 4-1: Mecanismo propuesto para la activación del receptor TRPV1 con CAP.



(A) Estructura química de la CAP, dividida según sus grupos funcionales: en rojo, su porción vaniloide; en azul, su porción amida; en fucsia, su porción alifática. (B) En el panel de la derecha se esquematiza la sección del receptor TRPV1 desde S4 a S6. Se propone un mecanismo de activación con configuración "tail-up, head-down" ("cola arriba, cabeza abajo"), en donde la porción terminal alifática interactúa con la porción S4 del receptor, la porción media o "cuello" interactúa con el residuo Thr-551, y la porción vaniloide o "cabeza" interactúa con el residuo Glu-571 (E571), ubicado en el enlazador S4-S5. Estas interacciones generan un movimiento del segmento S6 hacia la izquierda (flecha morada), y este movimiento provoca la apertura del canal iónico y, con ello, la activación del receptor. Adaptado de Yang *et al.*, 2015.

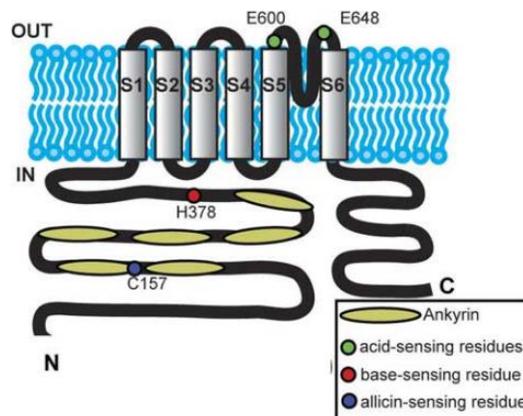
En segundo lugar, en cuanto a la estimulación térmica, se evidenció activación de TRPV1 en las hOLCs a temperaturas $\geq 43^\circ\text{C}$; resultado consistente con lo reportado en estudios previos realizados sobre OD humanos (El Karim *et al.*, 2011) y de ratón (Son *et al.*, 2009), y sobre neuronas aferentes primarias de rata (Park *et al.*, 2006). Estudios previos han atribuido esta activación térmica a dos mecanismos potencialmente complementarios: por una parte, se propone que la vía de señalización PKA/AKAP estaría implicada en el mecanismo de hiperalgesia térmica mediante la fosforilación de un residuo Ser-502 localizado entre el enlazador S2-S3 de TRPV1, lo que promovería la apertura del poro iónico (Rathee *et al.*, 2002); por otra, se sugiere que este poro iónico podría actuar como sensor térmico (Zhang *et al.*, 2017). Sin embargo, la falta de claridad en cuanto a los

detalles moleculares de la activación de TRPV1 por incremento de la temperatura ha conducido a sugerir todavía un tercer mecanismo, según el cual el dominio de repeticiones de ankirina podría sufrir cambios estructurales en respuesta al calor, lo que podría determinar la activación de TRPV1 (Ladrón-de-guevara *et al.*, 2020).

En tercer lugar, en cuanto a la exposición a distintos pH, se observó activación significativa del receptor TRPV1 en hOLCs sometidas a pH ácidos —de 5 y de 6—, tanto en la exposición inmediata (1 min) como crónica (20 min); lo que concuerda con reportes previos que registran una activación del receptor TRPV1 a pH inferiores a 6 (Tsumura *et al.*, 2012). Los resultados demostraron una discrepancia entre los dos tiempos de exposición (1 min y 20 min) a pH 4, con una activación significativa con la exposición sostenida por 20 min. Estos hallazgos guardan concordancia con, el estudio funcional de Tsumura *et al.* (2012) sobre OD de rata, en el cual se demostró una activación del receptor a los 2 min de exposición usando una solución ácida al mismo pH, activación que se conservó en las mediciones posteriores (Tsumura *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se observó una activación del receptor a pH básicos —entre 9 y 12—, reporte sin precedentes en estudios previos en OD. Dentro de este rango, la activación más significativa se presentó a pH 10, aunque sin llegar a ser tan notoria como en el caso de los pH ácidos. Investigaciones previas llevadas a cabo en neuronas del GT de ratón y en células HEK-293 transfectadas demostraron activación de TRPV1 por exposición a amonio (NH_4^+) —sustancia alcalina— y por alcalinización intracelular, las cuales provocan la deprotonación del residuo de Hys-378 en el dominio citoplasmático del receptor, y esta, a su vez, ocasionaría nuevas interacciones intra e intermoleculares y, con ello, un cambio conformacional que se traduciría en la activación del receptor (**Figura 4-2**) (Dhaka *et al.*, 2009). Tal activación se presentó con un $\text{pH} > 8$ en las primeras células y a un pH entre 7.8 y 9.5 en las segundas; lo que es consistente con los hallazgos de nuestro estudio.

Figura 4-2: Esquema propuesto de los aminoácidos implicados en la activación del receptor TRPV1 por exposición a distintos pH.

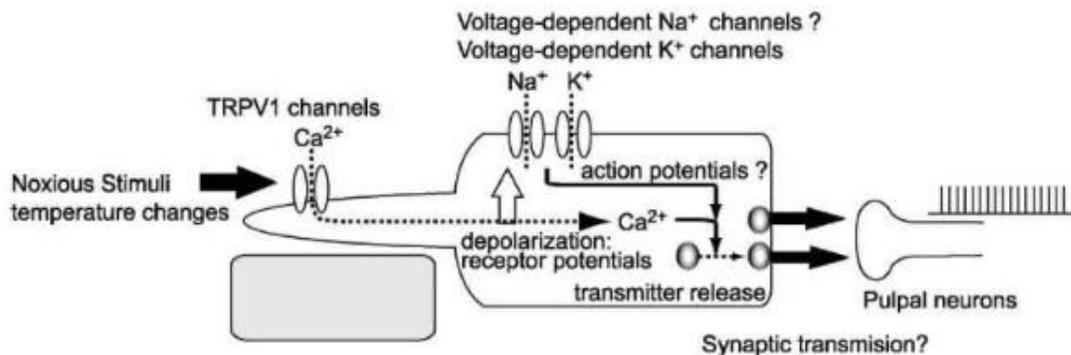


Estructura del receptor TRPV1 y los aa implicados en la activación del receptor por exposición a distintos pH: Glu-600 (E600) y Glu-648 (E648) con exposición a pH ácido (extracelular), Hys-378 (H378) con exposición a pH básico (intracelular), y un residuo sensible a alicina Cys-157 (C157). Tomado de Dhaka et al., 2009.

Llegado este punto, se da por demostrada la activación del receptor TRPV1 en hOLCs por las tres condiciones descritas, a saber: estimulación química, estimulación térmica, y exposición a distintos pH. A continuación, se procede a presentar las hipótesis que han intentado establecer el posible mecanismo mediante el que tal activación se traduce en dolor y su función en la nocicepción dental.

En primer lugar, Okumura *et al.* (2005) propusieron una posible interacción “neuroodontoblástica”: a causa de la activación del receptor TRPV1 provocada por estimulación térmica o mecánica, se produce el ingreso de Ca^{2+} al OD, lo que puede ocasionar la despolarización de sus membranas. A su vez, el ingreso de Ca^{2+} y la despolarización membranal serían mecanismos liberadores de “transmisores” estimulantes que podrían activar las terminaciones nerviosas cercanas (**Figura 4-3**) (Okumura *et al.*, 2005). Sin embargo, en su momento, Magloire *et al.* (2009) señalaban el desconocimiento del mecanismo por el cual los OD, a través de la activación del receptor TRPV1, podrían estimular las células nerviosas vecinas. No obstante, investigaciones más recientes han aportado más información acerca de este mecanismo (Magloire *et al.*, 2009).

Figura 4-3: Modelo propuesto por Okumura *et al.* (2005) para explicar el mecanismo de transducción de señal mediado por la activación TRPV1 en los OD.



Tomado de Okumura et al., 2005.

Posteriormente fue posible establecer una asociación entre el influjo de Ca^{2+} implicado en la activación del receptor TRPV1 y el estímulo de la producción de ATP en los OD. Este hallazgo constituye un aporte al esclarecimiento del mecanismo de comunicación entre OD y fibras nerviosas, por cuanto el ATP es una molécula a través de la cual, gracias a la presencia de receptores de tipo purinérgico tanto en los OD como en las terminaciones nerviosas, se da no sólo la comunicación interodontoblástica —tanto autocrina como

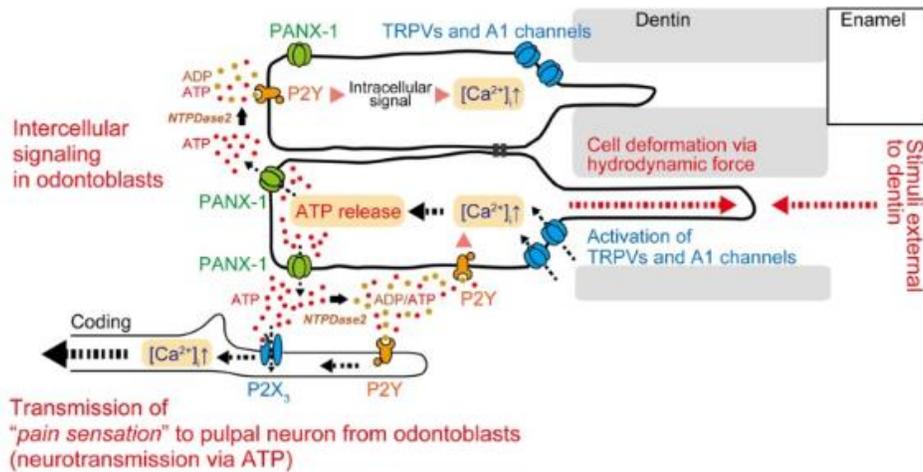
paracrina—, sino también la comunicación de los OD con las terminaciones nerviosas cercanas (Bleicher, 2014; Sato *et al.*, 2015; Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

En cuanto a los mecanismos de liberación del ATP, se proponen los dos más estudiados: por una parte, se reconoce un mecanismo dependiente de Ca^{2+} que implica la movilización de vesículas; por otra, se registra un mecanismo vía conexina 43 o panexina 1 (PANX-1), que funcionarían como transportadores membranales o hemicanales de liberación de este ATP (Bleicher, 2014; Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

En cuanto a los receptores de tipo purinérgico, hallazgos previos han permitido comprobar, tanto en OD como en terminaciones nerviosas, la presencia de receptores purinérgicos de tipo P2X (ionotrópicos) y P2Y (acoplados a proteínas G) (Sato *et al.*, 2015; Solé-Magdalena *et al.*, 2018).

En cuanto a la interacción neuro-odontoblástica, se atiende a dos estudios que han esclarecido los mecanismos de la misma: por una parte, Sato *et al.* (2015) demostraron que, tras estimulación mecánica en OD de ratón, se produce liberación de ATP a través de PANX-1 y, en consecuencia, se genera transmisión de la señal purinérgica a los OD cercanos por la activación de los receptores P2Y y de la vía de señalización de la fosfolipasa C; por otra parte, Shibukawa *et al.* (2015) reportaron, para un co-cultivo de OD y neuronas de GT de rata, no solo la misma liberación de ATP vía PANX-1, sino también la estimulación de los receptores P2X3 de las neuronas del GT (**Figura 4-4**). Estos hallazgos ofrecen un fuerte soporte a la hipótesis de la interacción neuro-odontoblástica. A su vez, Sato *et al.* (2015) adicionan a las implicaciones sensoriales de su estudio el descubrimiento de la formación de dentina reaccionaria, que se propone como un mecanismo de defensa frente a posibles estímulos agresores (Sato *et al.*, 2015; Shibukawa *et al.*, 2015). De este modo, ha quedado planteada la posibilidad de una interacción del receptor TRPV1 con otros receptores membranales implicados tanto en la dentinogénesis como en la nocicepción.

Figura 4-4: Modelo propuesto por Shibukawa *et al.* (2015) para explicar los mecanismos de transducción de señal interodontoblástica y neuro-odontoblástica mediados por activación de TRPV1 en los OD.

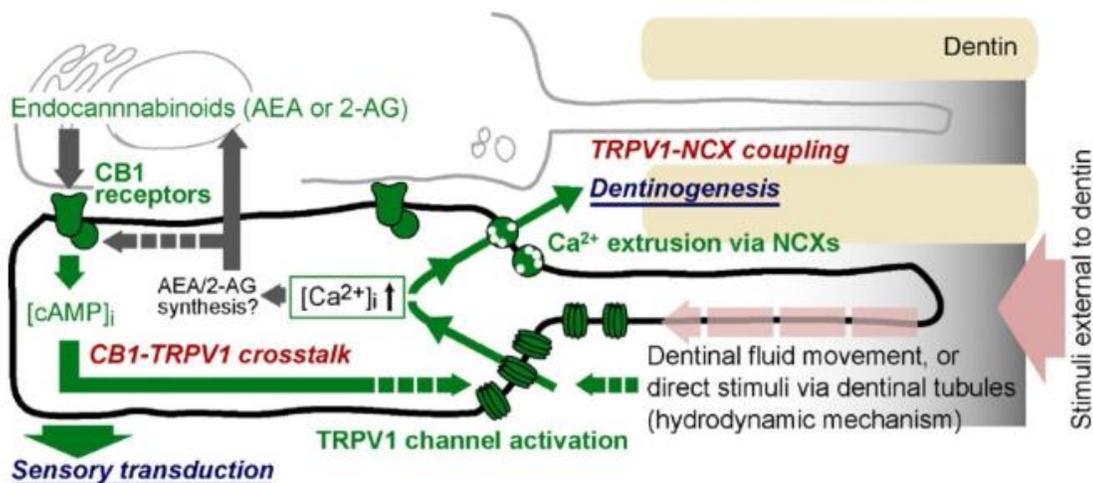


Tomado de Shibukawa et al., 2015

En cuanto a la dentinogénesis, Tsumura *et al.* (2012) mostraron las propiedades fisiológicas de TRPV1 involucradas en su acoplamiento funcional con receptores NCX en OD de rata. Este estudio evidenció un aumento de $[Ca^{2+}]_i$ provocado por la activación de TRPV1, seguido de la extrusión del mismo por NCX. Esta respuesta desempeñaría una función importante en la dentinogénesis y, con ello, en la protección frente a una agresión —mediante la formación de dentina secundaria—(Tsumura et al., 2012).

En cuanto a la nocicepción, Tsumura *et al.* (2012) demostraron también la posibilidad de acoplamiento funcional entre TRPV1 y receptores cannabinoides tipo 1 (CB1). Este estudio encontró, en los mencionados OD, expresión de ambos receptores —TRPV1 y CB1—; y observó que la entrada del Ca^{2+} , mediada por la activación de TRPV1, provoca la activación del receptor CB1 a través de la señalización de AMPc. Los autores sugieren la posibilidad, aún inexplorada, de que la transducción sensorial llegue a explicarse a través del acoplamiento entre TRPV1 y CB1 (Tsumura *et al.*, 2012).

Figura 4-5: Representación del modelo propuesto por Tsumura *et al.* (2012) para explicar el acoplamiento funcional de los receptores TRPV1, CB1 y NCX en OD.



Tomado de Tsumura et al., 2012

De este modo, los hallazgos sobre la relación entre receptor TRPV1 y la transmisión nociceptiva sugieren que la investigación orientada a la consecución de analgesia podría consagrarse al estudio de la desensibilización de tal receptor. Por ello, llegado este punto, conviene exponer los antecedentes teóricos relativos a la analgesia por desensibilización. Se procede, entonces, a presentar los hallazgos relacionados con la desensibilización del receptor TRPV1 inducida por tres tipos de condiciones: estimulación química, estimulación térmica y exposición a distintos pH.

En cuanto a la desensibilización del receptor por estimulación química, existen varios estudios que esclarecen y soportan la consecución de analgesia mediante el uso de vaniloides (Fattori et al., 2016).

Con respecto a esta desensibilización provocada por la exposición crónica a los agonistas (20 min), es importante hacer notar que los reportes disponibles han permitido caracterizar tal desensibilización como un proceso notablemente dependiente del ingreso de Ca²⁺ y de la activación de varias vías de señalización intracelular, debido a la importancia de este catión divalente como segundo mensajero.

Las primeras evidencias, aportadas por Bhave et al. (2002), mostraron que, en células derivadas de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas y estimuladas con CAP, el aumento en [Ca²⁺]_i provocó una marcada desensibilización del receptor TRPV1, producida por la desfosforilación intracelular de un residuo de Ser-116. A su vez, la disminución de esta desensibilización estaría mediada por la activación de la proteína quinasa A (PKA), la cual, refosforilaría este residuo; lo que constituye a la referida refosforilación como una estrategia de mantenimiento del estado funcional del receptor mediado por PKA. Por lo anterior, los autores proponen que la sustancia vaniloide sería la responsable de inactivar la PKA y, así, conducir a un estado desensibilizado del receptor TRPV1 (Bhave et al., 2002).

El estudio realizado por Mohapatra y Nau (2003) en células HEK-293 transfectadas corroboró el hallazgo precedente y encontró que en este proceso, además del residuo Ser-116, estaría implicado el residuo Thr-370; y que esta recuperación de la actividad funcional se daría no solo por PKA, sino también por la vía AMPc (Mohapatra & Nau, 2003). Más adelante, en 2005, los mismos autores, empleando igualmente células HEK-293, investigaron la influencia de la proteína fosfatasa 2B o calcineurina en esta desensibilización inducida por CAP. Como resultado encontraron que, efectivamente, la acción de la calcineurina logra una disminución de la sensibilidad cualitativa y cuantitativamente similar a la obtenida por la inactivación de PKA. Esta evidencia indicaría que la inactivación de PKA y la interacción con calcineurina serían mecanismos independientes, aunque ambos posiblemente relacionados con la Thr-370 (Mohapatra & Nau, 2005).

Un estudio llevado a cabo por Jung *et al.* (2004) permitió reconocer otro mecanismo de desensibilización en neuronas de ganglio de la raíz dorsal (GRD) de ratas. En él se pudo corroborar que, después de la activación del receptor con CAP, un pequeño aumento en el $[Ca^{2+}]_i$ activaría primero la calcineurina, lo que conduciría a la desfosforilación en los residuos Ser-502 y Thr-704 y, por lo tanto, a la desensibilización de TRPV1. Esta desensibilización conduciría a la activación de la enzima Ca^{2+} /calmodulina quinasa II (CaMKII), la cual refosforilaría el receptor en los residuos Ser-502 y Thr-704. Este proceso de refosforilación le devuelve al receptor TRPV1 su capacidad de activación, a condición de que otros residuos importantes —como los mencionados anteriormente— estén fosforilados previamente por PKA o proteína quinasa C (PKC). Los autores resaltan este equilibrio entre fosforilaciones y desfosforilaciones, las cuales podrían ser más complejas e igualmente involucrar más vías de señalización enzimática (Jung *et al.*, 2004).

Adicionalmente, Numazaki *et al.* (2003) demostraron, en células HEK-293, un mecanismo de desensibilización mediado por la unión de la calmodulina a un segmento de 35 aminoácidos en la porción C-Terminal de TRPV1 (Numazaki *et al.*, 2003). De forma complementaria, un estudio posterior reportó un dominio de unión de calmodulina ubicado en la porción N-Terminal de TRPV1, conformado por una sección de 33 aminoácidos adyacente al dominio de repeticiones de ankirina (ARD) (Rosenbaum *et al.*, 2004). Por otro lado, autores como Lishko *et al.* (2007) mencionan la importancia de esta sección ARD, a la cual se encuentra anclado un ATP como “sensibilizador” que, en conjunción con fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), mantienen al receptor TRPV1 listo para ser activado. Tras la activación de TRPV1, el influjo de $[Ca^{2+}]_i$ ocasionaría la liberación del ATP y la degradación de PIP₂ por la vía de la calmodulina, lo que derivaría en la desensibilización del receptor (Lishko *et al.*, 2007). Estos resultados guardan concordancia con el estudio de Liu *et al.* (2005), donde se indica que, para obtener una recuperación funcional completa del receptor TRPV1, se requieren una resíntesis de PIP₂ y una alta concentración de ATP intracelular (Liu *et al.*, 2005).

Por último, otro estudio realizado en neuronas de GRD de rata y en células HEK-293 demostró que la exposición crónica (20 min) a CAP (100 nM para las primeras y 1 μ M para las segundas) promueve la internalización y degradación del receptor de una manera que depende de dosis, tiempo y Ca^{2+} . Se reporta que esta internalización por ruta endocítica es independiente de clatrina y dinamina, y que aquella está, más bien, modulada por PKA (Sanz-salvador *et al.*, 2012). En este proceso confluyen varios mecanismos, puesto que, como se mencionó anteriormente, se propone que la CAP sería la responsable de inactivar PKA, lo que induce una desfosforilación de TRPV1 y, con ello, ocasiona su desensibilización (Bhave *et al.*, 2002). Además, se ha encontrado que la PKA participa activamente en la inserción funcional de TRPV1 en la membrana plasmática, por lo que su inactivación —causada por la CAP— induciría, adicionalmente, una reducción en los TRPV1 membranales. Así, la evidencia disponible indica que la exposición crónica a los vaniloideos podría producir una modulación en la expresión membranal de TRPV1 (Sanz-salvador *et al.*, 2012).

En resumen, se han reportado múltiples mecanismos de desensibilización química con vaniloideos, a saber: desfosforilación de TRPV1 por calcineurina (Jung *et al.*, 2004; Mohapatra & Nau, 2005), por quinasas dependientes de calmodulina (Jung *et al.*, 2004), o por inactivación de PKA (Bhave *et al.*, 2002; Mohapatra & Nau, 2003); unión de calmodulina (Numazaki *et al.*, 2003; Rosenbaum *et al.*, 2004); liberación de ATP o depleción de PIP2 de la membrana plasmática (Lishko *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005); e internalización y degradación del receptor TRPV1 de la membrana (Sanz-salvador *et al.*, 2012). Es preciso notar que la totalidad de los mecanismos mencionados exhiben un importante potencial para la consecución de analgesia. Como se ha reconocido a lo largo de esta presentación, tales mecanismos han sido estudiados principalmente en cultivos neuronales de GRD y de GT de ratas y ratones, en cultivos de células HEK-293 transfectadas, y en cultivos de células CHO transfectadas. Sin embargo, a la fecha no se reporta ningún estudio en que se investigue estos mecanismos de desensibilización en OD ni en hOLCs, por lo que se hace pertinente dilucidar si la desensibilización encontrada en nuestro estudio en hOLCs, provocada tanto con CAP como con EUG, podría ser explicada por medio de los mecanismos registrados anteriormente.

En cuanto a la desensibilización del receptor por estimulación térmica, en este estudio no se encontró evidencia de desensibilización inducida por este tipo de estímulo, sin variación entre las mediciones a 1 min y después de 20 min de exposición. Estos resultados son consistentes con la ausencia de reportes de desensibilización del receptor inducida por estimulación térmica en la literatura disponible.

En cuanto a la desensibilización del receptor por exposición a distintos pH, tampoco se encontró en el presente estudio evidencia a favor de la misma. Un estudio anterior encontró desensibilización del receptor TRPV1 en una única instancia, a través de exposición a una solución ácida a pH de 5.5; más allá se observó que, a diferencia de la estimulación inducida por vaniloideos, la desensibilización se produciría por un mecanismo independiente

de CaMKII, lo que sugiere que el proceso involucra otros factores y vías de señalización, aún desconocidos (Jung et al., 2004).

Por último, se procede a exponer brevemente la importancia clínica de la evidencia encontrada en el presente estudio.

Con respecto a la activación química del receptor TRPV1, conviene reconocer, antes que nada, que el EUG entró en desuso en odontología a causa de su interferencia con la polimerización de las resinas compuestas. No obstante, la presente investigación permite reivindicar su potencial en la activación química y consecuente desensibilización del receptor TRPV1, lo que lo proyecta como una alternativa terapéutica para la hipersensibilidad dentinal. Esta posibilidad está, por supuesto, mediada por investigaciones futuras que puedan avalar el uso clínico de este vaniloide.

Con respecto a la activación térmica del receptor TRPV1, se debe tener en cuenta que el complejo pulpo-dentinal está permanentemente expuesto a altas temperaturas, propias del consumo de bebidas o alimentos calientes. Adicionalmente, en contextos clínicos, tal activación térmica puede ser provocada por algunos protocolos odontológicos, por ejemplo: realización de provisionales acrílicos de autopolimerización que generan exotermia, uso de pieza de alta sin adecuada refrigeración, uso de fresas con pérdida de su capacidad de corte, procesos de cristalización de materiales dentales como el fosfato de zinc, uso de instrumento piezoeléctrico, uso de tecnología láser para remoción de caries o confección de cavidades, etc. Se debe recordar que todos estos procedimientos podrían activar los receptores TRPV1 y, con ello, podrían ocasionar dolor o sensibilidad posterior a la consulta odontológica.

Con respecto a la activación del receptor TRPV1 por exposición a distintos pH, es preciso mencionar que algunos materiales dentales involucrados en la práctica clínica suponen la exposición del complejo pulpo-dentinal a pH variados —básicos, como el del hidróxido de calcio; o ácidos, como el del ácido orto fosfórico (para la adhesión de resinas), el del ácido poliacrílico, el de algunos adhesivos autoacondicionantes, el del peróxido de hidrógeno, el del peróxido de carbamida (para blanqueamientos dentales), o el del fosfato de zinc, entre otros—. Por tal motivo, el estudio de los mecanismos de activación del receptor TRPV1 —u otros receptores de esta familia— asociados con exposición a distintos pH se impone como una necesidad con miras al perfeccionamiento de la práctica clínica y, posiblemente, al alivio de la sensibilidad posterior a ciertos procedimientos odontológicos.

Sea esta la oportunidad para destacar la utilidad del modelo *in vitro* de hOLCs empleado en esta investigación para el estudio de la fisiopatología pulpar, puesto que la mayoría de los hallazgos previos que permitieron establecer la presencia y activación de TRPV1 fueron realizados en otros tipos de modelos: cultivos neuronales, cultivos de ganglio trigeminal (GT) humano (Flegel et al., 2015), y neuronas aferentes primarias dentales de rata y ratón (Park et al., 2006; Story et al., 2003). Pocos estudios se habían llevado a cabo en OD y, de estos, la mayoría se ejecutó sobre OD de rata y ratón (Park et al., 2006; Son et al.,

2009; Tsumura *et al.*, 2012). Hasta la fecha, solo dos artículos habían reportado la presencia del receptor TRPV1 en OD humanos, tanto en un modelo “nativo” como en uno de hOLCs (El Karim *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2017).

En suma, en el presente estudio se demostró la presencia, localización membranal, y activación polimodal del receptor TRPV1 en un modelo de hOLCs. Estos hallazgos resultan importantes porque se consolidan como el paso inicial para la construcción de un modelo de estudio del dolor pulpar que suponga una contribución al desarrollo de alternativas terapéuticas para la hipersensibilidad dentinal basadas en el EUG como agente desensibilizante.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Dentro de los límites propuestos en este estudio, fue posible demostrar, por medio de la evidencia, la expresión y localización del receptor TRPV1 en un modelo de hOLCs; resultados que representan un aporte de singular relevancia para la comprensión de la complejidad de la sensibilidad dentinal. En primer lugar, el presente estudio demostró que el receptor TRPV1 se activa en respuesta a un amplio espectro de condiciones, a saber: estimulación química, estimulación térmica, y exposición a diferentes pH. Esta evidencia, tomada de manera conjunta, indica que TRPV1 funciona como un integrador para una variedad de entradas sensoriales. En segundo lugar, el presente trabajo permitió establecer que el receptor TRPV1 presenta capacidad de desensibilización bajo la estimulación con el agonista vaniloide EUG, de una forma similar a la que se ha registrado en el uso de CAP. Estos hallazgos representan un aporte significativo en el estudio de la analgesia y el control de la hipersensibilidad dentinal y se proyectan como fundamento para el desarrollo de una alternativa terapéutica para tal patología. Conviene recordar, por último, que la hipersensibilidad dentinal no solo constituye un motivo de consulta frecuente en la práctica odontológica, sino también que, en la actualidad, los procedimientos orientados al tratamiento de la misma exhiben un alto índice de fallo terapéutico.

Financiación

Se obtuvo la financiación de la Convocatoria para el fortalecimiento de alianzas interdisciplinarias y creación artística de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia, 2018. Código Hermes 42183.

Productos obtenidos

- Tesis de grado Maestría en Farmacología
- Sometimiento de artículo de investigación en revista indexada

- Presentación de ponencias en eventos científicos:
 - 2020 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. Washington DC – USA. Póster: Activation of TRPV1 receptor by Eugenol in human odontoblasts-like cells (Marzo 2020).
 - XXX Encuentro Nacional de Investigación ACFO 2019. Montería - Universidad del Sinú. Ponencia: Expresión del receptor polimodal TRPV1 en células similares a odontoblastos humanos (Septiembre 2019).
 - 2019 IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition. Vancouver – Canadá. Póster: Expression of Transient Receptor Potential Channels Transcripts in Odontoblast-like Cells (Junio 2019).
 - XIV Encuentro Nacional de Semilleros de investigación SIFO-ACFO. Bogotá – Universidad Nacional de Colombia. Ponencia: Proyecto de investigación: expresión del receptor TRPV1 en células similares a odontoblastos humanos: Una alternativa terapéutica para el dolor dental y la sensibilidad dentinal (Octubre 2018).

5.2 Recomendaciones

- Se sugiere la realización de los ensayos de estimulación mecánica que no se lograron desarrollar en el laboratorio debido a la pandemia COVID-19, probando la actividad mecanoreceptora de las hOLCs.
- Tomando en cuenta la relevancia de la investigación en esta área, con el fin de complementar este trabajo de tesis, en el grupo de investigación se ha planteado la posibilidad de realizar estudios posteriores con técnicas de estimulación indirecta (Transwell) a las hOLCs empleando el EUG, de modo que sea posible obtener más información que soporte el uso del mismo y, de esta manera, en un futuro, estos resultados puedan ser extrapolados en la práctica clínica. De este modo, desarrollos posteriores podrían traducirse en el diseño de un producto, barniz o gel desensibilizante que sea una alternativa para el tratamiento actual de la sensibilidad dentinal y pueda ser incluido en un protocolo de atención clínica. En este orden de ideas, y tomando en consideración la alta prevalencia de sensibilidad dentinal en la población, las investigaciones orientadas a incrementar la eficacia en el tratamiento de la sensibilidad dentinal ostentan un enorme potencial de impacto en la salud dental y general de los pacientes y, con ello, en la mejoría de la calidad de vida de la población en general.
- También se propone realizar más procedimientos experimentales que nos permitan establecer, desde un punto de vista molecular, los mecanismos de acción y vías de

señalización implicadas en estos procesos de estimulación polimodal. Adicionalmente, se propone un co-cultivo de hOLCs y neuronas que nos permitan dilucidar la interacción postulada en la llamada “teoría neuro-odontoblástica”.

Bibliografía

- Almushayt, A., Narayanan, K., Zaki, A. E., & George, A. (2006). Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Therapy*, 13(7), 611–620. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302687>
- Baldión, P. A., Velandia-romero, M. L., & Castellanos, J. E. (2018). Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *International Journal Cell Biology*. Article ID 6853189.
- Bekes, K., John, M. T., Schaller, H. G., & Hirsch, C. (2009). Oral health-related quality of life in patients seeking care for dentin hypersensitivity. *Journal of Oral Rehabilitation*, 36(1), 45–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2008.01901.x>
- Bhave, G., Zhu, W., Wang, H., Brasier, D. J., Oxford, G. S., & Gereau, R. W. (2002). cAMP-Dependent Protein Kinase Regulates Desensitization of the Capsaicin Receptor (VR1) by Direct Phosphorylation. *Neuron*, 35, 721–731. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00802-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00802-4)
- Bleicher, F. (2014). Odontoblast physiology. *Experimental Cell Research*, 325(2), 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.012>
- Chang, B., Svoboda, K. K. H., & Liu, X. (2019). Cell polarization: From epithelial cells to odontoblasts. *European Journal of Cell Biology*, 98(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2018.11.003>
- Charan Raja, M. R. (2015). Versatile and Synergistic Potential of Eugenol: A Review. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 06(05). <https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000367>
- Chen, S., Chen, L., Jahangiri, A., Chen, B., Wu, Y., Chuang, H. H. MacDougall, M. (2008). Expression and processing of small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins in mouse odontoblastic cells. *Archives of Oral Biology*, 53(9), 879–889. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.05.005>
- Cho, Y. D., Yoon, W. J., Woo, K. M., Baek, J. H., Park, J. C., & Ryoo, H. M. (2010). The canonical BMP signaling pathway plays a crucial part in stimulation of dentin sialophosphoprotein expression by BMP-2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(47), 36369–36376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103093>
- Chung, G., & Oh, S. (2013). TRP channels in dental pain. *The Open Pain Journal*, 31–36. <https://doi.org/10.2174/1876386301306010031>

- Chung, M.-K. (2013). Targeting trp channels for pain relief: TRPV1 and beyond. *Open Pain Journal*, 6(SPEC.ISSUE.1), 8–9. <https://doi.org/10.2174/1876386301306010008>
- Cohen. (2011). Vias de la Pulpa. In S. C. Kenneth M. Hargreaves, Louis.H. Berman (Ed.), *Cohen's Pathways of the pulp* (10 Edition).
- Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2013). The amazing odontoblast: Activity, autophagy, and aging. *Journal of Dental Research*, 92(9), 765–772. <https://doi.org/10.1177/0022034513495874>
- da Rosa, W. L.O. Piva, E. da Silva, A. F. (2018). Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *International Endodontic Journal*, 51(8), 829–846. <https://doi.org/10.1111/iej.12906>
- Dhaka, A., Uzzell, V., Dubin, A. E., Mathur, J., Petrus, M., Bandell, M., & Patapoutian, A. (2009). TRPV1 Is Activated by Both Acidic and Basic pH. *The Journal of Neuroscience*, 29(1), 153–158. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4901-08.2009>
- Dominici, M., Blanc, K. Le, Mueller, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J. Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells . The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- El Karim, I. A., Linden, G. J., Curtis, T. M., About, I., McGahon, M. K., Irwin, C. R., & Lundy, F. T. (2011). Human odontoblasts express functional thermo-sensitive TRP channels: Implications for dentin sensitivity. *Pain*, 152(10), 2211–2223. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.10.016>
- Fattori, V., Hohmann, M. S. N., Rossaneis, A. C., Pinho-Ribeiro, F. A., & Verri, W. A. (2016). Capsaicin: Current understanding of its mechanisms and therapy of pain and other pre-clinical and clinical uses. *Molecules*, 21(7), 1–33. <https://doi.org/10.3390/molecules21070844>
- Flegel, C., Schöbel, N., Altmüller, J., Becker, C., Tannapfel, A., Hatt, H., & Gisselmann, G. (2015). RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128951>
- Fluo-4, AM, cell permeant. (2019, 25 de Noviembre). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F14201#/F14201>
- Fu, H., Fang, P., Zhou, H. Y., Zhou, J., Yu, X. W., Ni, M., Hu, Z. L. (2016). Acid-sensing ion channels in trigeminal ganglion neurons innervating the orofacial region contribute to orofacial inflammatory pain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43(2), 193–202. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12510>
- Han, N., Zheng, Y., Li, R., Li, X., Zhou, M., Niu, Y., & Zhang, Q. (2014). β -catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2. *PLoS ONE*, 9(2), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088890>
- Hermansteyne T.O., Markowitz K., Fan L., & M. S. G. (2008). *Mechanotransducers in Rat Pulpal Afferents*. 31(9), 1713–1723.

- <https://doi.org/10.1109/TMI.2012.2196707>. Separate
- Huang, S. M., Bisogno, T., Trevisani, M., Al-Hayani, A., De Petrocellis, L., Fezza, F., Di Marzo, V. (2002). An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12), 8400–8405. <https://doi.org/10.1073/pnas.122196999>
- Islam, S. (2011). *Transient Receptor Potential Channels*. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3>
- Jung, J., Shin, J. S., Lee, S., Hwang, S. W., Koo, J., Cho, H., & Oh, U. (2004). Phosphorylation of Vanilloid Receptor 1 by Ca²⁺ / Calmodulin- dependent Kinase II Regulates Its Vanilloid Binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7048–7054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311448200>
- 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>
- Kim, J., & Park, J. (2017). Dentin hypersensitivity and emerging concepts for treatments. *Journal of Oral Biosciences*, 59(4), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.job.2017.09.001>
- Kim, T. H., Bae, C. H., Lee, J. Y., Lee, J. C., Ko, S. O., Chai, Y., & Cho, E. S. (2015). Temporo-spatial requirement of Smad4 in dentin formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 459(4), 706–712. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.014>
- Kim, T. H., Lee, J. Y., Baek, J. A., Lee, J. C., Yang, X., Taketo, M. M., Cho, E. S. (2011). Constitutive stabilization of β -catenin in the dental mesenchyme leads to excessive dentin and cementum formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412(4), 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.116>
- Kim, Y. S., Jung, H. K., Kwon, T. K., Kim, C. S., Cho, J. H., Ahn, D. K., & Bae, Y. C. (2012). Expression of transient receptor potential Ankyrin 1 in human dental pulp. *Journal of Endodontics*, 38(8), 1087–1092. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.04.024>
- Kwon, M., Baek, S. H., Park, C.-K., Chung, G., & Oh, S. B. (2014a). Single-cell RT-PCR and immunocytochemical detection of mechanosensitive transient receptor potential channels in acutely isolated rat odontoblasts. *Archives of Oral Biology*, 59(12), 1266–1271. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.07.016>
- Kwon, M., Baek, S. H., Park, C. K., Chung, G., & Oh, S. B. (2014b). Single-cell RT-PCR and immunocytochemical detection of mechanosensitive transient receptor potential channels in acutely isolated rat odontoblasts. *Archives of Oral Biology*, 59(12), 1266–1271. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.07.016>
- Ladrón-de-guevara, E., Dominguez, L., Rangel-yescas, G. E., Daniel, A., Torres-larios, A., Rosenbaum, T., Fernández-velasco, D. A. (2020). The contribution of the ankyrin repeat domain of TRPV1 as a thermal module. *Biophysical Journal*, 118(4), 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.10.041>

- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(5), 1. <https://doi.org/10.1186/scrt328>
- Li, W., Chen, L., Chen, Z., Wu, L., Feng, J., Wang, F., Chen, S. (2017). Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation. *Scientific Reports*, 7(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00339-w>
- Li, Y., Lü, X., Sun, X., Bai, S., Li, S., & Shi, J. (2011). Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF- β 1. *Archives of Oral Biology*, 56(11), 1221–1229. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.05.002>
- Liedtke, W. B., & Heller, S. (2007). *TRP ion channel function in sensory transduction and cellular signaling cascades*. CRC/Taylor & Francis.
- Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B., & Gaudet, R. (2007). Article The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity. *Neuron*, 54, 905–918. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.027>
- Liu, B., Zhang, C., & Qin, F. (2005). Functional Recovery from Desensitization of Vanilloid Receptor TRPV1 Requires Resynthesis of Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate. *The Journal of Neuroscience*, 25(19), 4835–4843. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1296-05.2005>
- Magloire, H., Couble, M. L., Thivichon-Prince, B., Maurin, J. C., & Bleicher, F. (2009). Odontoblast: A mechano-sensory cell. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312(5), 416–424. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21264>
- Mesentier-Louro L.A, Zaverucha-Do-Valle C, Da Silva A.J, Dos-santos G., Gubert F., Padilha A.B, Torres A.L, Paredes B,...Santago M. (2014). Distribution of mesenchymal stem cells and effects on neuronal survival and axon regeneration after optic nerve crush and cell therapy. *PLoS One*, 9(10). <https://doi:10.1371/journal.pone.0110722>
- Ministerio de Salud. Resolución Numero 8430 de 1993., Octubre (1993). Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2014). *IV Estudio Nacional de Salud Bucal ENSAB*. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ENSAB-IV-Situacion-Bucal-Actual.pdf>
- Mohapatra, Durga P, & Nau, C. (2003). Desensitization of Capsaicin-activated Currents in the Vanilloid Receptor TRPV1 Is Decreased by the Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Pathway *. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50080–50090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306619200>
- Mohapatra, Durga Prasanna, & Nau, C. (2005). Regulation of Ca²⁺-dependent

- Desensitization in the Vanilloid Receptor TRPV1 by Calcineurin and cAMP-dependent Protein Kinase *. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13424–13432. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410917200>
- Moran, M. M., McAlexander, M. A., Bíró, T., & Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(8), 601–620. <https://doi.org/10.1038/nrd3456>
- Nakashima, M. (2005). Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16(3 SPEC. ISS.), 369–376. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.02.011>
- Nakatomi, M., Ida-Yonemochi, H., & Ohshima, H. (2013). Lymphoid enhancer-binding factor 1 expression precedes dentin sialophosphoprotein expression during rat odontoblast differentiation and regeneration. *Journal of Endodontics*, 39(5), 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.016>
- Nie, X., Luukko, K., & Kettunen, P. (2006). BMP signalling in craniofacial development. *International Journal of Developmental Biology*, 50(6), 511–521. <https://doi.org/10.1387/ijdb.052101xn>
- Numazaki, M., Tominaga, T., Takeuchi, K., Murayama, N., Toyooka, H., & Tominaga, M. (2003). Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *PNAS*, 100(13), 8002–8006.
- Okumura, R., Shima, K., Muramatsu, T., Nakagawa, K., Shimono, M., Suzuki, T., Shibukawa, Y. (2005). The odontoblast as a sensory receptor cell? The expression of TRPV1 (VR-1) channels. *Arch Histol Cytol*, Vol. 68, pp. 251–257. <https://doi.org/JST.JSTAGE/aohc/68.251> [pii]
- Palkar, R., Lippoldt, E. K., & McKemy, D. D. (2015). The molecular and cellular basis of thermosensation in mammals. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.010>
- Park, C. K., Mi, S. K., Fang, Z., Hai, Y. L., Sung, J. J., Choi, S. Y., Seog, B. O. (2006). Functional expression of thermo-transient receptor potential channels in dental primary afferent neurons: Implication for tooth pain. *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17304–17311. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511072200>
- Priyam Jani, Chao Liu, Hua Zhang, Khaled Younes, M. D. B., & Qin, and C. (2018). The Role of Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4 in Mouse Dentinogenesis. *Arch Oral Biol*, 90, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Qin, C., Baba, O., & Butler, W. T. (2004). Post - translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 15(3), 126–136.
- Rathee, P. K., Distler, C., Obreja, O., Neuhuber, W., Wang, G. K., Wang, S., ... Kress, M. (2002). PKA / AKAP / VR-1 Module : A Common Link of G s -Mediated Signaling to Thermal Hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience*, 22(11), 4740–4745.

- Rosenbaum, T., Gordon-shaag, A., Munari, M., & Gordon, S. E. (2004). *Ca²⁺ / Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin* *The Journal of General Physiology*, 123(January). <https://doi.org/10.1085/jgp.200308906>
- Roth, V. (2006). Retrieved from Doubling Time Computing website: <http://www.doubling-time.com/compute.php>
- Sanz-salvador, L., Andres-borderia, A., Ferrer-montiel, A., & Planells-cases, R. (2012). Agonist- and Ca²⁺-dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19462–19471. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289751>
- Sato, M., Furuya, T., Kimura, M., Kojima, Y., Tazaki, M., Sato, T., & Shibukawa, Y. (2015). Intercellular odontoblast communication via ATP mediated by pannexin-1 channel and phospholipase C-coupled receptor activation. *Frontiers in Physiology*, 6(NOV). <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00326>
- Sato, M., Sobhan, U., Tsumura, M., Kuroda, H., Soya, M., Masamura, A., Shibukawa, Y. (2013). Hypotonic-induced stretching of plasma membrane activates transient receptor potential vanilloid channels and sodium-calcium exchangers in mouse odontoblasts. *Journal of Endodontics*, 39(6), 779–787. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.01.012>
- Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel “gene expression’s C T difference” formula. *Journal of Molecular Medicine*, 84(11), 901–910. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0097-6>
- Scheller, E. L., Chang, J., & Wang, C. Y. (2008). Wnt/ β -catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation. *Journal of Dental Research*, 87(2), 126–130. <https://doi.org/10.1177/154405910808700206>
- Shibukawa, Y., Sato, M., Kimura, M., Sobhan, U., Shimada, M., Nishiyama, A., ... Tazaki, M. (2015). Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 467(4), 843–863. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1551-x>
- Solé-Magdalena, A., Martínez-Alonso, M., Coronado, C. A., Junquera, L. M., Cobo, J., & Vega, J. A. (2018). Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. *Annals of Anatomy*, 215, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.09.006>
- Solé-Magdalena, A., Revuelta, E. G., Menéñez-Díaz, I., Calavia, M. G., Cobo, T., García-Suárez, O., ... Vega, J. A. (2011). Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. *Microscopy Research and Technique*, 74(5), 457–463. <https://doi.org/10.1002/jemt.20931>
- Son, A. R., Yang, Y. M., Hong, J. H., Lee, S. I., Shibukawa, Y., & Shin, D. M. (2009). Odontoblast TRP channels and thermo/mechanical transmission. *Journal of Dental Research*, 88(11), 1014–1019. <https://doi.org/10.1177/0022034509343413>

- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., ... Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, *112*(6), 819–829. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00158-2)
- Tazawa, K., Ikeda, H., Kawashima, N., & Okiji, T. (2017). Transient receptor potential melastatin (TRPM) 8 is expressed in freshly isolated native human odontoblasts. *Archives of Oral Biology*, *75*, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.12.007>
- Thivichon-Prince, B., Couble, M. L., Giamarchi, A., Delmas, P., Franco, B., Romio, L., Bleicher, F. (2009). Primary cilia of odontoblasts: Possible role in molar morphogenesis. *Journal of Dental Research*, *88*(10), 910–915. <https://doi.org/10.1177/0022034509345822>
- Tripathi K.D. (2008). Sección 3: Farmacos importantes en el tratamiento odontológico. In E. M. Panamericana (Ed.), *Farmacología En Odontología : Fundamentos* (pp. 327–352).
- Tsumura, M., Sobhan, U., Muramatsu, T., Sato, M., Ichikawa, H., Sahara, Y., Shibukawa, Y. (2012). TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts. *Cell Calcium*, *52*(2), 124–136. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2012.05.002>
- Vandewauw, I., Owsianik, G., & Voets, T. (2013). Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. *BMC Neuroscience*, *14*(21). <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-21>
- Wen, W., Que, K., Zang, C., Wen, J., Sun, G., Zhao, Z., & Li, Y. (2017). Expression and distribution of three transient receptor potential vanilloid (TRPV) channel proteins in human odontoblast-like cells. *Journal Of Molecular Histology*, *48*(5–6), 367–377. <https://doi.org/10.1007/s10735-017-9735-2>
- Wu, A., Bao, Y., Yu, H., Zhou, Y., & Lu, Q. (2019). Berberine Accelerates Odontoblast Differentiation by Wnt/ β -Catenin Activation. *Cellular Reprogramming*, *21*(2), 108–114. <https://doi.org/10.1089/cell.2018.0060>
- Yang, B.H., Piao, Z.G., Kim, Y-B., Lee, C-H., Lee, J.K., Park, K., Kim, J.S., & Oh S.B. (2013). Activation of Vanilloid Receptor 1 (VR1) by Eugenol. *Journal of Dental Research*, *10*(82), 781–785.
- Yang, F., Xiao, X., Cheng, W., Yang, W., Yu, P., Song, Z., Zheng, J. (2015). binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nature Chemical Biology*, *12*(june), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1835>
- Yokose, S., & Naka, T. (2010). Lymphocyte enhancer-binding factor 1: An essential factor in odontoblastic differentiation of dental pulp cells enzymatically isolated from rat incisors. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *28*(6), 650–658. <https://doi.org/10.1007/s00774-010-0185-0>

Yu, C., & Abbott, P. (2007). An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Australian Dental Journal*, 52, S4–S6. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2007.tb00525.x>

Zhang, F., Jara-oseguera, A., Chang, T., Bae, C., Hanson, S. M., & Swartz, K. J. (2017). Heat activation is intrinsic to the pore domain of TRPV1. *PNAS*, 317–324. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717192115>