



Universidad de Oviedo

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO
CIENCIAS DE LA SALUD

Órganos de los sentidos y Sistema Nervioso Periférico

Tesis Doctoral

Mecanobiología de la pulpa dentaria

Juan José Gaité García

Oviedo 2023

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
PROGRAMA DE DOCTORADO
CIENCIAS DE LA SALUD
Órganos de los sentidos y Sistema Nervioso Periférico

Tesis Doctoral

Mecanobiología de la pulpa dentaria

Juan José Gaite García

Directores

**Benjamín Martín Biedma
José A. Vega Álvarez**

Oviedo 2023



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis Doctoral	
Español: MECANOBIOLÓGÍA DE LA PULPA DENTARIA	Inglés: MECHANOBIOLOGY OF THE DENTAL PULP
2.- Autor	
Nombre: JUAN JOSE GAITE GARCIA	
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Línea de Investigación: ORGANOS DE LOS SENSIDOS Y SISTEMA NERVIOSO PERIFERICO	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN

Introducción. La mecanobiología se define como los cambios químicos y biológicos que se producen en las células como consecuencia de la acción de una fuerza. En los últimos años se han ido acumulando evidencias sobre la presencia de canales iónicos mecanosensibles en el aparato sensitivo de los dientes y en las propias células de la pulpa dentaria, especialmente los odontoblastos, pero aún quedan numerosos aspectos sin aclarar. Por otro lado, no existen estudios que relacionen la expresión de canales iónicos mecanosensibles con la odontogénesis y ello podría aportar información sobre la función de las fuerzas en la conformación de los dientes. Para contribuir al conocimiento de estos aspectos de la mecanobiología dentaria se ha diseñado el presente trabajo investigación. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se analizará la presencia de dos mecanoproteínas (PIEZO1 y PIEZO2) en la pulpa dentaria de dientes humanos permanentes y en dientes de ratón de diferentes edades (pre y postnatales), y en el ligamento periodontal. Por otro lado, mediante técnicas de biología celular y molecular se analizará *in vitro* el efecto de las fuerzas mecánicas de estiramiento sobre las expresión de esas mecanoproteínas en una línea de células odontoblasto-like humanas.

Hipótesis. Las células de la pulpa dentaria, tanto los odontoblastos como los fibroblastos, son mecanosensibles y expresan canales iónicos directamente relacionados con la mecanosensación/meconotransducción, o que son necesarias para el desarrollo de ambos procesos.

Objetivos. El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de la mecanobiología del diente. Como **objetivos específicos** se han planteado los siguientes: 1.- Estudiar la expresión y distribución en los dientes humanos de los canales iónicos mecanosensibles PIEZO1 y PIEZO2; 2.- Estudiar la expresión y distribución en dientes de ratón, de diferentes edades, de la expresión y distribución de los canales iónicos mecanosensibles PIEZO1 y PIEZO2; 3.- Estudiar el efecto mecánico del estiramiento sobre la expresión de PIEZO1 y PIEZO2 a nivel de mRNA y de proteína sobre la línea celular humana odontoblast-like hTERT-hOd-1.

Material y métodos. Se utilizaron 25 dientes humanos (2 incisivos, 2 caninos, 11 premolares y 10 molares) obtenidos de exodoncias de sujetos de entre 25 y 65 años. El material de ratones procedía de animales de la cepa C57B1/6 de las siguientes edades: 15, 17 y 18 días prenatales (n = 5 por cada edad), y 7, 17, 21 y 30 días postnatales (n = 3 por cada edad). Los experimentos *in vitro* se realizaron sobre la línea celular humana odontoblast-like hTERT-hOd-1, y se analizaron en las siguientes condiciones: células hTERT-hOd-1 crecidas en medio básico; células hTERT-hOd-1 crecidas en medio básico suplementado; células hTERT-hOd-1 crecidas en medio básico sometidas a estiramiento; y células hTERT-hOd-1 crecidas en medio básico suplementado y sometidas a estiramiento.

Se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica para analizar la presencia de PIEZO1 y PIEZO2 en los dientes humanos permanentes y en los dientes de ratón. Por otro lado, mediante técnicas de biología celular y molecular (RT-PCR y Western-blot) se analizará *in vitro* el efecto de las fuerzas mecánicas de estiramiento sobre las expresión de esas mecanoproteínas en una línea de células odontoblasto-like humanas.

Resultados. En los dientes humanos se encontró inmunorreacción para PIEZO1 y PIEZO2 en una subpoblación celular de la capa de los odontoblastos que, en base a su morfología y localización, se identificó como pre-odontoblastos o células madre de la pulpa dentaria. También fueron positivos para ambas proteínas grupos de fibroblastos de la parte central de la pulpa. En los dientes de los ratones, durante todo el periodo embrionario se detectó inmunorreacción para PIEZO1 y PIEZO2 tanto en la capa de los odontoblastos como en la de los ameloblastos, siendo más intensa en la primera; sin embargo, en el periodo postnatal la inmunorreacción predominó en los odontoblastos; también fue positiva la inmunorreacción en el ligamento periodontal de humanos y de ratones. En cuanto a los resultados *in vitro*, las células hTERT-hOd-1 expresan constitutivamente *Piezo1* y *Piezo2* y la expresión de ambas no se ve influenciada por la suplementación del medio del cultivo, pero sí por el estiramiento (se incrementa hasta 80-100 veces para *Piezo2* y 55-60 veces para *Piezo1*). El Western-blot confirmó a nivel proteico los resultados.

Conclusiones. Los tipos celulares de la pulpa dentaria que expresan PIEZO1 y PIEZO2 son diferentes en humanos y en ratón; en humanos se localizan en células pre-odontoblásticas y en nichos de fibroblastos de la pulpa mientras que en los ratones son positivos ameloblastos y odontoblastos durante el periodo embrionario, y odontoblastos (sobre todo) y fibroblastos del ligamento periodontal en la vida postnatal. En el modelo murino no se apreciaron diferencias entre los dientes en crecimiento permanente (incisivos) y los de crecimiento limitado (molares). La línea celular humana hTERT-hOd-1 expresa constitutivamente *Piezo1* y *Piezo2* a nivel de mRNA y de proteína y su expresión es regulada al alta por los estímulos mecánicos de estiramiento.

SUMMARY

Introduction. Mechanobiology is defined as the chemical and biological changes that occur in cells because of the action of a force. In recent years, evidence has been accumulated on the presence of mechanosensitive ion channels in the sensory apparatus of the teeth as well as in the cells of the dental pulp themselves, especially the odontoblasts, but there are still many aspects that remains to be clarified. On the other hand, there are no studies that relate the expression of mechanosensitive ion channels with odontogenesis, and this could provide information on the role of forces in the conformation of teeth. To contribute to the knowledge of these aspects of dental mechanobiology, this research work has been designed. Immunohistochemical techniques will analyze the presence of two mechanoproteins (PIEZO1 and PIEZO2) in the dental pulp of permanent human teeth and mouse teeth of different ages (pre and postnatal), and in the periodontal ligament. On the other hand, cell and molecular biology techniques will be analyzed *in vitro* the effect of mechanical stretching forces on the expression of these mechanoproteins in a line of human odontoblast-like cells.

Hypothesis. The cells of the dental pulp, both odontoblasts and fibroblasts, are mechanosensitive and express ion channels directly related to mechanosensation/mechanotransduction, or which are necessary for the development of both processes.

Objectives. The **main goal** of the study is to contribute to the knowledge of the mechanobiology of the tooth. As **specific objectives** have been raised the following:

- 1.- To study the expression and distribution in human teeth of the mechanosensitive ion channels PIEZO1 and PIEZO2;
- 2.- To study the expression and distribution in mouse teeth, of different ages, of the expression and distribution of the mechanosensitive ion channels PIEZO1 and PIEZO2;
- 3.- To study the mechanical effect of stretching on the expression of PIEZO1 and PIEZO2 at the level of mRNA and protein on the human cell line odontoblast-like hTERT-hOd-1.

Material and Methods. 25 exodontia human teeth (2 incisors, 2 canines, 11 premolar and 10 molars) were obtained from subjects between 25 and 65 years. The mouse material came from animals of the C57B1/6 strain of the following ages: 15, 17 and 18 days prenatal (n = 5 for each age), and 7, 17, 21 and 30 days postnatal (n = 3 for each age). In vitro experiments were performed on the human cell line odontoblast-like hTERT-hOd-1 and were analyzed under the following conditions: hTERT-hOd-1 cells grown in basic medium; hTERT-hOd-1 cells grown in supplemented basic medium; hTERT-hOd-1 cells grown in basic medium subjected to stretching; and hTERT-hOd-1 cells grown in basic medium supplemented and subjected to stretching. Immunohistochemical techniques were used to analyze the presence of PIEZO1 and PIEZO2 in permanent human teeth and mouse teeth. On the other hand, cell and molecular biology techniques (RT-PCR and Western-blot) will be analyzed in vitro the effect of mechanical stretching forces on the expression of these mechanoproteins in a line of human odontoblast-like cells.

Results. In human teeth, immunoreactivity for PIEZO1 and PIEZO2 was found in a cell subpopulation of the odontoblast layer that, based on its morphology and location, were identified as pre-odontoblasts or dental pulp stem cells. Fibroblast niches in the central part of the pulp were also positive for both proteins. In the teeth of mice, immunoreaction for PIEZO1 and PIEZO2 was detected throughout the embryonic period in both the odontoblast and ameloblast layers, being more intense in the former; however, in the postnatal period immunoreaction predominated in odontoblasts. Periodontal ligament immunoreaction in humans and mice was also positive. Regarding the results *in vitro*, the cells hTERT-hOd-1 constitutively express *Piezo1* and *Piezo2* and the expression of both is not influenced by the supplementation of the culture medium but by stretching (it increases up to 80-100 times for *Piezo2* and 55-60 times for *Piezo1*). The Western blot confirmed the results at the protein level.

Conclusions. Cell types of the dental pulp expressing PIEZO1 and PIEZO2 are different in humans and mice. In humans they are identified as pre-odontoblastic cells and in fibroblast niches of the pulp while in mice ameloblasts and odontoblasts are positive during the embryonic period, and odontoblasts and fibroblasts of the periodontal ligament in postnatal life. In the murine model, no differences were observed between permanently growing teeth (incisors) and those with limited growth (molars). The human cell line hTERT-hOd-1 constitutively expresses *Piezo1* and *Piezo2* at the level of mRNA and protein and its expression is upregulated by mechanical stretching stimuli.

*A mi esposa Elena, faro de mi vida.
A mis hijos, María, Javier e Ignacio, mis tesoros.*

Agradecimientos

Quisiera, en este apartado, expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que han contribuido a la realización de este trabajo.

Agradecer a mis directores, Prof. Benjamín Martín y Prof. José Antonio Vega, por el ánimo y apoyo incondicional , a lo largo de estos años. Siempre estaré en deuda con ellos.

Un especial agradecimiento al Departamento de Estomatología de la Universidad del País Vasco y a la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra, por confiar en mi, en todos los proyectos educativos que hemos iniciado a lo largo de los últimos años.

A mi familia, esposa, hijos y a mis padres por su comprensión y apoyo en los momentos de ausencia.

A mis compañeros y compañeras de la Clínica Dental Iortia y de la Unidad Dental de la Clínica Universidad de Navarra, por su ayuda en todo momento.

Índice

Documentos administrativos	05
Dedicatoria	13
Agradecimientos.....	15
1. Introducción	19
2. Estado actual del problema	25
3. Hipótesis y Objetivos.....	39
4. Material y Técnicas.....	43
5. Resultados.....	53
6. Discusión	67
7. Conclusiones.....	75
8. Bibliografía.....	79
Anexo 1 – Curriculum vitae	95
Anexo 2 – Artículo derivado de la Tesis Doctoral.....	119

1. Introducción

1. Introducción

La **mecanobiología** puede definirse como el efecto causado por la acción de una fuerza sobre la biología de las células, y abarca cambios físicos, químicos y biológicos (**Figura 1.1**). Dentro de este concepto se incluyen aspectos tan dispares como las variaciones en las células de los corpúsculos sensitivos del tacto cutáneo o de la propiocepción articular (Cobo et al., 2021; Martín-Alguacil et al., 2021; Vega y Suazo, 2021); la distensión del tubo gastrointestinal (Alcaino et al., 2017; Yang et al., 2022) o de la vejiga de la orina (Dalghi et al., 2019, 2021); la barorrecepción que determina la presión arterial (Zeng et al., 2018; Burke et al., 2019); y otras, menos conscientes, como los cambios en la biología del ligamento periodontal como consecuencia de los tratamientos ortodóncicos (Huang et al., 2018; Dieterle et al., 2021) o de las células de la pulpa dentaria durante los movimientos masticatorios (Marrelli et al., 2018; Sun et al., 2022).

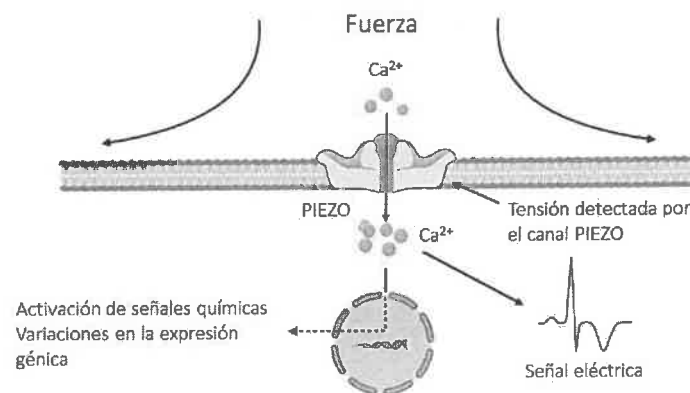


Figura 1.1.- Acciones de la fuerza sobre la biología celular. Modificado de Liu et al. (2022).

En todos esos ejemplos una fuerza produce una respuesta celular que puede resultar en un estímulo nervioso (caso del tacto) o, simplemente, en cambios de la actividad de las células sobre las que influye. En otras palabras, la **mecanobiología** es el impacto del ambiente mecánico en los procesos biológicos (**Figuras 1.1 y 1.2**).

La mecanobiología conlleva, necesariamente, una fase de **mecanoactivación** (**Figura 1.2**), definida como el conjunto de respuestas tisulares a la acción mecánica. Entre ellas están las modificaciones en la matriz extracelular, que se acompañan de cambios en las

propiedades mecánicas del tejido. También un incremento en la resistencia intrínseca del citoesqueleto para evitar que se altere la forma de la célula a la vez que aumentan las adhesiones intercelulares, en un intento de resistencia a que el tejido se modifique. A todo ello debe añadirse la liberación por parte la célula sometida a la fuerza de moléculas de señalización y comunicación intercelular.

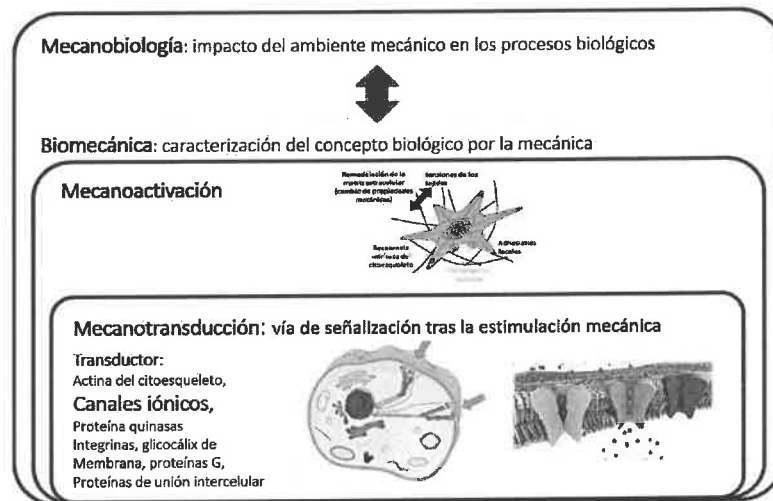


Figura 1.2.- Conceptos de biomecánica, mecanoactivación y mecanotransducción. Modificado de: C. Huselstein et al. (2016) Selected papers from the 6th China–France International Symposium “Stem Cells and Regenerative Medicine” and the first meeting of the France–China International CNRS Network (GDRI) CeSMER, Nancy, 10-13 July 2016. Guest editors: J.-F. Stoltz, J. Magdalou and D. Bensoussan

La última fase del proceso es la **mecanotransducción (Figura 1.2)**, es decir, la activación de las vías de señalización y que son las bases moleculares de la mecanobiología. En ella están implicadas, de nuevo, algunas proteínas de la matriz extracelular, las proteínas del citoesqueleto y diferentes **canales iónicos**. Justamente el presente trabajo de Tesis Doctoral se centra en la detección de dos canales iónicos, con propiedades de mecanosensibilidad en las células que forman la pulpa dentaria, los **canales PIEZO1 y PIEZO2**.

Durante las dos últimas décadas se ha demostrado que todas las sensibilidades tienen en su base molecular la activación de canales iónicos. En la actualidad se acepta la participación de los canales iónicos en la mecanosensibilidad, aunque los canales por sí mismos no pueden explicar completamente el proceso de mecanotransducción, y para

ello se requiere la participación de la matriz extracelular y las proteínas del citoesqueleto (Lin et al., 2009; Sachs, 2010). Diferentes canales iónicos, miembros de las familias degenerina/canales epiteliales de sodio (DEG/ENa⁺C), receptor de potencial transitorio (TRP), dominio de dos poros de potasio (K_{2p}) y Piezo, son canales mecanotransductores total o parcialmente (Delmas y Coste, 2013; Ranade et al., 2015). Como se expondrá en el capítulo siguiente, hasta la fecha, de entre todos los canales propuestos, solo PIEZO1 y PIEZO2 cumplen los criterios de canal mecanosensible mecanostransductor.

Según Delmas y Coste (2013), existen dos categorías de canales iónicos mecanosensibles: los que responden a la tensión de la membrana y los que son susceptibles de estiramiento; y los datos experimentales sugieren, al menos, tres mecanismos capaces de activarlos: 1) cambios de la membrana celular en las proximidades de los canales; 2) tensión de la matriz extracelular y/o proteínas citoesqueléticas ancladas a los dominios extra o intracitoplasmáticos, respectivamente, de los canales iónicos de membrana; 3) acoplamiento de proteínas mecanosensoriales secundarias a los canales iónicos (Lumpkin y Caterina, 2007; Sharif-Naeini, 2015). Por lo tanto, cualquiera de estos tres mecanismos, o una combinación de ellos, es la base de la apertura del canal iónico mecanosensible y, en consecuencia, de la mecanotransducción.

En los últimos años se han ido acumulando evidencias sobre la presencia de canales iónicos mecanosensibles en el aparato sensitivo de los dientes y en las propias células de la pulpa dentaria, especialmente los odontoblastos (ver Solé-Magdalena et al., 2011,2018; Lee et al., 2019), pero aún quedan numerosos aspectos sin aclarar. Por otro lado, no hemos encontrado estudios que relacionen la expresión de canales iónicos mecanosensibles con la odontogénesis y ello podría aportar información sobre la función de las fuerzas en la conformación de los dientes.

Para contribuir al conocimiento de estos aspectos de la mecanobiología dentaria se ha diseñado el presente trabajo de Tesis Doctoral. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se analizará la presencia de dos mecanoproteínas (PIEZO1 y PIEZO2) en dientes humanos permanentes y en dientes de ratón en diferentes etapas del desarrollo pre y postnatal. Por otro lado, mediante técnicas de biología celular y

molecular, se analizará *in vitro* el efecto de las fuerzas mecánicas de estiramiento sobre la expresión de esas mecanoproteínas en una línea de células odontoblasto-like humanas.

2. Estado actual del problema

2. Estado actual del problema

2.1. Estructura de la pulpa dentaria

La pulpa dentaria es un tejido conectivo muy diferenciado formado por varios tipos de células, matriz extracelular fibrilar y no fibrilar, vasos y nervios (Goldberg y Smith, 2004). Las poblaciones celulares que contiene son muy heterogéneas e incluyen los odontoblastos, fibroblastos de la pulpa, células troncales y células inmunocompetentes (Sloan y Schmith, 2007; Yu y Abbot, 2007; Ren et al., 2022) que no se distribuyen de manera uniforme si no que están organizadas en cuatro zonas. Desde la dentina hasta el centro de la pulpa se diferencian cuatro capas: la de los odontoblastos (formada por odontoblastos y células troncales; **Figura 2.1**), la zona libre de células, la zona rica en células (fibroblastos y células troncales; **Figura 2.2**) y el núcleo pulpar, que contiene los vasos y nervios (D'Aquino et al., 2008; Lizier et al., 2012; França et al., 2019).

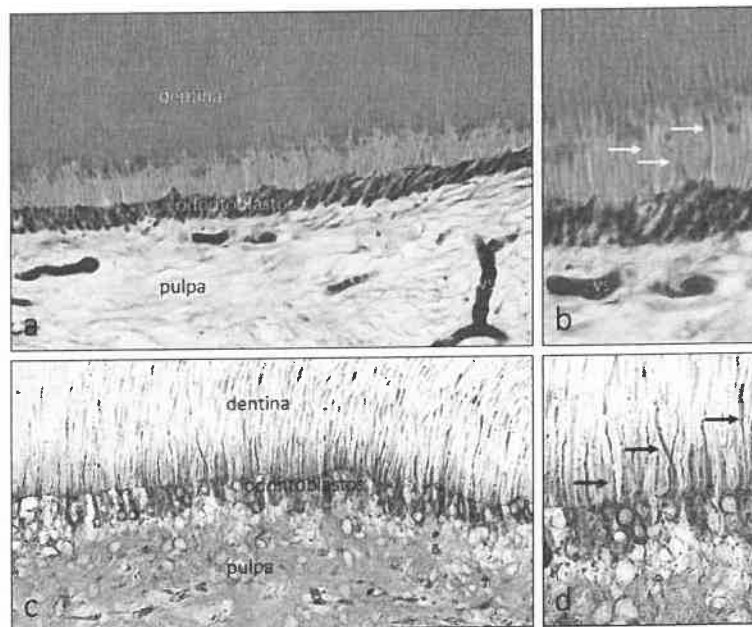


Figura 2.1. Capa de los odontoblastos en los dientes humanos. A y B: tricrómico de Masson; C y D: inmunomarcaje para la vimentina. Cortesía del Laboratorio del Grupo SINPOS. Universidad de Oviedo.

Pero la variedad de células en la pulpa dentaria es mucho mayor que la expuesta en el párrafo anterior. Recientemente, Krivanek et al. (2020) investigaron la composición celular de los dientes de ratón y humanos en crecimiento y no crecimiento. En el caso del

incisivo del ratón, que tiene crecimiento continuo, encontraron poblaciones diferenciadas de células troncales (progenitoras y diferenciados espacialmente) restringidas a los compartimentos epitelial y mesenquimal, además de dos tipos principales de células pulpares y diversos subtipos epiteliales. También observaron que entre el ratón y el hombre hay paralelismos y diferencias en la heterogeneidad tisular. Aunque en términos generales son parecidas existen diferencias moleculares y subtipos celulares específicos de cada especie. Estos hechos son esenciales a la hora de interpretar los resultados que se obtengan en ratón y en humanos.

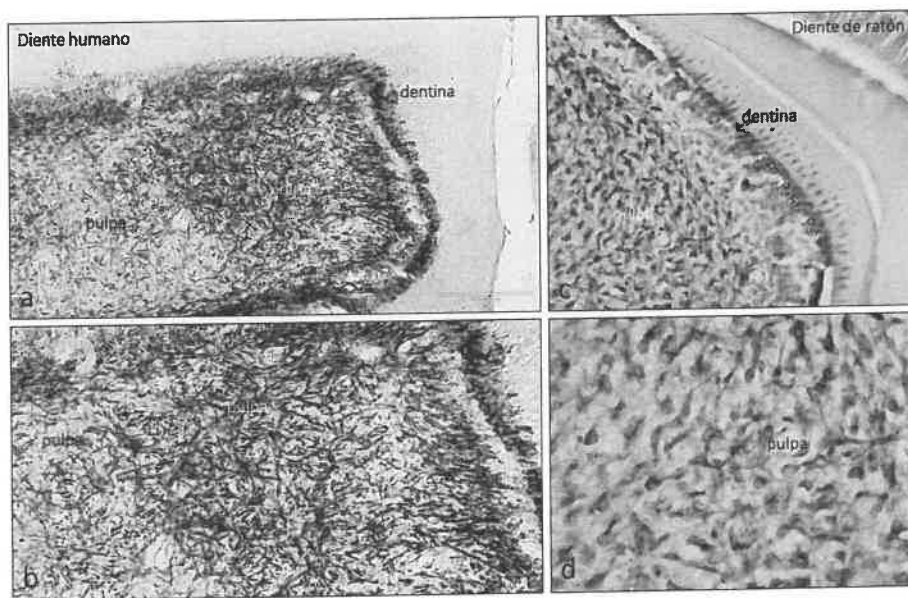


Figura 2.2. Capa de los odontoblastos y zona rica en células de la pulpa dentaria en los dientes humanos (a,b) y de ratón (c,d). Inmunomarcaje para la vimentina. Cortesía del Laboratorio del Grupo SINPOS. Universidad de Oviedo.

La sensibilidad de la pulpa dentaria se basa en la expresión de canales iónicos para las diferentes modalidades sensoriales en los odontoblastos, los fibroblastos de la pulpa y las fibras nerviosas originadas en las neuronas del ganglio del trigémino que alcanzan el diente. Los odontoblastos y los fibroblastos están inervados por fibras nerviosas sensitivas de tipo C y A δ (ver Solé-Magdalena et al, 2018; Lee et al., 2019) y la comunicación entre ambos tipos celulares (considerados células sensoriales primarias) y las fibras nerviosas se realiza mediante neurotransmisión mediada, principalmente, por ATP (Egbuniwe et al., 2014; Liu et al., 2015; Lee et al., 2017).

2.1.1. Odontoblastos

Los odontoblastos son células muy especializadas de la pulpa dentaria, que se originan a partir del ectomesénquima cefálico (Mayor y Theveneau, 2013) y son las responsables de la síntesis de matriz dentinaria mineralizada (Arana-Chávez y Massa, 2004; Bleicher, 2014; Kawashima y Okiji, 2016). La morfología de los odontoblastos, así como su proteoma varían considerablemente durante el proceso de diferenciación y maduración celular (Simon et al., 2009; Byers y Westenbroek, 2011; Couve et al., 2013).

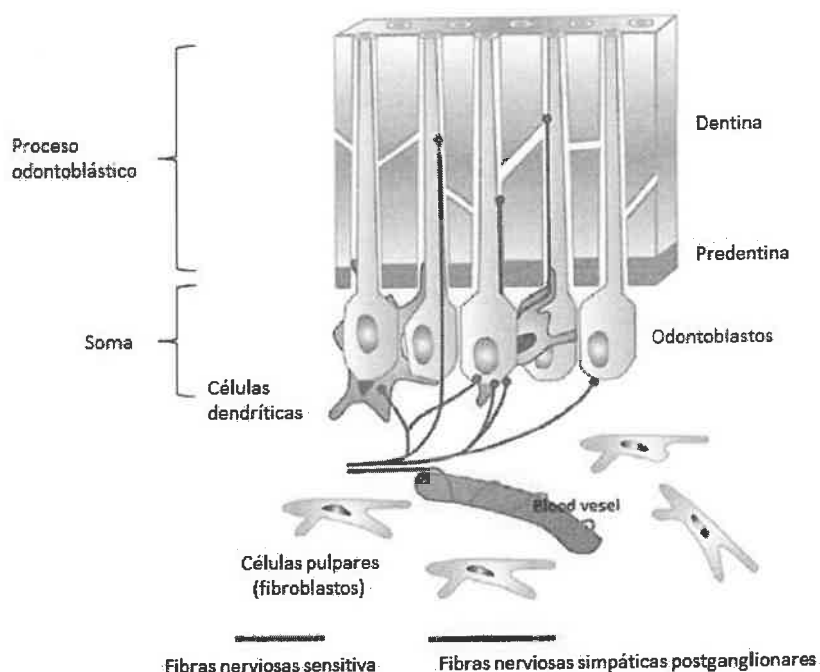


Figura 2.3. Esquema de los odontoblastos y sus relaciones con otras células pulpares. Modificado de A Solé-Magdalena, M Martínez-Alonso, CA Coronado, LM Junquera, J Cobo, JA Vega. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. *Ann Anat.* 2018; 215:20-9.

Los odontoblastos diferenciados y maduros tienen dos partes: el cuerpo y el proceso odontoblástico. Los cuerpos se localizan en la unión dentina-pulpa formando una línea continua y están conectados entre ellos en el polo apical por numerosos complejos de unión (*tight junctions* y *desmosoma-like*). Los procesos odontoblásticos, por su lado, se sitúan dentro de los túbulos dentinarios y están bañados por el fluido dentinario (ver Murray et al., 2003; Bleicher, 2014).

Los odontoblastos participan principalmente en la formación de la dentina, pero también en los estadios iniciales de los procesos sensitivos desempeñando un papel esencial en la detección de la sensibilidad térmica, química y mecánica del diente y, por tanto, en la sensibilidad y dolor de origen dental (Gillam, 1995; Maurin et al., 2003; Aminoshariae y Kulild, 2021). Esto es lógico si se considera su localización en el diente: los odontoblastos son las primeras dianas para los estímulos externos y pueden, por tanto, actuar como células sensoriales, hecho que se ve reforzado porque expresan distintos canales iónicos, algunos de los cuales pueden actuar como mecanosensores (Son et al., 2009) (Figura 2.3)

2.1.2. Fibroblastos de la pulpa dentaria

Los fibroblastos son la población celular más abundante de la pulpa dentaria (Martínez y Araujo, 2004). Forman una población heterogénea que depende de la etapa de desarrollo del diente, localización y del microambiente tisular (Denu et al., 2016); de hecho, se pueden encontrar diferentes subtipos en el mismo tejido (Lynch y Watt, 2018) y pueden sufrir transformación fenotípica (Phan, 2008).

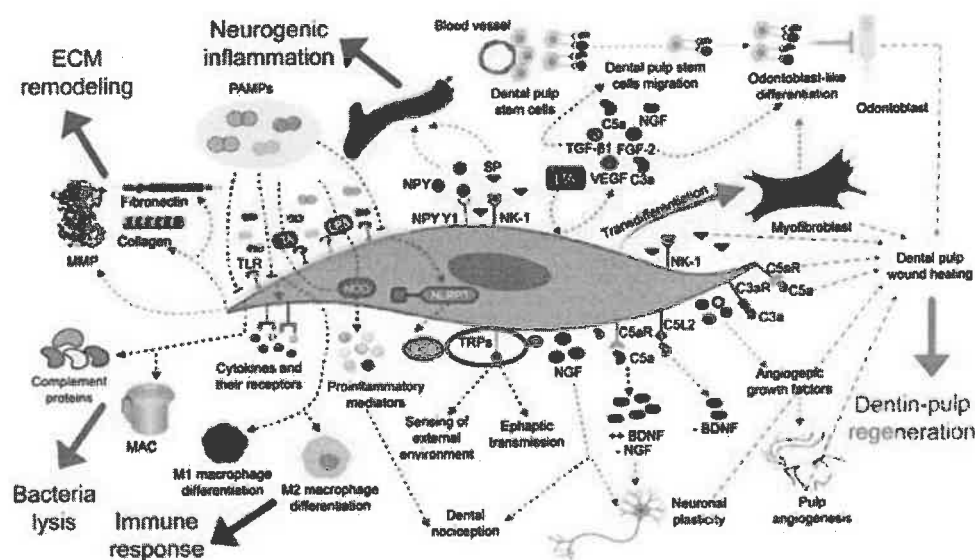


Figura 2.4. Representación esquemática de las principales funciones de los fibroblastos de la pulpa dentaria. En el círculo rojo se evidencian los canales iónicos de la superfamilia TRP. Tomada de JL Alvarez-Vasquez, CP Catañeda-Alvarado. *Dental Pulp Fibroblast: A Star Cell*. J Endod. 2022;4 8:1005-19.

Típicamente tienen morfología fusiforme o estrellada y son reguladores de la homeostasis tisular (**Figura 2.4**). Su función principal es la remodelación de la matriz extracelular, pero además ejercen una función inmunológica (Chmilewsky et al., 2014), controlan los procesos inflamatorios y participan en el proceso regeneración dentina-pulpa mediante la producción de citoquinas, moléculas angiogénicas y diferentes tipos de factores de crecimiento (El Karim et al., 2009; Chmilewsky et al., 2016; Jeanneau et al., 2017; Le Fournis et al., 2020).

Los fibroblastos de la pulpa dental son también células sensibles como lo demuestra el hecho de que expresen canales iónicos relacionados con diferentes tipos de sensibilidad. En ellos se han detectado TRPA1 (El Karim et al., 2011) que se activa por frío (El Karim et al., 2011) e irritantes químicos (Bandell et al., 2004; Sawada et al., 2008); TRPV1 sensible a capsaicina, calor nocivo y condiciones ácidas (Miyamoto et al., 2005); TRPM8 por temperaturas frías (Peier et al., 2002; El Karim et al., 2011); y TRPM2 por estrés oxidativo (Rowland et al., 2007). En apartados posteriores de este capítulo se relacionarán los disponibles sobre la presencia en estas células de potenciales proteínas mecanosensibles.

En cuanto a la comunicación de los fibroblastos con las fibras nerviosas presentes en la pulpa dentaria, se piensa que podría ser por transmisión háptica, es decir, los campos iónicos generados por los odontoblastos pueden alterar la excitabilidad de las neuronas cercanas (Allard et al., 2006) o mediante la activación de flujos de calcio (Shibukawa et al., 2015).

En la pulpa dentaria, además de los dos tipos de células principales descritos en los párrafos anteriores, hay células presentadoras de antígeno, incluidos macrófagos y células dendríticas, células similares a los odontoblastos y diferentes tipos de células inmunocompetentes (Quispe-Salcedo y Ohshima, 2021).

2.2. Mecanosensibilidad y mecanotransducción

Desde finales del siglo pasado se han ido acumulando evidencias de que algunas familias de canales iónicos están implicadas en la detección de estímulos térmicos, químicos o

mecánicos (Belmonte y Viana, 2008; Nilius y Szallasi, 2014). Inicialmente se creyó que cada canal era específico para un tipo de sensibilidad (frío, calor, ácido, amargo, ...), pero actualmente se sabe que la capacidad sensorial de una célula es el resultado de una combinación propia de canales iónicos (Liedtke, 2007; Belmonte y Viana, 2008; Ezak et al., 2010). Esa característica se cumple en las neuronas y fibras nerviosas del trigémino (Vandewauw et al., 2013; Luo et al., 2021) y en los odontoblastos (Magloire et al., 2009, 2010; Solé-Magdalena et al., 2011).

2.2.1. Canales iónicos relacionados con la mecanosensibilidad

Tal y como se planteó en la Introducción, la mecanosensibilidad puede definirse como la capacidad de las células para responder a estímulos mecánicos mediante activación o desactivación, en última instancia, de diferentes genes; la mecanotransducción, por su lado, son los mecanismos moleculares que desencadenan a la respuesta al estímulo mecánico.

En la actualidad, varios miembros de las superfamilias degenerina/canales epiteliales de sodio (DEG/ENa⁺C), potencial de receptor transitorio (TRP), dominio de dos poros de potasio (K_{2p}) y Piezo, han demostrado ser canales iónicos mecanosensibles y/o mecanotransductores, total o parcialmente (ver Coste y Delmas, 2013; Ranade et al., 2015; Sharif-Naeini, 2015) (Figura 2.5). Sin embargo, los fenotipos sensitivos de los ratones deficientes en estas proteínas no siempre apoyan un papel clave en la mecanotransducción, y solo *Piezo1* y *Piezo2* ha demostrado propiedades mecanotransductoras en vertebrados. Por lo tanto, todos de demás, podrían ser proteínas accesorias y no una parte esencial del canal o canales iónicos mecanosensibles.

Según Sachs (2015) las estructuras celulares mecanosensibles son aquellas en las que la energía de salida es mayor que la energía de entrada. Los canales iónicos pueden comportarse como tales porque funcionan como enzimas eliminando energía almacenada al catalizar el transporte iónico. Por tanto, teóricamente, los canales iónicos mecanosensitivos pueden definirse como aquellos cuyo rango dinámico es accesible con fuerzas fisiológicas (Meng y Sachs, 2011; Verma et al., 2012), mientras que otros canales

iónicos, como los voltaje-dependientes, se regulan por tensión mecánica pero no pueden abarcar su rango dinámico solo con mecánica (Morris, 2011,2012).

Hay dos tipos fundamentales de canales mecanosensitivos: los que se abren-cierran por tensión-deformación de las proteínas de la membrana celular (Moe y Blount, 2005; Martinac, 2014) y los que abren-cierran por la tensión de las proteínas estructurales unidas a ellos (es decir, de la matriz extracelular y del citoesqueleto; Meng y Sachs, 2011; Suchyna et al., 2007,2009,2011; Huang et al., 2013; Martinac, 2014) (**Figura 2.5**).

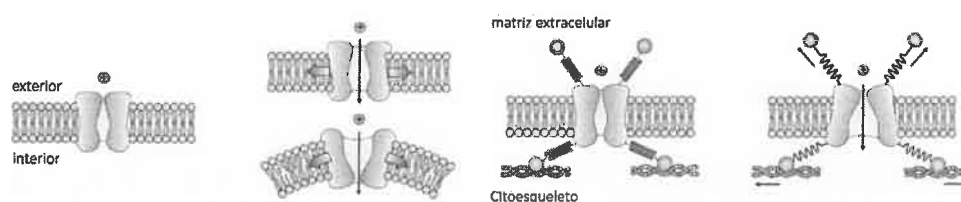


Figura 2.5. Paradigmas de activación de los canales iónicos mecanosensibles. Los dos principales se definen de acuerdo con los componentes de la membrana celular (bicapa lipídica (a) o la matriz extracelular y el citoesqueleto (b) que transmiten la fuerza de activación directamente a los canales. Modificado de P Ridine, M Vassalli, B Martinac. Piezo1 mechanosensitive channels: what are they and why are they important. *Biophys Rev.*, 11: 795-805.

2.2.1.1 Familia de las Degenerinas/ENa⁺C – ASIC

Dentro de la superfamilia de las Degenerinas/canales epiteliales de sodio (Deg/ENa⁺C), algunos miembros de la familia de los ASIC (*acid sensing ion channels*) tienen propiedades mecanosensibles y mecanotransductoras. Los ASIC son canales catiónicos selectivos para el sodio, insensibles a voltaje y bloqueables por amiloride. Su función principal es regular desviaciones moderadas del pH extracelular respecto a los valores fisiológicos (Waldmann et al., 1997; Lingueglia, 2007; Lumpkin y Caterina, 2007; Baron y Lingueglia, 2015). Hasta la fecha se han identificado 6 proteínas ASIC codificadas por cuatro genes: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 y ASIC4, que difieren en su cinética, sensibilidad al pH, distribución tisular y propiedades farmacológicas (Krishtal, 2003; Kress y Waldmann, 2006; Hanukoglu, 2017).

En cuanto al papel mecanosensor de los ASICs, no está totalmente claro y se desconoce si son auténticos mecanotransductores o solo se quieren para la mecanocepción (ver

Ruan et al., 2021). No obstante, durante los últimos años se han realizado numerosos estudios que vinculan a los canales de la familia ASIC con la mecanotransducción (Cheng et al., 2018; Ruan et al., 2021). En particular el canal ASIC2 puede ser mecanosensible en sistema nervioso periférico, sobre todo en las neuronas mecanoceptoras y los mecanorreceptores cutáneos (Cabo et al., 2015; Cheng et al., 2018; Glitsch, 2019). ASIC2 también está involucrado en la mecanosensación en el sistema nervioso autónomo a través del ganglio nodoso (Dusenkova et al., 2014). La regulación del sistema nervioso autónomo por ASIC2 es vital ya que controla las aferencias cardíacas que detectan la presión arterial (Hattori et al., 2009) y ello demuestra, indirectamente, las funciones baroreceptoras, y por tanto mecánicas, de ASIC2 (Abboud y Benson, 2015).

2.2.1.2. Familia de canales receptores transitorios de membrana

Los canales iónicos de potencial de receptor transitorio (TRP) son una superfamilia de canales catiónicos estructuralmente homólogos integrada por siete familias que incluyen, al menos, 28 proteínas (Clapham et al., 2005; Samanta et al., 2018). Casi todas las familias TRP tienen miembros potencialmente mecanosensibles. Sin embargo, no se ha establecido completamente si estos canales iónicos son mecanosensores o solo son necesarios para la mecanosensación (Lin y Corey, 2005; Martinac y Poole, 2018). Así sucede con TRPA1, de la familia de las anquirinas (Kurhanewicz et al., 2017), TRPC1, TRPC3, TRPC5 y TRPC6 de la familia de los canónicos (Reeh y Fischer, 2022), o TRPV2 y TRPV4, pertenecientes a la familia de los TRP vanilloides (Liedtke, 2007).

2.2.1.3. Familia de canales Piezo

Las proteínas codificadas por el gen *Piezo*, PIEZO1 y PIEZO2, son las únicas, hasta la fecha, que demostrado capacidad mecanosensorial real y, por lo tanto, su participación directa en la mecanotransducción (Coste et al., 2010; Jiang et al., 2021).

Los canales *Piezo*/PIEZO forman una familia de proteínas conservada filogenéticamente. Piezo1 como Piezo2 son canales catiónicos no selectivos con ~42% de identidad y su estructura y propiedades mecanográficas de Piezo1 y Piezo2 se han dilucidado recientemente (Wu et al., 2017; Delmas et al., 2022; Young et al., 2022). Las proteínas PIEZO forman de parte de canales iónicos que se comportan como mecanosensibles y

mecanotransductores en múltiples sistemas biológicos y se activan por estímulos físicos, incluyendo presión, estiramiento y cizalladura.

Los canales Piezo son catiónicos no selectivos, y en humanos están formados por 2521 y 2752 aminoácidos para Piezo1 y Piezo2, respectivamente, y tienen una identidad del 42 % (Honore et al., 2015). Recientemente se han establecido la estructura y propiedades de Piezo1 (Zhao et al., 2018) y Piezo2 (Taberner et al., 2019; Wang et al., 2019).

PIEZO1 está formado por tres subunidades con 16-18 hélices de transmembrana (Coste et al., 2015; Zhao et al., 2016). En el caso de **PIEZO2** se trata de una proteína de con 17-19 hélices transmembrana que se requiere en los canales catiónicos no selectivos mecanosensibles de las células de los mamíferos, aunque los canales iónicos mecanosensibles pueden abrirse también independientemente de estrés mecánico (Honore et al., 2015; Taberner et al., 2019; Wang et al., 2019). Funcionalmente, PIEZO1 es un sensor más polimodal para las fuerzas mecánicas que detectan un mayor número de estímulos, mientras que PIEZO2 está más adaptado para detectar específicamente el tacto mecánico (Bagriantsev y Gracheva, 2014; Wu et al., 2017) (**Figura 2.6**).

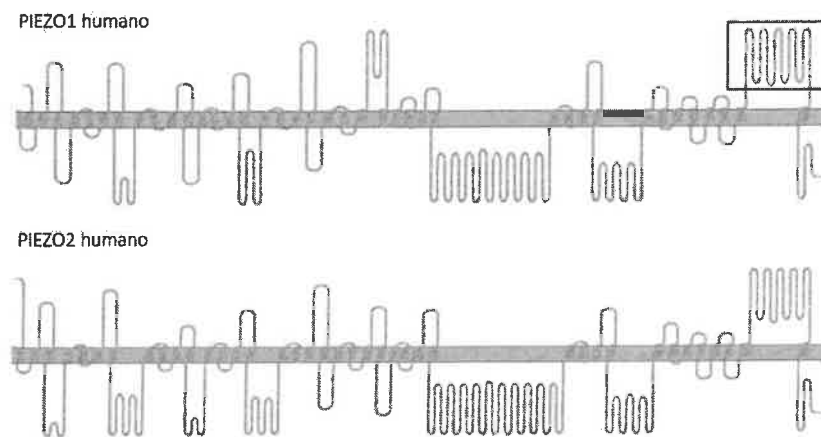


Figura 2.6.- Estructura de los canales mecanosensitivos PIEZO1 y PIEZO2 humanos. Modificado de Soattin et al. (2016). L Soattin, M Fiore, P Gavazzo, F Viti, P Facci, R Raiteri, F Difato, M Pusch, M Vassalli. The biophysics of Piezo1 and Piezo2 mechanosensitive channels. *Biophys Chem.* 2016; 208:26-33.

2.3. Canales iónicos mecanosensibles y diente

Los odontoblastos y en las células pulpares expresan canales iónicos de diferentes superfamilias, aparte de otros inespecíficos que están implicados en la nocicepción y otros tipos de sensibilidad, como los canales de calcio tipo-L, canales de potasio mecanosensibles y canales de sodio activados por voltaje (Magloire et al., 2003, 2009, 2010; Allard et al., 2000, 2006, Solé-Magdalena et al., 2011, 2018; Ichikawa et al., 2012; Lee et al., 2019). Por otro lado, en las neuronas del ganglio de Gasser y las fibras nerviosas sensitivas que salen de él se han detectado casi todos los canales iónicos que interviene en todas las modalidades sensoriales (Vandewauw et al., 2013; Flegel et al., 2015; Fu et al., 2016) (Figura 2.7).

Numerosos estudios han investigado los efectos de las fuerzas mecánicas en la pulpa dental utilizando modelos *in vitro*. Las diversas fuerzas mecánicas que actúan sobre los dientes se transmiten a la pulpa e influyen sobre la proliferación, la diferenciación odontoblástica y odontogénica (Cai et al., 2011; Hata et al., 2012; Tatullo et al., 2016; Miyashita et al., 2017; Yang et al., 2018; Marrelli et al., 2018; He et al., 2021).

Los mecanismos a través de los cuales las células de la pulpa dental responden a las fuerzas son parcialmente conocidos, y este es un paso esencial para determinar cómo estas células convierten los estímulos mecánicos en función (mecanotransducción), incluida la especificación del linaje. Los mejores candidatos para estos procesos son los canales iónicos mecanosensibles pertenecientes a diferentes familias y superfamilias, especialmente los miembros de la familia Piezo (Lumpkin y Caterina, 2007; Arnadottir y Chalfie, 2010; Delmas y Coste, 2013; Honoré et al., 2015; Ranade et al., 2015; Wu et al., 2017) junto con componentes de la matriz extracelular y diferenciaciones y citoesqueleto (Jin et al., 2020; Swaminathan y Gloerich, 2021).

Teniendo en cuenta que el presente trabajo de Tesis Doctoral se centra en la posible mecanosensación de las células pulpares se hará referencia exclusivamente a los canales iónicos de las familias TRP, ASIC y PIEZO que se han detectado en los dientes y en su aparato sensitivo (Figura 2.7).

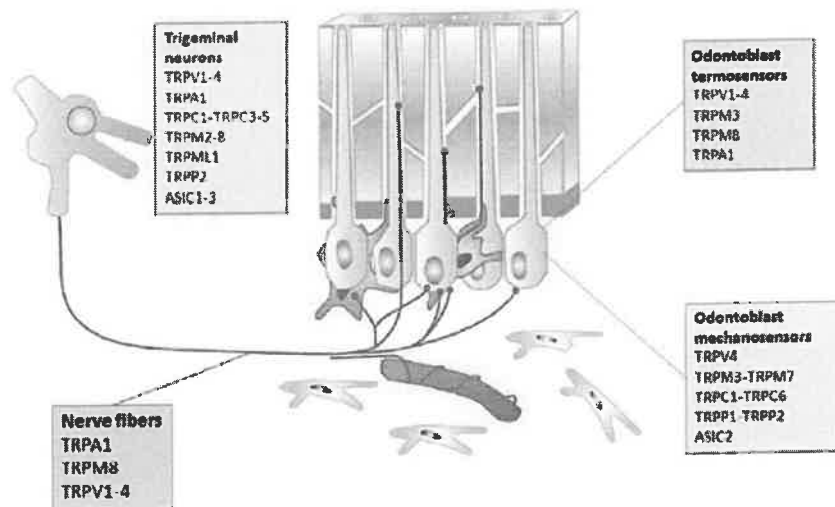


Figura 2.7. Esquema de la distribución de los principales canales iónicos localizados en el aparato sensitivo de los dientes. Modificado de A Solé-Magdalena, M Martínez-Alonso, CA Coronado, LM Junquera, J Cobo, JA Vega. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. *Ann Anat.* 2018; 215:20-9.

2.3.1. Familia de las Degenerinas- Na^+E – ASIC

Hasta donde nosotros conocemos los miembros de esta familia detectados en los dientes son ASIC2 y las subunidades β y γ de ENa^+C (Solé-Magdalena et al., 2011) en dientes humanos y mediante técnicas de inmunohistoquímica.

2.3.2. Familia de canales receptores transitorios de membrana

Los miembros de la familia TRP con potencial mecánico detectados son muy abundantes. En los odontoblastos de ratón *in vitro* se expresan TRPV4, TRPM3, TRPP1 y TRPP2 (Son et al., 2009; Sato et al., 2013), en rata adulta TRPM7, TRPC1, TRPC6 y TRPV4 (Kwon et al., 2014). Además, en la superficie de los odontoblastos, en la base de los cilios primarios, se han detectado TRPP1 y TRPP2 (Thivichon-Prince et al., 2009). En los dientes humanos el más detectado ha sido TRPV4 en los odontoblastos (Solé-Magdalena et al., 2011; Gallorini et al., 2021) y fibroblastos (Liu et al., 2019) y en las fibras nerviosas pulpares (Bakri et al., 2018). Los canales TRPM3, TRPV4, TRPA1, ASIC3, $\text{ENa}^+\text{C}-\alpha$ y $\text{ENa}^+\text{C}-\gamma$ han sido detectados en neuronas primarias aferentes dentales (Hermansteyne et al., 2008; Vandewauw et al., 2013).

2.3.3. Familia de canales Piezo

Los datos relativos a la expresión de proteínas PIEZO en los dientes, o en sistema sensitivo de los mismos, son escasos. Cho et al. (2022) detectaron PIEZO1 en las neuronas de tamaño intermedio y grandes del ganglio del trigémino y en la raíz sensitiva del ganglio (fibras C, 15.5%; fibras A δ , 60.2%; fibras A β , 24.3%) . También encontraron PIEZO1 en la pulpa humana. Sun et al. (2022) demostraron PIEZO1 en células odontoblasto-like humanas y cuerpos y procesos odontoblásticos, así como, con menor expresión, en los fibroblastos de la pulpa dental. PIEZO1 estimula la migración a través de la inducción de la liberación de ATP y la posterior activación de la señalización purinérgica del receptor P2 (Mousawi et al., 2020; Ohyama et al., 2022). Por otro lado, existen evidencias de PIEZO1 pueden actuar en los odontoblastos humanos de dos formas: generando sensibilidad dentinaria y suprimiendo la dentinogénesis fisiológica y/o reactiva tras la deformación celular inducida por la fuerzas dinámicas dentro de los túbulos dentinarios (Matsunaga et al., 2021). Y los resultados de los trabajos de Miyazaki et al. (2019) sugieren que PIEZO1 funciona como mecanotransductor de presión en intracelulares durante la diferenciación del odontoblasto.

En cuanto a PIEZO2 se ha detectado en neuronas sensoriales primarias mecanosensibles del ganglio trigémino (Won et al., 2017) y en pequeños axones mielinizados (A δ). En la pulpa dental, se expresa numerosos axones (Han et al., 2022). Por su lado Khatibi Shahidi et al. (2015) han demostrado la presencia ubicua de *Piezo2* en los odontoblastos de ratón, y Gao et al. (2017) detectaron PIEZO2 en células troncales del ligamento periodontal.

3. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Las células de la pulpa dentaria, tanto los odontoblastos como los fibroblastos, son mecanosensibles y expresan canales iónicos directamente relacionados con la mecanosensación/mecanotransducción, o que son necesarios para el desarrollo de ambos procesos.

Objetivos

El **objetivo general** del estudio es contribuir al conocimiento de la mecanobiología del diente.

Como **objetivos específicos** se han planteado los siguientes:

- 1.- Estudiar la expresión y distribución en los dientes humanos de los canales iónicos mecanosensibles PIEZO1 y PIEZO2.
- 2.- Estudiar la expresión y distribución en dientes de ratón, de diferentes edades pre y postnatales, de la expresión de los canales iónicos mecanosensibles PIEZO1 y PIEZO2.
- 3.- Estudiar el efecto mecánico de estiramiento sobre sobre la línea celular humana odontoblasto-like hTERT-hOd-1, a nivel de mRNA y de proteína.

4. Material y técnicas

4. Material y técnicas

4.1. Material

4.1.1. Material humano

Para la realización del presente estudio, se utilizó material del banco de tejidos humanos del grupo de investigación SINPOS (Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo; Registro Nacional de Biobancos, Sección colecciones, Ref. C-0001627, responsable Prof. Olivia García Suárez) y se obtuvo en cumplimiento de la legislación española (RD 1301/2006; Ley 14/2007; DR 1716/2011; Orden ECC 1414/2013). Corresponde a 25 dientes (2 incisivos, 2 caninos, 11 premolares y 10 molares) obtenidos de exodoncias que, en el momento de su obtención y a la observación macroscópica, no presentaban alteraciones estructurales evidentes. La edad de los pacientes de los sujetos de los que se obtuvo material fue entre 25 y 65 años.

El procesado de las piezas tras su llegada al laboratorio desde la clínica de origen fue el siguiente: lavado con agua corriente y solución salina fría durante 15 min, y fijación-descalcificación en una solución de formol al 10%, ácido nítrico 15,4 M y agua destilada (10:5:85 v/v/v), con controles periódicos de la consistencia-dureza hasta la descalcificación completa (entre 7 y 10 días). Después se lavaron en agua durante 12 h y se procesaron para su inclusión en parafina de manera automatizada en el laboratorio de morfología de Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) como sigue: deshidratación en una batería de etanoles de gradación creciente (70%: 24 horas; 80%: 1 hora; 90%: 1 hora; 96%: 1 hora; 100%: 1 hora x 3), diafanización en xilol (100%: 30 min x 3) y pase por baños de parafina blanda (30 min a 55° C) y dura (2 horas a 60° C). A continuación, se confeccionaron los bloques y las muestras se cortaron de forma seriada a un grosor de 10 µm con un micrótopo convencional (Microm®). Las secciones obtenidas se pusieron sobre portaobjetos gelatinizados y secadas en estufa a 45° C durante 24h.

Para la realización de las distintas técnicas de estudio, se procedió a la desparafinización (mediante baños en xilol 100%; 20 min x2) y rehidratación (paso por una batería de

alcoholes de gradación decreciente, de 10 min cada uno, hasta agua corriente) de los cortes. A continuación, se seleccionaron algunas secciones para la realización de una tinción rutinaria de hematoxilina y eosina con el fin de verificar la integridad estructural de los tejidos e identificar las estructuras objeto.

4.1.2. Material de ratón

El material de ratones procedía de animales con idéntica base genética de la cepa C57B1/6 y se obtuvo de las secciones histológicas depositadas en el laboratorio del Grupo de Investigación Acreditado SINPOS. Incluyó material de animales de ambos sexos de las siguientes edades: 15, 17 y 18 días prenatales (n = 5 por cada edad), y 7, 17, 21 y 30 días postnatales (n = 3 por cada edad). El material había sido obtenido en aplicación del Acuerdo de transparencia sobre el uso de animales en experimentación científica en España, suscrito por la Universidad de Oviedo. Todos los animales fueron sacrificados por decapitación rápida tras anestesia con hidrato de cloral (350 mg/kg, i.p.) o por transfusión por vía transcardiaca con una solución fría de cloruro de sodio al 0.9% seguida de otra de paraformaldehído frío al 4% en 0.1M PBS, a un pH de 7,4.

Las cabezas de los animales se mantuvieron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. A continuación, se procedió a lavar las piezas en agua corriente durante 24 horas para proceder a su descalcificación e inclusión en parafina (mismo protocolo que el descrito para el material humano). Las piezas se cortaron a un grosor de 10 μ m con un micrótopo convencional (Microm[®]) y se utilizó el mismo proceso de secado y eliminación de la parafina descrito en el apartado anterior.

4.1.3. Línea celular

Los trabajos *in vitro* se realizaron sobre la línea celular humana odontoblast-like hTERT-hOd-1 (Derived from sampling site: Tooth bud; dental papilla; Cellosaurus - Swiss Institute for Bioinformatic) siguiendo las recomendaciones propuestas por Klein et al. (2022). Las células hTERT-hOd-1 se cultivaron en medio esencial α mínimo (α -MEM, Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) que contenía un 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, EUA), 2 mmol l⁻¹ de L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO, EUA). Las condiciones de cultivo fueron estándar (37°C, 21% O₂,

5% CO₂). El cultivo se llevó a cabo en placas elásticas (placas de cultivo Bioflex, Flexcell int.; **Figura 4.1**) a una densidad de 2×10^5 . Además, se cultivaron las mismas células en medio suplementado con 25 ng ml⁻¹ de M-CSF humano recombinante (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA, 216-MC) y 50 ng ml⁻¹ RANKL humano recombinante (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA, 390-TN) para inducir la diferenciación celular.

Tras 24 h en cultivo, las células se expusieron a estiramiento cíclico (15% de elongación, 15 ciclos/min, relación estiramiento:relajación 1:1) durante 24 h. Se utilizaron células no estiradas, cultivadas en las mismas placas, como control (**Figura 4.2**).

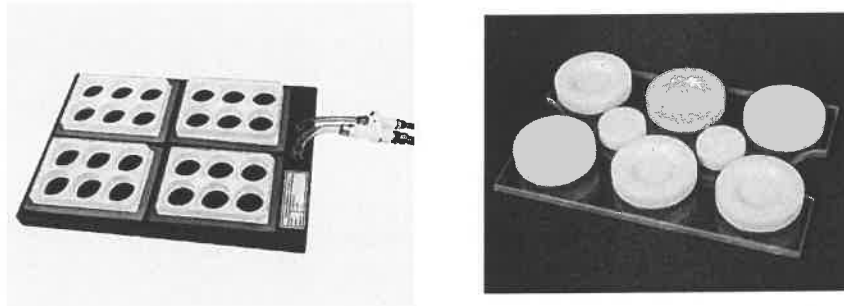


Figura 4.1. Placas de cultivo Bioflex y sistema de vacío utilizados en el trabajo. Tomado de la página web de FexCell International.

Por tanto, los estudios in vitro se realizaron sobre 4 experimentos: células hTERT-hOd-1 crecidas en medio básico; células hTERT-hOd-1 crecidas en medio básico suplementado; células hTERT-hOd-1 hTERT-hOd-1 crecidas en medio básico sometidas a estiramiento; y células hTERT-hOd-1 crecidas en medio básico suplementado y sometidas a estiramiento.

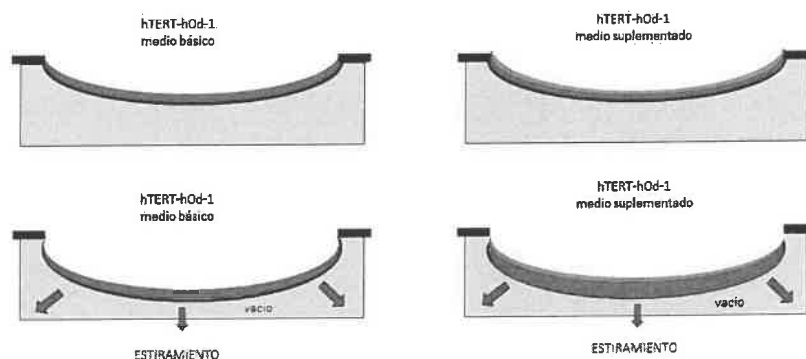


Figura 4.2. Esquema de las placas de Bioflex en las diferentes condiciones experimentales

Posteriormente, las células se recolectaron con TRIzol® (Invitrogen) para el análisis cuantitativo de PCR y RNAseq. Otras placas se lavaron y se recolectaron el en medio adecuado para la realización de los estudios de Western-blot (ver más adelante).

4.2. Técnicas

4.2.1. Estudio estructural

Como control de la estructura de los dientes se seleccionaron aleatoriamente 5 secciones por pieza que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y tricómico de Masson estándar. A continuación, las secciones se lavaron en agua, se deshidrataron en una batería de etanoles de concentración creciente, se diafanizaron en xilol y se montaron con Entellan®. Las preparaciones se fotografiaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nokia DS-5M.

4.2.2. Inmunohistoquímica simple: método PAP

Secciones desparafinadas y rehidratadas, los cortes se sometieron a la acción de una solución de peróxido de hidrogeno de 30 v durante 30 min para inhibir la actividad peroxidasa endógena. A continuación, tras un lavado en Tris buffter (pH de 7,4), se trataron con suero bovino fetal al 15% para bloquear las uniones inespecíficas. Los cortes se incubaron overnight a 4° C en cámara húmeda, con los anticuerpos primarios que se relacionan en las **Tabla 4.1**. En el pie de la tabla se especifican las secuencias de mapeo reconocidas por los anticuerpos utilizados.

Tabla 4.1 – Anticuerpos utilizados en el estudio

Antígeno	Fuente	Dilución	Obtenido de
PIEZO1	Conejo	1:200	Alomone ¹
PIEZO2	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich ²

¹Jerusalem, Israel; ²Saint Louis, MS, USA

PIEZO1: Anticuerpo policlonal desarrollado contra un péptido sintético (C)EDLKPQHRRHISIR, correspondiente a los aminoácidos 1863-1876 del PIEZO1 de rata.

PIEZO2: Anticuerpo policlonal desarrollado contra un péptido sintético del PIEZO2 humano con la secuencia: VFGFWAFGKHSAAADITSSLSAQVPGPFLVMVLIQFGT MVVD RALYLRK

Tras la incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron en Tris-HCl y se incubaron durante 1 h, a temperatura ambiente, con IgG de cabra anti-conejo (Amersham, Buckinghamshire, UK) ligada a peroxidasa, a una dilución de 1:100. Finalmente se lavaron los cortes en búfer Tris-HCl y se visualizó la peroxidasa usando 3,3'-DAB como cromógeno. Finalmente, las secciones se contrastaron con hematoxilina de Harris.

La especificidad de la inmunorreacción se comprobó sustituyendo el anticuerpo primario por un suero específicamente preabsorbido, por un suero de conejo preinmune. En ambos casos no se detectó inmunorreacción específica.

4.2.3. Transcripción reversa de ARN acoplada a PCR (RT-PCR)

4.2.3.1 Extracción del ARN

El RNA se extrajo de los cultivos de células hTERT-hOd-1 usando un kit comercial (Trizol Reagent, invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial. EL RNA se precipito y lavó con etanol frio y después se secó y se disolvió en tampón Tris-EDTA (10mM Tris-HCl pH8.0 y 1mM EDTANa²). A continuación, las muestras se trataron con 1 U de DNase durante 1 hora a 37° C para digerir el DNA genómico. Los RNAs se precipitaron, lavaron y disolvieron de nuevo en el mismo tampón. La concentración de RNA se midió a 260 nm (Biomate 3, Thermo Electron, Corporation, Waltham, MA, USA) y su pureza se valoró por un lector de ratio 269/280 nm. Se uso el kit High capacity cDNA archive (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) para obtener cDNA a partir de 10µg de RNA total a 42° C durante 90 minutos siguiendo las especificaciones del productor.

4.2.3.2 RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR)

La PCR cuantitativa se llevó a cabo usando 1 µg de cDNA. Los primers utilizados aparecen en la **Tabla 4.2**. Las reacciones de PCR se realizaron con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) usando 5 pmol de cada primer y 9 pmol de las sondas de PIEZO1, PIEZO2 y β-actina. Los ensayos se realizaron por triplicado utilizando una 7500 PCR real-time system (Applied Biosystem) y la cuantificación se calculó usando el

algoritmo $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las diferencias estadísticas entre los 4 grupos (células estimuladas y/o estiradas) se analizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) ($p \leq 0.05$)

	10 ciclos			20 ciclos			
1 min 94° C	1 min 94° C	30 seg 65° C	45 seg 72° C	1 min 94° C	30 seg 61° C	45 seg 72° C	5 min 72° C

Tabla 4.2. Primers diseñados según las secuencias consenso de *Homo sapiens* del genBank (números de acceso)

Gen	Forward	Reverse
Piezo1 NM_001142864	5'GATCTATGTGTGCTGGCA3'	5' AACTGGAAGGTGTAGACGGC3'
Piezo2 NM_001378183.1	5'ACCCAGGATGACTACAAACC'	5' TTCCTCCTCTCGCTTTTCTG3'
β -actina NM_001101	5' GAGAAAATCTGGCACACAC3'	5'GGTCTCAAACATGATCTGGG3'

Los productos de PCR se visualizaron por tinción con bromuro de etidio bajo luz UV después de la electroforesis en un 2 % gel de agarosa con marcador Ready Load 1KB plus DNA ladder de ADN (Invitrogen, Carlsband, USA).

4.2.4. Western-blot

Para determinar PIEZO1 y PIEZO2 a nivel proteico se realizó un análisis de Western-blot en homogenizados de la línea celular hTERT-hOd-1, en los cuatro grupos experimentales. Brevemente, las muestras se trituraron de forma mecánica en frio y a continuación se homogenizaron (1: 2, p/v) en una solución salina de Tris-HCl (TBS; 0.1M, pH 7,5) que contenía 1 μ M de leupeptina, pepstatina 10 μ M y 2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonyl. Los homogenizados resultantes se centrifugaron a 25.000 revoluciones, durante 15 m a 4°C, y el sedimento resultante se disolvió en Tris HCl 10 mM, pH 6,8, SDS al 2%, dithiothreitol 100 mM y glicerol al 10%, a una temperatura de 4°C. Los sobrenadantes se analizaron por electroforesis en geles de SDS de poliácridamida discontinuos al 12%. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se bloqueó por inmersión durante 3 h en PBS que contenía un 5% de leche en polvo desnatada y un 0,1% Tween-20. A continuación se incubaron las

membranas a 4°C durante 2 h con los anticuerpos primarios anti PIEZO1 y anti PIEZO2 (ver sección de inmunohistoquímica) a una dilución de 1:500. Además, se utilizó un anticuerpo anti- β -actina (Abcam) como control de la carga de proteínas. Tras la incubación, las membranas se lavaron con una solución Tris-salina (pH 7.6) que contenía Tween-20 al 20%, y se incubaron de nuevo durante 1 h con IgG de cabra anti-conejo (diluido 1/100) a temperatura ambiente. Después, las membranas se lavaron de nuevo y se incubaron con el complejo PAP, diluido 100, durante 1 h a temperatura ambiente. Por último, se desarrolló y visualizó la reacción con un kit de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) y la exposición a Hyperfilm. Las proteínas se visualizaron por tinción con Brilliant Blue. La cuantificación se realizó mediante densitometría utilizando el software Image J (National Institutes of Health).

5. Resultados

5. Resultados

5.1. Estudio inmunohistoquímico sobre dientes humanos y de ratón

5.1.1. Dientes humanos

La distribución de las mecanoproteínas PIEZO1 y PIEZO2 se analizó mediante técnicas de inmunohistoquímica en secciones de dientes adultos embebidos en parafina y descalcificados. El procesamiento de las piezas fue idéntico y siguiendo protocolos bien establecidos, pero es posible que la intensidad de la inmunotinción pueda verse alterada por los componentes utilizados en los procesos de descalcificación. No hubo diferencias en la distribución de la inmunorreacción entre los caninos y los molares.

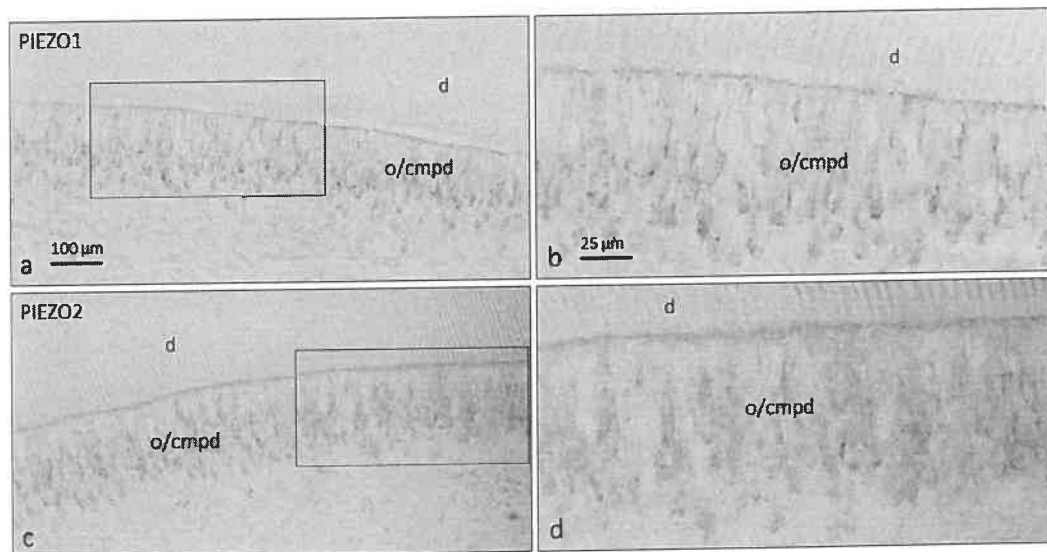


Figura 5.1. Detección inmunohistoquímica de PIEZO1 (a,b) y PIEZO2 (c,d) en secciones de un molar humano. d: dentina; o/cmpd: odontoblastos células madre de la pulpa dentaria.

La inmunorreacción para PIEZO1 se detectó en una subpoblación de células pulpares cerca de la unión dentina-pulpa, dentro de la capa de los odontoblastos. Sin embargo, las células no tenían la morfología típica de los odontoblastos, y aunque se observaron procesos inmunorreactivos en alguno de ellos, en ningún caso se detectó inmunorreactividad para PIEZO1 dentro de los conductos dentinarios (**Figuras 5.1 y 5.2**). También se encontraron células PIEZO2 positivas en la capa de los odontoblastos. Su morfología y densidad fue semejante a las de las células positivas para PIEZO1, y nunca

en células con morfología de odontoblastos maduros; tampoco se detectó la presencia de PIEZO2 en los túbulos dentinarios (**Figuras 5.1 y 5.2**).

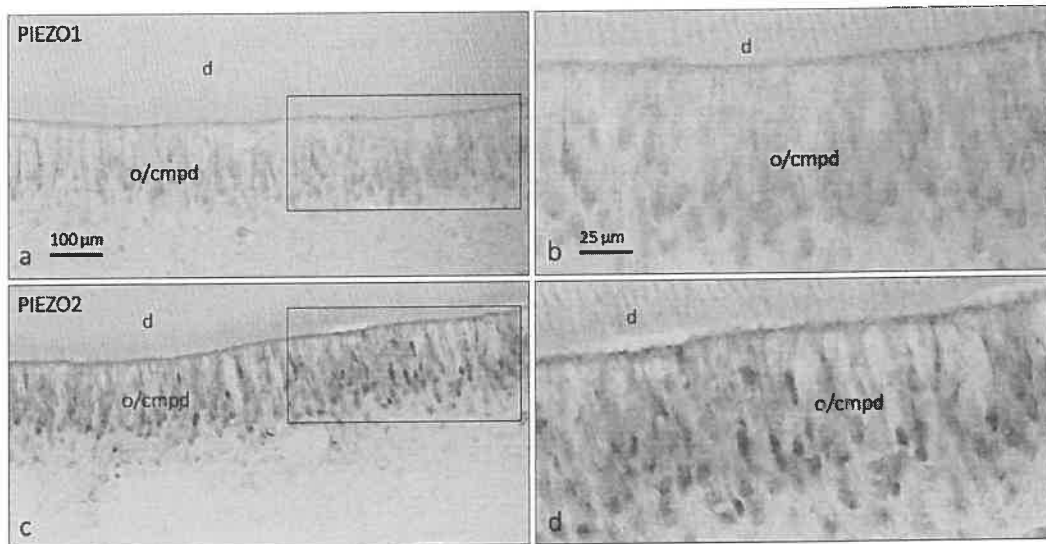


Figura 5.2. Detección inmunohistoquímica de PIEZO1 (a,b) y PIEZO2 (c,d) en secciones de un canino humano. d: dentina; o/cmpd: odontoblastos células madre de la pulpa dentaria.

En la parte central de la pulpa dentaria, con mucha heterogeneidad de unos dientes a otros, e incluso en secciones distintas del mismo diente, se encontró inmunorreacción para PIEZO1 y PIEZO2 en grupos de fibroblastos y en las paredes de los vasos sanguíneos (**Figura 5.3**).

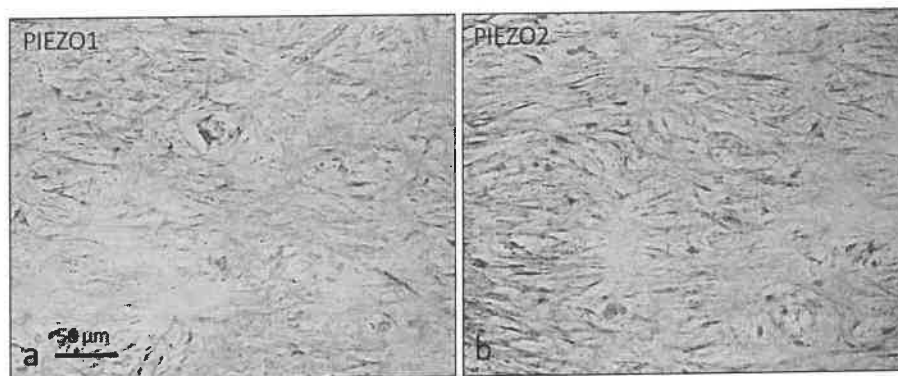


Figura 5.3. Detección inmunohistoquímica de PIEZO1 (a,b) y PIEZO2 (c,d) en secciones de un canino humano.

5.1.2. Dientes de ratón

Los dientes de ratón se estudiaron a diferentes edades del desarrollo. Además, se analizaron por separado en los molares y en los incisivos ya que ambos tipos de dientes

tienen un patrón de crecimiento diferente. Por otro lado, en todos los casos se compararon los perfiles de expresión de las proteínas PIEZO1 y PIEZO2 con los de la vimentina, utilizada como marcador específico de los odontoblastos.

En los embriones de 15 días (E15) la inmunorreacción para PIEZO1 se localizó en islotes de células que se corresponden con los primeros odontoblastos y ameloblastos. Una localización similar se detectó para PIEZO2, aunque la intensidad de la inmunorreacción fue menor. La comparación de las imágenes de cortes seriados sugiere que ambas proteínas se localizan en algunas células. En ningún caso se detectaron las mecanoproteínas en los fibroblastos de la pulpa (**Figura 5.4**). La inmunorreacción para la vimentina a esta edad fue negativa (datos no mostrados).

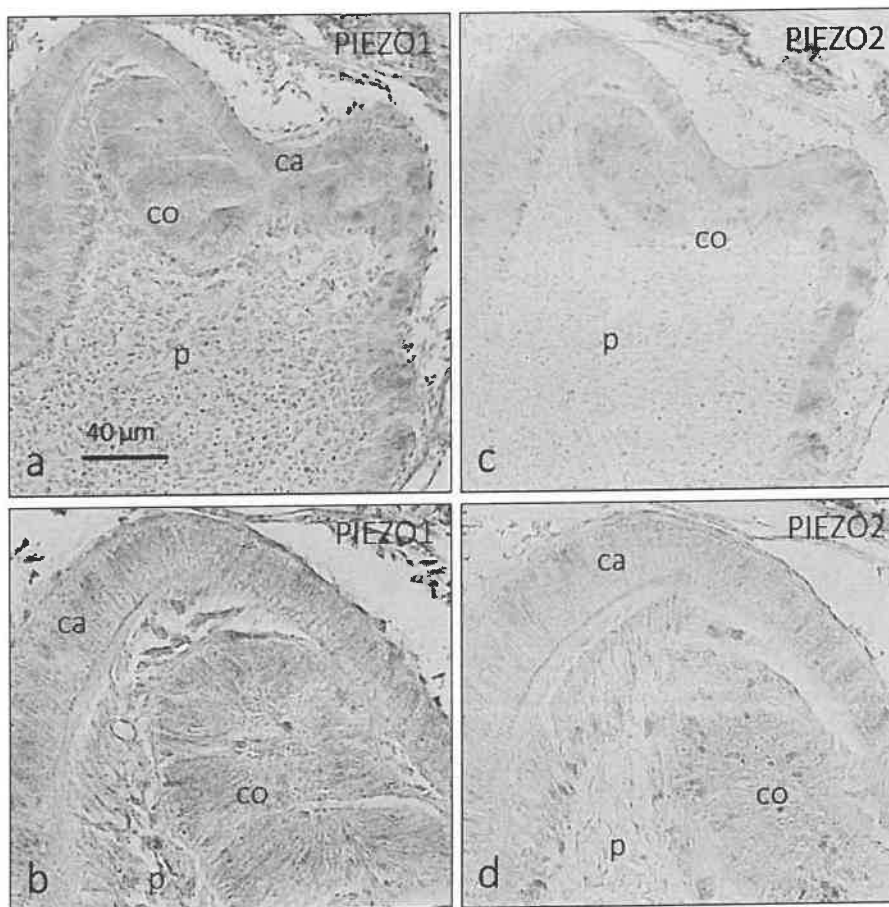


Figura 5.4. Detección inmunohistoquímica de PIEZO1 (a,b) y PIEZO2 (c,d) en secciones de un molar de ratón de 15 días de desarrollo embrionario. ca: capa de ameloblastos; co: capa de odontoblastos; p: pulpa.

A los 17 días del desarrollo embrionario (E17) comienzan a mostrar inmunorreacción para la vimentina algunas células de la capa de los odontoblastos, lo que sugiere que esta estirpe celular comienza a diferenciarse. Son células poco diferenciadas y que aun no muestran su morfología típica. Al igual que en el grupo de E15, tanto PIEZO1 como PIEZO2 se localizan en los odontoblastos y en los ameloblastos, especialmente en los segundos. La co-localización de ambas proteínas fue evidente en algunos grupos celulares (**Figura 5.5**). Ocasionalmente se detectaron grupos de células PIEZO1 positivas en los fibroblastos de la parte central de la pulpa (datos no mostrados).

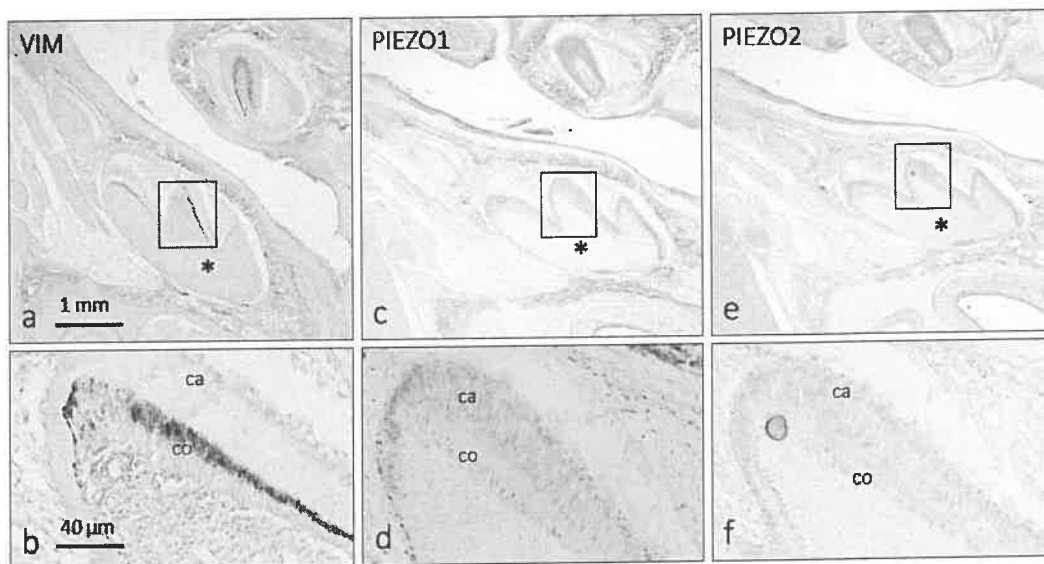


Figura 5.5. Detección inmunohistoquímica de vimentina (a,b), PIEZO1 (c,d) y PIEZO2 (e,f) en secciones de un molar (asterisco) de ratón de 17 días de desarrollo embrionario. ca: capa de ameloblastos; co: capa de odontoblastos.

Un día después (E18), aumenta notablemente la intensidad de la inmunorreacción para PIEZO2 mientras que la de PIEZO1 parece estable. En ambos casos, la inmunorreacción esta polarizada al polo basal de los ameloblastos y los odontoblastos (**Figura 5.6**).

En resumen, durante el periodo final de la embriogénesis (E15 a E18) PIEZO1 y PIEZO2 se localizan, y aparentemente co-localizan, en los odontoblastos y ameloblastos.

En la primera semana postnatal (P7) los odontoblastos expresan vimentina de manera uniforme y muestran una morfología semejante a la de las células maduras. Los procesos de los odontoblastos fueron evidentes y situados en el espesor de la capa de dentina.

También se detectó vimentina en los fibroblastos de la región central de la pulpa (Figuras 5.7a y b).

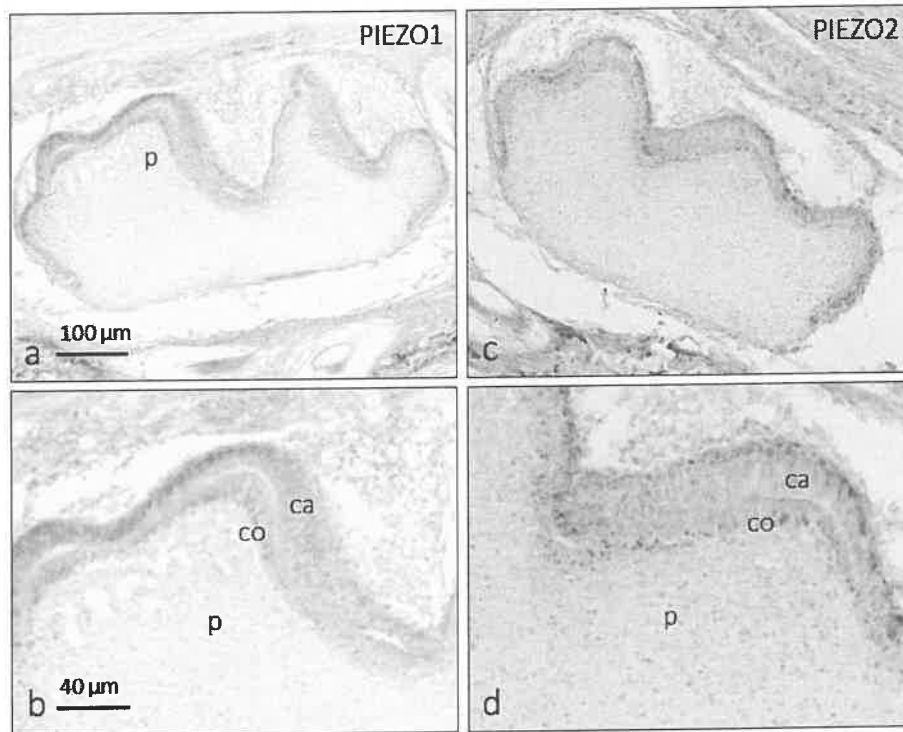


Figura 5.6. Detección inmunohistoquímica PIEZO1 (a,c) y PIEZO2 (b,d) en secciones de un molar de ratón de 18 días de desarrollo embrionario. ca: capa de ameloblastos; co: capa de odontoblastos; p: pulpa.

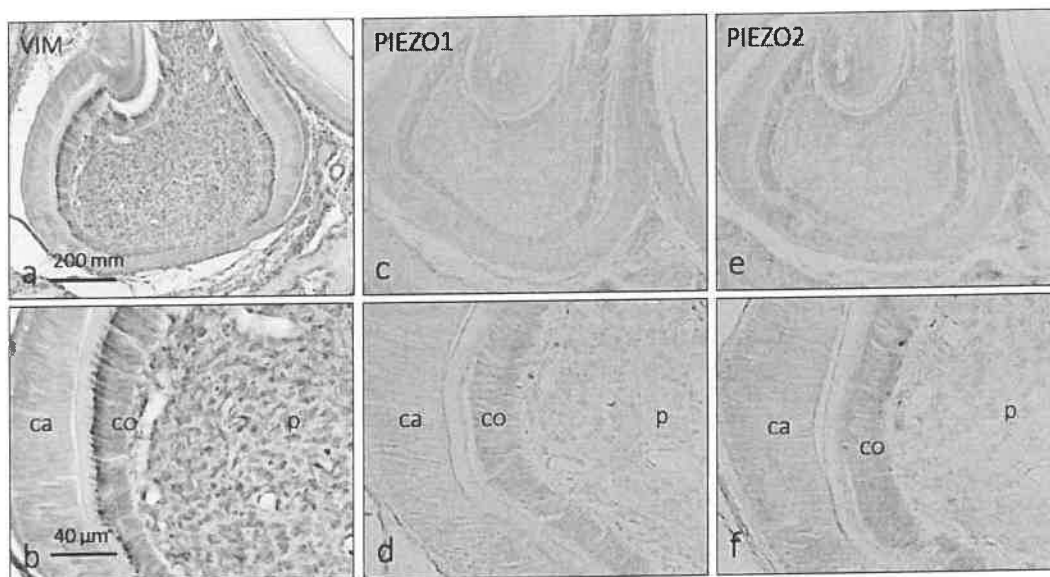


Figura 5.7. Detección inmunohistoquímica vimentina (a,d), PIEZO1 (b,e) y PIEZO2 (c,f) en secciones de un molar de ratón de 7 días postnatales. ca: capa de ameloblastos; co: capa de odontoblastos; p: pulpa.

A esta edad la inmunorreacción en los ameloblastos es casi inexistente y solo se mantiene a niveles residuales PIEZO2. Por el contrario, la expresión de PIEZO1 y PIEZO2 se mantiene en los odontoblastos, predominando la expresión de PIEZO2 (Figuras 5.7c-f).

La expresión descrita para P7 se mantiene a los dos semanas postnatales (P17) a nivel de los molares. Sin embargo, en los incisivos la inmunorreacción para PIEZO1 y PIEZO2 se mantiene en los ameloblastos y odontoblastos (Figura 5.8).

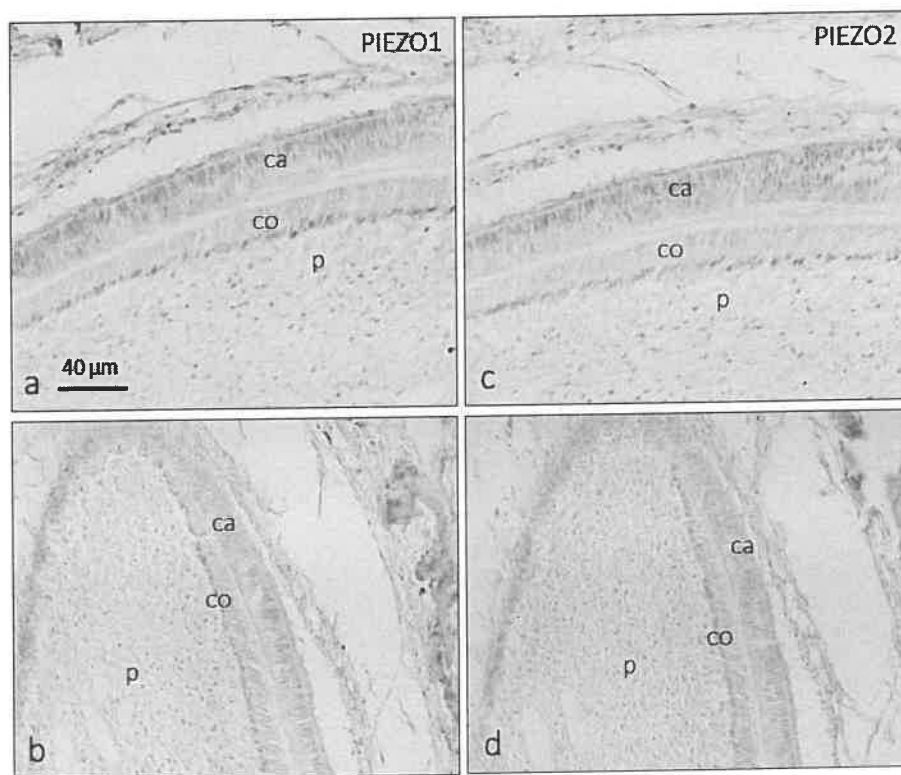


Figura 5.8. Detección inmunohistoquímica de vimentina PIEZO1 (a,b) y PIEZO2 (c,d) en secciones de un molar de ratón de 17 días postnatales. ca: capa de ameloblastos; co: capa de odontoblastos; p: pulpa.

En los animales de 3 semanas de vida, los odontoblastos tienen la morfología y el perfil inmunohistoquímico propios de los odontoblastos maduros tanto en los molares como en los incisivos (Figuras 5.9a-b y 5.10a-b). A esta edad, la inmunorreacción para PIEZO1 y PIEZO2 se localiza exclusivamente en los somas de los odontoblastos siendo más intensa para PIEZO2 (Figuras 5.9c-d y 5.10c-d). Algunos grupos de fibroblastos de la pulpa fueron PIEZO2 positivos.

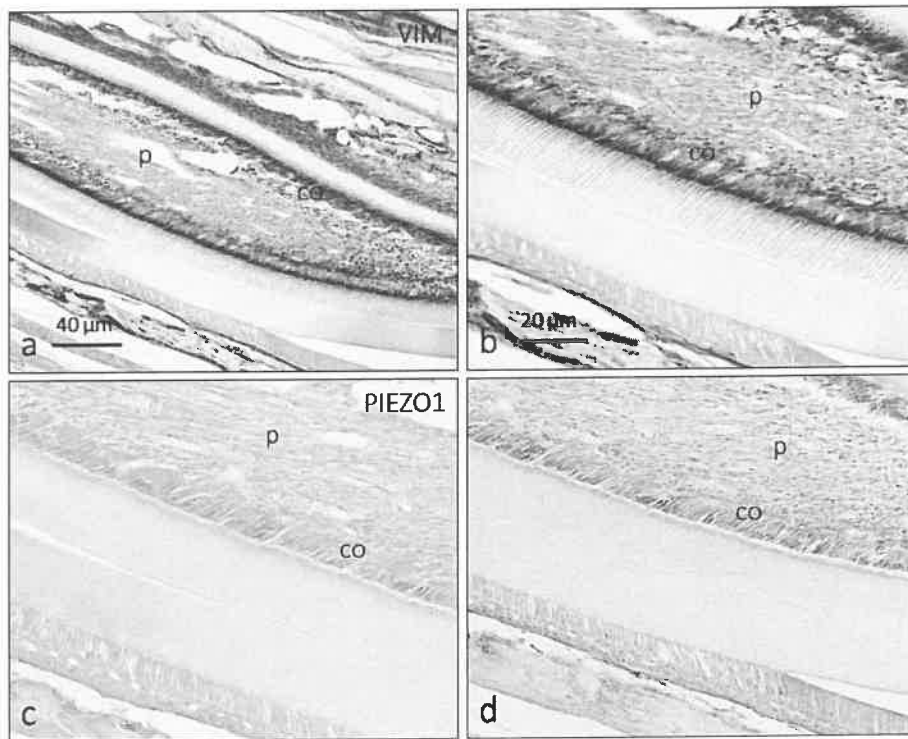


Figura 5.9. Detección inmunohistoquímica de vimentina (a,b) y PIEZO1 (c,d) en secciones de incisivo de ratón de 21 días postnatales. ca: capa de ameloblastos; co: capa de odontoblastos, p: pulpa.

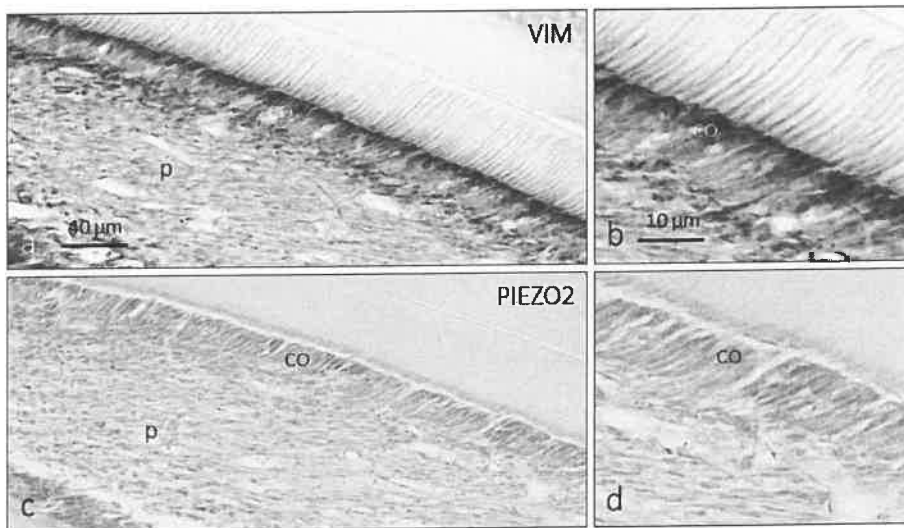


Figura 5.10. Detección inmunohistoquímica de vimentina (a,b) y PIEZO2 (c,d) en secciones de incisivo de ratón de 21 días postnatales. ca: capa de ameloblastos; co: capa de odontoblastos, p: pulpa.

En cuanto a los molares, se ha detectado inmunorreacción para PIEZO1 y PIEZO2 en la totalidad de los odontoblastos. La inmunorreacción se localizó en la somas y solo

ocasionalmente en los procesos. Por otro lado, la comparación de cortes seriados muestra que ambas mecanoproteínas se co-localizan en las mismas células (**Figura 5.11**).

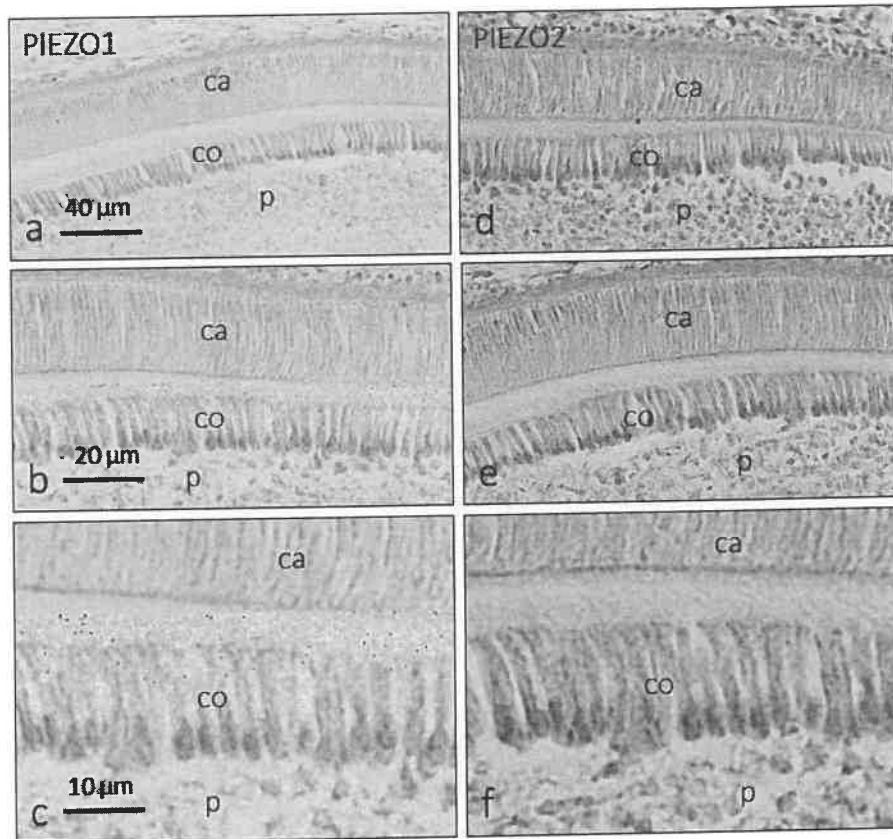


Figura 5.11. Detección inmunohistoquímica de PIEZO1 (a-c) y PIEZO2 (d-f) en secciones de molar de ratón de 21 días postnatales. ca: capa de ameloblastos; co: capa de odontoblastos, p: pulpa.

A modo de resumen, de forma semicuantitativa pueden resumirse los hallazgos en los ratones en las **Tablas 5.1** y **5.2**.

Tabla 5.1. Expresión de PIEZO1 en los ameloblastos y odontoblastos

	E7	E15	E17	E18	P7	P15	P17	P21
Ameloblastos								
Odontoblastos								

NR	+	++	+++
----	---	----	-----

Tabla 5.2. Expresión de PIEZO2 en los ameloblastos y odontoblastos

	E7	E15	E17	E18	P7	P15	P17	P21
Ameloblastos								
Odontoblastos								

NR	+	++	+++
----	---	----	-----

En los animales de 21 días postnatales también se detectó PIEZO1 y PIEZO2 en los fibroblastos del ligamento periodontal (**Figura 5.12**).

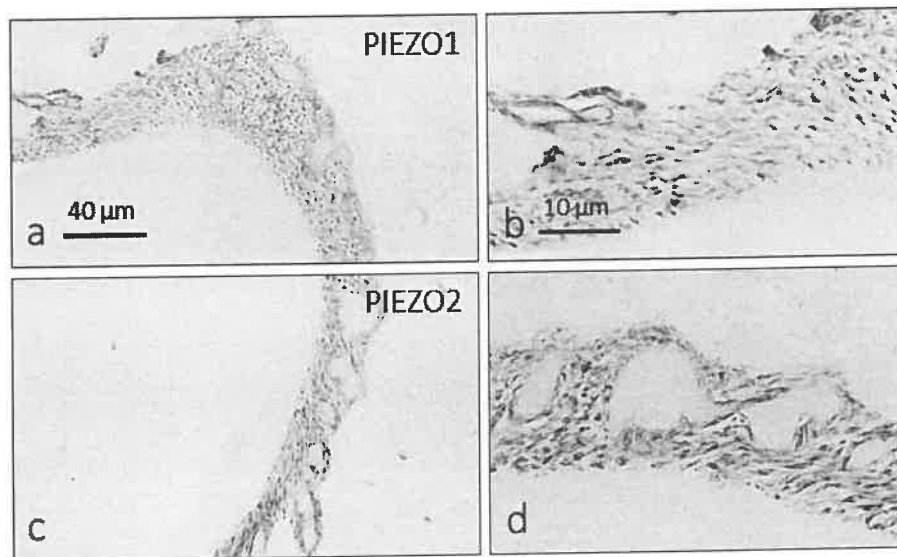


Figura 5.12. Detección inmunohistoquímica de PIEZO1 (a,b) y PIEZO2 (c,d) en secciones de incisivo de ratón de 30 días postnatales.

5.2. Estudios *in vitro* sobre la línea celular odontoblasto-like línea celular hTERT-hOd-1

5.2.1. qPCR

Los resultados del estudio de qRT-PCR han puesto de evidencia que en la línea celular humana odontoblasto-like hTERT-hOd-1 expresa *PIEZO1* y *PIEZO2* de manera constitutiva. Tomando como referencias los valores de las células cultivadas en medio basal, en el resto de los experimentos realizados se ha encontrado expresión a la alta (*up regulated*) de ambos genes, especialmente de *PIEZO2* (**Tabla 5.3**).

Tabla 5.3. Resultados del estudio de qRT-PCR en la línea celular humana odontoblasto-like hTERT-hOd-1. Las variaciones en la expresión de ambos genes se expresan en unidades relativas respecto a los valores de las células cultivadas en el medio basal.

hTERT-hOd-1	PIEZO 1	PIEZO2
Medio básico	1	1
Medio suplementado	2,5-4 ^a	3,1-4 ^a
Medio básico + estiramiento	55-60 ^b	80-100 ^b
Medio suplementado + estiramiento	60-65 ^{c,d}	90-100 ^{c,d}

a: $p < 0.05$ medio básico vs. medio suplementado; b: $p < 0.001$ medio básico vs. medio básico más estiramiento; c: $p < 0.01$ medio suplementado vs. medio suplementado más estiramiento; d: $p > 0.5$ medio básico más estiramiento vs. medio suplementado más estiramiento.

La suplementación del medio básico con factores facilitadores del crecimiento y relacionados con el proceso de mineralización produjo una elevación a la alta de las expresión de *Piezo1* (entre 2,5 y 4 veces) y de *Piezo 2* (entre 3,1 y 4 veces) que, aunque significa ($p < 0.05$) no significa una alta activación biológica (Tabla 5.3). Sin embargo, las células mantenidos en medio básico que fueron sometidas a ciclos de estiramiento, elevan la expresión de *Piezo2* entre 80 y 100 veces más ($p < 0.001$) y la de *Piezo1* entre 55 y 60 veces más ($p < 0.001$). Ello pone en evidencia que la expresión de los genes que codifican para ambas mecanoproteínas se regula por las fuerzas mucho más que por factores de diferenciación. Esta observación se confirmó al estudiar la expresión de los dos genes en condiciones de suplementación y estiramiento. Los resultados fueron estadísticamente significativos a la alta en comparación con las células crecidas solo en medio suplementado (60-65 veces para *Piezo1*, $p < 0.001$; 90-100 veces para *Piezo2*, $p < 0.001$), mientras que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.5$) entre las células sometida a estiramiento, suplementadas y no suplementadas. Estos hallazgos demuestran que las células hTERT-hOd-1 regulan la expresión de los genes de las mecanoproteínas *Piezo* y *Piezo2* sobre todo por la acción de las fuerzas.

5.2.2. Western-blot

El paso siguiente fue investigar si PIEZO1 y PIEZO2 también se expresan a nivel proteico en la línea celular humana odontoblasto-like hTERT-hOd-1 y si la expresión varía en función de las condiciones experimentales creadas. Mediante Western-blot en muestras de homogenizados celulares crecidos en medio básico, los anticuerpos utilizados ponen

en evidencia una banda proteica única con pesos moleculares de 310-315 kDa para PIEZO1, y de 78-80 kDa para PIEZO2; los pesos moleculares detectados se ajustan a los rangos de los proporcionados por las casas comerciales de los anticuerpos y están basados en la longitud de las cadenas de aminoácidos que detectan (**Figura 5.13**). En el caso de las otras situaciones experimentales creadas, la situación más llamativa es el notable incremento de la banda correspondiente a PIEZO1 y PIEZO2 tras el estiramiento, así como la presencia de bandas adicionales de mayor y menor peso molecular. Las primeras pueden corresponder a formas modificadas (especialmente carboxiladas) de las proteínas mientras que las de menor peso molecular posiblemente están en relación con formas parcialmente degradadas de las mismas.

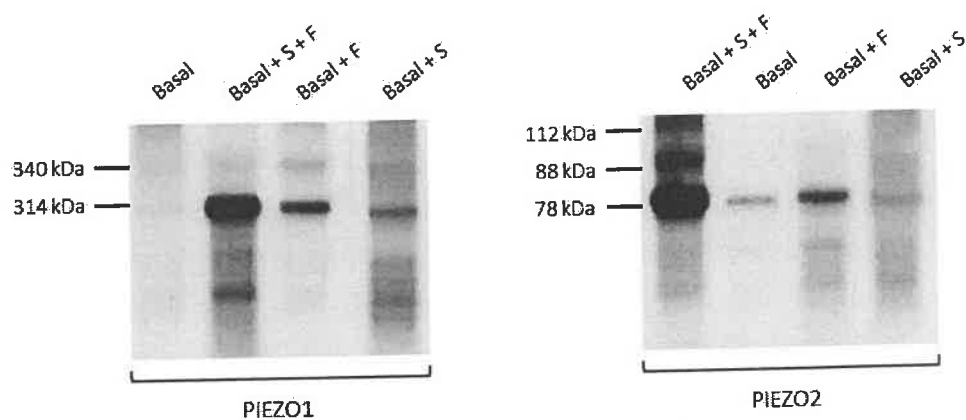


Figura 5.13. Western-blot para PIEZO1 y PIEZO2 en homogenizados de la línea celular hTERT-hOd-1 en las diferentes condiciones experimentales creadas.

Por tanto, los resultados del Western-blot demuestran que las fuerzas son capaces no solo de aumentar la expresión de los genes que codifican para las mecanoproteínas PIEZO1 y PIEZO2, sino que además favorecen la traducción proteica de los mismos.

6. Discusión

6. Discusión

6.1. Consideraciones generales

El presente trabajo de investigación se diseñó para estudiar si las células de la pulpa dentaria expresan las mecanoproteínas PIEZO1 y PIEZO2 y, por tanto, son capaces de transducir a efectos biológicos los estímulos mecánicos a los que se encuentran sometidas. Además, se incluyó en el estudio el ligamento periodontal.

Numerosos estudios han analizado los efectos de las fuerzas sobre los diferentes tejidos y tipos celulares de los dientes, incluida la pulpa dental. La mayoría de esos estudios se han realizado *in vitro*, utilizando líneas celulares muy heterogéneas y de diferentes orígenes. Ello ha hecho que los resultados no sean comparables y, consecuentemente, no se haya avanzado en este campo. Las diversas fuerzas mecánicas que actúan sobre los dientes, especialmente durante la masticación, se transmiten a la pulpa y pueden modular la proliferación celular, así como la diferenciación odontoblástica (Cai et al., 2011; Hata et al., 2012; Tatullo et al., 2016; Miyashita et al., 2017; Yang et al., 2018; Marrelli et al., 2018; He et al., 2021). Igualmente se conoce que las fuerzas pueden modular el proceso de mineralización de los tejidos duros del diente controlando su mineralización (ver Dzamukova et al., 2022) así como la osificación del ligamento periodontal (Manokawinchoke et al., 2023).

En la base de los efectos biológicos de las células se encuentran canales iónicos capaces de “sensar” los diferentes tipos de fuerza (presión, estiramiento, etc ...) y de todos los conocidos en la actualidad con potencialidad mecanosensora (algunos canales ASIC y TRP, los canales de doble poro de potasio, etc) solo los pertenecientes a la familia Piezo pueden ser considerados mecanosensores y mecanotransductores (Delmas y Coste, 2013; Bagriantsev et al., 2014; Ranade et al., 2015; Douguet y Honoré, 2019; Jin et al., 2020), y participan directamente en la mecanotransducción. Estudios previos han demostrado que diferentes poblaciones celulares de la pulpa dental expresan posibles mecanoproteínas como γ -ENa+C, ASIC2 o TRPV4 (Magloire et al., 2009; Solé-Magdalena

et al., 2011, 2018), y basándose en su expresión se ha considerado que las células de la pulpa dentaria, especialmente los odontoblastos, son células mecanosensibles.

La discusión de los resultados que se realiza en las páginas que siguen se centran, de manera exclusiva, y para evitar caer en la especulación, en los datos existentes sobre las mecanoproteínas PIEZO1 y PIEZO2 en humanos, modelos experimentales y líneas celulares.

6.2. Discusión de los resultados

6.2.1. Distribución de la inmunorreacción para PIEZO1 y PIEZO2 en humanos y ratones

La presencia de PIEZO1 y PIEZO2 en dientes humanos adultos se investigó mediante inmunohistoquímica. Con carácter general no se encontraron diferencias en la localización de estas entre los diferentes tipos de dientes.

Hasta donde sabemos, esta Tesis Doctoral, junto con el trabajo pionero de Solé-Magdalena (2020; *Bases moleculares de la sensibilidad de la dentina*, Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo), es el primero en analizar la presencia de PIEZO1 y PIEZO2 en dientes humanos. Tanto Solé-Magdalena como nosotros hemos encontrado inmunorreacción positiva para PIEZO1 y PIEZO2 solo en células situadas en la capa de los odontoblastos, pero que no son odontoblastos maduros ya que no expresan la proteína vimentina, filamento intermedio típico del citoesqueleto de estas células.

Como ya se ha expuesto en capítulos anteriores, la capa de odontoblastos de la pulpa dentaria está compuesta por odontoblastos y células madre de la pulpa dental (DPSC) (Fox y Heeley, 1980; D'Aquino et al., 2008; Lizier et al., 2012; França et al., 2019) y es en esta capa de la pulpa en la que hemos encontrado las células positivas para PIEZO1 y PIEZO2. Por lo tanto, basándonos en criterios topográficos, morfológicos e inmunohistoquímicos puede afirmarse que las células PIEZO1 y PIEZO2 positivas de los dientes humanos adultos no son odontoblastos maduros y, seguramente, son pre-odontoblastos/DPSC.

Los DPSC son células mecanosensibles y pueden reconocer cambios mecánicos y transformar esta información en respuestas celulares (Gao et al., 2017). Si estas células expresan realmente PIEZO1 y PIEZO2, las fuerzas podrían ejercer sus efectos biológicos sobre las DPSC a través de ellas (Du et al., 2022). Los estímulos mecánicos pueden aumentar significativamente la proliferación de DPSC *in vitro* (Hata et al., 2012; Yang et al., 2018). En contraste, Yu et al. (2009) informaron que las fuerzas mecánicas pudieron reducir la supervivencia y adhesión de DPSC. Además, Miyazaki et al. (2019) observaron que PIEZO1 funciona como un mecanotransductor durante la diferenciación de los odontoblastos conectando las señales de presión a la señalización intracelular; no existen datos para PIEZO2 en pre-odontoblastos/DPSC.

Si las células positivas PIEZO1 y PIEZO2 que hemos identificado en la pulpa dental humana son DPSCs, se puede plantear la hipótesis de que las fuerzas que actúan PIEZO1 y / o PIEZO2 también participan en la diferenciación de DPSC / pre-odontoblastos a odontoblastos.

Con respecto al ligamento periodontal (PDL), es una capa delgada de tejido conectivo fibroso entre el hueso alveolar y el cemento, y las células PDL son mecanosensibles y desempeñan un papel fundamental en la homeostasis del tejido periodontal (De Jong et al., 2017; Lin et al., 2021). Expresan PIEZO1 diferencialmente ajustable por presión (Jin et al., 2015; Shen et al., 2020) y PIEZO2 (Gao et al., 2017). La presencia de PIEZO1 y PIEZO2 en esta formación la hace susceptible de manejo farmacológico en el curso de los tratamientos de ortodoncia que requieren su manipulación por distintos tipos de fuerzas.

En cuanto a los resultados en los dientes de ratón, y hasta donde nosotros conocemos, nuestro estudio es el primero que ha estudiado la expresión de las proteínas PIEZO1 y PIEZO2 en diferentes fases del desarrollo dentario, y también el que ha demostrado por primera vez la presencia de ambas mecanoproteínas en la capa de los ameloblastos, especialmente durante las etapas tempranas de la formación de los dientes, lo que sugiere que PIEZO1 y PIEZO2 podrían estar implicados en la formación del esmalte.

Por otro lado, en lo que se refiere a la presencia de estas mecanoproteínas en los odontoblastos, nuestros resultados están en sintonía con los trabajos que han reportado la presencia de PIEZO1 (Mousawi et al., 2020; Ohyama et al., 2022; Sun et al., 2022), y PIEZO2 en odontoblastos de ratón (Khatibi Shahidi et al., 2015), así como en el ligamento periodontal (Jin et al., 2015; Gao et al., 2017; Jiang et al., 2021).

En el proceso de maduración de los odontoblastos de ratón se ha observado la adquisición paulatina de vimentina. Esto hecho hay que ponerlo en relación con el hecho, bien conocido, de que la morfología de los odontoblastos, así como su proteoma, varían considerablemente durante el proceso de diferenciación y maduración celular (Simon et al., 2009; Byers y Westenbroek, 2011; Couve et al., 2013).

Nuestro estudio ha puesto de evidencia lo importante de ser prudente a la hora de comparar los resultados cuando se obtienen en diferentes modelos. En los dientes humanos los odontoblastos son las únicas células positivas para PIEZO1 y PIEZO2 mientras que en el ratón también lo son los ameloblastos; no obstante, la tendencia durante la formación de los dientes es la restricción de la expresión de PIEZO1 y PIEZO2 en los odontoblastos. Creemos que las discrepancias en los resultados pueden deberse a las diferentes especies estudiadas, que muchos de los resultados se obtuvieron de líneas celulares y a las técnicas utilizadas. Pero las variedades celulares en la pulpa dentaria, es mucho mayor que la expuesta en el párrafo anterior. Recientemente, Krivanek et al. (2020) investigaron la composición celular de los dientes de ratón y humanos en crecimiento y no crecimiento. Observaron que entre el ratón y el hombre hay paralelismos y diferencias en la heterogeneidad tisular, y aunque en términos generales son parecidos existen diferencias moleculares y subtipos celulares específicos de cada especie. Estos hechos son esenciales a la hora de interpretar los resultados que se obtengan en ratón y en humanos.

Finalmente hay que comentar que no hemos encontrado imágenes que sugieran la presencia de PIEZO1 o PIEZO2 en las fibras nerviosas de la pulpa a pesar de que están presentes en subpoblaciones neuronales del ganglio trigémino y fibras nerviosas de la pulpa dental (Won et al., 2017; Sato et al., 2018; Cho et al., 2022; Han et al., 2022).

PIEZO 1 y PIEZO2 están presentes en los dientes, pero en la actualidad sus funciones son poco conocidas y aún no se han establecido definitivamente (Lin et al., 2022; Pei et al., 2021). Nuestros hallazgos sugieren que los dientes humanos pueden estar involucrados en la diferenciación de CPD / pre-odontoblastos a odontoblastos, pero se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

6.2.2. Resultados de los experimentos in vitro sobre la línea celular hTERT-hOd-1

Mediante la aplicación de un modelo de estiramiento se ha valorado el efecto de las fuerzas sobre la expresión a nivel génico y de proteína de Piezo1 y Piezo 2 en una línea celular odontoblasto-like. Esta línea celular, en función de las condiciones en las que se encuentre o se condicione puede diferenciarse a odontoblasto y cumplir todos los procesos fisiológicos de estas células. La suplementación que se realizó en estos casos, especialmente con la adición de RANK fue con intención de estimular la fase secretora de preentina (ver Liu et al., 2016). Sin embargo, estos factores tienen poco efecto en la expresión de la PIEZO1 y PIEZO2 por los pre-odontoblastos. Por el contrario, la fuerza regula muy a la alta su expresión. Existe abundante literatura sobre el efecto de la fuerza en diferentes funciones celulares, pero este trabajo es el primero que demuestra que *in vitro* el estiramiento puede modificar la expresión de mecanoproteínas.

6.3. Limitaciones del trabajo y futuros estudios

Aunque se han cumplidos los objetivos específicos propuestos para el presente trabajo, aún quedan aspectos por aclarar relativos a la mecanobiología de los dientes. El primero sería analizar la expresión de mecanoproteínas, en particular PIEZO1 y PIEZO2 en los dientes humanos deciduales, así como en dientes adultos que nunca se hayan cargado (cordales incluidos).

El segundo, estudiar si los efectos sobre la expresión de PIEZO1 y PIEZO2 por las células de la pulpa dentaria, depende del tipo de fuerza que se aplique sobre el diente; nosotros hemos analizados exclusivamente el estiramiento, pero es posible que la presión o la torsión tengan efectos diferentes.

Y, por último, sería importante estudiar en detalle los efectos que las fuerzas pueden tener sobre PIEZO1 y PIEZO2 como mediadores de la formación del esmalte, ya que durante el desarrollo embrionario de los dientes, al menos en ratón, ambas proteínas se expresan en los ameloblastos.

En la actualidad ya existen moléculas capaces de modular farmacológicamente PIEZO1 y PIEZO2 (Xiao, 2020) por lo que profundizar en el conocimiento de su distribución y fisiología en los dientes puede conllevar nuevas estrategias terapéuticas en odontología.

7. Conclusiones

7. Conclusiones

Después del análisis detallado de los resultados y de la oportuna discusión de los mismos, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- Los dientes humanos adultos, con independencia del tipo de dientes, muestran inmunorreacción para PIEZO1 y PIEZO2 en una subpoblación celular de la capa de los odontoblastos que, por su localización, morfología y perfil inmunohistoquímico, se han identificado como células troncales de la pulpa dentaria.
- 2.- No se detectado con regularidad expresión de PIEZO1 y PIEZO2 en los fibroblastos de la pulpa dentaria. En base a la expresión de esas mecanoproteínas solo pequeños grupos de fibroblastos pulpares pueden considerarse como mecanosensibles.
- 3.- En los dientes de ratón en desarrollo tanto los odontoblastos como los ameloblastos son inmunorreactivos para PIEZO y PIEZO2, mientras que en el periodo postnatal ambas mecanoproteínas se expresan, casi exclusivamente, en los odontoblastos.
- 4.- Los fibroblastos del ligamento periodontal humano y de ratón son positivos para PIEZO1 y PIEZO2.
- 5.- La línea celular odontoblasto-like hTERT-hOd-1 expresa constitutivamente *Piezo1* y *Piezo2* y ambos son regulados a la alta, cuando se somete a condiciones de estiramiento. La sobreexpresión inducida por la fuerza también se evidencio en la traducción a nivel proteico.

8. Bibliografía

8. Bibliografía

- Abboud FM, Benson CJ. ASICs and cardiovascular homeostasis. *Neuropharmacology*. 2015; 94:87-98.
- Alcaino C, Farrugia G, Beyder A. Mechanosensitive Piezo Channels in the Gastrointestinal Tract. *Curr Top Membr*. 2017;79:219-44.
- Allard B, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Characterization and gene expression of high conductance calcium-activated potassium channels displaying mechanosensitivity in human odontoblasts. *J Biol Chem*. 2000; 275: 25556-61.
- Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem*. 2006; 281: 29002-10.
- Aminoshariae A, Kulild JC. Current Concepts of Dentinal Hypersensitivity. *J Endod*. 2021; 47: 1696-702.
- Arana-Chavez VE, Massa LF Odontoblasts: the cells forming and maintain-ing dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004; 36: 1367-73.
- Arnadottir J, Chalfie M. Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys*. 2010; 39: 111-37.
- Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem*. 2014; 289:31673-81.
- Bakri MM, Yahya F, Munawar KMM, Kitagawa J, Hossain MZ. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression on the nerve fibers of human dental pulp is upregulated under inflammatory condition. *Arch Oral Biol*. 2018; 89: 94-8.
- Baron A, Lingueglia E. Pharmacology of acid-sensing ion channels - Physiological and therapeutical perspectives. *Neuropharmacology* 2015; 94:19-35.
- Belmonte C, Viana F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 2008; 4, 14.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 2004; 41: 849-57.
- Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*. 2014; 325:65-71.
- Burke SD, Jordan J, Harrison DG, Karumanchi SA. Solving Baroreceptor Mystery: Role of PIEZO Ion Channels. *J Am Soc Nephrol*. 2019; 30:911-3.

- Byers MR, Westenbroek RE. Odontoblasts in developing, mature and ageing rat teeth have multiple phenotypes that variably express all nine voltage-gated sodium channels. *Arch Oral Biol.* 2011; 56: 1199-220.
- Cabo R, Alonso P, Viña E, Vázquez G, Gago A, Feito J, Pérez-Moltó FJ, García-Suárez O, Vega JA. ASIC2 is present in human mechanosensory neurons of the dorsal root ganglia and in mechanoreceptors of the glabrous skin. *Histochem. Cell Biol.* 2015;143:267-76.
- Cai X, Zhang Y, Yang X, Grottkau BE, Lin Y. Uniaxial cyclic tensile stretch inhibits osteogenic and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5: 347-53.
- Cheng YR, Jiang BY, Chen CC. Acid-sensing ion channels: Dual function proteins for chemo-sensing and mechano-sensing. *J Biomed Sci.* 2018; 25:46.
- Chmilewsky F, About I, Chung SH. Pulp Fibroblasts Control Nerve Regeneration through Complement Activation. *J Dent Res.* 2016; 95: 913-22.
- Chmilewsky F, Jeanneau C, Laurent P, About I. Pulp fibroblasts synthesize functional complement proteins involved in initiating dentin-pulp regeneration. *Am J Pathol.* 2014; 184:1991-2000.
- Cho YS, Han HM, Jeong SY, Kim TH, Choi SY, Kim YS, Bae YC. Expression of Piezo1 in the Trigeminal Neurons and in the Axons That Innervate the Dental Pulp. *Front Cell Neurosci.* 2022;16: 945948.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 427-50.
- Cobo R, García-Piqueras J, Cobo J, Vega JA. The Human Cutaneous Sensory Corpuscles: An Update. *J Clin Med.* 2021; 10:227.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 2010; 330: 55-60.
- Coste B, Murthy SE, Mathur J, Schmidt M, Mechioukhi Y, Delmas P, Patapoutian A. Piezo1 ion channel pore properties are dictated by C-terminal region. *Nat Commun.* 2015; 6:7223.
- Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res.* 2013; 92: 765-72.
- Dalghi MG, Clayton DR, Ruiz WG, Al-Bataineh MM, Satlin LM, Kleyman TR, Ricke WA, Carattino MD, Apodaca G. Expression and distribution of PIEZO1 in the mouse urinary tract. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019; 317: F303-F321.

- Dalghi MG, Ruiz WG, Clayton DR, Montalbetti N, Daugherty SL, Beckel JM, Carattino MD, Apodaca G. Functional roles for PIEZO1 and PIEZO2 in urothelial mechanotransduction and lower urinary tract interoception. *JCI Insight*. 2021; 6:e152984.
- D'Aquino R., Papaccio G., Laino G., Graziano A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008; 4: 21-6.
- de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res*. 2017; 52: 965-74.
- Delmas P, Coste B. Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell*. 2013; 155:278-84.
- Delmas P, Parpaite T, Coste B. PIEZO channels and newcomers in the mammalian mechanosensitive ion channel family. *Neuron*. 2022; 110: 2713-27.
- Denu RA, Nemcek S, Bloom DD, Goodrich AD, Kim J, Mosher DF, Hematti P. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematol*. 2016; 136: 85-97.
- Dieterle MP, Husari A, Steinberg T, Wang X, Ramminger I, Tomakidi P. Role of Mechanotransduction in Periodontal Homeostasis and Disease. *J Dent Res*. 2021; 100: 1210-9.
- Douguet D, Honoré E. Mammalian Mechanoelectrical Transduction: Structure and Function of Force-Gated Ion Channels. *Cell*. 2019; 179: 340-54.
- Du H, Bartleson JM, Butenko S, Alonso V, Liu WF, Winer DA, Butte MJ. Tuning immunity through tissue mechanotransduction. *Nat Rev Immunol*. 2023; 23:174-88.
- Dzamukova M, Brunner TM, Miotla-Zarebska J, Heinrich F, Brylka L, Mashreghi MF, Kusumbe A, Kühn R, Schinke T, Vincent TL, Löhning M. Mechanical forces couple bone matrix mineralization with inhibition of angiogenesis to limit adolescent bone growth. *Nat Commun*. 2022; 13: 3059.
- Dusenikova S, Ru F, Surdenikova L, Nassenstein C, Hatok J, Dusenka R, Banovcin P Jr., Kliment J, Tatar M, Kollarik M. The expression profile of acid-sensing ion channel (ASIC) subunits ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, and ASIC3 in the esophageal vagal afferent nerve subtypes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2014;307:G922-G930.
- Egbuniwe O, Grover S, Duggal AK, Mavroudis A, Yazdi M, Renton T, Di Silvio L, Grant, AD. TRPA1 and TRPV4 activation in human odontoblasts stimulates ATP release. *J Dent Res*. 2014; 93: 911-7.

- El Karim IA, Linden GJ, Irwin CR, Lundy FT. Neuropeptides regulate expression of angiogenic growth factors in human dental pulp fibroblasts. *J Endod.* 2009; 35: 829-33.
- El Karim IA, Linden GJ, Curtis TM, About I, McGahon MK, Irwin CR, Killough SA, Lundy FT. Human dental pulp fibroblasts express the "cold-sensing" transient receptor potential channels TRPA1 and TRPM8. *J Endod.* 2011; 37: 473-8.
- Ezak MJ, Hong E, Chaparro-Garcia A, Ferkey DM. *Caenorhabditis elegans* TRPV channels function in a modality-specific pathway to regulate response to aberrant sensory signaling. *Genetics* 2010; 185: 233-44.
- Flegel C, Schöbel N, Altmüller J, Becker C, Tannapfel A, Hatt H, Gisselmann G. RNA-Seq Analysis of Human Trigeminal and Dorsal Root Ganglia with a Focus on Chemoreceptors. *PLoS One* 2015; 10: e0128951.
- Fox AG, Heeley JD. Histological study of pulps of human primary teeth. *Arch Oral Biol.* 1980; 25: 103-10.
- França CM, Riggers R, Muschler JL, Widbiller M, Lococo PM, Diogenes A, Bertassoni LE. 3D-Imaging of Whole Neuronal and Vascular Networks of the Human Dental Pulp via CLARITY and Light Sheet Microscopy. *Sci Rep.* 2019; 9:10860.
- Fu H, Fang P, Zhou HY, Zhou J, Yu XW, Ni M, Zheng JY, Jin Y, Chen JG, Wang F, Hu ZL. Acid-sensing ion channels in trigeminal ganglion neurons innervating the orofacial region contribute to orofacial inflammatory pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2016; 43:193-202.
- Gallorini M, Krifka S, Widbiller M, Schröder A, Brochhausen C, Cataldi A, Hiller KA, Buchalla W, Schweikl H. Distinguished properties of cells isolated from the dentin-pulp interface. *Ann Anat.* 2021; 234:151628.
- Gao Q, Cooper PR, Walmsley AD, Scheven BA. Role of piezo channels in ultrasound-stimulated dental stem cells. *J Endod.* 2017; 43: 1130-6.
- Gillam DG. Mechanisms of stimulus transmission across dentin - a review. *J. West Soc. Periodontol. Periodontal Abstr.* 1995; 43, 53-65.
- Glitsch M. Mechano- and pH-sensing convergence on Ca²⁺-mobilising proteins - A recipe for cancer? *Cell Calcium.* 2019; 80:38-45.
- Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 13-27.
- Han HM, Jeong SY, Cho YS, Choi SY, Bae YC. Expression of Piezo2 in the dental pulp, sensory root and trigeminal ganglion and its coexpression with vesicular glutamate transporters. *J Endod.* 2022:S0099-2399(22)00509-X.

- Hanukoglu I. ASIC and ENaC type sodium channels: conformational states and the structures of the ion selectivity filters. *FEBS J.* 2017; 284: 525-45.
- Hata M, Naruse K, Ozawa S, Kobayashi Y, Nakamura N, Kojima N, Omi M, Katanosaka Y, Nishikawa T, Naruse K, Tanaka Y, Matsubara T. Mechanical stretch increases the proliferation while inhibiting the osteogenic differentiation in dental pulp stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2012; 19: 625-33.
- Hattori A, Chen, Harding AM, Price MP, Lu Y, Abboud FM, Benson CJ. ASIC2a and ASIC3 heteromultimerize to form pH-sensitive channels in mouse cardiac dorsal root ganglia neurons. *Circ Res.* 2009;105:279-86.
- He Y, Guan X, Du Y, Liu G, Li Y, Wei Z, Shi C, Yang J, Hou T. Screening of differentially expressed miRNAs during osteogenic/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells exposed to mechanical stress. *Am J Transl Res.* 2021 Oct 15;13: 11126-43.
- Hermansteyne TO, Markowitz K, Fan L, Gold MS. Mechanotransducers in rat pulpal afferents. *J Dent Res.* 2008; 87: 834-8.
- Honoré E, Martins JR, Penton D, Patel A, Demolombe S. The Piezo Mechanosensitive Ion Channels: May the Force Be with You! *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2015; 169:25-41.
- Huang H, Bae C, Sachs F, Suchyna TM. Caveolae regulation of mechanosensitive channel function in myotubes. *PLoS One.* 2013; 8:e72894.
- Huang H, Yang R, Zhou YH. Mechanobiology of Periodontal Ligament Stem Cells in Orthodontic Tooth Movement. *Stem Cells Int.* 2018; 2018: 6531216.
- Ichikawa H, Kim HJ, Shuprisha A, Shikano T, Tsumura M, Shibukawa Y, Tazaki M. Voltage-dependent sodium channels and calcium-activated potassium channels in human odontoblasts in vitro. *J Endod.* 2012; 38: 1355-62.
- Jeanneau C, Lundy FT, El Karim IA, About I. Potential Therapeutic Strategy of Targeting Pulp Fibroblasts in Dentin-Pulp Regeneration. *J Endod.* 2017; 43: S17-S24.
- Jiang Y, Yang X, Jiang J, Xiao B. Structural Designs and Mechanogating Mechanisms of the Mechanosensitive Piezo Channels. *Trends Biochem Sci.* 2021; 46: 472-88.
- Jin P, Jan LY, Jan YN. Mechanosensitive Ion Channels: Structural Features Relevant to Mechanotransduction Mechanisms. *Annu Rev Neurosci.* 2020; 43:207-29.
- Jin Y, Li J, Wang Y, Ye R, Feng X, Jing Z, Zhao Z. Functional role of mechanosensitive ion channel Piezo1 in human periodontal ligament cells. *Angle Orthod.* 2015 ;85: 87-94.

- Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom. (Kyoto)* 2016; 56: 144-53.
- Khatibi Shahidi M, Krivanek J, Kaukua N, Ernfors P, Hladik L, Kostal V, Masich S, Hampl A, Chubanov V, Gudermann T, Romanov RA, Harkany T, Adameyko I, Fried K. Three-dimensional Imaging Reveals New Compartments and Structural Adaptations in Odontoblasts. *J Dent Res.* 2015; 94:945-54.
- Klein C, Meller C, Schäfer E. Human Primary Odontoblast-like Cell Cultures-A Focused Review Regarding Cell Characterization. *J Clin Med.* 2022; 11:5296.
- Kress M, Waldmann R. Acid sensing ionic channels. *Curr Top Membr.* 2006; 57:241-76.
- Krishtal O. The ASICs: signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci.* 2003; 26: 477-83.
- Krivanek J, Soldatov RA, Kastriti ME, Chontorotzea T, Herdina AN, Petersen J, Szarowska B, Landova M, Matejova VK, Holla LI, Kuchler U, Zdrilic IV, Vijaykumar A, Balic A, Marangoni P, Klein OD, Neves VCM, Yianni V, Sharpe PT, Harkany T, Metscher BD, Bajénoff M, Mina M, Fried K, Kharchenko PV, Adameyko I. Dental cell type atlas reveals stem and differentiated cell types in mouse and human teeth. *Nat Commun.* 2020; 11: 4816.
- Kurhanewicz N, McIntosh-Kastrinsky R, Tong H, Ledbetter A, Walsh L, Farraj A, Hazari M. TRPA1 mediates changes in heart rate variability and cardiac mechanical function in mice exposed to acrolein. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017; 324: 51-60.
- Kwon M, Baek SH, Park CK, Chung G, Oh SB. Single-cell RT-PCR and immunocytochemical detection of mechanosensitive transient receptor potential channels in acutely isolated rat odontoblasts. *Arch Oral Biol.* 2014; 59: 1266-71.
- Lee K, Lee BM, Park CK, Kim YH, Chung G. Ion Channels Involved in Tooth Pain. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:2266.
- Lee BM, Jo H, Park G, Kim YH, Park CK, Jung SJ, Chung G, Oh SB. Extracellular ATP induces calcium signaling in odontoblasts. *J Dent Res.* 2017; 9: 200-7.
- Le Fournis C, Jeanneau C, Roumani S, Giraud T, About I. Pulp Fibroblast Contribution to the Local Control of Pulp Inflammation via Complement Activation. *J Endod.* 2020; 46: S26-S32.
- Liedtke WB. TRPV channels' function in osmo- and mechanotransduction. In: Liedtke WB, Heller S (Eds.), *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. CRC Press, Boca Raton, FL. 2007.
- Lin SY, Corey DP. TRP channels in mechanosensation. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; 15:350-7.

- Lin YW, Cheng CM, Leduc PR, Chen CC. Understanding sensory nerve mechanotransduction through localized elastomeric matrix control. *PLoS One*. 2009; 4:e4293.
- Lin Y, Cheng T, Zhu S, Gu M, Jin L, Yang Y. mRNA and long non-coding RNA expression profiling of human periodontal ligament cells under tension loading. *Eur J Orthod*. 2021; 43: 698-707.
- Lin Y, Ren J, McGrath C. Mechanosensitive Piezo1 and Piezo2 ion channels in craniofacial development and dentistry: Recent advances and prospects. *Front Physiol*. 2022;13:1039714.
- Lingueglia E. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem*. 2007; 282: 17325-9.
- Liu H, Hu J, Zheng Q, Feng X, Zhan F, Wang X, Xu G, Hua F. Piezo1 Channels as Force Sensors in Mechanical Force-Related Chronic Inflammation. *Front Immunol*. 2022;13: 816149.
- Liu Y, Du H, Wang Y, Liu M, Deng S, Fan L, Zhang L, Sun Y, Zhang Q. Osteoprotegerin-Knockout Mice Developed Early Onset Root Resorption. *J Endod*. 2016; 42: 1516-22.
- Liu X, Wang C, Fujita T, Malmstrom HS, Nedergaard M, Ren YF, Dirksen RT. External dentin stimulation induces ATP release in human teeth. *J Dent Res*. 2015; 94: 1259-66.
- Liu J, Zhao Z, Wen J, Wang Y, Zhao M, Peng L, Zang C, Que K. TNF- α differently regulates TRPV2 and TRPV4 channels in human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2019; 52:1617-28.
- Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One*. 2012; 7: e39885.
- Lumpkin EA, Caterina MJ. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*. 2007; 445: 858-65.
- Luo Y, Suttle A, Zhang Q, Wang P, Chen Y. Transient Receptor Potential (TRP) Ion Channels in Orofacial Pain. *Mol Neurobiol*. 2021; 58: 2836-50.
- Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest*. 2018; 128: 26-35.
- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B: Mo. Dev Evol*. 2009; 312B: 416-24.
- Magloire H, Lesage F, Couble ML, Lazdunski M, Bleicher F. Expression and localization of TREK-1 K⁺ channels in human odontoblasts. *J Dent Res*. 2003; 82: 542-5.

- Magloire H, Maurin JC, Couble ML, Shibukawa Y, Tsumura M, Thivichon-Prince B, Bleicher F. Topical review. Dental pain and odontoblasts: facts and hypotheses. *J Orofac Pain* 2010; 24: 335-49.
- Manokawinchoke J, Chareonvit S, Trachoo V, Limraksasin P, Egusa H, Osathanon T. Intermittent compressive force regulates dentin matrix protein 1 expression in human periodontal ligament stem cells. *J Dent Sci.* 2023; 18:105-11.
- Marrelli M, Codispoti B, Shelton RM, Scheven BA, Cooper PR, Tatullo M, Paduano F. Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell Behavior. *Front Physiol.* 2018; 9:1685.
- Martinac B, Poole K. Mechanically activated ion channels. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018; 97:104-7.
- Martin-Alguacil N, de Gaspar I, Schober JM, Pfaff DW, Vega JA. Somatosensation. En: *Neuroscience in the 21st Century.* Donald W. Pfaff and Nora D. Volkow Eds. Springer Science+Business Media. New York 2021.
- Martinac B. The ion channels to cytoskeleton connection as potential mechanism of mechanosensitivity. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1838:682-91.
- Martínez EF, Araujo VC. *In vitro* immunoexpression of extracellular matrix proteins in dental pulpal and gingival human fibroblasts. *Int Endod J.* 2004; 37: 749-55.
- Matsunaga M, Kimura M, Ouchi T, Nakamura T, Ohyama S, Ando M, Nomura S, Azuma T, Ichinohe T, Shibukawa Y. Mechanical Stimulation-Induced Calcium Signaling by Piezo1 Channel Activation in Human Odontoblast Reduces Dentin Mineralization. *Front Physiol.* 2021; 12:704518.
- Maurin JC, Couble ML, Thivichon-Prince B, Magloire H. Odontoblast: a key cell involved in the perception of dentinal pain. *Med Sci (Paris)* 2003; 29, 293-9.
- Mayor R, Theveneau E. The neural crest. *Development* 2013;40: 224751.
- Meng F, Sachs F. Measuring strain of structural proteins in vivo in real time. En: Kohl P, Sachs F, Franz MR, editors. *Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia: From Pipette to Patient.* Oxford: Oxford University Press; 2011. pp. 431-4.
- Miyamoto R, Tokuda M, Sakuta T, Nagaoka S, Torii M. Expression and characterization of vanilloid receptor subtype 1 in human dental pulp cell cultures. *J Endod.* 2005 ;31: 652-8.
- Miyashita S, Ahmed NE, Murakami M, Iohara K, Yamamoto T, Horibe H, Kurita K, Takano-Yamamoto T, Nakashima M. Mechanical forces induce odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on three-dimensional biomimetic scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 11: 434-46.

- Miyazaki A, Sugimoto A, Yoshizaki K, Kawarabayashi K, Iwata K, Kurogoushi R, Kitamura T, Otsuka K, Hasegawa T, Akazawa Y, Fukumoto S, Ishimaru N, Iwamoto T. Coordination of WNT signaling and ciliogenesis during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1. *Sci Rep.* 2019; 9:14762.
- Moe P, Blount P. Assessment of potential stimuli for mechano-dependent gating of Mscl: effects of pressure, tension, and lipid headgroups. *Biochemistry.* 2005; 44:12239-44.
- Morris CE. Voltage-gated channel mechanosensitivity: fact or friction? *Front Physiol.* 2011; 2:25. 40.
- Morris CE. Why are so many ion channels mechanosensitive? In: Sperelakis N, editor. *Cell Physiology Source Book.* Elsevier; 2012. pp. 493-505.
- Mousawi F, Peng H, Li J, Ponnambalam S, Roger S, Zhao H, Yang X, Jiang LH. Chemical activation of the Piezo1 channel drives mesenchymal stem cell migration via inducing ATP release and activation of P2 receptor purinergic signaling. *Stem Cells.* 2020; 38: 410-21.
- Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Windsor LJ, Smith AJ. Odontoblast morphology and dental repair. *J Dent.* 2003; 31: 75-82.
- Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev.* 2014; 66: 676-814.
- Ohyama S, Ouchi T, Kimura M, Kurashima R, Yasumatsu K, Nishida D, Hitomi S, Ubaidus S, Kuroda H, Ito S, Takano M, Ono K, Mizoguchi T, Katakura A, Shibukawa Y. Piezo1-pannexin-1-P2X₃ axis in odontoblasts and neurons mediates sensory transduction in dentinal sensitivity. *Front Physiol.* 2022;13:891759.
- Pei F, Liu J, Zhang L, Pan X, Huang W, Cen X, Huang S, Jin Y, Zhao Z. The functions of mechanosensitive ion channels in tooth and bone tissues. *Cell Signal.* 2021; 78:109877
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell.* 2002; 108: 705-15.
- Phan SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 5: 334-7.
- Quispe-Salcedo A, Ohshima H. The Role of Dendritic Cells during Physiological and Pathological Dentinogenesis. *J Clin Med.* 2021; 10: 3348.
- Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron.* 2015; 87:1162-79.

- Reeh PW, Fischer MJM. Nobel somatosensations and pain. *Pflugers Arch.* 2022; 474: 405-20.
- Ren H, Wen Q, Zhao Q, Wang N, Zhao Y. Atlas of human dental pulp cells at multiple spatial and temporal levels based on single-cell sequencing analysis. *Front Physiol.* 2022; 13:993478.
- Rowland KC, Kanive CB, Wells JE, Hatton JF. TRPM2 immunoreactivity is increased in fibroblasts, but not nerves, of symptomatic human dental pulp. *J Endod.* 2007; 33: 245-8.
- Ruan N, Tribble J, Peterson AM, Jiang Q, Wang JQ, Chu XP. Acid-Sensing Ion Channels and Mechanosensation. *Int J Mol Sci.* 2021; 22:4810.
- Sachs F. Stretch-activated ion channels: what are they? *Physiology (Bethesda).* 2010; 25:50-6.
- Sachs F. Mechanical transduction by ion channels: A cautionary tale. *World J Neurol.* 2015; 5: 74-87.
- Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY. Transient Receptor Potential (TRP) Channels. *Subcell Biochem.* 2018; 87:141-65.
- Sato M, Sobhan U, Tsumura U, Kuroda H, Soya M, Masamura A, Nishiyama A, Katakura A, Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y. Hypotonic-induced stretching of plasma membrane activates transient receptor potential vanilloid channels and sodium-calcium exchangers in mouse odontoblasts. *J Endod.* 2013; 39: 779-87.
- Sato M, Ogura K, Kimura M, Nishi K, Ando M, Tazaki M, Shibukawa Y. Activation of Mechanosensitive Transient Receptor Potential/Piezo Channels in Odontoblasts Generates Action Potentials in Cocultured Isolectin B4-negative Medium-sized Trigeminal Ganglion Neurons. *J Endod.* 2018; 44: 984-91.
- Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, Kobayashi S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci.* 2008; 27: 1131-42.
- Sharif-Naeini R. Contribution of mechanosensitive ion channels to somatosensation. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2015;131: 53-71.
- Shen Y, Pan Y, Guo S, Sun L, Zhang C, Wang L. The roles of mechanosensitive ion channels and associated downstream MAPK signaling pathways in PDLC mechanotransduction. *Mol Med Rep.* 2020; 21: 2113-22.
- Shibukawa Y, Sato M, Kimura M, Sobhan U, Shimada M, Nishiyama A, Kawaguchi A, Soya M, Kuroda H, Katakura A, Ichinohe T, Tazaki M. Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors

- mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pflugers Arch.* 2015; 467: 843-63.
- Simon S, Smith AJ, Lumley PJ, Berdal A, Smith G, Finney S, Cooper PR. Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone* 2009; 45: 693-703.
- Sloan A, Schmith A. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 2007; 13: 151-7.
- Solé-Magdalena A, Martínez-Alonso M, Coronado CA, Junquera LM, Cobo J, Vega JA. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. *Ann Anat.* 2018; 215:20-9.
- Solé-Magdalena A, Revuelta EG, Menéñez-Díaz I, Calavia MG, Cobo T, García-Suárez O, Pérez-Piñera P, De Carlos F, Cobo J, Vega JA. Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. *Microsc Res Tech.* 2011; 74: 457-63.
- Son AR, Yang YM, Hong JH, Lee SI, Shibukawa Y, Shin DM. Odontoblast TRP channels and thermo/mechanical transmission. *J Dent Res.* 2009; 88: 1014-9.
- Suchyna TM, Markin VS, Sachs F. Biophysics and structure of the patch and the gigaseal. *Biophys J.* 2009; 97:738-47.
- Suchyna TM, Sachs F. Mechanosensitive channel properties and membrane mechanics in mouse dystrophic myotubes. *J Physiol.* 2007; 581:369-87.
- Suchyna T, Sachs F. The Membrane/Cytoskeleton Interface and Stretch-Activated Channels. In: Kohl P, Sachs F, Franz MR, editors. *Cardiac Mechano-Electric Coupling and Arrhythmia: From Pipette to Patient.* Oxford, UK: Oxford University Press; 2011. pp. 57-65.
- Sun XF, Qiao WW, Meng LY, Bian Z. PIEZO1 Ion Channels Mediate Mechanotransduction in Odontoblasts. *J Endod.* 2022; 48: 749-58.
- Swaminathan V, Gloerich M. Decoding mechanical cues by molecular mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2021; 72:72-80.
- Taberner FJ, Prato V, Schaefer I, Schrenk-Siemens K, Heppenstall PA, Lechner SG. Structure-guided examination of the mechanogating mechanism of PIEZO2. *Proc Natl Acad Sc. USA* 2019; 116: 14260-9.
- Tatullo M, Marrelli M, Falisi G, Rastelli C, Palmieri F, Gargari M, Zavan B, Paduano F, Benagiano V. Mechanical Influence of Tissue Culture Plates and Extracellular Matrix on Mesenchymal Stem Cell Behavior: A Topical Review. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2016; 29: 3-8.

- Thivichon-Prince B, Couble ML, Giamarchi A, Delmas P, Franco B, Romio L, Struys T, Lambrichts I, Ressenkoff D, Magloire H, Bleicher F. Primary cilia of odontoblasts: possible role in molar morphogenesis. *J Dent Res.* 2009; 88: 910-5.
- Vega JA, Suazo I. *El tacto. Tocar y sentir.* Universidad Autónoma de Chile, 2021.
- Verma D, Ye N, Meng F, Sachs F, Rahimzadeh J, Hua SZ. Interplay between cytoskeletal stresses and cell adaptation under chronic flow. *PLoS One.* 2012; 7: e44167.
- Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* 1997; 386: 173-7.
- Vandewauw I, Owsianik G, Voets T. Systematic and quantitative mRNA expression analysis of TRP channel genes at the single trigeminal and dorsal root ganglion level in mouse. *BMC Neurosci.* 2013; 14: 21.
- Wang L, Zhou H, Zhang M, Liu W, Deng T, Zhao Q, Li Y, Lei J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2. *Nature* 2019; 573: 225-9.
- Won J, Vang H, Lee PR, Kim YH, Kim HW, Kang Y, Oh SB. Piezo2 Expression in Mechanosensitive Dental Primary Afferent Neurons. *J Dent Res.* 2017; 96: 931-7.
- Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42:57-71.
- Yang H, Hou C, Xiao W, Qiu Y. The role of mechanosensitive ion channels in the gastrointestinal tract. *Front Physiol.* 2022; 13:904203.
- Xiao B. Levering Mechanically Activated Piezo Channels for Potential Pharmacological Intervention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2020; 60:195-218.
- Yang H, Shu YX, Wang LY, Zou WL, Guo LY, Shao MY, Gao QH, Hu T. Effect of cyclic uniaxial compressive stress on human dental pulp cells in vitro. *Connect Tissue Res.* 2018; 59: 255-62.
- Young M, Lewis AH, Grandl J. Physics of mechanotransduction by Piezo ion channels. *J Gen Physiol.* 2022; 154:e202113044.
- Yu C, Abbot P. An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury. *Aust Dent J.* 2007; 52 (1 Suppl): S4-S6.
- Yu V, Damek-Poprawa M, Nicoll SB, Akintoye SO. Dynamic hydrostatic pressure promotes differentiation of human dental pulp stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 386: 661-5.

Zhao Q, Wu K1, Geng J, Chi S, Wang Y, Zhi P, Zhang M, Xiao B. Ion permeation and mechanotransduction mechanisms of mechanosensitive piezo channels. *Neuron*. 2016; 89:1248-63.

Zhao Q, Zhou H, Chi S, Wang Y, Wang J, Geng J, Wu K, Liu W, Zhang T, Dong MQ, Wang J, Li X, Xiao B. Structure and mechanogating mechanism of the Piezo1 channel. *Nature* 2018; 554: 487-92.

Zeng WZ, Marshall KL, Min S, Daou I, Chapleau MW, Abboud FM, Liberles SD, Patapoutian A. PIEZOs mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex. *Science*. 2018; 362: 464-7.

Anexo 1- Curriculum Vita

1.- IDENTIFICACION

2.- SITUACION PROFESIONAL

2.1.- SITUACION PROFESIONAL ACTUAL

2.2.- CARGOS ANTERIORES

3.- FORMACION ACADEMICA RECIBIDA

3.1.- TITULACION UNIVERSITARIA

3.2.- FORMACION ESPECIALIZADA

4.- ACTIVIDAD DOCENTE

4.1.- FORMACION ACADEMICA IMPARTIDA

4.2.- OTRAS ACTIVIDADES

5.- ACTIVIDADES CIENTIFICAS Y TECNOLOGICAS

5.1.- PRODUCCION CIENTIFICA

5.1.1.- PUBLICACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS

5.1.2.- TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

5.1.3.- TRABAJOS PRESENTADOS EN JORNADAS

5.2.- OTROS MERITOS

5.2.1.- AYUDAS Y BECAS

5.2.2.- SOCIEDADES CIENTIFICAS Y ASOCACIONES PROF.

5.2.3.- PREMIOS , MENCIONES, DISTINCIONES.

1.- IDENTIFICACIÓN

NOMBRE: JUAN JOSE GAITE GARCIA

FECHA NACIMIENTO: 26-10-1969

DNI. 16301733T

NACIONALIDAD: ESPAÑOLA

DIRECCION CONTACTO: CAMINO POZO 23- 31180, ZIZUR
MAYOR(NAVARRA)

TELEFONO: 948467603/ 687726695

MAIL: jgaitegarcia@gmail.com

2.- SITUACION PROFESIONAL

2.1.- SITUACIÓN PROFESIONAL ACTUAL

1.- Entidad empleadora: Iortia Servicios Clínicos.

Cargo profesional: Odontólogo/ administrador.

Fecha de inicio: 24 febrero 2009.

2.- Entidad empleadora: Clínica Universidad de Navarra.

Cargo profesional: Odontólogo/ Codirector Unidad Dental.

Fecha de inicio: 1 mayo 2022.

3.- Entidad empleadora: Universidad País Vasco.

Cargo profesional: Profesor Asociado.

Fecha Inicio: 19 diciembre 1996.

4.- Entidad empleadora: Universidad de Navarra.

Cargo profesional: Profesor Clínico Asociado

Fecha Inicio: 1 septiembre 2019.

2.2.-CARGOS ANTERIORES

1.- Entidad empleadora: Clínica Dental Iortia.

Cargo profesional: Odontólogo titular autónomo.

Fecha Inicio: 20 diciembre 1996 hasta 24 febrero 2009.

2.- Entidad empleadora: Clínica dental Sada.

Cargo profesional: Odontólogo colaborador autónomo.

Fecha Inicio: 1 enero 1994 hasta 1 enero. 2000.

3.- Entidad empleadora: Clínica dental Dr Larraga.

Cargo profesional: Odontólogo colaborador autónomo.

Fecha Inicio: 1 enero 1994 hasta 2008.

4.- Entidad empleadora: Clínica Universidad de Navarra.

Cargo profesional: Odontólogo colaborador autónomo.

Fecha Inicio: 1 enero 2008 hasta mayo 2022.

5.- Entidad empleadora: Osakidetza, Servicio Vasco de Salud.

Cargo profesional: Odontólogo.

Fecha Inicio: julio y agosto año 1992 y 1993.

6.- Entidad empleadora: Osasunbidea, Servicio Navarro de Salud.

Cargo profesional: Odontólogo.

Fecha Inicio: agosto año 1994.

3.- FORMACION ACADÉMICA RECIBIDA

3.1.- TITULACION UNIVERSITARIA

1.- **Título:** Licenciado Odontología

Entidad Titulación: Universidad País Vasco

Fecha Titulación: 28 julio 1992

2.- **Título:** Grado en Odontología

Entidad Titulación: Universidad País Vasco

Fecha Titulación: Tesina Licenciatura 26 octubre 1993

3.- **Título:** Suficiencia Investigadora

Entidad: Universidad País Vasco

Fecha: 21 julio 2010

4.- **Título:** Máster Universitario Endodoncia

Entidad: Universidad de Santiago Compostela

Fecha: curso 2004-2005

5.- **Título:** Diploma Postgrado Endodoncia

Entidad: Universidad de Valencia

Fecha: 22 abril 2015

3.2.- FORMACION ESPECIALIZADA

1.- **Título Formación:** Curso buenas practicas clínicas en investigación

Entidad Titulación: Clínica Universidad de Navarra

Fecha Finalización: 26 abril 2018

Duración: 2.36 créditos

2.- Título Formación: Postgrado Periodoncia e Implantología Oral

Entidad Titulación: Clínica Gingiva

Fecha Finalización: 14 diciembre 2002

Duración: 30 horas

3.- Título Formación: Curso Formación Continuada Implantología

Entidad Titulación: Colegio Odontólogos Cantabria

Fecha Finalización: junio 1999

Duración: 100 horas

4.- Título Formación: Curso Dirección Instalaciones Radioactivas

Entidad Titulación: Colegio Odontólogos Navarra

Fecha Finalización: 11 febrero 1995

Duración: 19 horas

5.- Título Formación: Curso Formación Continuada Periodoncia

Entidad Titulación: Consejo General Odontólogos y Estomatólogos

Fecha Finalización: 29 septiembre 2001

Duración: 31 horas

6.- Título Formación: Curso Gestión Clínica

Entidad Titulación: Universidad País Vasco

Fecha Finalización: 17 mayo 1998

Duración: 48 horas

7.- Título Formación: Curso Endodoncia Dr. Walker

Entidad Titulación: Asociación Española Endodoncia

Fecha Finalización: 30 octubre 1999

Duración: 4 horas

- 8.- Título Formación:** Curso Endodoncia Dr Abou Rass
Entidad Titulación: Asociación Española Endodoncia
Fecha Finalización: 30 octubre 1999
Duración: 8 horas
- 9.- Título Formación:** Curso Nuevas Tendencias Endodoncia
Entidad Titulación: Academia Ciencias Médicas de Cataluña
Fecha Finalización: 11 noviembre 2000
Duración: 7 horas
- 10.- Título Formación:** Curso Actualización Resinas Compuestas
Entidad Titulación: Universidad Complutense
Fecha Finalización: 27 octubre 2001
Duración: 8 horas
- 11.- Título Formación:** Curso Actualización Odontología General
Entidad Titulación: Clínica Dr Pla
Fecha Finalización: 10 abril 2010
Duración: 20 horas
- 12.- Título Formación:** Formación Continuada Endodoncia
Entidad Titulación: European Society of Endodontology
Fecha Finalización: 19 setiembre 2015
Duración: 18 horas
- 13.- Título Formación:** Curso Endodoncia, XI Simposium
Entidad Titulación: Asociación Española Endodoncia
Fecha Finalización: 25 febrero 2012
Duración: 1,7 créditos
- 14.- Título Formación:** Curso Integral Endodoncia

Entidad Titulación: Supredente

Fecha Finalización: 27 octubre 2021

Duración: 60 horas

4.- ACTIVIDAD DOCENTE

4.1.- FORMACION ACADÉMICA IMPARTIDA

1.- Tipo Docencia: Docencia Oficial. Profesor Colaborador

Nombre Asignatura: Odontología Integrada Adultos

Tipo Programa: Licenciatura Odontología

Fecha Inicio y Finalización: Curso 1992-1993

Entidad Realización: Universidad País Vasco

2.- Tipo Docencia: Docencia Oficial. Profesor Colaborador

Nombre Asignatura: Odontología Integrada Adultos

Tipo Programa: Curso Homologación Título Odontólogos

Fecha Inicio y Finalización: Curso 1992-1993

Entidad Realización: Universidad País Vasco

3.- Tipo Docencia: Docencia Oficial. Profesor Colaborador

Nombre Asignatura: Odontología Integrada Adultos

Tipo Programa: Curso homologación Titulo Odontólogos

Fecha Inicio y Finalización: Curso 1993-1994

Entidad Realización: Universidad País Vasco

4.- Tipo Docencia: Docencia Oficial: Profesor Colaborador Honorífico

Nombre Asignatura: Odontología Integrada Adultos

Tipo Programa: Licenciatura Odontología

Fecha Inicio y Finalización: 14 marzo 1996 hasta 13 diciembre 1996

Entidad Realización: Universidad País Vasco

5.- Tipo Docencia: Docencia Oficial. Profesor Asociado.

Nombre Asignatura: Odontología Integrada Adultos

Tipo Programa: Licenciatura Odontología

Fecha Inicio y Finalización: 19 diciembre 1996- actualidad

Horas-créditos: 12,1 créditos

Entidad Realización: Universidad País Vasco

6.- Tipo Docencia: Docencia Oficial. Profesor Colaborador

Nombre Asignatura: Master Teórico Práctico Endodoncia Avanzada

Tipo Programa: Master Odontología

Fecha Inicio y Finalización: 1-10- 2019 hasta 30-07-2021

Horas-créditos: 5 horas

Entidad Realización: Universidad Santiago Compostela

7.- Tipo Docencia: Docencia Oficial. Profesor Colaborador

Nombre Asignatura: Master Endodoncia

Tipo Programa: Master Odontología

Fecha Inicio y Finalización: Curso 2020-2022

Horas-créditos: 5 horas

Entidad Realización: Universidad Zaragoza

8.- Tipo Docencia: Docencia Oficial. Profesor asociado

Nombre Asignatura: Odontología General para Médicos

Tipo Programa: Grado Medicina

Fecha Inicio y Finalización: Curso 2019- actualidad.

Horas-créditos: 21 horas

Entidad Realización: Universidad Navarra

4.2.- OTRAS ACTIVIDADES

1.- Descripción Actividad: Director y Docente Curso Modular Endodoncia y Reconstrucción Diente Endodonciado

Entidad Organizadora: Clínica Universidad Navarra y Colegio Odontólogos Navarra

Fecha Realización: Curso 2018- 2019-2021-2022-2023

Horas-créditos: 11,26 créditos

2.- Descripción Actividad: Director y Docente Curso Modular Implantología Básica

Entidad Organizadora: Clínica Universidad Navarra y Colegio Odontólogos Navarra

Fecha Realización: Curso 2022

Horas-créditos: 12,26 créditos

3.- Descripción Actividad: Docente Curso Modular Endodoncia

Entidad Organizadora: Colegio Odontólogos A Coruña

Fecha Realización: Curso 2021-2022-2023

Horas-créditos: 9.4 créditos

4.- Descripción Actividad: Ponente II Jornadas Odontológicas UPV

Entidad Organizadora: Asociación Vasca Estudiantes Odontología

Fecha realización: 16 Abril 2010

Horas-créditos: 4 horas

5.- Descripción Actividad: Ponente XII Jornadas Odontológicas UPV

Entidad Organizadora: Odontólogo Berriak

Fecha Realización: 12 Marzo 2021

Horas- créditos: 4 horas

6.- Descripción Actividad: Ponente II Congreso Actualización Odontología

Entidad organizadora: Consello Galego Odontólogos

Fecha Realización: 5-7 julio 2018

7.- Descripción Actividad: Ponente 42 congreso AEDE

Entidad Organizadora: Asociación Española Endodoncia

Fecha Realización: 27-29 Octubre 2022

8.- Descripción Actividad: Miembro Comité Científico I Congreso Internacional Innovación Docente

Entidad Organizadora: Colegio Odontólogos A Coruña

Fecha Realización: 12 marzo 2022

9.- Descripción Actividad: Miembro Comité Científico I Congreso Gallego de Implantología y Endodoncia

Entidad Organizadora: Colegio Odontólogos A Coruña

Fecha Realización: 9-10 julio 2021

10.- Descripción Actividad: Presidente Comité Organizador XXIV Congreso Nacional SEOC

Entidad Organizadora: Sociedad Española Odontología Conservadora

Fecha Realización: 12-14 mayo 2022

5.- ACTIVIDADES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

5.1.- PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

5.1.1.- PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS

1.- Artículo Revista Nacional

Autores: JJ Gaité García, E Guinea, J Ellacuría, R Triana

Título: Conductos laterales en área de la furca de los molares inferiores

Referencia Revista: Revista de la Asociación Española de Endodoncia

Indicadores de Calidad: ISSN 0212-4688

Volumen: volumen 15 número 3

Fecha de Publicación Original: 01-07-1997

2.- Artículo Revista Nacional

Autores: V Gómez Carrillo, J Giner, L Maniegas, JJ Gaité

Título: Apicectomía quirúrgica: propuesta de un protocolo basado en la evidencia.

Referencia Revista: Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial

Indicadores de Calidad: ISSN 1130-0558

Volumen: volumen 33 número 2

Fecha de Publicación Original: abr-jun 2011

3.- Libro

Título: Endodoncia para todos.

Editorial: Peldaño

Coautor: Capítulo 5: Obturación Termoplástica. Capítulo 7. Fractura Instrumentos

5.1.2.- TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

1.- Tipo de Participación: Comunicación Libre

Carácter del Congreso: Nacional

Autores: De Orte ML, Cearra P, Gaité J.

Título: Estudio descriptivo de 107 biopsias realizadas en la consulta de cirugía oral de la comarca de Baracaldo-Sestao (Osakidetza)

Congreso: II Jornadas de Salud Pública Osorik 97

Lugar de Celebración: Bilbao

Fecha: 7 noviembre 1997

2.- Tipo de Participación: Comunicación Libre

Carácter del Congreso: Nacional

Autores: JJ Gaité, R Triana, C Prado, A Arellano

Título: Estudio preliminar mediante meb. de la presencia de forámenes accesorios en el área de la furca de los molares inferiores

Congreso: II Congreso SEOC (Sociedad Española de Odontología Conservadora)

Lugar de Celebración: Barcelona

Fecha: 26 de noviembre de 1993

3.- Tipo de Participación: Comunicación Libre

Carácter del Congreso: Nacional

Autores: JJ Gaité

Título: Evaluación clínica de diferentes adhesivos dentinarios y un barniz de copal bajo restauraciones de amalgama de plata

Congreso: IV Congreso SEOC (Sociedad Española de Odontología Conservadora)

Lugar de Celebración: Valencia

Fecha: 23 de noviembre de 1995

4.- Tipo de Participación: Póster

Caracter del Congreso: Internacional

Autores: I Abarrategui, F Juarros, JJ Gaite, E Guinea

Título: Permanent dentition and hipodontia

Congreso: 34th Annual Meeting of the International Association for Dental Research (I.A.D.R.)

Lugar de Celebración: Madrid

Fecha: 18-20 septiembre 1997

5.- Tipo de Participación: Póster

Caracter del Congreso: Internacional

Autores: I Abarrategui, F Juarros, JJ Gaite, E Guinea, JM Prado

Título: Caries index in decidual dentition

Congreso: 34th Annual Meeting of the International Association for Dental Research (I.A.D.R.)

Lugar de Celebración: Madrid

Fecha: 18-20 septiembre 1997

6.- Tipo de Participación: Póster

Caracter del Congreso: Internacional

Autores: E Guinea, JJ Gaite, J Ellacuría, I Abarrategui,

Título: Anatomical alterations in the furcation area in mandibular molars

Congreso: 34th Annual Meeting of the International Association for Dental Research (I.A.D.R.)

Lugar de Celebración: Madrid

Fecha: 18-20 septiembre 1997

7.- Tipo de Participación: Póster

Caracter del Congreso: Nacional

Autores: R Larraga, JJ Gaité ,J Abascal

Título: Rehabilitación dentoalveolar telescópica completamente dentosoportada

Congreso: XXVII Reunion Anual Sociedad Española de Prótesis Estomatológica

Lugar de Celebración: Pamplona

Fecha: 9-11 octubre 1997

8.- Tipo de Participación: Comunicación Libre

Caracter del Congreso: Nacional

Autores: Anache D'Abate M, Méndez Hernández P, Méndez Díaz R, Gaité García JJ, TeuléTrull M, Martín Cruces J

Título: Protocolo clínico de un blanqueamiento interno de un diente traumatizado, en un paciente médicamente comprometido

Congreso: XXIV Congreso SEOC

Lugar de Celebración: Pamplona

Fecha: 12-14 mayo 2022

9.- Tipo de Participación: Comunicación Libre

Caracter del Congreso: Nacional

Autores: Feijóo Artacho L, Miguens Vila R. Castelo Baz P., Gaité García. JJ, Varela Aneiros I.

Título: Resorción cervical externa de un premolar inferior: Tratamiento con acceso quirúrgico

Congreso: XXIV Congreso SEOC

Lugar de Celebración: Pamplona

Fecha: 12-14 mayo 2022

10.- Tipo de Participación: Comunicación Libre

Caracter del Congreso: Nacional

Autores: Garrido Parada S, Feijoo Pato N, Gaviño Orduña, J, Castelo Baz P Gaité García, JJ.

Título: Endodontic regenerative procedures in necrotic adult teeth. A literature review

Congreso: XXIV Congreso SEOC

Lugar de Celebración: Pamplona

Fecha: 12-14 mayo 2022

5.2. OTROS MERITOS

5.2.1.- AYUDAS Y BECAS

1.- Nombre ayuda: Beca Anual Postgrado AEDE

Entidad concesionaria: Asociación Española Endodoncia

Fecha Concesión y Finalización: 28 mayo 1994

5.2.2.- SOCIEDADES CIENTIFICAS Y ASOCACIONES PROF.

1.- Nombre Sociedad: Asociación Española Endodoncia

Fecha Inicio: 1999-actualidad

2.- Nombre Sociedad: Sociedad Española Odontología Conservadora

Fecha Inicio: 2018-actualidad

3.- Nombre Sociedad: Asociación Española Odontología Integrada

Fecha Inicio: 2000- actualidad

5.2.3.- PREMIOS, MENCIONES, DISTINCIONES.

1.- Descripción: Premio mejor poster XXVII Reunión Anual SEPES

Entidad Concesionaria: Sociedad Española Prótesis

Fecha Concesión: 9-11 octubre 1997

2.- Descripción: Evaluación Positiva para Acreditación Profesor UPV

Entidad Concesionaria: Agencia Evaluación y Calidad Sistema Universitario Vasco, unigual.

Fecha Concesión: 11 marzo 2011

3.- Descripción: Informe Anual Evaluación Alumnado UPV (media 4.9 sobre 5)

Entidad Concesionaria: Universidad País Vasco

Fecha Concesión: 2016-actualidad

Anexo 2- Publicaciones derivadas de la Tesis Doctoral

Artículo aceptado en *The Anatomical Record*

IMMUNOLOCALIZATION OF THE MECHANOGATED ION CHANNELS PIEZO1 AND PIEZO2 IN HUMAN DENTAL PULP AND PERIODONTAL LIGAMENT

Juan J. Gaité^{1,2*}, Antonio Solé-Magdalena^{1*}, Yolanda García-Mesa¹, Patricia Cuendias¹, José Martín-Cruces¹, Olivia García-Suárez¹, José A. Vega^{1,3}, Benjamín Martín-Biedma⁴

¹Departamento de Morfología y Biología Celular, Grupo SINPOS, Universidad de Oviedo, Spain

²Unidad Dental, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain

³Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile

⁴Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

*These authors contributed equally to this paper

To whom all correspondence should be addressed

José A. Vega, M.D., Ph.D.
e-mail: javega@uniovi.es

Abstract. Background. PIEZO1 and PIEZO2 are essential components of mechano-gated ion channels that are required for mechanotransduction as well as cell functions associated to mechano-associated biologic processes. There is evidence of the presence of PIEZO1 and PIEZO2 in the teeth and periodontal ligament, especially in cell lines and mice, while human studies are scarce. **Methods.** Decalcified permanent human teeth were processed for immunohistochemical detection of PIEZO1 and PIEZO2; confocal laser microscopy was also used to co-locate both mechanoproteins with vimentin (considered as a marker of differentiated odontoblasts). **Results.** In the outer layer of the dental pulp abundant PIEZO1 and PIEZO2 positive cells were found that had no odontoblast morphology and were vimentin positive. Based on their morphology, location and immunohistochemical profile, they were identified as dental pulp stem cells/pre-odontoblast. In addition, intense immunoreactivity has been observed for PIEZO1 and PIEZO2 in the periodontal ligament. **Conclusions.** Our findings suggest that forces acting on PIEZO1 and PIEZO2 could participate in the process of differentiation from dental pulp stem cells/pre-odontoblast to odontoblasts, and in the transmission of forces by the periodontal ligament.

Key words: dental pulp, odontoblasts, periodontal ligament, human, mechano-gated ion channels, PIEZO1, PIEZO2

Introduction

The process whereby cells convert mechanical inputs into electrical or biochemical signals is currently referred as mechanotransduction. Many studies have investigated the effects of mechanical forces on dental pulp using animal and in vitro models. The various

types of forces (stretching, pressure) that act on the teeth are transmitted to the dental pulp and can subsequently influence cell biology (Cai et al., 2011; Hata et al., 2012; Miyashita et al., 2017; Marrelli et al., 2018; Yang et al., 2018; He et al., 2021). Nevertheless, the mechanisms throughout which dental pulp cells sense the environmental forces are only partially known, and this an essential step to determine how mechanical stimuli are converted into function, including lineage specification.

Strong candidates for mechanotransduction are mechano-gated ion channels of the cellular membrane belonging of different families and superfamilies, especially members of the Piezo family (Honoré et al., 2015; Ranade et al., 2015; Wu et al., 2017; Kefauver et al., 2020; Fang et al., 2021). Moreover, in this process also participates some extracellular matrix components and the cytoskeleton (Jin et al., 2020; Swaminathan and Gloerich, 2022). PIEZO1 and PIEZO2, are vertebrate stretch-gated multipass transmembrane protein, required for nonselective cationic mechanosensitive channels in mammalian cells. Piezo channels are essential for mechanosensing (Ikeda et al., 2014; Woo et al., 2014; Handler and Ginty, 2021; Nagel and Chesler, 2022) but also participate in functions associated to mechano-associated biologic processes including cellular development, migration, proliferation, and elongation (Coste et al., 2010; Bagriantsev et al., 2014; Wu et al., 2017; Fang et al., 2021; Du et al., 2022).

Data about the occurrence and functioning of PIEZOs in the teeth are scarce. Functional PIEZO1 is expressed in the human pulp (Mousawi et al., 2020; Ohyama et al., 2022; Sun et al., 2022) and periodontal ligament (Jin et al., 2015; Jiang et al., 2021) whereas PIEZO2 was found ubiquitously present in mouse odontoblasts (Khatibi Shahidi et al., 2015) and periodontal cell lines (Gao et al., 2017).

Because the scarcity of studies on the occurrence of mechanoproteins in human teeth, the present research was designed to study the distribution of PIEZO1 and PIEZO2 in the human dental pulp and periodontal ligament to contribute to the knowledge of the mechanobiology of the tooth.

Material and Methods

Teeth that showed no evident pathologies (5 canines and 6 molars) were removed for various reasons from patients with ages ranging between 25 to 48 years, males (n = 4) and females (n = 7) in different private clinics. The pieces were washed with tap water followed with cold saline, and then placed in a solution containing 10% formalin, 15.4 M nitric acid and distilled water (10:5:85 v/v) until decalcification was complete (7 to 10 days). After decalcification, they were washed in tap water for 12 h and processed for paraffin embedding. Then, longitudinal 10 µm thick sections were cut, mounted on gelatine-coated microscope slides and processed for immunohistochemistry.

Single immunohistochemistry. Deparaffinized and rehydrated sections were processed for detection of PIEZO1 and PIEZO2 using the EnVision antibody complex detection kit (Dako, Copenhagen, Denmark), following supplier's instructions. Briefly, the endogenous

peroxidase activity was inhibited (3% H₂O₂ for 15 min) and the non-specific binding was blocked (10% bovine serum albumin for 20 min). Sections were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies. The anti-PIEZO1 antibody was polyclonal raised in rabbit against a synthetic peptide (C)EDLKPQHRRHISIR, corresponding to amino acids sequence 1863-1876 of rat PIEZO1 (Alomone, Jerusalem, Israel), used diluted 1:200. The antibody against PIEZO2 was polyclonal raised in rabbit against a synthetic peptide of human PIEZO2 with the sequence: VFGFWAFGKHSAAADITSSLSLSEDQVPGPFLVMVLIQFGT MVVD RALYLRK (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MS, USA), used diluted 1:200. Subsequently, the sections were incubated with the anti-rabbit EnVision system-labelled polymer (Dako-Cytomation) for 30 min, washed in buffer solution, and treated with peroxidase blocking buffer (Dako Cytomation). Finally, the slides were washed with buffer solution and the immunoreaction was visualized with diaminobenzidine as a chromogen, washed, dehydrated, and mounted with Entellan® (Merk, Darmstadt, Germany). To ascertain structural details the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Double immunofluorescence. Sections were also processed for simultaneous detection of PIEZO1 and PIEZO2 together with vimentin, a marker for odontoblasts, pulp fibroblasts, and fibroblasts of the periodontal ligament (Solé-Magdalena et al., 2011,2018). Non-specific binding was prevented by incubating the sections for 30 minutes with a solution of 25% calf bovine serum in tris-buffered saline (TBS), pH 7,4. The sections were incubated overnight at 4°C in a humid chamber with a 1:1 mixture of the polyclonal antibody against PIEZO1 or PIEZO2 described above (used diluted 1:100) with a mouse monoclonal antibody anti-vimentin (clone 334, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany, used diluted 1:500). After rinsing with TBS, the sections were incubated for 1 hour with CFL488-conjugated bovine anti-rabbit IgG (sc-362260, SantaCruz Biotech, CA, USA), diluted 1:200 in TBS, then rinsed again and incubated for another hour with CyTM3-conjugated donkey anti-mouse antibody (Jackson-ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA) diluted 1:100 in TBS. Both steps were performed at room temperature in a dark humid chamber. Sections were finally washed, and the cell nuclei were stained with DAPI (10 ng/ml). Triple fluorescence was detected using a Leica DMR-XA automatic fluorescence microscope (Microscopía fotónica y proceso de imagen, servicios científico-técnicos, Universidad de Oviedo) coupled with a Leica Confocal Software, version 2.5 (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Germany) and the images captured were processed using the software Image J version 1.43 g Master Biophotonics Facility, Mac Master University Ontario (www.macbiophotonics.ca). For control purposes representative sections were processed in the same way as described using non-immune rabbit or mouse sera instead of the primary antibodies or omitting the primary antibodies in the incubation. Furthermore, when available, additional controls were carried out using specifically preabsorbed antisera. Under these conditions no positive immunoreactivity was observed (data not shown).

Results

The distribution of the mechanoproteins PIEZO1 and PIEZO2 was analyzed using immunohistochemistry and immunofluorescence (associated with confocal laser microscopy) techniques in sections from paraffin-embedded and decalcified adult teeth. The processing of the pieces was identical and following well-established protocols, but it is possible that the intensity of the immunostaining can be altered by the components used in the processes of decalcification. There were no differences in the location of the immunoreaction between the canines and the molars.

PIEZO1 was detected in a subpopulation of pulp cells near the dentin-pulp junction, within the odontoblast layer. However, the cells did not have the typical morphology of odontoblasts, and although immunolabelled processes were observed in some of them, in no case was immunoreactivity detected for PIEZO1 within the dentinal ducts (Fig. 1a-b). Positive PIEZO2 cells were also found in the odontoblast layer. They displayed a morphology like that of the PIEZO1 positive cells, and never that of mature odontoblasts; in addition, the presence of PIEZO2 was not observed in the dentinal tubules (Fig. 1c-d). The blood vessel walls of the pulp were also PIEZO2 positive. Space cells displaying PIEZO1 and PIEZO2 immunoreactivity were also observed in the core of the dental pulp, and occasionally also in the walls of the capillaries (data not shown).

When performing experiments of co-localization of PIEZO1 or PIEZO2 with vimentin (which specifically labels odontoblasts), it was observed that PIEZO1 and PIEZO2 positive cells, and vimentin positive cells represent two different and independent cell populations (Figs. 2 and 3). Therefore, cells displaying PIEZO1 and PIEZO2 are not mature odontoblasts, and presumably correspond to a subpopulation of dental pulp stem cells and/or pre-odontoblasts.

Strong immunostaining was detected for PIEZO1 (Fig. 4a) and PIEZO2 (Figs. 4b and c) in the periodontal ligament partially co-located with vimentin in the fibroblasts just at its junction with the cementum (Fig. 4d-f).

Discussion

Of all the possible mechanosensitive ion channels currently considered, only those of the Piezo family meet all the properties to be considered as such (Delmas and Coste, 2013; Ranade et al., 2015; Douguet and Honoré, 2019; Jin et al., 2020), and participate directly in mechanotransduction (Bagriantsev et al., 2014). Several studies have shown that different cell populations of the dental pulp express putative mechanoproteins like γ -ENa+C, ASIC2, or TRPV4 (Solé-Magdalena et al., 2011, 2018), and based on the expression of these ion channels and others, Magloire et al. (2009) considered odontoblasts as mechanosensitive cells.

In the present research, the presence of PIEZO1 and PIEZO2 in adult human teeth was investigated using immunohistochemistry. Expression of proteins was observed in a cellular subpopulation of the dental pulp and in the periodontal ligament. To the better of our knowledge this work is the first to analyze the presence of PIEZO1 and PIEZO2 in human teeth. Our findings do not agree with previous studies reporting the presence of PIEZO1 (Mousawi et al., 2020; Ohyama et al., 2022; Sun et al., 2022), and PIEZO2 in mouse odontoblasts (Khatibi Shahidi et al., 2015). Conversely, our results for PIEZO1 (Jin et al., 2015; Jiang et al., 2021) and PIEZO2 (Gao et al., 2017) in the periodontal ligament are in complete agreement with previously studies. We believe that the discrepancies in the results can be due to the different species studied, that many of the results were obtained from cell lines, and the techniques used. On the other hand, we have not found images suggesting the presence of PIEZO1 or PIEZO2 in the nerve fibers of the pulp even though they are present in neuronal subpopulations of the trigeminal ganglion and nerve fibers of the dental pulp (Won et al., 2017; Sato et al., 2018; Cho et al., 2022; Han et al., 2022).

The human dental pulp contains heterogeneous cell populations (Krivanek et al., 2020) not uniformly distributed but organized into four zones from the dentine to pulp core: the odontoblasts layer, the cell-free zone, the cell-rich zone, and the pulp core (Fox and Heeley, 1980; D'Aquino et al., 2008; Lizier et al., 2012; França et al., 2019). The external layer, in which we have found the PIEZO1 and PIEZO2 positive cells, is comprised of odontoblasts and dental pulp stem cells (DPSCs). Therefore, based on topographical, morphological and immunohistochemical criteria PIEZO1 and PIEZO2 positive cells we have observed are not mature odontoblasts, and surely they are pre-odontoblasts/DPSCs.

DPSC are mechanosensitive cells and can recognize mechanical changes and transform this information into cellular responses (Gao et al., 2017). Forces acting through PIEZO1 and PIEZO2 mediate the effects of mechanical stimuli on different cellular functions (Du et al., 2022). Mechanical stimuli can significantly increase DPSC proliferation in vitro (Han et al., 2008; Hata et al., 2012; Yang et al., 2018). In contrast, Yu et al. (2009) reported that mechanical forces were able to reduce DPSC survival and adhesion. Furthermore, Miyazaki et al. (2019) observed that during odontoblast differentiation PIEZO1 functions as a mechanotransducer that connects pressure signals to the intracellular signaling; no data exist for PIEZO2 in pre-odontoblasts/DPSC. If the PIEZO1 and PIEZO2 positive cells that we have identified in the human dental pulp are DPSC, it can be hypothesized that the forces acting PIEZO1 and / or PIEZO2 also participate in the differentiation of DPSC / pre-odontoblasts to odontoblasts. Regarding the periodontal ligament (PDL), it is a thin layer of fibrous connective tissue between the alveolar bone and cementum, and PDL cells are mechanosensitive and play a pivotal role in periodontal tissue homeostasis (De

Jong et al., 2017; Lin et al., 2021). They express PIEZO1 differentially adjustable by pressure (Jin et al., 2015; Shen et al., 2020) and PIEZO2 (Gao et al., 2017).

PIEZO 1 and PIEZO2 are present in the teeth but at present their functions are poorly understood and remains to be definitive established (Lin et al., 2022; Pei et al., 2021). Our findings suggest that human teeth maybe involved in differentiation from DPCs/pre-odontoblasts to odontoblasts but further studies are needed to confirm this hypothesis.

References

- Bagriantsev SN, Gracheva EO, Gallagher PG. Piezo proteins: regulators of mechanosensation and other cellular processes. *J Biol Chem.* 2014; 289:31673-81.
- Cai X, Zhang Y, Yang X, Grottkau BE, Lin Y. Uniaxial cyclic tensile stretch inhibits osteogenic and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5: 347-53.
- Cho YS, Han HM, Jeong SY, Kim TH, Choi SY, Kim YS, Bae YC. Expression of Piezo1 in the Trigeminal Neurons and in the Axons That Innervate the Dental Pulp. *Front Cell Neurosci.* 2022; 16: 945948.
- Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE, Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 2010; 330: 55-60.
- D'Aquino R., Papaccio G., Laino G., Graziano A. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008; 4: 21-6.
- de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res.* 2017; 52: 965-74.
- Delmas P, Coste B. Mechano-gated ion channels in sensory systems. *Cell* 2013; 155:278-84.
- Douguet D, Honoré E. Mammalian Mechanoelectrical Transduction: Structure and Function of Force-Gated Ion Channels. *Cell.* 2019; 179: 340-54.
- Du H, Bartleson JM, Butenko S, Alonso V, Liu WF, Winer DA, Butte MJ. Tuning immunity through tissue mechanotransduction. *Nat Rev Immunol.* 2023; 23:174-88.
- Fang XZ, Zhou T, Xu JQ, Wang YX, Sun MM, He YJ, Pan SW, Xiong W, Peng ZK, Gao XH, Shang Y. Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell Biosci.* 2021; 11: 13.
- Fox AG, Heeley JD. Histological study of pulps of human primary teeth. *Arch Oral Biol.* 1980; 25: 103-10.
- França CM, Riggers R, Muschler JL, Widbiller M, Lococo PM, Diogenes A, Bertassoni LE. 3D-Imaging of Whole Neuronal and Vascular Networks of the Human Dental Pulp via CLARITY and Light Sheet Microscopy. *Sci Rep.* 2019; 9:10860.
- Gao Q, Cooper PR, Walmsley AD, Scheven BA. Role of piezo channels in ultrasound-stimulated dental stem cells. *J Endod.* 2017; 43: 1130-6.
- Han HM, Jeong SY, Cho YS, Choi SY, Bae YC. Expression of Piezo2 in the dental pulp, sensory root and trigeminal ganglion and it's coexpression with vesicular glutamate transporters. *J Endod.* 2022; 8:S0099-2399(22)00509-X.

- Handler A, Ginty DD. The mechanosensory neurons of touch and their mechanisms of activation. *Nat Rev Neurosci.* 2021; 22: 521-37.
- Hata M, Naruse K, Ozawa S, Kobayashi Y, Nakamura N, Kojima N, Omi M, Katanosaka Y, Nishikawa T, Naruse K, Tanaka Y, Matsubara T. Mechanical stretch increases the proliferation while inhibiting the osteogenic differentiation in dental pulp stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2012; 19: 625-33.
- He Y, Guan X, Du Y, Liu G, Li Y, Wei Z, Shi C, Yang J, Hou T. Screening of differentially expressed miRNAs during osteogenic/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells exposed to mechanical stress. *Am J Transl Res.* 2021; 13: 11126-43.
- Honoré E, Martins JR, Penton D, Patel A, Demolombe S. The Piezo Mechanosensitive Ion Channels: May the Force Be with You! *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2015; 169:25-41.
- Ikeda R, Cha M, Ling J, Jia Z, Coyle D, Gu JG. Merkel cells transduce and encode tactile stimuli to drive A β -afferent impulses. *Cell.* 2014; 157:664-75.
- Jin P, Jan LY, Jan YN. Mechanosensitive Ion Channels: Structural Features Relevant to Mechanotransduction Mechanisms. *Annu Rev Neurosci.* 2020; 43:207-29.
- Jin Y, Li J, Wang Y, Ye R, Feng X, Jing Z, Zhao Z. Functional role of mechanosensitive ion channel Piezo1 in human periodontal ligament cells. *Angle Orthod.* 2015 ;85: 87-94.
- Jiang Y, Guan Y, Lan Y, Chen S, Li T, Zou S, Hu Z, Ye Q. Mechanosensitive Piezo1 in Periodontal Ligament Cells Promotes Alveolar Bone Remodeling During Orthodontic Tooth Movement. *Front Physiol.* 2021; 12: 767136.
- Kefauver JM, Ward AB, Patapoutian A. Discoveries in structure and physiology of mechanically activated ion channels. *Nature.* 2020; 587:567-76.
- Khatibi Shahidi M, Krivanek J, Kaukua N, Ernfors P, Hladik L, Kostal V, Masich S, Hampl A, Chubanov V, Gudermann T, Romanov RA, Harkany T, Adameyko I, Fried K (2015) Three-dimensional Imaging Reveals New Compartments and Structural Adaptations in Odontoblasts. *J Dent Res* 94:945-54.
- Krivanek J, Soldatov RA, Kastriti ME, Chontorotzea T, Herdina AN, Petersen J, Szarowska B, Landova M, Matejova VK, Holla LI, Kuchler U, Zdrilic IV, Vijaykumar A, Balic A, Marangoni P, Klein OD, Neves VCM, Yianni V, Sharpe PT, Harkany T, Metscher BD, Bajénoff M, Mina M, Fried K, Kharchenko PV, Adameyko I. Dental cell type atlas reveals stem and differentiated cell types in mouse and human teeth. *Nat Commun.* 2020; 11: 4816.
- Lin Y, Cheng T, Zhu S, Gu M, Jin L, Yang Y. mRNA and long non-coding RNA expression profiling of human periodontal ligament cells under tension loading. *Eur J Orthod.* 2021; 43: 698-707.
- Lin Y, Ren J, McGrath C. Mechanosensitive Piezo1 and Piezo2 ion channels in craniofacial development and dentistry: Recent advances and prospects. *Front Physiol.* 2022;13:1039714.
- Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One.* 2012; 7: e39885.
- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009; 312B:416-24.
- Marrelli M, Codispoti B, Shelton RM, Scheven BA, Cooper PR, Tatullo M, Francesco Paduano F. Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell Behavior. *Front Physiol.* 2018; 9: 1685.

- Miyashita S, Ahmed NE, Murakami M, Iohara K, Yamamoto T, Horibe H, Kurita K, Takano-Yamamoto T, Nakashima M. Mechanical forces induce odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on three-dimensional biomimetic scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 11: 434-46.
- Miyazaki A, Sugimoto A, Yoshizaki K, Kawarabayashi K, Iwata K, Kurogoushi R, Kitamura T, Otsuka K, Hasegawa T, Akazawa Y, Fukumoto S, Ishimaru N, Iwamoto T. Coordination of WNT signaling and ciliogenesis during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1. *Sci Rep.* 2019; 9:14762.
- Mousawi F, Peng H, Li J, Ponnambalam S, Roger S, Zhao H, Yang X, Jiang LH. Chemical activation of the Piezo1 channel drives mesenchymal stem cell migration via inducing ATP release and activation of P2 receptor purinergic signaling. *Stem Cells.* 2020; 38: 410-21.
- Nagel M, Chesler AT. PIEZO2 ion channels in proprioception. *Curr Opin Neurobiol.* 2022; 75:102572.
- Ohyama S, Ouchi T, Kimura M, Kurashima R, Yasumatsu K, Nishida D, Hitomi S, Ubaidus S, Kuroda H, Ito S, Takano M, Ono K, Mizoguchi T, Katakura A, Shibukawa Y. Piezo1-pannexin-1-P2X3 axis in odontoblasts and neurons mediates sensory transduction in dentinal sensitivity. *Front Physiol.* 2022;13:891759.
- Pei F, Liu J, Zhang L, Pan X, Huang W, Cen X, Huang S, Jin Y, Zhao Z. The functions of mechanosensitive ion channels in tooth and bone tissues. *Cell Signal.* 2021; 78:109877
- Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A. Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron* 2015; 87:1162-79.
- Sato M, Ogura K, Kimura M, Nishi K, Ando M, Tazaki M, Shibukawa Y. Activation of Mechanosensitive Transient Receptor Potential/Piezo Channels in Odontoblasts Generates Action Potentials in Cocultured Isolectin B4-negative Medium-sized Trigeminal Ganglion Neurons. *J Endod.* 2018; 44: 984-91.
- Shen Y, Pan Y, Guo S, Sun L, Zhang C, Wang L. The roles of mechanosensitive ion channels and associated downstream MAPK signaling pathways in PDLC mechanotransduction. *Mol Med Rep.* 2020; 21: 2113-22.
- Solé-Magdalena A, Martínez-Alonso M, Coronado CA, Junquera LM, Cobo J, Vega JA. Molecular basis of dental sensitivity: The odontoblasts are multisensory cells and express multifunctional ion channels. *Ann Anat.* 2018 Jan;215:20-29.
- Solé-Magdalena A, Revuelta EG, Menéñez-Díaz I, Calavia MG, Cobo T, García-Suárez O, Pérez-Piñera P, De Carlos F, Cobo J, Vega JA. Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. *Microsc Res Tech.* 2011; 74: 457-63.
- Sun XF, Qiao WW, Meng LY, Bian Z. PIEZO1 Ion Channels Mediate Mechanotransduction in Odontoblasts. *J Endod.* 2022; 48: 749-58.
- Swaminathan V, Gloerich M. Decoding mechanical cues by molecular mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2021; 72:72-80.
- Won J, Vang H, Lee PR, Kim YH, Kim HW, Kang Y, Oh SB. Piezo2 Expression in Mechanosensitive Dental Primary Afferent Neurons. *J Dent Res.* 2017; 96:931-7.
- Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy K, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A. Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature.* 2014; 509:622-6.
- Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42:57-71.

- Yang H, Shu YX, Wang LY, Zou WL, Guo LY, Shao MY, Gao QH, Hu T. Effect of cyclic uniaxial compressive stress on human dental pulp cells in vitro. *Connect Tissue Res.* 2018; 59: 255-62.
- Yu V, Damek-Poprawa M, Nicoll SB, Akintoye SO. Dynamic hydrostatic pressure promotes differentiation of human dental pulp stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 386: 661-5.

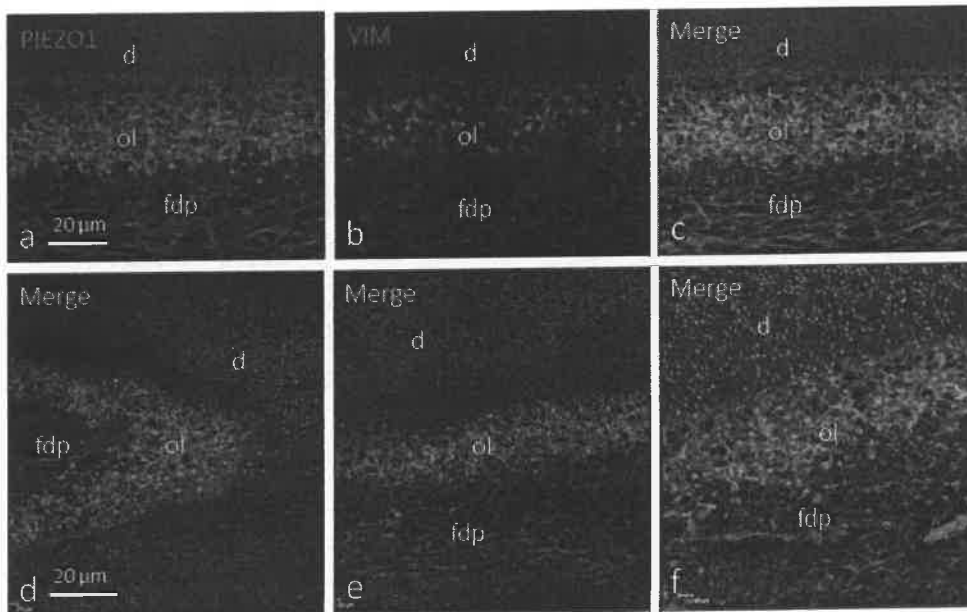
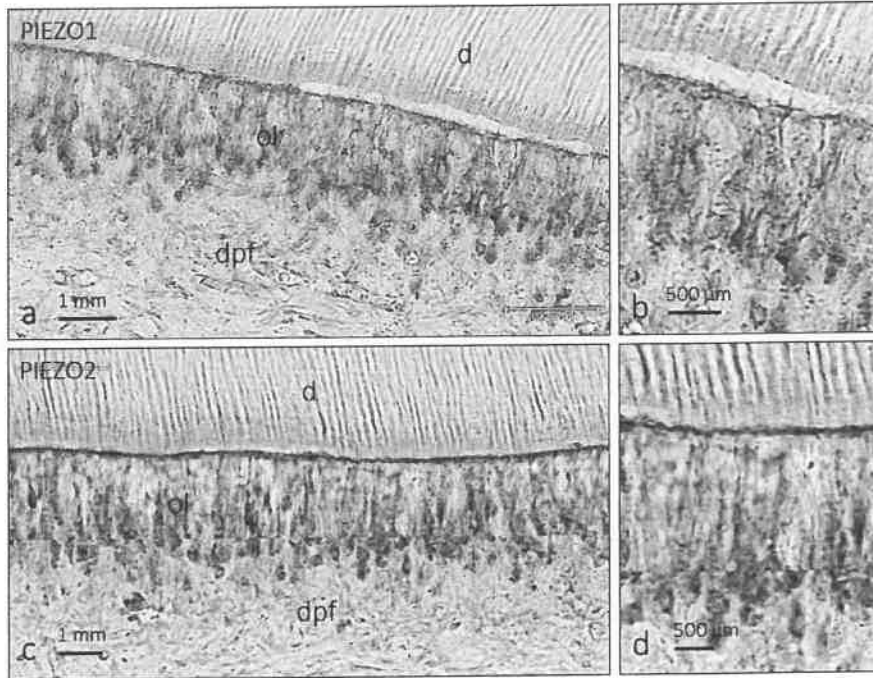
Legends for figures

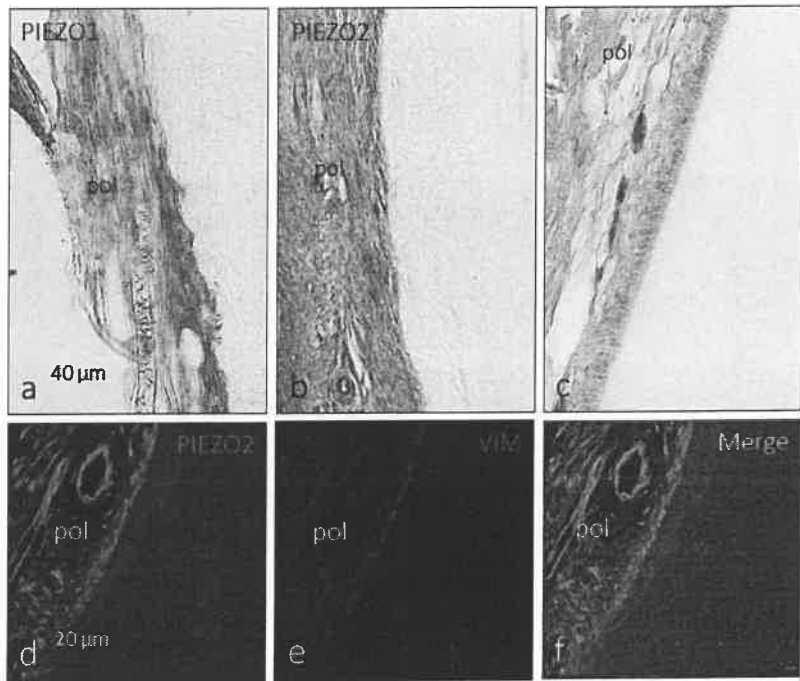
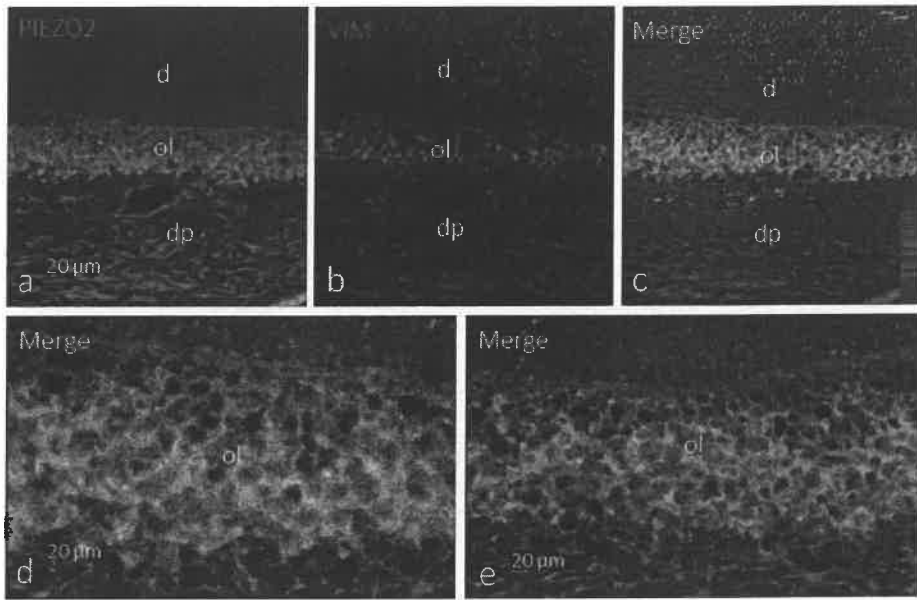
Figure 1.- Immunohistochemical detection of PIEZO1 (a,b) and PIEZO2 (c,d) in human teeth. Positive immunoreactivity for both proteins was detected a cell subpopulation present in the outer layer pulp. d: dentin; fdp: fibroblast of the dental pulp; ol: odontoblast layer.

Figure 2.- Double immunofluorescence showing the no co-localization of PIEZO1 (green fluorescence) and vimentin (red fluorescence), thus suggesting that that PIEZO1 is not present in mature odontoblasts. Lens 60/1.25 oil; pinhole resolution 1.XY 156 nm and resolution Z 334 nm. d: dentin; fdp: fibroblast of the dental pulp; ol: odontoblast layer.

Figure 3.- Double immunofluorescence showing the no co-localization of PIEZO2 (green fluorescence) and vimentin (red fluorescence), thus suggesting that that PIEZO2 is not present in mature odontoblasts. Lens 60/1.25 oil; pinhole resolution 1.XY 156 nm and resolution Z 334 nm. d: dentin; dp: dental pulp; ol: odontoblast layer.

Figure 4.- Immunohistochemical detection of PIEZO1 (a) and PIEZO2 (b,c) in human periodontal ligament. Double immunofluorescence (d,f) showing the no co-localization of PIEZO2 (green fluorescence) and vimentin (red fluorescence). Lens 60/1.25 oil; pinhole resolution 1.XY 156 nm and resolution Z 334 nm. pol: periodontal ligament.





RV: Anatomical Record Manuscript accepted - AR-23-0106.R2

JOSE ANTONIO VEGA ALVAREZ <javega@uniovi.es>

Mié 26/04/2023 12:49

Para: 'Yolanda García Mesa' <yolandagm_navia@hotmail.com>

De: Anatomical Record <onbehalf@manuscriptcentral.com>**Enviado:** lunes, 3 de abril de 2023 15:05**Para:** yolandagm_navia@hotmail.com <yolandagm_navia@hotmail.com>; pepe3214@gmail.com <pepe3214@gmail.com>; PATRICIA CUENDIAS FERNANDEZ <cuendiaspatricia@uniovi.es>; juancobodiaz@gmail.com <juancobodiaz@gmail.com>; OLIVIA GARCIA SUAREZ <garciaolivia@uniovi.es>; jgaitegarcia@gmail.com <jgaitegarcia@gmail.com>; JOSE ANTONIO VEGA ALVAREZ <javega@uniovi.es>; benjamin.martin@usc.es <benjamin.martin@usc.es>**Asunto:** Anatomical Record Manuscript Accepted - AR-23-0106.R2

Dear Dr. Yolanda García-Mesa:

Congratulations! Your manuscript, titled "IMMUNOLOCALIZATION OF THE MECHANOGATED ION CHANNELS PIEZO1 AND PIEZO2 IN HUMAN DENTAL PULP AND PERIODONTAL LIGAMENT", has been accepted for publication in The Anatomical Record.

CRedit Taxonomy: authors' contribution(s) to the submitted manuscript are attributed as below. Submitting Authors may provide Author Contributions at original submission but MUST provide the information at revised submission. At revision submission, all authors should check the contributions carefully as if your manuscript is accepted, this information will be included in the published article:

Author Contributions:
José Martín-Cruces: Conceptualization; Investigation; Methodology. Patricia Cuendias: Investigation; Visualization. Yolanda García-Mesa: Investigation; Methodology; Visualization. Juan L. Cobo: Investigation; Funding acquisition; Writing - original draft. Olivia García-Suárez: Conceptualization; Methodology; Writing - review & editing. Juan J. Gaite: Investigation; Validation; Methodology. José A. Vega: Conceptualization; Investigation; Writing - original draft; Writing - review & editing; Supervision. Benjamín Martín-Biedma: Conceptualization; Investigation; Methodology; Supervision.

This journal offers a number of license options for published papers; information about this is available here: https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html. The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

Thank you for your interest in The Anatomical Record.

Sincerely yours,

Heather F. Smith, Ph.D.

Editor-in-Chief, The Anatomical Record

Midwestern University

hsmith@midwestern.edu

03-Apr-2023

AR-23-0106.R2

Title

IN VIVO LOCALIZATION OF THE MECHANOGATED ION CHANNELS PIEZO1 AND PIEZO2 IN HUMAN DENTAL PULP AND PERIODONTAL LIGAMENT

Manuscript Files

Name	Type of File	Size
reference... 31.23 PIEZO1 IN DENTAL PULP.docx	Main Document - MS Word	326 KB
Figure 1.tif	Image	779 / KB
Figure 2.tif	Image	175.2 KB
Figure 3.tif	Image	189.8 KB
Figure 2.tif	Image	138.7 KB
Cover letter - Junji Sakai et al.doc	Cover letter / Comments	498.5 KB

Abstract

Background: PIEZO1 and PIEZO2 are essential components of mechanosensitive ion channels that are required for the development of the nervous system. PIEZO1 and PIEZO2 are widely expressed in various tissues and organs, including the heart, lung, and bone. PIEZO1 and PIEZO2 are also expressed in the pulp and periodontal ligament (PDL) of the tooth. While human studies are scarce, previous studies in rodent teeth have shown that PIEZO1 and PIEZO2 are expressed in the pulp and PDL. The aim of this study was to investigate the localization of PIEZO1 and PIEZO2 in human dental pulp and PDL. Methods: Immunohistochemical analysis was performed on human dental pulp and PDL sections. Results: PIEZO1 and PIEZO2 were localized in the pulp and PDL. PIEZO1 was localized in the pulp and PDL, while PIEZO2 was localized in the pulp and PDL. Conclusion: PIEZO1 and PIEZO2 are localized in the pulp and PDL. This study provides the first evidence of PIEZO1 and PIEZO2 localization in human dental pulp and PDL. Keywords: PIEZO1, PIEZO2, dental pulp, periodontal ligament, immunohistochemistry.

Authors

Name	Email	Country/Location	Roles
Junji Sakai 1, 2	jsakai@rad.nippon.com	Japan	Conception, Investigation, Methodology, Visualization

**IMMUNOLOCALIZATION OF THE MECHANOGATED ION CHANNELS
PIEZO1 AND PIEZO2 IN HUMAN DENTAL PULP AND PERIODONTAL
LIGAMENT**

Juan J. Gaité^{1,2*}, Antonio Solé-Magdalena^{1*}, Yolanda García-Mesa¹, Patricia Cuendias¹,
José Martín-Cruces¹, Olivia García-Suárez¹, José A. Vega^{1,3}, Benjamín Martín-Biedma⁴

¹Departamento de Morfología y Biología Celular, Grupo SINPOS, Universidad de Oviedo, Spain

²Unidad Dental, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, Spain

³Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Chile, Santiago, Chile

⁴Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

*These authors contributed equally to this paper

To whom all correspondence should be addressed

José A. Vega, M.D., Ph.D.
e-mail: javega@uniovi.es

Introduction

The process whereby cells convert mechanical inputs into electrical or biochemical signals is currently referred to as mechanotransduction. Many studies have investigated the effects of mechanical forces on dental pulp using animal and *in vitro* models. The various types of forces (stretching, pressure) that act on the teeth are transmitted to the dental pulp and can subsequently influence cell biology (Cai et al., 2011; Hata et al., 2012; Miyashita et al., 2017; Marrelli et al., 2018; Yang et al., 2018; He et al., 2021). Nevertheless, the mechanisms through which dental pulp cells sense the environmental forces are only partially known, and this is an essential step to determine how mechanical stimuli are converted into function, including lineage specification.

Strong candidates for mechanotransduction are mechano-gated ion channels of the cellular membrane belonging to different families and superfamilies, especially members of the Piezo family (Honoré et al., 2015; Ranade et al., 2015; Wu et al., 2017; Kefauver et al., 2020; Fang et al., 2021). Moreover, in this process also participate some extracellular matrix components and the cytoskeleton (Jin et al., 2020; Swaminathan and Gloerich, 2022). PIEZO1 and PIEZO2, are vertebrate stretch-gated multipass transmembrane proteins, required for nonselective cationic mechanosensitive channels in mammalian cells. Piezo channels are essential for mechanosensing (Ikeda et al., 2014; Woo et al., 2014; Handler and Ginty, 2021; Nagel and Chesler, 2022) but also participate in functions associated to mechano-associated biologic processes including cellular development, migration, proliferation, and elongation (Coste et al., 2010; Bagriantsev et al., 2014; Wu et al., 2017; Fang et al., 2021; Du et al., 2022).

Data about the occurrence and functioning of PIEZOs in the teeth are scarce. Functional PIEZO1 is expressed in the human pulp (Mousawi et al., 2020; Ohyama et al., 2022; Sun et al., 2022) and periodontal ligament (Jin et al., 2015; Jiang et al., 2021) whereas

rabbit against a synthetic peptide of human PIEZO2 with the sequence: VFGFWAFGKHSAAADITSSLSLSEDQVPGPFLVMVLIQFGT MVVD RALYLRK (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MS, USA), used diluted 1:200. Subsequently, the sections were incubated with the anti-rabbit EnVision system-labelled polymer (Dako-Cytomation) for 30 min, washed in buffer solution, and treated with peroxidase blocking buffer (Dako Cytomation). Finally, the slides were washed with buffer solution and the immunoreaction was visualized with diaminobenzidine as a chromogen, washed, dehydrated, and mounted with Entellan® (Merk, Darmstadt, Germany). To ascertain structural details the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Double immunofluorescence. Sections were also processed for simultaneous detection of PIEZO1 and PIEZO2 together with vimentin, a marker for odontoblasts, pulp fibroblasts, and fibroblasts of the periodontal ligament (Solé-Magdalena et al., 2011,2018). Non-specific binding was prevented by incubating the sections for 30 minutes with a solution of 25% calf bovine serum in tris-buffered saline (TBS), pH 7.4. The sections were incubated overnight at 4°C in a humid chamber with a 1:1 mixture of the polyclonal antibody against PIEZO1 or PIEZO2 described above (used diluted 1:100) with a mouse monoclonal antibody anti-vimentin (clone 334, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany, used diluted 1:500). After rinsing with TBS, the sections were incubated for 1 hour with CFL488-conjugated bovine anti-rabbit IgG (sc-362260, SantaCruz Biotech, CA, USA), diluted 1:200 in TBS, then rinsed again and incubated for another hour with CyTM3-conjugated donkey anti-mouse antibody (Jackson-ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA) diluted 1:100 in TBS. Both steps were performed at room temperature in a dark humid chamber. Sections were finally washed, and the cell nuclei were stained with DAPI (10 ng/ml). Triple fluorescence was

morphology like that the PIEZO1 positive cells, and never that of mature odontoblasts; in addition, the presence of PIEZO2 was not observed in the dentinal tubules (Fig. 1c-d). The blood vessel walls of the pulp were also PIEZO2 positive. Space cells displaying PIEZO1 and PIEZO2 immunoreactivity were also observed in the core of the dental pulp, and occasionally also in the walls of the capillaries (data not shown).

When performing experiments of co-localization of PIEZO1 or PIEZO2 with vimentin (which specifically labels odontoblast), it was observed that PIEZO1 and PIEZO2 positive cells, and vimentin positive cells represent two different and independent cell populations (Figs. 2 and 3). Therefore, cells displaying PIEZO1 and PIEZO2 are not mature odontoblasts, and presumably correspond to a subpopulation of dental pulp stem cells and/or pre-odontoblasts.

Strong immunostaining was detected for PIEZO1 (Fig. 4a) and PIEZO2 (Figs. 4b and c) in the periodontal ligament partially co-located with vimentin in the fibroblasts just at its junction with the cementum (Fig. 4d-f).

Discussion

Of all the possible mechanosensitive ion channels currently considered, only those of the Piezo family meet all the properties to be considered as such (Delmas and Coste, 2013; Ranade et al., 2015; Douguet and Honoré, 2019; Jin et al., 2020), and participate directly in mechanotransduction (Bagriantsev et al., 2014). Several studies have shown that different cell populations of the dental pulp express putative mechanoproteins like γ -ENa⁺C, ASIC2, or TRPV4 (Solé-Magdalena et al., 2011, 2018), and based on the expression of these ion channels and others, Magloire et al. (2009) considered odontoblasts as mechanosensitive cells.

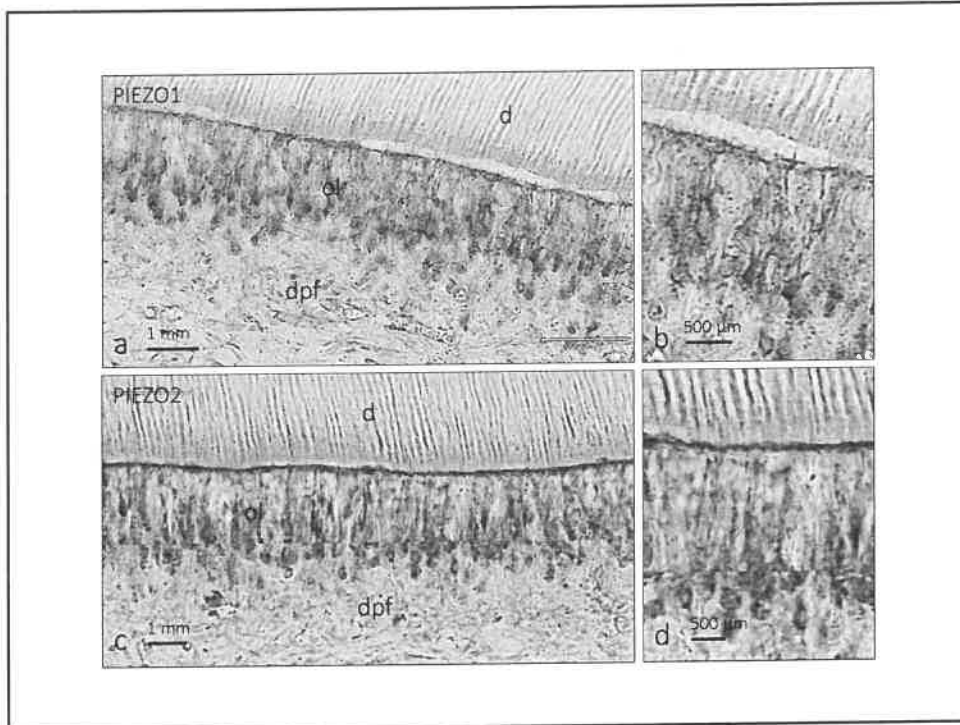
DPSC are mechanosensitive cells and can recognize mechanical changes and transform this information into cellular responses (Gao et al., 2017). Forces acting through PIEZO1 and PIEZO2 mediate the effects of mechanical stimuli on different cellular functions (Du et al., 2022). Mechanical stimuli can significantly increase DPSC proliferation in vitro (Han et al., 2008; Hata et al., 2012; Yang et al., 2018). In contrast, Yu et al. (2009) reported that mechanical forces were able to reduce DPSC survival and adhesion. Furthermore, Miyazaki et al. (2019) observed that during odontoblast differentiation PIEZO1 functions as a mechanotransducer that connects pressure signals to the intracellular signaling; no data exist for PIEZO2 in pre-odontoblasts/DPSC. If the PIEZO1 and PIEZO2 positive cells that we have identified in the human dental pulp are DPSCs, it can be hypothesized that the forces acting through PIEZO1 and / or PIEZO2 also participate in the differentiation of DPSC / pre-odontoblasts to odontoblasts. Regarding the periodontal ligament (PDL), it is a thin layer of fibrous connective tissue between the alveolar bone and cementum, and PDL cells are mechanosensitive and play a pivotal role in periodontal tissue homeostasis (De Jong et al., 2017; Lin et al., 2021). They express PIEZO1 differentially adjustable by pressure (Jin et al., 2015; Shen et al., 2020) and PIEZO2 (Gao et al., 2017).

PIEZO 1 and PIEZO2 are present in the teeth but at present their functions are poorly understood and remain to be definitively established (Lin et al., 2022; Pei et al., 2021). Our findings suggest that human teeth may be involved in differentiation from DPSCs/pre-odontoblasts to odontoblasts but further studies are needed to confirm this hypothesis.

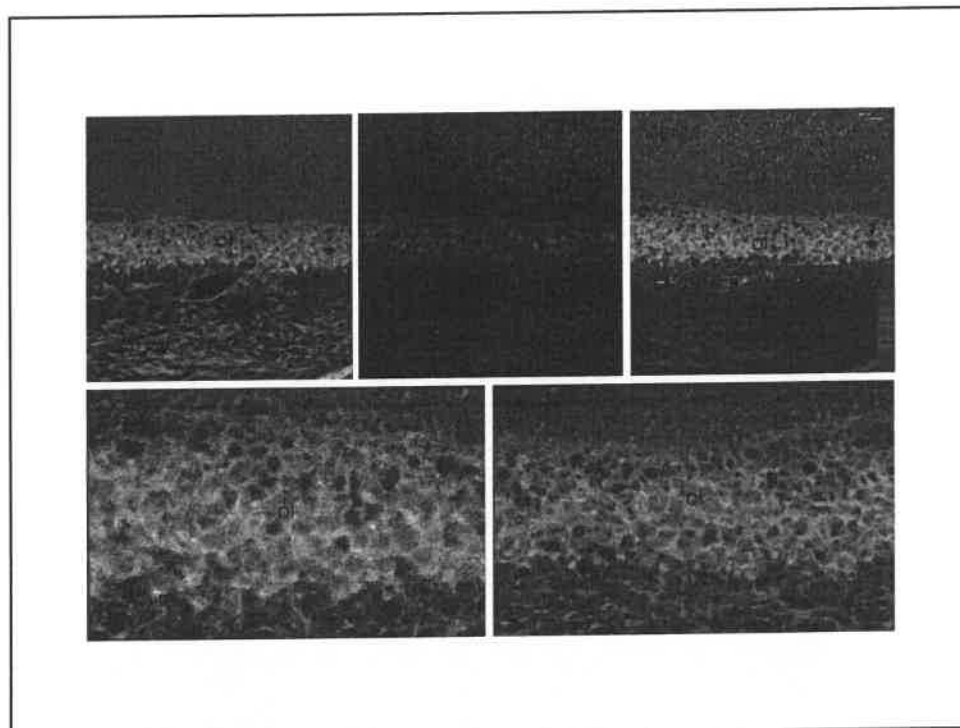
- Fang XZ, Zhou T, Xu JQ, Wang YX, Sun MM, He YJ, Pan SW, Xiong W, Peng ZK, Gao XH, Shang Y. Structure, kinetic properties and biological function of mechanosensitive Piezo channels. *Cell Biosci.* 2021; 11: 13.
- Fox AG, Heeley JD. Histological study of pulps of human primary teeth. *Arch Oral Biol.* 1980; 25: 103-10.
- França CM, Riggers R, Muschler JL, Widbiller M, Lococo PM, Diogenes A, Bertassoni LE. 3D-Imaging of Whole Neuronal and Vascular Networks of the Human Dental Pulp via CLARITY and Light Sheet Microscopy. *Sci Rep.* 2019; 9:10860.
- Gao Q, Cooper PR, Walmsley AD, Scheven BA. Role of piezo channels in ultrasound-stimulated dental stem cells. *J Endod.* 2017; 43: 1130-6.
- Han HM, Jeong SY, Cho YS, Choi SY, Bae YC. Expression of Piezo2 in the dental pulp, sensory root and trigeminal ganglion and it's coexpression with vesicular glutamate transporters. *J Endod.* 2022; 8:S0099-2399(22)00509-X.
- Handler A, Ginty DD. The mechanosensory neurons of touch and their mechanisms of activation. *Nat Rev Neurosci.* 2021; 22: 521-37.
- Hata M, Naruse K, Ozawa S, Kobayashi Y, Nakamura N, Kojima N, Omi M, Katanosaka Y, Nishikawa T, Naruse K, Tanaka Y, Matsubara T. Mechanical stretch increases the proliferation while inhibiting the osteogenic differentiation in dental pulp stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2012; 19: 625-33.
- He Y, Guan X, Du Y, Liu G, Li Y, Wei Z, Shi C, Yang J, Hou T. Screening of differentially expressed miRNAs during osteogenic/odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells exposed to mechanical stress. *Am J Transl Res.* 2021; 13: 11126-43.

- Lin Y, Cheng T, Zhu S, Gu M, Jin L, Yang Y. mRNA and long non-coding RNA expression profiling of human periodontal ligament cells under tension loading. *Eur J Orthod.* 2021; 43: 698-707.
- Lin Y, Ren J, McGrath C. Mechanosensitive Piezo1 and Piezo2 ion channels in craniofacial development and dentistry: Recent advances and prospects. *Front Physiol.* 2022;13:1039714.
- Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, Kerkis I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS One.* 2012; 7: e39885.
- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009; 312B:416-24.
- Marrelli M, Codispoti B, Shelton RM, Scheven BA, Cooper PR, Tatullo M, Francesco Paduano F. Dental Pulp Stem Cell Mechanoresponsiveness: Effects of Mechanical Stimuli on Dental Pulp Stem Cell Behavior. *Front Physiol.* 2018; 9: 1685.
- Miyashita S, Ahmed NE, Murakami M, Iohara K, Yamamoto T, Horibe H, Kurita K, Takano-Yamamoto T, Nakashima M. Mechanical forces induce odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on three-dimensional biomimetic scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017; 11: 434-46.
- Miyazaki A, Sugimoto A, Yoshizaki K, Kawarabayashi K, Iwata K, Kurogoushi R, Kitamura T, Otsuka K, Hasegawa T, Akazawa Y, Fukumoto S, Ishimaru N, Iwamoto T. Coordination of WNT signaling and ciliogenesis during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1. *Sci Rep.* 2019; 9:14762.
- Mousawi F, Peng H, Li J, Ponnambalam S, Roger S, Zhao H, Yang X, Jiang LH. Chemical activation of the Piezo1 channel drives mesenchymal stem cell migration

- transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. *Microsc Res Tech.* 2011; 74: 457-63.
- Sun XF, Qiao WW, Meng LY, Bian Z. PIEZO1 Ion Channels Mediate Mechanotransduction in Odontoblasts. *J Endod.* 2022; 48: 749-58.
- Swaminathan V, Gloerich M. Decoding mechanical cues by molecular mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol.* 2021; 72:72-80.
- Won J, Vang H, Lee PR, Kim YH, Kim HW, Kang Y, Oh SB. Piezo2 Expression in Mechanosensitive Dental Primary Afferent Neurons. *J Dent Res.* 2017; 96:931-7.
- Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy K, Lumpkin EA, Stucky CL, Patapoutian A. Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature.* 2014; 509:622-6.
- Wu J, Lewis AH, Grandl J. Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem Sci.* 2017; 42:57-71.
- Yang H, Shu YX, Wang LY, Zou WL, Guo LY, Shao MY, Gao QH, Hu T. Effect of cyclic uniaxial compressive stress on human dental pulp cells in vitro. *Connect Tissue Res.* 2018; 59: 255-62.
- Yu V, Damek-Poprawa M, Nicoll SB, Akintoye SO. Dynamic hydrostatic pressure promotes differentiation of human dental pulp stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 386: 661-5.



1



2