

Una década de investigación en células madre de la cavidad oral: Explorando su rol en la generación de células grasas

A decade of oral cavity stem cell research: Exploring their role in the generation of fat cells

Beatriz A. Rodas Junco^{13,14,15}

Geovanny Nic Can^{13,14,15}

Fernando Aguilar Ayala¹⁶

Leydi Carrillo Cocom¹⁷

Rafael Rojas Herrera¹⁷

Resumen

Las células madre son objeto de investigaciones constantes debido a su prometedora aplicación en terapia celular, por su capacidad de generar diversos tipos celulares. En particular, las encontradas en la cavidad bucal son una fuente de obtención prometedora, porque pueden ser aisladas de tejidos dentales o de dientes temporales y permanentes. Además, tienen la capacidad de generar células de “grasa” o adipogénicas, aptas para estudios relacionados con la obesidad. En el año 2024 se cumple una década de inicio de la Línea de investigación en Células Troncales de Origen Dental en la UADY, a través del Programa Investigadoras e Investigadores por México-CONAHCYT. En este artículo se presenta

13 CONAHCYT-Facultad de Ingeniería Química. Cuerpo Académico de Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Autónoma de Yucatán.

14 Laboratorio de Células Troncales. Facultad de Odontología. Universidad Autónoma de Yucatán.

15 Autor para correspondencia: beatriz.rodas@correo.uady.mx; geovanny.nic@correo.uady.mx

16 Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán.

17 Facultad de Ingeniería Química. Universidad Autónoma de Yucatán.



un resumen de las investigaciones que se han realizado en el estudio de la adipogénesis empleando células de la cavidad oral, con el fin de contribuir al conocimiento sobre los mecanismos moleculares involucrados en tal proceso, que pueda incidir en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la obesidad.

Palabras clave: células madre, células troncales de la pulpa dental, adipogénesis.

Abstract

Stem cells are the subject of constant research due to their promising application in cell therapy because of their capacity to generate various cell types. Those found in the oral cavity are a promising source of procurement because they can be isolated from dental tissues or from primary and permanent teeth. In addition, they have the capacity to generate “fat” or adipogenic cells, suitable for obesity-related studies. The year 2024 marks a decade since the beginning of the research line on Stem Cells of Dental Origin at UADY, through the Researchers for Mexico-CONAHCYT Program. This article presents a summary of the research that has been carried out in the study of adipogenesis using cells from the oral cavity, with the aim of contributing to the knowledge of the molecular mechanisms involved in this process, which may have an impact on the treatment of obesity-related diseases.

Keywords: stem cells, dental pulp stem cells, adipogenesis.

Introducción

El término “células madre”(1) ha cobrado gran relevancia en las últimas tres décadas. Estas son un tipo de células que presentan características especiales, como la autorrenovación y plasticidad. La autorrenovación describe la facultad que poseen de dividirse y crear otras células idénticas a ellas. A su vez, la plasticidad define la capacidad para especializarse (diferenciarse), generando células con diversas funciones, las cuales conforman la totalidad de un organismo.

Debido a la disponibilidad de ese tipo de células en algunos tejidos adultos y, a la capacidad que tienen para generar diversas células (linajes celulares) del cuerpo completo, existe un interés genuino por conocer cuáles son los procesos biológicos que guían la especialización para la generación de los diversos linajes celulares a partir de ellas. Este conocimiento y, el dominio técnico de los procesos de obtención de CM de tejidos adultos, así como de los métodos de diferenciación, se prevén contribuyan al establecimiento de terapias para la regeneración de tejidos u órganos dañados (medicina regenerativa) y, en general, a otros tipos de terapias celulares para enfermedades oncológicas, degenerativas e inmunológicas, entre otras.

Entre las diferentes poblaciones de CM, existen algunas que destacan por su potencial regenerativo. Una de ellas son las células madre mesenquimales (CMM), las cuales pueden originar tipos celulares que, de forma natural, se derivan de las capas celulares que se establecen durante el desarrollo del embrión: el endodermo, que origina los órganos internos; el ectodermo, responsable de las estructuras externas como la piel y el sistema nervioso; y el mesodermo, que da lugar a los tejidos de soporte y conectivo.

De manera particular, las CM de origen dental (CMOD) son CMM con un alto potencial de autorrenovación y capaces de especializarse en tipos celulares tales como células de hueso (osteogénicas), de cartílago (condrogénicas), de grasa (adipogénicas), del sistema nervioso (neurogénicas) y de origen dental (odontogénicas) (2). Las CMOD se han aislado con éxito de la pulpa dental contenida dentro de los dientes permanentes (muelas del juicio) o de leche exfoliados (dientes de leche) y, de tejidos circundantes a las piezas dentales, como ligamentos periodontales, folículos dentales y papilas gingivales y apicales (2). Se cree que la plasticidad de las CMOD es debido a que la cavidad oral surge como resultado de interacciones complejas entre una población de células embrionarias transitorias (de mayor plasticidad) en la superficie inferior de la mesénquima y el ectodermo, en un proceso denominado odontogénesis. En esta revisión, se describe una década de investigación con las CMOD en la UADY destacando los resultados generados en el tema de diferenciación a células adiposas, que podrían ofrecer avances significativos en la generación de conocimientos



para, en un futuro, aplicarlos en la práctica clínica, en relación con la obesidad.

El inicio de la investigación en células madre de origen dental en la UADY

La línea de investigación en CMOD tuvo su inicio en la UADY en el 2014 con el proyecto Cátedras-CONAHCYT titulado “Caracterización epigenética de células madre de la pulpa dental con fines de uso en terapia celular”. Para desarrollar el proyecto se enfrentaron varios retos. Uno de los primeros fue la implementación de un espacio especializado para el cultivo de las CMOD. Por tal motivo, el 28 de agosto del 2017, nació el Laboratorio Traslacional de Células Troncales de la Cavidad Bucal (LTCTCB) como un esfuerzo conjunto entre los directores Dra. Marcela Zamudio de la Facultad de Ingeniería Química (FIQ) y el Dr. Fernando Aguilar Ayala de la Facultad de Odontología (FO). Este laboratorio fue concebido para el desarrollo de investigación básica interdisciplinaria en el área de CMOD, participando Investigadores por México (IXM; Dra. Beatriz A. Rodas Junco y Dr. Geovanny Nic Can), investigadores de la FIQ (Dra. Leydi Carrillo Cocom y Dr. Rafael Rojas Herrera) e investigadores de la FO (Dr. David Aguilar Pérez, Dr. Ricardo Peñaloza Cuevas y M. en C. Nelly Castro). A continuación, se abordan aspectos generales de las CMOD, así como las investigaciones realizadas en esta década.

Células madre dentales

En el 2000, Gronthos et al, descubrieron que el cultivo de tejidos derivados del interior de las piezas dentales contenía poblaciones celulares con características mesenquimales, capaces de autorrenovarse y diferenciarse en diferentes tipos celulares, por lo cual fueron bautizadas como células troncales de la pulpa dental (CTPD) (3). Este hecho cautivó la búsqueda de poblaciones celulares que derivaron rápidamente en el aislamiento y caracterización de células troncales de dientes deciduos (CTDD), células troncales de la papila apical (CTPA), células troncales del folículo dental (CTFD), células troncales derivadas de la gingival (CTDG), células troncales del germen dental (CTGD), células troncales

del ligamento periodontal (CTLP) y células troncales de la medula ósea alveolar (CTMOA).

El estudio de estas células en el laboratorio ha demostrado que exhiben múltiples proteínas en su superficie propias de CTM. Entre estas proteínas, se incluyen las llamadas CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146, y STRO-1, entre otras. Además, también se ha demostrado que todas estas poblaciones presentan algunas proteínas asociadas con células madre embrionarias (OCT4, SOX2 o KLF4), las cuales se forman durante las primeras etapas del desarrollo del embrión y tienen una mayor capacidad de diferenciación. Además, las CMOD exhiben características inmunosupresoras, alta proliferación y capacidad para diferenciarse hacia odontoblastos, condrocitos, osteoblastos, neuronas y adipocitos. Específicamente, en nuestro laboratorio se han adaptado diversos protocolos de aislamiento, expansión y caracterización celular que en conjunto ha permitido almacenar diversas líneas celulares con características mesenquimales para diversos estudios de diferenciación celular (Figura 1). Por ejemplo, hemos aislado y comparado las características biológicas de poblaciones celulares incluyendo CTLP, CTFD y CTPD. Hemos observado que las CTFD tienen una excelente capacidad de autorrenovación en comparación con las CTLP y CTPD, y que difieren en su potencial de diferenciación osteogénica y adipogénica. Siendo esta última, el motivo de investigación de nuestro grupo por la importancia relevante en torno al padecimiento de la obesidad.

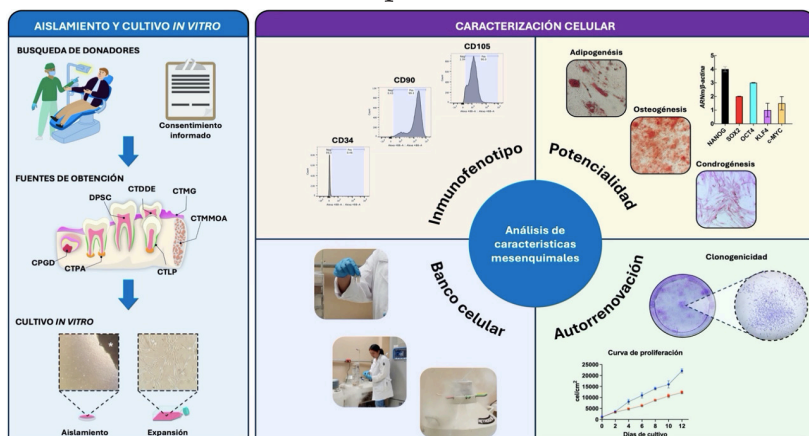


Figura 1. Aislamiento, expansión y criopreservación de las células madre de origen dental en el Laboratorio de Células Troncales de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán.



Diferenciación adipogénica de células madre y su relación con la obesidad

La comprensión de los mecanismos biológicos que contribuyen a la especialización de las CM para generar “grasa”, durante el proceso conocido como “diferenciación adipogénica”, podría aportar conocimientos valiosos para la identificación de futuros enfoques terapéuticos contra la obesidad. Esta condición médica, definida como un exceso de grasa corporal, está asociada a diversas enfermedades como las cardiovasculares, el cáncer y la diabetes tipo 2, entre otros padecimientos que acortan la esperanza de vida en todo el mundo.

Se sabe que diversos tejidos del cuerpo humano contienen tejido adiposo. Así se pueden encontrar adipocitos en las regiones viscerales y subcutáneas (como el abdomen, la cadera, el muslo y el glúteo) y, en pequeños depósitos, como en los músculos, en la medula ósea, en la cara, en las articulaciones, en el pecho y en la piel (4). En estos sitios se pueden encontrar, además, diversos tipos de adipocitos: blancos, marrones y beige. Los adipocitos blancos conforman el tejido adiposo blanco (TAB) que representa al menos el 10% del peso corporal de un individuo saludable normal. En general, se sabe que todos los adipocitos se generan a partir de células mesenquimales para cumplir la función de almacenamiento de energía y regulación de la temperatura, así como de regulación inmune y hormonal. Si bien los adipocitos contenidos en los tejidos adiposos tienen funciones esenciales, el consumo excesivo de calorías incrementa los niveles de tejido adiposo lo cual puede resultar en diversas complicaciones de salud (5). Por tal motivo, el control de la adipogénesis es esencial.

La diferenciación adipogénica requiere de instrucciones precisas para que las CMM generen nuevos adipocitos, durante dos etapas reconocidas (6). Las instrucciones permiten que, en la primera etapa, las CMM generen células con la habilidad de decidir el linaje adipogénico. En la segunda etapa, estas señales permiten que las células pre-adipogénicas terminen su maduración y adquieran sus funciones de transporte, síntesis y almacenamiento de lípidos (Figura 2).

Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos moleculares que contribuyen a la especialización de las CM para generar adipocitos

podría aportar conocimientos valiosos para la identificación de futuros enfoques terapéuticos contra la obesidad. Actualmente, se ha sugerido que algunos mecanismos a nivel del interior celular participan mediando las interacciones entre los genes y el ambiente en la obesidad (7, 8).

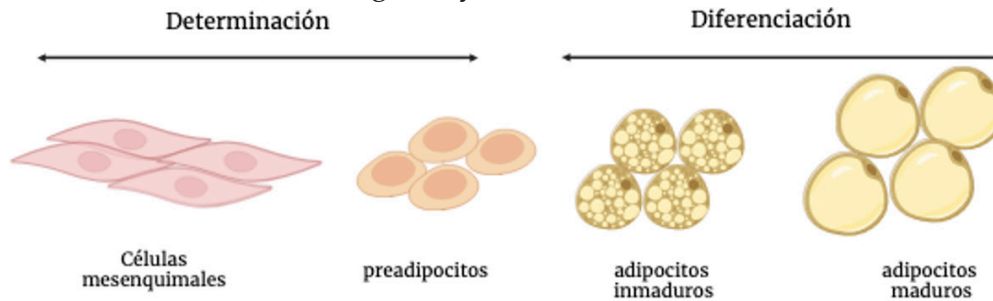


Figura 2. Etapas del proceso de diferenciación adipogénica a partir de CMM. La adipogénesis inicia con la etapa de determinación, en la cual las CM se comprometen hacia el linaje adipogénico, mientras que, en la etapa de diferenciación, los pre-adipocitos adquieren las características específicas de los adipocitos maduros.

Establecimiento del modelo adipogénico en las células troncales dentales

Los estudios sobre el proceso adipogénico tienen la finalidad de ampliar el panorama sobre la biología de los adipocitos y comprender a detalle los mecanismos que subyacen al compromiso adipogénico. Gran parte del conocimiento sobre este proceso se deriva de modelos celulares de ratón, entre los que destacan líneas celulares derivadas de fibroblastos de tejido adiposo de ratón (línea 3T3-L1) y los fibroblastos embrionarios de ratón (9). Sin embargo, el estudio de la adipogénesis en células humanas ha ganado importancia por la confiabilidad que se les puede otorgar en el estudio de enfermedades humanas. Desafortunadamente, estos estudios se han centrado en las células troncales del tejido adiposo (CTTA) seguidas por las células troncales de la médula ósea (CTMO), donde se ha utilizado medios de inducción comerciales para esos tipos celulares. Desafortunadamente, aun cuando se ha descrito que el establecimiento del ambiente adipogénico es “sencillo”, esta depende de múltiples señales intracelulares que modifican la respuesta celular y por lo tanto condicionan la respuesta de las células. Esto indica que cada tipo celular podría requerir estímulos específicos para la generación de los



adipocitos. Por ejemplo, aun cuando las CTTA y las CTMO que derivan de la misma capa germinal (mesodermo), estas difieren en su capacidad adipogénica (8). Siendo entonces más sencillo obtener adipocitos de las CTTA comparado con las CTMO. De ahí que la obtención de adipocitos a partir de linajes celulares no relacionados al tejido adiposo es un verdadero reto.

En la literatura, se ha reportado que los componentes fundamentales para inducir la formación de adipocitos a partir de CM humanas son la insulina (In), la isobutil-metil xantina (IBMX) y la dexametasona (D), así como la indometacina (I). Estos fármacos estimulan la proliferación de las células y la expresión de genes asociados al proceso adipogénico. Sin embargo, la concentración de estos componentes para inducir la adipogénesis a partir de CMOD varía considerablemente de un protocolo a otro, por lo que nuestros esfuerzos iniciales por replicarlos para inducir la adipogénesis fueron nulos. Es por ello que nos dimos a la tarea de optimizar una metodología para la inducción de la adipogénesis a partir de las CMOD obtenidas en nuestro laboratorio.

Después de analizar la composición del medio de inducción adipogénica (MIA) reportada, y tras mantener los niveles constantes de IBMX e In, observamos que las elevadas concentraciones de D e I en el medio de cultivo no producían células adiposas. Por el contrario, al reducir la concentración de estos últimos compuestos, observamos la acumulación de pequeñas gotas lipídicas en el interior de las CTPD derivadas de dos diferentes donadores (10). Lo que sugería la replicabilidad del medio de cultivo para la inducción adipogénica. Para validar este pequeño hallazgo, la respuesta adipogénica se evaluó en diferentes líneas celulares de la cavidad oral. Los resultados revelaron que las CTFD son las más responsivas, seguidas por las CTLP y las CTPD con una capacidad intermedia y una baja capacidad respectivamente (10). La diferencia entre las CMOD en su capacidad de respuesta adipogénica abrió la puerta para iniciar estudios moleculares y epigenéticos que influyen en la decisión celular para convertir una célula dental en un adipocito.

Regulación epigenética de la diferenciación en las CMOD

La evidencia actual indica que la regulación epigenética es uno de los mecanismos que definen las instrucciones específicas para que las CM puedan convertirse en diversos tipos celulares. Pero ¿qué son los mecanismos epigenéticos? Los mecanismos epigenéticos, son modificaciones químicas (marcas) que decoran el ADN y a las proteínas que empaquetan el ADN (histonas) que son colocadas y eliminadas de una manera dinámica por enzimas, generando el "encendido" y "apagado" de genes (Figura 3). Entre las “marcas epigenéticas” que estudiamos en el grupo están la metilación en el ADN y la acetilación en las histonas.

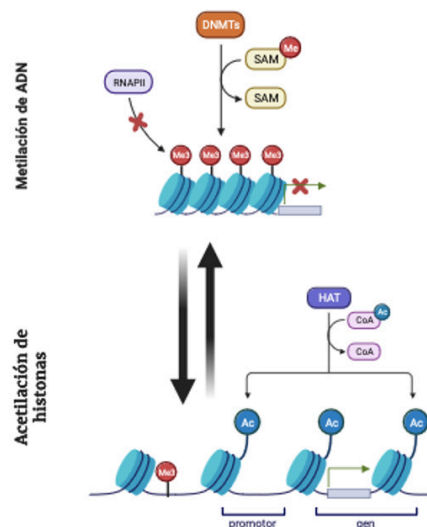


Figura 3. Panorama representativo de las modificaciones epigenéticas en el “encendido” y “apagado” de genes. Los cambios dinámicos en la metilación del ADN (adición y eliminación de grupos metilo; Me) o en la acetilación de las histonas (adición o eliminación de grupos acetilo; Ac) permiten encender y apagar la expresión de muchos genes.

Metilación del ADN y acetilación en histonas durante la adipogénesis de las células troncales de la cavidad oral

La metilación, representada como 5meC, es un fenómeno que ocurre durante el proceso de diferenciación y es clave para la generación de células especializadas. Este consiste en la adición de un grupo metilo (Me) a los nucleótidos de citosina (C) en el ADN de las células, por enzimas especializadas denominadas metiltransferasas de ADN (DNMT). La



adición de los grupos metilos impide la lectura del ADN, lo que conlleva a la represión de ciertos genes y a cambios a nivel celular (Figura 4A). Sin embargo, la marca 5meC no es estática y puede ser eliminada por otras moléculas nombradas desmetilasas de ADN (TET), para permitir la lectura del ADN.

En nuestro grupo de investigación, ha sido de interés conocer el papel que juega la metilación en la capacidad de las CTPD en la diferenciación adipogénica. Reportes recientes indican que las CTPD cultivadas en medio de inducción adipogénica son incapaces de almacenar lípidos (11). En particular, porque estas células carecen de las instrucciones apropiadas, para generar adipocitos, ya que parecen seguir fuertes instrucciones para generar osteoblastos, odontoblastos e incluso células neurales, los cuales parecen ser indicados por el perfil de metilación del ADN. Es por lo anterior que nos preguntamos si en las CTPD esta marca podría representar una barrera que interfiere con su flexibilidad hacia el tipo adipogénico.

A través de un estudio comparativo, encontramos que las instrucciones moleculares, como la expresión de genes propios de células adiposas (*PPAR γ 2*, *LPL* y *ADIPOQ*) se encuentran reducidos en las CTPD, pero no en las CTLP. Por el contrario, las instrucciones para decorar el ADN con 5meC (genes DNMTs), son más altas en las CTPD que en las CTLP. Además, el principal instructor para generar adipocitos (gen *PPAR γ 2*) se encuentra enriquecido con 5meC (12). Lo cual sugiere que las DNMTs podrían estar impidiendo a las CTPD seguir las indicaciones para convertirse en células de grasa.

Aunque la metilación del ADN es el cambio epigenético más estudiado, cada vez se reconoce que las modificaciones químicas que sufren las proteínas histonas después de ser producidas por las células pueden afectar el encendido y apagado de los genes. Una de estas modificaciones es la acetilación, la cual puede alterar la organización de la cromatina (fibra condensada compuesta por ADN y proteínas llamadas histonas en las células). La acetilación es un proceso dinámico que está bajo el control de dos enzimas llamadas histonas acetiltransferasas (HATs) e histonas desacetilasas (HDACs). Las HATs adicionan un grupo químico acetilo a los residuos del aminoácido lisina (K), los cuales son

componentes básicos de las histonas. Lo anterior favorece el acceso de la maquinaria que contribuye a la expresión de los genes, con las repercusiones a nivel de producción de proteínas y de las características celulares. Por el contrario, las HDACs promueven el retiro del grupo acetilo impidiendo la expresión de los genes (Figura 4B).

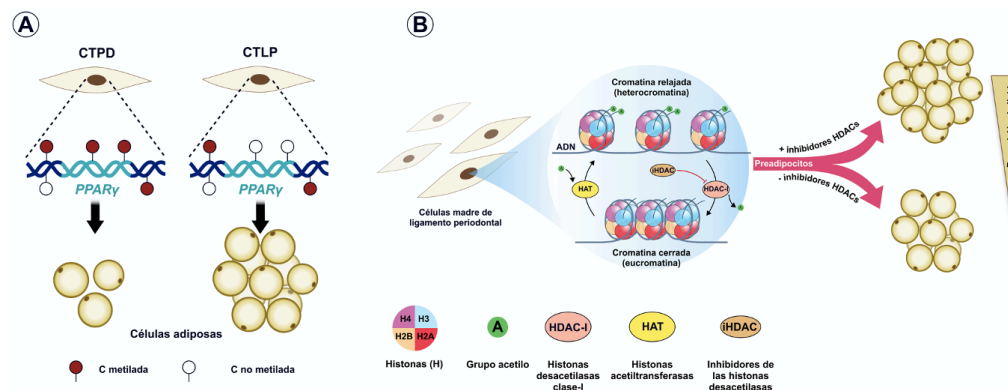


Figura 4. Influencia de la metilación del ADN en las células troncales de pulpa dental (CTPD) y la acetilación en H3K9 en células troncales de ligamento periodontal (CTLP) durante la generación de adipocitos. (A) La presencia o ausencia de 5meC en el ADN de las CTPD, influye negativamente en la formación de células con grasa, (B) mientras que en las CTLP la acetilación en H3K9ac favorece un incremento en la cantidad de células adiposas.

La participación de la acetilación en histonas en la generación de tipos celulares como el adipogénico aun no es clara. Por lo que en los últimos cinco años nos hemos centrado en analizar la contribución de la acetilación en el aminoácido “lisina 9” de la proteína “histona H3” (H3K9ac), en la apertura de la cromatina. Esta apertura es importante porque permite el encendido de genes reguladores durante la diferenciación celular. Debido a lo anterior, nos preguntamos ¿cuál es la contribución de la acetilación H3K9ac en el proceso molecular que regula la adipogénesis a partir de CM de origen dental? Para responder a ello, se eligió a las CTLP como modelo de estudio, por ser un tipo de células que poseen una alta flexibilidad hacia el linaje adipogénico (10, 12). La estrategia metodológica fue disminuir mediante el uso de fármacos el retiro de los grupos acetilo, como lo realizan las HDACs, para posteriormente identificar si se incrementa la acetilación H3K9ac



en el genoma de las CTLP (13). Nuestros hallazgos indican que la presencia de los fármacos como TSA favorece un enriquecimiento de H3K9 en regiones donde se controla la expresión del gen maestro *PPAR γ* , generando un aumento en el número de células adiposas y con mayor contenido de grasa (Montero del Toro, in press 2024). Aunque nuestros resultados son alentadores, se requieren más estudios adicionales para comprender si las DNMTs y TETs en el ADN o H3K9ac en las histonas impiden o contribuyen en la formación de células de grasa. Esto en un futuro será útil para combatir la obesidad.

Conclusiones

La Línea de Investigación en Células Madre de Origen Dental en la UADY ha favorecido el fortalecimiento académico con colegas de las Facultades de Ingeniería Química y Odontología generando publicaciones conjuntas. Asimismo, se ha articulado la actividad docente de pre y posgrado con la labor de investigación en esta área emergente en la medicina regenerativa. Esto ha permitido que el grupo de investigación sea un referente científico en el sureste de México en el área de células madre. En el ámbito de investigación, las CMOD ofrece un modelo biológico muy interesante para el estudio de los mecanismos epigenéticos involucrados en los procesos para generar un tipo especializado de células. Lo cual es relevante para abordar problemáticas de salud pública como la obesidad o diabetes.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Programa Cátedras-Conahcyt, 2014, Ciencia Básica-Conahcyt (ID: A1-S-38758); Ciencia de Frontera 2019, 2023 (ID:429849, ID:2023-1-1680) y del Programa Seeding Labs (2018, 2022). Los autores agradecen a la Facultad de Ingeniería Química y la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán por el apoyo brindado durante los 10 años. Un agradecimiento especial a todos los tesisistas de pregrado y posgrado de la Facultad de Ingeniería Química y Facultad de Odontología, así como a la posdoctorante Dra. Angélica Serralta Interian. Todos ellos han contribuido al fortalecimiento de la línea de investigación en Células Troncales de origen dental en la UADY.

Referencias

1. Deisenroth et al. (2014). MYC is an early response regulator of human adipogenesis in adipose stem cells. *PLoS One* 9, e114133. 10.1371/journal.pone.0114133.
2. Rodas-Junco et al. (2017). Stem Cells from Dental Pulp: What Epigenetics Can Do with Your Tooth. *Front Physiol* 8, 999. 10.3389/fphys.2017.00999.
3. Gronthos et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13625-13630. 10.1073/pnas.240309797.
4. Ghaben, A.L., and Scherer, P.E. (2019). Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10.1038/s41580-018-0093-z.
5. Machado et al. (2022). Browning of the white adipose tissue regulation: new insights into nutritional and metabolic relevance in health and diseases. *Nutr Metab (Lond)* 19, 61. 10.1186/s12986-022-00694-0.
6. Matsushita, K., and Dzau, V.J. (2017). Mesenchymal stem cells in obesity: insights for translational applications. *Lab Invest* 97, 1158-1166. 10.1038/labinvest.2017.42.
7. Keller et al. (2023). Genetics and Epigenetics in Obesity: What Do We Know so Far? *Curr Obes Rep* 12, 482-501. 10.1007/s13679-023-00526-z.
8. Chen et al. (2016). Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ* 23, 1128-1139. 10.1038/cdd.2015.168.
9. Ruiz-Ojeda et al. (2016). Cell Models and Their Application for Studying Adipogenic Differentiation in Relation to Obesity: A Review. *Int J Mol Sci* 17, 1040. 10.3390/ijms17071040.
10. Mercado-Rubio et al (2021). Similar Features, Different Behaviors: A Comparative In Vitro Study of the Adipogenic Potential of Stem Cells from Human Follicle, Dental Pulp, and Periodontal Ligament. *J Pers Med* 11. 10.3390/jpm11080738.
11. Fracaro et al. (2020). The Expression Profile of Dental Pulp-Derived Stromal Cells Supports Their Limited Capacity to Differentiate into Adipogenic Cells. *Int J Mol Sci* 21. 10.3390/ijms21082753.
12. Argaez-Sosa et al. (2022). Higher Expression of DNA (de)



methylation-Related Genes Reduces Adipogenicity in Dental Pulp Stem Cells. *Front Cell Dev Biol* 10, 791667. 10.3389/fcell.2022.791667.

13. Serralta-Interian et al. (2024). Inhibition of histone deacetylases class I improves adipogenic differentiation of human periodontal ligament cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 70, 40-47. 10.14715/cmb/2024.70.5.7.