



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORES DEL CALCIO A
NIVEL DENTARIO EN EL RATÓN.**

**AUTORA: DAISY C. COLMENARES P.
C.I: V- 14786105**

VALENCIA, OCTUBRE 2014



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORES DEL CALCIO A
NIVEL DENTARIO EN EL RATÓN.**

Trabajo de Grado presentado para optar al Título de Magister en Biología Oral

AUTORA: DAISY C. COLMENARES P.

TUTOR: Dr. DOMINIQUE HOTTON.

Dra. ALBA BOLAÑOS.

AVAL DEL TUTOR

Dando cumplimiento a lo establecido en el reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo en su artículo 133, quien suscribe examinador que se designe.

En Valencia a los veintisiete días del mes de Junio del año Dos Mil Catorce.

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas a las cuales debo parte de esta meta que alcanzo hoy, pero me quedaré con las más trascendentales, con aquellas que han sido un soporte muy fuerte en momentos en los que pensaba en darme por vencido.

A Dios y a la Virgen, por guiarme e iluminarme el camino.

A mis padres, Daisy y Jesús, por su apoyo afectivo que de manera incondicional me han brindado durante toda mi vida.

A mi hijo, Ricardo Jesús, mi porción de cielo, gracias por inspirarme y transmitirme la fuerza y el entusiasmo necesario para no renunciar. ¡Te amo hijo!

Al Profesor Dominique Hotton, y a la Profesora Alba Bolaños, gracias por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia, enmarcada por la confianza, el afecto y la amistad que tenemos para guiarme como profesional y como persona. El desarrollo y culminación de este trabajo no habría sido posible sin su motivación, paciencia, colaboración y compromiso para conmigo.

A Marle, María Cristina y Maribel, amigas y colegas, mi compañeras de aventuras durante este viaje. Gracias por su amistad incondicional.

A la profesora Emilia Barrios, Directora del instituto BIOMOLP, gracias por abrir, incondicionalmente, las puertas del instituto y por brindarme sus conocimientos y experiencia en el campo de la ciencia, permitiéndome lograr tan anhelada meta.

A la Coordinación de la maestría Biología Oral de la Facultad de Odontología U.C, el Centre de Recherche des Cordeliers. Biología Oro facial y Patología UMRS 872. Equipo5 Universidad Paris VII. Francia, por aportar los recursos materiales necesarios para la realización de la investigación.

A todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron en la elaboración de este trabajo de grado.

¡GRACIAS!

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
Amelogénesis	2
<i>Etapa de Secreción</i>	3
Etapa de Maduración	4
El incisivo de crecimiento continuo como sistema de estudio	7
Dinámica del Calcio	9
Transporte de Calcio en el ameloblasto	11
<i>Influjo celular de calcio</i>	14
<i>Transient Receptor Potencial (TRP)</i>	14
<i>Transient Receptor Potencial Vallynoid (TRPV5)</i>	15
Tránsito a través de la célula	18
<i>Calbindina</i>	19
<i>Calbindina D_{28k}</i>	20
Eflujo celular de Calcio	22
<i>Intercambiador Na/Ca (NCX)</i>	23
II. OBJETIVO GENERAL	27
Objetivos Específicos	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
Muestra	28
Inmunohistoquímica	29
IV. RESULTADOS	31
TRPV5	31
NCX1	35
V. DISCUSIÓN	38
V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL



**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORES DEL
CALCIO A NIVEL DENTARIO EN EL RATÓN.**

RESUMEN

Los tejidos dentarios (esmalte, dentina y cemento) poseen en su composición material inorgánico, representado principalmente, por iones de calcio y fosfato, en un porcentaje de peso que varía entre uno y otro, siendo superior en el esmalte (96%); por tanto se hace evidente, la significancia del transporte de calcio, como proceso, para alcanzar la maduración de los tejidos. Sin embargo, los mecanismos involucrados en el desplazamiento de dicho ión requieren ser dilucidados. El propósito de este estudio fue investigar la expresión y localización de TRPV5 y NCX1, usando incisivo de ratón como modelo. Análisis inmunohistoquímicos revelaron diferencias en los patrones de expresión de TRPV5 y NCX1 a nivel del órgano del esmalte, y odontoblasto. A nivel del ameloblasto en etapa de maduración, el TRPV5 se localizó en toda la extensión del ameloblasto, mostrando mayor intensidad en la membrana basal que en la membrana apical y en el citoplasma; en el odontoblasto, TRPV5 mostró una distribución similar; por su parte, el NCX1 se expresó significativamente en la capa papilar y en la capa apical del odontoblasto, a nivel del ameloblasto, la expresión fue más débil. Estos resultados indican que TRPV5 y NCX1 están involucrados en el influjo y extrusión de Calcio, respectivamente, durante la odontogénesis.

Palabras claves: Biología Oral, TRPV5, NCX1, Calcio, transportador, ameloblasto, odontoblasto.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIRECCIÓN DE POSTGRADO
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA ORAL**



**EXPRESSION OF PROTEIN TRANSPORT CALCIUM IN A TOOTH
MOUSE**

ABSTRACT

Dental tissues (enamel, dentin and cementum) have in their inorganic material composition, represented mainly by calcium and phosphate ions in a weight percentage ranging between one another, being higher in the enamel (96%); therefore it is evident, the calcium transport significance as a process for achieving tissue maturation. However, the mechanisms involved in the displacement of the ion required to be elucidated. The purpose of this study was to investigate the expression and localization of TRPV5 and NCX1, using mouse as a model incisor. Immunohistochemical analysis revealed differences in the expression patterns of TRPV5 and NCX1 level of the enamel organ, odontoblastoblasto, cementoblast, pulp and periodontal ligament cells, A level ameloblast maturation stage, the TRPV5 was located in the basement membrane, showing greater intensity in some areas in the apical membrane and cytoplasm .; meanwhile, the NCX1 was significantly expressed in the papillary layer and with lesser intensity in the apical pole. These results indicate that NCX1 TRPV5 and are involved in the calcium influx and extrusion, respectively, during odontogenesis.

Key Words: Oral Biology, NCX1, TRPV5, transport, calcium, ameloblast, odontoblast.

INTRODUCCIÓN

Hasta hace escasos años eran pocas las investigaciones que respondían los enigmas existentes sobre los mecanismos que intervienen en la formación del esmalte como tejido calcificado, a diferencia de la maquinaria celular implicada en la formación de la dentina que se encuentra mejor estudiada. Este hecho hace pensar en la amelogénesis como un proceso dinámico y complejo que ha requerido, del avance de las técnicas en biología molecular y genética para comenzar a emerger de las sombras, como un tema de interés científico.

Esto se evidencia en la tendencia focal de estudios que ha dado lugar al desarrollo de diversas líneas de investigación dirigidas a identificar los genes que están vinculados con los cambios bioquímicos y celulares que ocurren durante la amelogénesis (1, 2, 3, 4, 5).

Uno de los puntos de interés de los científicos ha sido descubrir los mecanismos a través de los cuales células como el ameloblasto llegan a tolerar altas concentraciones de calcio (6), en función a los elevados requerimientos del mineral durante las etapas tardías de la amelogénesis sin llegar a niveles de toxicidad, pues se conoce que el calcio no solo es un ion necesario para la señalización celular durante la amelogénesis, sino que también juega un rol importante en la mineralización del esmalte.

Los estudios sobre este tema, continúan avanzando y las investigaciones en modelos experimentales a nivel de tejidos epiteliales en órganos como el riñón (7, 8), intestino (8), páncreas (9), corazón (9), útero (10), hueso (11,12), mediante técnicas de Reacción en cadena de Polimerasa (PCR) cuantitativo y Western Blotting, han dejado en evidencia la existencia de una serie de transportadores con alta afinidad por el calcio.

Cuando la naturaleza ha establecido un principio general para realizar una tarea, el mismo principio puede ser adaptado a otro tejido que posea funciones similares. Es así como los hallazgos en otros órganos del cuerpo han permitido establecer supuestos teóricos sobre el transporte de calcio en el ameloblasto, a partir de los cuales se ha abierto un abanico de investigaciones en esa línea, que buscan proveer nuevas luces respecto a la maquinaria utilizada para tal fin (2,4,6,13,14).

Se ha demostrado que el transporte de calcio celular no solo ocurre por difusión pasiva, sino que cuando aumentan las necesidades de este ion aumenta la expresión de una serie de proteínas encargadas del transporte de calcio celular en el ameloblasto: TRPV5, Calbindina D_{28K}, Atpasa Na⁺/Ca, NCX1 y NCKX1 (1,2,5). La identificación de estas proteínas en las células del esmalte, ha sido, principalmente, a través de análisis amplios del genoma en ameloblasto (1,2); son pocos los estudios que han inmunolocalizado las mismas en cortes histológicos, la ubicación en el ameloblasto se ha dado por la superposición de evidencias en otros tejidos corporales (6, 15).

Adicionalmente, los mecanismos implicados en estos procesos, aún no han sido descritos ampliamente, por esta razón en la presente investigación se recurre a técnicas de Inmunohistoquímica para determinar la localización de TRPV5 y NCX1 en mandíbula de modelos experimentales de ratón, con el objeto de confirmar las pistas que ofrecen tejidos como el riñón y odontoblastos sobre las expresiones proteínicas mencionadas.

Amelogénesis

La amelogénesis es un proceso de construcción biológica a través del cual se forma esmalte como producto final. El esmalte es formado por dos procesos

simultáneos, en los cuales el ameloblasto es instrumento: la secreción de la matriz de proteínas y la formación de cristales minerales en esta matriz. Como parte de ese proceso, el ameloblasto transporta activamente iones de calcio hacia el frente de mineralización (2, 15,16).

Por consiguiente, los ameloblastos, células derivadas del epitelio encargadas de formar el tejido acelular más duro del esqueleto de los mamíferos, por su alto contenido mineral, transitan por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos progresivos y estrictamente programados, que se supone son regulados genéticamente (1,2)

La amelogénesis implica una serie de etapas sucesivas: presecretora, secretora, transicional y maduración, siendo las más importantes, la etapa de secreción y la etapa de maduración. La apariencia morfológica de los ameloblastos con su correspondiente repertorio de genes involucrados en la amelogénesis difiere en cada etapa (1, 7).

En este sentido, durante la amelogénesis, los cristales de hidroxiapatita en crecimiento que se encuentran embebidos en una matriz rica en proteínas estructurales, secretada por los ameloblastos, transitan hacia un esmalte altamente mineralizado y organizado, para ello, se hace necesario que el agua y las proteínas del esmalte sean reabsorbidas y reemplazadas por minerales (2,5). Por lo cual, se puede considerar a la amelogénesis como un proceso en donde fases secretorias y reabsortivas se alternan en el tiempo.

Etapas de Secreción

Durante la etapa secretoria se observan en el órgano del esmalte, desde el punto de vista histológico, cuatro capas celulares: el epitelio externo del esmalte, el

retículo estrellado y la capa interna de ameloblastos, las cuales provienen de la diferenciación de las células epiteliales (4; Fig.1)

En esta etapa, los ameloblastos se caracterizan por ser células alargadas, estrechas, muy polarizadas que a menudo alcanzan los 60 a 100 micrómetros de longitud, además, poseen abundantes organelas como mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi bien desarrollados acordes con su función de síntesis, y una pequeña y cónica prolongación, en el polo apical, rodeada por la matriz del esmalte, llamada Proceso de Tómes (4, 13, 17), sin olvidar, que presentan una permeabilidad muy limitada para la difusión de iones metálicos, comportándose como una barrera (6,13).

La síntesis y secreción de proteínas específicas por parte del ameloblasto alcanza su máximo nivel en esta etapa y ocurre en condiciones de pH ligeramente alcalino, 8.0 (1, 4, 17), proteínas como la amelogenina, enamelina, ameloblastina terminan conformando la matriz orgánica que posteriormente será parcialmente mineralizada por una enzima localizada en el polo basal de los ameloblastos secretorios: la fosfatasa alcalina. Así, esta enzima interviene en la aposición de cristales minerales, principalmente, de Hidroxiapatita, agrupados en estructuras llamados prismas, dando como resultado un esmalte inmaduro con tan solo 30 % de contenido inorgánico (4)

Una vez que el volumen total de esmalte ha sido organizado estructuralmente, sucede una pausa en la secreción de proteínas y se detiene la aposición de cristales minerales, dando paso a la siguiente etapa de formación.

Etapa de maduración

La etapa de maduración del esmalte es un proceso largo, se sabe que en la dentición permanente del humano puede durar 4 años o más (5). Durante la

maduración la principal función del ameloblasto es la degradación y remoción de las proteínas de la matriz secretadas previamente, y la posterior difusión de iones minerales, principalmente calcio y fósforo, hacia el esmalte (18).

En este sentido, la capacidad de síntesis y liberación de proteínas por parte del ameloblasto se ve disminuida en función al cambio en las necesidades.

La velocidad de adquisición de minerales, el control del stress asociado al pH medianamente ácido y la degradación de proteínas incrementan significativamente (1, 6), por lo cual, el ameloblasto, una vez que ha secretado la matriz del esmalte, se transforma para poder controlar el exceso de acidez (pH 6) por la liberación de protones durante la maduración del esmalte y el flujo de iones necesarios para la expansión volumétrica del cristal de Hidroxiapatita, los cristales que inicialmente estaban densamente empaquetados y eran pequeños, crecen rápidamente en anchura y espesor(1,2)

En concordancia, los ameloblastos se convierten en células cortas y anchas (1). Asimismo, las cuatro capas de células supraameloblásticas que se diferencian en la etapa de secreción también son modificadas morfológicamente durante la maduración, resultando en la formación de la Capa Papilar (5,17).

La función de esta capa celular en el órgano del esmalte durante la formación de la matriz y maduración del esmalte aún no está descrita; sin embargo, hallazgos recientes, relacionados con la presencia de proteínas de membrana especializadas para el transporte de HCO_3 , sugieren la capacidad de defensa de la célula ante los cambios de pH en el ambiente extracelular (5).

Por otra parte, los ameloblastos en maduración suelen sufrir cambios cíclicos en su borde apical, variando de forma muy rápida, entre estriado y liso (5, 17, Fig.1).

En el incisivo de la rata, un ameloblasto modula ciclos de 8 horas; las células del esmalte pasan un período de cuatro horas con borde estriado antes de que al instante se transformen a sí mismos en ameloblastos de borde liso por las próximas 2 horas, después de que pasan otras 2 horas vuelven a crear una nueva superficie estriada en su polo apical (5, 17, 18). En promedio, se ha observado, en cortes histológicos de incisivos de rata, que aproximadamente 70% de las células se encuentran en etapa estriada (RA) y 23% en etapa lisa (SA) (18).

Se presume que la célula de borde estriado es impermeable en su polo apical por la presencia de uniones estrechas, permitiendo la difusión de iones, como el calcio e iones fosfatos, en un ambiente ácido, que sobresaturan el esmalte fluido; mientras que las células de borde liso, cuyo pH es neutro, es impermeable al movimiento iónico en su polo basal favoreciendo la remoción, lo cual pudiera estar en relación con fases de calcificación y reabsorción de la matriz proteica, respectivamente, siendo los ameloblastos de borde liso los que presentan mayor actividad celular (5,19). Como consecuencia de estas variaciones cíclicas, la precipitación del calcio en el esmalte se realiza de forma intermitente y esto determina la aparición de las estrías de Retzius.

Es así como el producto final del complejo proceso de la amelogénesis no es más que un esmalte maduro rico en contenido inorgánico (95%) (6,15).

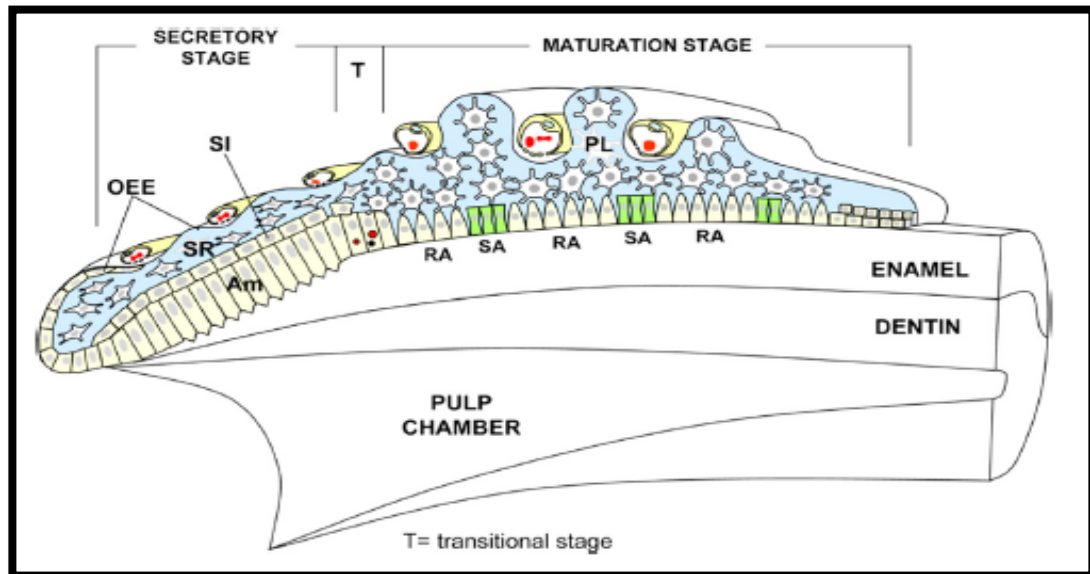


Figura 1. Modelo esquemático de un incisivo de ratón y las células del órgano del esmalte durante la amelogénesis. Amelogénesis se divide en la etapa secretora y la etapa de maduración, separados por un corto período de transiciones morfológicas y funcionales de ameloblastos (etapa de transición). En la etapa secretora el órgano del esmalte se compone de varias capas de células: ameloblastos (Am), estrato intermedio (SI), retículo estrellado (SR), y epitelio externo del esmalte (OEE). Durante el proceso de larga duración de la maduración del esmalte, los ameloblastos cambian cíclicamente su estructura y función entre ameloblastos de borde estriado (RA) y ameloblastos de borde liso (SA). Aquí el órgano del esmalte además comprende la capa papilar (PL) siendo profundamente invaginada por una red capilar. Tomado de Josephsen y cols (5).

El incisivo de crecimiento continuo como sistema de estudio

El incisivo de crecimiento continuo en roedores (ratas y ratones) es un modelo adecuado para estudiar la amelogénesis debido a que el incisivo mantiene una capa continua de ameloblastos que contiene toda la secuencia de las etapas de formación del esmalte (5, Fig.1).

Este modelo fue caracterizado a finales de los años 60 y se utiliza tanto para estudios *in situ* como para el análisis bioquímico de proteínas y ARNm (19).

El modelo presenta un segmento labial análogo a la corona de los molares y un segmento lingual análogo a la raíz de los molares. (Fig.2) En el segmento labial es posible distinguir la zona apical del incisivo y su unión con el epitelio oral, la secuencia de etapas de la amelogenesis y la dentinogénesis. En la parte lingual es posible distinguir una la dentinogénesis radicular, la cementogénesis acelular y la formación del ligamento periodontal (19).

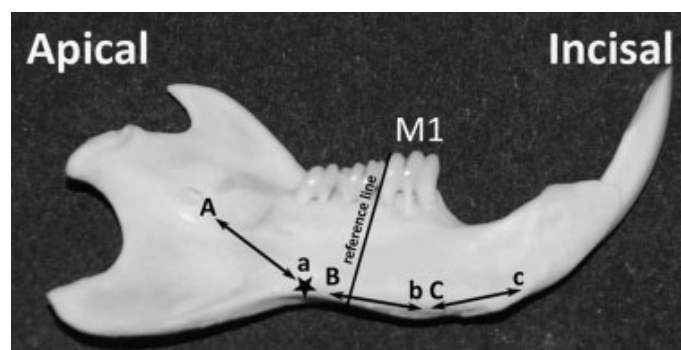


Figura 2. Referencia anatómica para la localización de las etapas de formación del esmalte. Ameloblastos en etapa de secreción (entre A y a), Ameloblastos en etapa de maduración temprana (entre B y b), Ameloblastos en etapa de maduración tardía (entre C y c). Tomado de la Cruz (15.)

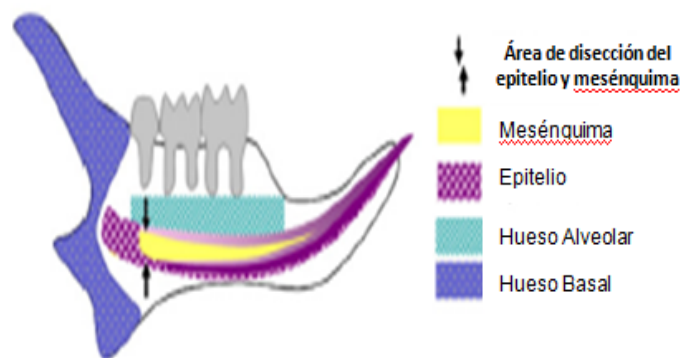


Figura 3. Área de disección del epitelio y mesénquima. Tomado de Aioub (20)

Dinámica Del Calcio

El calcio es considerado un ión esencial en la señalización celular, pues es bien conocido su rol como segundo mensajero, por tal razón, el mantenimiento del equilibrio de Calcio en el cuerpo es esencial para la ejecución de funciones fisiológicas vitales como la excitabilidad neuronal, la contracción muscular, la formación de hueso y muchas más (11,21).

De allí, el rol significativo del intestino, riñón y hueso en mantener la homeostasis del ión calcio, mientras que el calcio proveniente de la dieta es absorbido a nivel del intestino e incorporado en la circulación sistémica, el riñón por otro lado y de forma simultánea, se encarga de excretarlo, para así poder mantener un adecuado balance (11,21).

Este ión se encuentra en todos los tejidos corporales, tanto en compartimientos extracelulares como intracelulares, en forma libre o unido a ligandos (6). En la mayoría de las células, una gran cantidad de calcio intracelular se encuentra formando complejos con ligandos orgánicos intracelulares tales como proteínas fijadoras de calcio o secuestrado en el interior de organelos como el retículo endoplásmico, los cuales son capaces de almacenar grandes cantidades de calcio, desde donde es liberado según los requerimientos de la célula (6, 22, 23).

Se ha determinado, que el rol funcional y la concentración de calcio depende de la localización (6); por ello, los niveles de calcio varían entre un compartimiento y otro, en la mayoría de los tipos celulares, la actividad del calcio intracitoplasmático está en el rango micromolar o menos, mientras que la concentración total en el fluido extracelular, incluyendo plasma sanguíneo, es próxima a los 3 mM, de tal concentración, la mitad o menos se encuentra en forma ionizada (23), lo que permite mantener un gradiente de concentración de Calcio a favor de la célula. Este gradiente,

es estrechamente controlado por la absorción intestinal, el intercambio en el hueso y la reabsorción a nivel renal (5).

A pesar del gradiente de concentración que se establece entre uno y otro lado de la membrana, la célula no permite que todo el calcio difunda libremente a través de la membrana celular, por ello, la entrada de calcio ocurre por 2 vías, transporte pasivo paracelular y transporte activo transcelular, utilizando proteínas con afinidad por el Calcio, llamadas canales de Ca^{2+} (23, 24).

Una vez en el medio intracelular, el calcio se mantiene a bajas concentraciones, pues la viabilidad celular depende de que el calcio libre en el citoplasma se mantenga por debajo de los $0,2 \mu\text{mol/L}$, y aunque aumentos transitorios son bien tolerados, incrementos extremos pueden ser tóxicos e incluso llegar a producir la muerte celular (8). En el citoplasma, mitocondria y núcleo, el rango oscila entre $0,1$ a $0,2 \mu\text{mol/L}$, mientras que en organelas, como el retículo endoplásmico rugoso, la concentración es superior, aproximadamente $0,8 \mu\text{mol/L}$ (6), esto obedece, a su rol como movilizador y depósito de calcio (6).

En el odontoblasto se ha logrado describir la localización intracelular de calcio, utilizando técnicas para cuantificar el calcio total. Las evidencias revelan que el calcio se ubica en el polo distal o apical de la célula, en forma ionizada o dentro de organelas, así como en los procesos odontoblásticos y formando complejos con las macromoléculas de la predentina (22).

Como es bien sabido, el esmalte y la dentina son tejidos calcificados, la concentración en peso de contenido mineral, varía entre 95% (6, 15) y 70% (23) respectivamente, siendo el calcio, en su forma libre ionizada, el principal ion responsable en la mineralización de los mismos, el incremento del stress oxidativo y toxicidad celular (1, 6), por ello, se hace evidente la importancia del transporte de

calcio en el epitelio dental y los odontoblastos, pues se ven sometidos a manejar concentraciones elevadas durante la etapa de maduración (6).

Transporte del calcio en el ameloblasto

Durante la amelogénesis y la dentinogénesis, los iones de calcio y fosfato son transferidos desde el lecho vascular, a través de la célula, y en el caso de los odontoblastos, aunque en menor medida, también entre ella, hacia el frente de mineralización (6, 23). En este sentido, un número de sistemas transportadores de Calcio asociados a membrana con diferentes propiedades han sido identificados y caracterizados tanto en la membrana celular como en la membrana de organelas celulares. Algunos de estos sistemas están diseñados para trasladar grandes cantidades de calcio más lentamente, mientras que otros, son capaces de un rápido y preciso ajuste de las concentraciones iónicas de calcio (13, 23).

El transporte celular de calcio, de un lado de la membrana a la otra, está bien dilucidado a nivel renal e intestinal e involucra dos vías: la paracelular, que depende de la proximidad entre las uniones celulares y la vía transcelular, que depende de la presencia de proteínas vinculadas con el tránsito a través de la célula (11, 19, 24, Fig.4)

La ruta paracelular, implica difusión pasiva del calcio y depende principalmente de gradientes de concentración y uniones epiteliales. Representa la principal vía de reabsorción de calcio a nivel renal y ocurre a nivel del intestino delgado, túbulo proximal y el asa de Henle. Mientras que en la vía transepitelial, el calcio entra a la célula a través de la membrana apical, utilizando canales permeables de calcio de la familia TRP (transient receptor potential), valinoide tipo 5 y tipo 6. En el citoplasma, los iones son acoplados a las proteínas reguladoras de calcio como la

Calbindina D_{9k} , D_{28k} y luego, extruidos activamente, en la membrana basal del epitelio, a través de la bomba ATPasa Ca^{2+} (PMCA1) y del intercambiador Na^+/Ca^{2+} (NCX1), entrando así a la circulación sistémica (11, 21,24; Fig. 4).

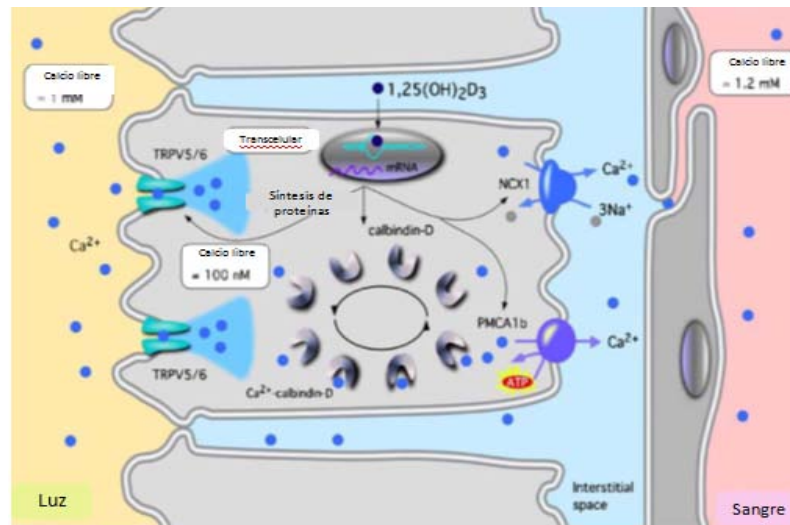


Figura 4. Mecanismo de transporte activo epitelial de Calcio. Tomado de Van Abel (24).

En este sentido, el movimiento significativo de calcio a través de la célula del órgano del esmalte durante la maduración y no entre ella como ocurre en riñón e intestino, y más cerca aún, en el odontoblasto, sugiere la existencia de estrechas uniones entre los ameloblastos que limitan el transporte iónico paracelular, lo que indica que el epitelio del esmalte actúa como una barrera semipermeable (6).

El problema del transporte transcelular se presenta por el riesgo de acumulación intracelular y posible toxicidad debido a una difusión lenta del calcio en su paso por el citoplasma y a los mayores requerimientos de calcio durante la mineralización del esmalte (6), sin embargo no hay evidencias de toxicidad celular asociada al calcio en ameloblastos lo que ha hecho suponer que existen mecanismos moleculares de transporte activo implicados en el influjo, tránsito y eflujo celular de este ión (6). Estudios bioquímicos previos realizados en células de rata y ratón,

revelaron la presencia de abundantes proteínas fijadoras de calcio en el ameloblasto y odontoblastos (13, 22).

El transporte de calcio a través de estos mecanismos le permite a la célula ser capaz de controlar la velocidad y especificidad iónica, la unidireccionalidad y el transporte a favor de un gradiente de concentración (6).

Este mismo mecanismo ha sido descrito por científicos en células derivadas del epitelio de otros órganos, lo que ha permitido dibujar paralelismos entre la formación del esmalte y la formación de tejidos no mineralizado como el riñón. La diferencia fisiológica se presenta en la direccionalidad del proceso, mientras investigadores del campo de la medicina han descrito la extrusión de calcio hacia el flujo sanguíneo (polo apical) (10). En el ameloblasto el flujo de calcio transcelular es inverso, tal como se mencionó anteriormente; ocurre desde el polo basal del ameloblasto, relacionado con el capilar sanguíneo, hacia el polo apical relacionado con la capa de esmalte (Fig.5).

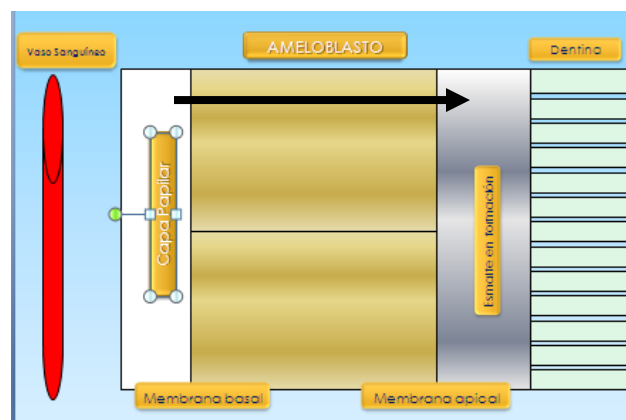


Figura 5. Representación esquemática del órgano del esmalte. La flecha indica el sentido en el que ocurre el transporte. Tomada de Hubbard (6).

Sin embargo, aún falta por aclarar si los iones de Ca^{2+} , dirigidos al frente de mineralización, son transportados a través del ameloblasto (transcelular), extruidos desde organelas citoplasmáticas (transcitosis) o, incluso ambos. Por tanto, teóricamente, en este punto cabe interrogarse ¿cómo pasa el calcio de la sangre a través del ameloblasto para ser depositado en el esmalte en formación?

Influjo celular de calcio

Existe evidencia científica de que la entrada de calcio al interior de la célula es significativamente mayor en etapa de maduración respecto a la etapa de secreción, los hallazgos indican una tasa de transporte de calcio 4 veces superior (6,18). Esto se explica, porque durante la etapa de secreción, el epitelio del esmalte funciona como una barrera, restringiendo la entrada de calcio a través de la membrana (6).

En cambio durante la maduración del esmalte, la célula adquiere una permeabilidad transitoria, que permite el influjo de calcio a través de la membrana basal del ameloblasto hacia el esmalte en formación. Son pocos los estudios que se han hecho al respecto en tejido dentario, sin embargo, la evidencia en tejido renal e intestinal sugiere que la entrada ocurre a través de dos miembros de la familia de canales de Calcio TRP (transient receptor potencial) tipo Valinoide: TRPV5 y TRPV6 (11, 21, 24). Estos canales son coexpresados en los diferentes tejidos transportadores de calcio como riñón, intestino y ameloblastos (11) aunque no en igual proporción.

Transient Receptor Potencial (TRP)

La familia TRP, es una larga familia de proteínas constituida por diferentes subfamilias, que han evolucionado como canales iónicos, sensibles a un gran número de estímulos (8). Sus 27 homólogos mamíferos están comúnmente agrupados en 6

subfamilias, en base a la secuencia de su aminoácido primario más que por su selectividad, debido a que sus propiedades son heterogéneas y su regulación es compleja. Hasta ahora se conocen: TRPC (“Canonical”), TRPM (“Melastatin”), TRPV (“Vanilloid”), TRPA (“Ankyrin”), TRPP (“Polycistin”) y TRPML (“Mucolipin”) (11, 25).

En general, los canales TRP son proteínas de membrana con seis dominio transmembrana y un poro permeable al catión, esta región está formada por un pequeño estiramiento hidrofóbico entre el quinto y sexto dominio transmembrana (11, 21, 24).

Transient Receptor Potential Vallynoid (TRPV)

La subfamilia TRPV (receptor Vallinoide) puede ser dividida en 4 grupos: TRPV1/2, TRPV3, TRPV4 y TRPV5. Estudios han demostrados que estas proteínas están involucradas en una variedad de procesos sensoriales, tales como: sensación térmica, osmótica, mecánica, olfato, gusto, visión y percepción del dolor (25).

Los canales TRPV1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4 son canales catiónicos no selectivos, discretamente permeables al calcio, que pueden ser activados por diversos estímulos, tales como: ligandos de segundos mensajeros, frío, calor y estrés mecánico o químico (11).

En este sentido, hallazgos recientes han mostrado que los odontoblastos expresan funcionalmente canales TRP, de los cuales, TRPV1 está vinculado con la transducción de estímulos, por parte del odontoblasto, cuando hay exposición dentinaria (26), por tanto, estos canales juegan un rol crucial en la mediación de sensaciones térmicas en el diente (27).

Por otra parte, TRPV5/TRPV6, antiguamente conocido como ECaC1, son canales iónicos con estructura molecular similar, que poseen afinidad por cationes monovalentes o divalentes, siendo mayor su afinidad por el calcio (7). A diferencia de los otros miembros de la familia, TRPV5 and TRPV6, son altamente selectivos para el calcio y estrictamente regulados por las concentraciones intracelulares de Calcio (25).

Los genes de TRPV5/TRPV6 comprenden 15 exones, que codifican proteínas de aproximadamente 730 aminoácidos (24). Esta proteína contiene seis dominios transmembrana y un dominio intracelular. Después de la transcripción y traducción, las proteínas TRPV5 son ensambladas como canales tetraméricos funcionales que juntos forman un poro para la entrada selectiva de Ca^{2+} (7, 8).

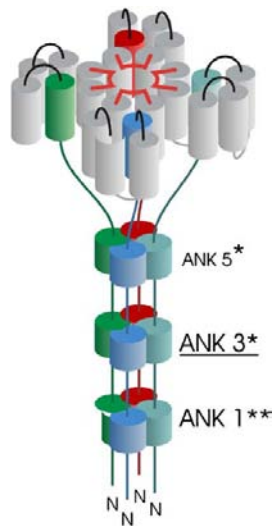


Figura 6. Modelo de ensamblaje de las subunidades TRPV5/6. Tomado de Niemeyer (8).

La distribución tisular de estos canales está asociado a órganos que median el transporte transcelular de calcio como intestino, riñón, páncreas, próstata, glándula mamaria, cerebro, colón, recto, glándula salival, odontoblastos y ameloblastos (7, 11, 24, 25); mostrando patrones de expresión distintos, entre uno y otro tejido, en este

sentido, TRPV5 y TRPV6, se expresan a nivel de la membrana apical de las células de los tejidos anteriormente mencionados (Fig. 4,5), excepto en el ameloblasto y odontoblasto, en donde ha sido descrita en la membrana basal (6, 24; Fig. 4,5). TRPV5 es típico en tejido renal mientras que TRPV6, predomina en intestino delgado, próstata, cerebro, estómago (24, 25).

La expresión de las proteínas mencionadas, se ve afectada por las concentraciones de Vitamina D, estrógeno y calcio proveniente de la dieta. Aportes científicos dejan claro que la forma activa de la Vitamina D (1,25 dihidroxivitamina D3) incrementa los niveles de canales de calcio en la membrana plasmática (24), lo que sugiere que TRPV5/6 no está presente de forma continua en la membrana, sino que se encuentra almacenada, ampliamente, en compartimientos intracelulares (endosomas), y cuando los requerimientos de calcio aumentan, pueden ser trasladadas a la membrana plasmática de una manera controlada (7; Fig. 5). El transporte de TRPV5 o TRPV6 hacia la membrana plasmática proporciona un mecanismo de regulación a corto plazo para aumentar la captación de calcio a nivel renal e intestinal, respectivamente.

El rol funcional de estos canales, está asociado a la homeostasis del calcio, debido a que son responsables, gracias a que actúan como una compuerta, del transporte activo de calcio hacia el citoplasma, a favor de un gradiente de concentración, para satisfacer las demandas de este ión en diversos procesos fisiológicos (11, 24), por lo que es posible presumir, que son responsables de la captación de calcio en la membrana basal durante la amelogénesis y la dentinogénesis. Esencialmente, es poco lo que se conoce sobre la entrada de calcio en el ameloblasto durante la mineralización del tejido, mientras que en el odontoblasto, utilizando técnicas inmunohistoquímicas se logró demostrar la presencia de canales de calcio (22).

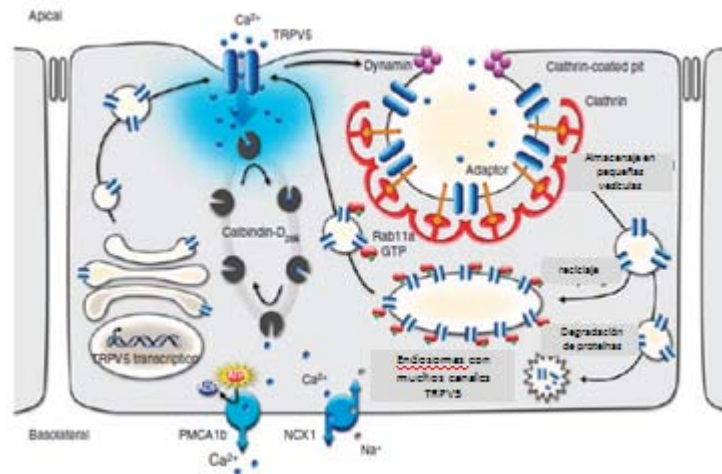


Figura 7. TRPV5, función y regulación de la reabsorción de calcio a nivel renal. Tomado de Groot (7).

Tránsito a través de la célula

La actividad de las TRPV5/6 es regulada por las concentraciones intracelulares de calcio que actúan como un interruptor, aumentando o disminuyendo su expresión; por tanto, una vez que dicho ión ingresa al ameloblasto u odontoblasto, está listo para ser acoplado a proteínas fijadoras de calcio, que modulan de forma estricta las concentraciones citoplasmáticas del mismo, evitando así la citotoxicidad asociada a la disminución del pH. La comunidad científica dedicada a estudiar la biología del esmalte, ha propuesto diferentes rutas para explicar la difusión del calcio a través del citoplasma, desde la membrana basal hasta la membrana apical; siendo la calbindina (ruta transcelular, basada en gran parte en estudios de intestino y riñón) y las organelas tubulo-vesicular intracitoplasmáticas (ruta transcitosis) las protagonistas de ambas propuestas (6, 13).

Calbindina

Estudios a nivel renal e intestinal, han demostrado y caracterizado la presencia de una proteína fijadora de calcio, localizada en el citoplasma denominada Calbindina, que tiene la capacidad de moverse, por lo cual, está asociada al transporte de calcio a través de la célula en dichos tejidos.

La Calbindina es una calciproteína (CaBP) perteneciente a la superfamilia de las proteínas citosólicas fijadoras de calcio (6, 19), que incluyen calmodulina, troponina C, parvalbumina, S100, las cuales son proteínas móviles, codificadas por el gen S100g, que se caracterizan por poseer una estructura EF hands. Estas proteínas son reagrupadas en dos grupos, los sensores de calcio y los tampones de calcio.

Ciertamente, la estructura EF hands es un dominio estructural de proteínas tipo hélice-bucle-hélice, que consta de dos alfa hélices E y F, respectivamente, situadas perpendicularmente entre sí. Separadas por un bucle central que contienen cadenas de aminoácidos, donde se encuentra el sitio de unión para el ión de calcio. El término EF hand se debe a que el patrón tridimensional de la alfa hélice puede ser representado por el dedo pulgar y el índice (19).

Dos miembros pertenecen a esta familia: Calbindina_{9k} localizada más extensamente en epitelio transportador de calcio (intestino, pulmón, placenta y órgano del esmalte) y Calbindina D_{28k} localizada en epitelio transportador-Vitamina D dependiente (intestino, riñón y órgano del esmalte) de aves y mamíferos (6). En mamíferos la Calbindina D_{9k} está presente principalmente en intestino delgado, mientras que la Calbindina D_{28k} se expresa típicamente en el túbulo contorneado distal y túbulo conector del riñón (21). Siendo el riñón, el único órgano que expresa ambas proteínas,

Calbindina D_{28K}

La Calbindina D_{28k} es una proteína fijadora de calcio con alta afinidad por este ión, debido a los seis sitios de unión que presenta. Similar a lo que ocurre en los canales TRPV5, la expresión de esta proteína va a ser inducida por la regulación transcripcional de hormonas calciotrópicas como la 1,25 hidroxivitamina D3, la Paratohormona, así como por el calcio proveniente de la dieta. Adicionalmente, investigaciones recientes han involucrado a un nuevo elemento en la regulación de la expresión de la calbindina D_{28k}, el gen MSX2, cuya sobreexpresión, reprime la actividad del promotor de esta proteína (nt-1075/+34) (4,19).

Se caracteriza por poseer un peso molecular de 28 kD, y, contener 261 residuos de aminoácidos. Se encuentra presente en altas concentraciones en intestino, riñón, cerebro y páncreas; en efecto, en algunas células se han reportado concentraciones superiores a 1 mM (28).

Consecuentemente, la expresión de la Calbindina D_{28k} es elevada en el ameloblasto, tanto en la etapa secretora como en la etapa de maduración (19) y, representa 1% de las proteínas totales citosólicas en el epitelio dental (4). Asimismo, su presencia ha sido demostrada en odontoblastos humanos y de rata (23), sin embargo, ciertos investigadores difieren de estos hallazgos, pues han reportado una localización exclusiva en el órgano del esmalte (29).

La importancia fisiológica de la Calbindina D en estos tejidos radica en su capacidad de transportar el calcio de un lado de la membrana al otro, por lo que controla fluctuaciones en las concentraciones intracelulares de este, actuando así como un tampón cálcico, de acción rápida (6, 21, 28).

Es así como, en el riñón se coexpresa con TRPV5, estando funcionalmente vinculadas en la reabsorción de calcio; estudios previos han demostrado que en este proceso fisiológico, TRPV5 juega un rol más crítico, pues, la disminución en el influjo de calcio mediada por TRPV5 suprime la expresión de la calbindina D_{28k} (21). En otros tejidos como el sistema nervioso, se ha demostrado que la calbindina neuronal, controla la respuesta intracelular a los estímulos. Adicionalmente, se ha sugerido un papel protector de esta proteína en contra de la muerte celular apoptótica, en células del riñón, cerebro, páncreas, osteoblastos (29).

Por otra parte, la presencia de calbindina D_{28k} en el ameloblasto, sugiere que el transporte de calcio hacia el frente de mineralización ocurre por un proceso transcelular. Esta proteína aumenta la difusibilidad del calcio hacia el extremo apical para que pueda ser expulsado, al servirle de transportador como lo haría un “ferry”, de esta manera, provee protección contra los altos niveles tóxicos de calcio al amortiguar las concentraciones citoplásmicas del mismo, y a su vez, interactúa directamente con los transportadores epiteliales TRPV5 para controlar el influjo de este ión (4, 6, 30; fig.9).

En contraposición, estudios realizados en ratones mutantes deficientes en calbindina D_{28k} reflejaron que en ausencia de Calbindina D_{28k} ni la mineralización del esmalte ni hueso se vio afectada, asimismo no se evidenció aumento de otra proteína fijadora de calcio citoplasmática para compensar la ausencia de Calbindina D_{28k} , lo que deja en entredicho el papel funcional que se le atribuye hasta ahora a la calbindina D_{28k} y se sugiere que el transporte transcelular de calcio ocurre a través de organelas citoplasmáticas tolerantes al calcio como el Retículo endoplasmático (31), este hallazgo modifica las teorías convencionales en el transporte de calcio y abre las puertas para un nuevo dogma llamado Transcitosis (6, 13).

Ciertamente, estos resultados revelan la baja regulación de la principal calbindina (28kDa) durante la maduración del esmalte, sin embargo, los hallazgos de Bolaños (4), lo contradicen (Fig. 8). Asimismo, fue demostrado, en análisis de perfil genético de la familia de genes S100g que codifican la calbindina 9kDa, la elevada regulación de ésta en ameloblastos en etapa de maduración (1), por lo cual la teoría del transporte transcelular en el ameloblasto no puede ser descartada tan fácilmente.

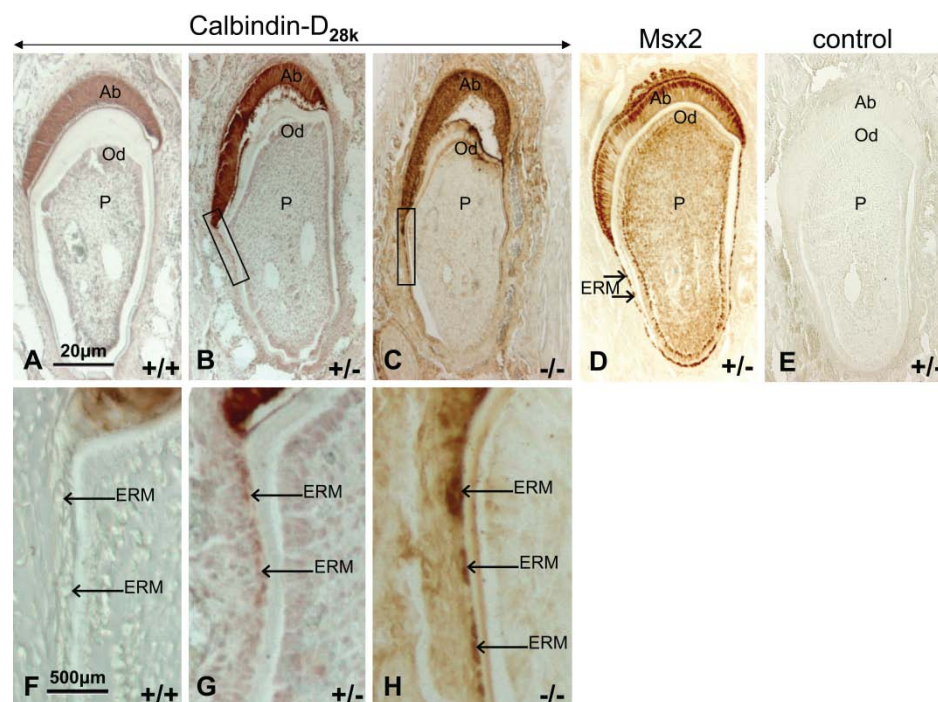


Figura 8. Expresión de la Calbindina D_{28k} en el incisivo de ratón. La proteína Calbindina D_{28k} fue comparativamente inmunodetectada en los incisivos de ratones de 14 días, *Msx2* +/+ (A,F), *Msx2* +/- (B,G), y *Msx2* -/- (C,H). Tomado de Bolaños (4).

Eflujo celular de calcio

Una vez que el volumen de calcio necesario para la mineralización atraviesa el citoplasma del ameloblasto, queda a disposición de proteínas con alta afinidad por este ión, para ser expulsado hacia la capa de esmalte en formación. Estudios previos han revelado el rol aparente que tiene la bomba ATPasa Na/Ca (PMCA), los

intercambiadores Na/Ca (NCX) y más recientemente, el intercambiador (Na/K/Ca) en este proceso (14, 18).

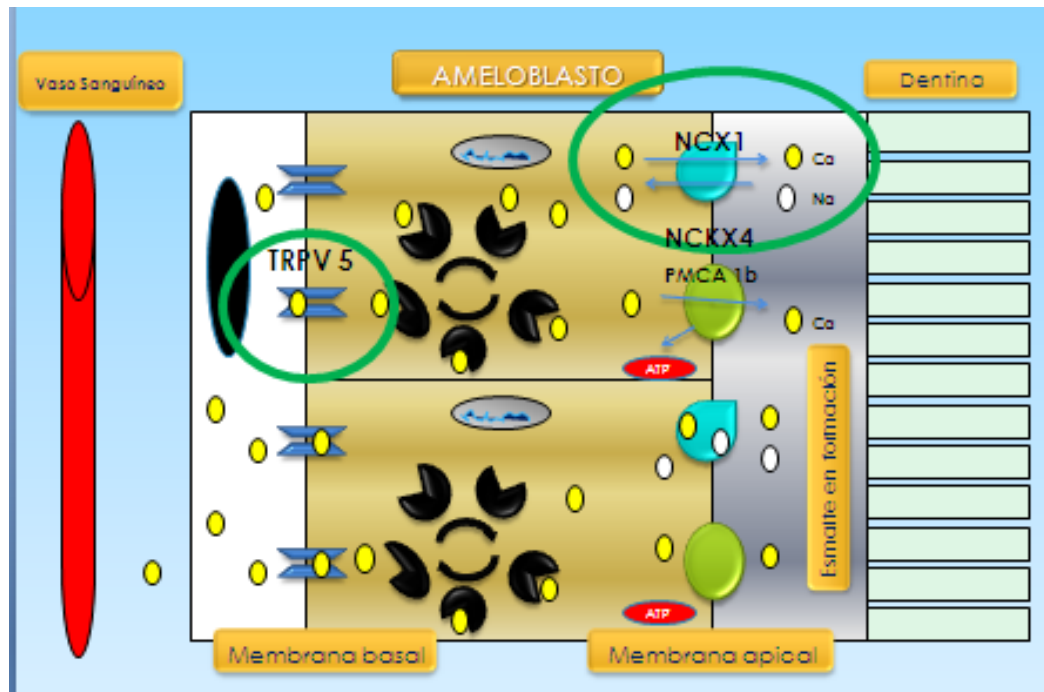


Figura 9. Transporte transepitelial de Calcio en el ameloblasto. Modificado por Colmenares de Hubbard (6) y Van Abel (24).

Intercambiador Na/Ca (NCX)

Los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ son miembros de una numerosa superfamilia de genes antiporter catión/calcio, la superfamilia CaCA. Esta superfamilia tiene cinco ramas principales, que han sido nombradas, en base a sus características funcionales: 1) YRBG, integrada por miembros de bacterias; 2) CAX, comprende, en su mayoría, miembros de plantas y levaduras; ambas ramas catalizan intercambio $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$; 3) NCX (SLC8); 4) NCKX (SLC24), ambos, comprenden, exclusivamente, miembros de mamíferos y catalizan intercambios $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y 5) CCX, que cataliza intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y Li^+/Ca^+ (32, Fig.10).

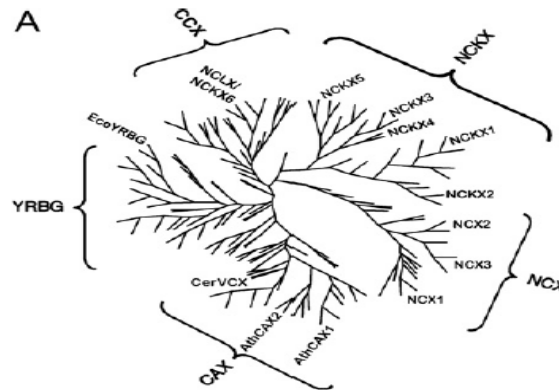


Figura 10. Árbol filogenético de la superfamilia CaCA. Tomada de Lytton (29)

La asociación de miembros de la familia de genes SLC (solute carrier) y el desarrollo del esmalte es una línea de investigación que ha sido de gran interés en los últimos años; recientes investigaciones han demostrado la presencia de estos genes en el órgano del esmalte, por lo cual se sugiere el rol crítico de algunos de ellos en la amelogenénesis.

La familia de genes SLC8A es responsable de codificar a los miembros de la proteína NCX, encargada del transporte bidireccional de cationes $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, hacia afuera o dentro de la membrana. La dirección del movimiento de iones, depende del gradiente electroquímico y de la concentración de iones a ser transportados; por tanto, NCX es responsable del eflujo/influjo, completamente reversible, de Ca^{2+} .

A diferencia de la bomba de calcio (ATPasa Ca^{2+}) con la que comparten funciones en la membrana plasmática, la cual tiene alta afinidad pero baja capacidad de transporte, las NCX son proteínas de membrana, con baja afinidad pero alta capacidad para transportar calcio (33). En mamíferos, existen tres subfamilias de NCX1 (SLC8A1), NCX2 (SLC8A2) y NCX3 (SLC8A3), cada una se expresa en

diferentes sistemas orgánicos y se encargan de extruir Calcio con la finalidad de favorecer la homeostasis intracelular (9).

De los tres intercambiadores, NCX1, es el más ampliamente expresado, originalmente fue caracterizado en tejido cardíaco, pero estudios posteriores han demostrado su presencia en otras células como cerebro, riñón (9, 32), células β del páncreas (33), osteoblasto (34) y osteoclastos (12).

Tan significativo es su rol a nivel cardíaco y células β del páncreas, que se ha evidenciado que NCX1, representa el principal mecanismo de extrusión de Ca^{2+} , aproximadamente, 70 % y 90%, respectivamente (33).

A diferencia de NCX1, los patrones de expresión de los otros miembros son más restringidos. NCX2, está localizada exclusivamente a nivel neuronal, en todas las regiones del cerebro; mientras que NCX3, se expresa en músculo esquelético y más, débilmente, en ciertas áreas del cerebro (32) y en el polo apical del ameloblasto (18) y odontoblasto (36).

Dichas proteínas catalizan el intercambio de 3 moléculas de Na^+ por 1 molécula de Ca^{2+} , el movimiento de cargas desigual revela que el transporte de NCX es electrogénico; ciertamente, el intercambio se da, en contra de su gradiente, sin consumo de energía, gracias a que la entrada de Na^+ genera una corriente que provee la energía necesaria para la extrusión de calcio, sin embargo, cambios en el potencial de membrana o la acumulación intracelular de Na^+ , modifican la dirección del intercambio, favoreciendo el influjo de Ca^{++} (9, 14, 18, 33).

Al respecto, se cree que el intercambio de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es mediado por una serie de pasos secuenciales, ligados o no, a cambios conformacionales; este proceso, involucra, la presencia de un sitio de unión al catión, que puede acomodar, indistintamente, tres Na^+ o un Ca^+ . Es así como, la ocupación completa del sitio con

cualquiera de los dos cationes, Na^+ o Ca^{2+} , permite el transporte del ión fijado a través de la membrana; por lo cual, investigadores han sugerido que el intercambiador podría estar catalizando, tanto el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, como el intercambio Na^+/Na^+ , $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (32).

A nivel dentario, NCX1 y NCX3 se expresan en el polo apical o apico/lateral de los ameloblastos (6, 18; Fig. 9) y en la membrana apical del odontoblasto, siendo mayormente expresado NCX3 que NCX1 (21). Adicionalmente, NCX1 ha sido aislado de mitocondrias a nivel de odontoblastos (22, 36).

Estos hallazgos sugieren el rol funcional de estas proteínas en la formación del esmalte. Se cree que NCX es responsable de la extrusión de Calcio hacia el frente de mineralización, siempre que exista un gradiente de Na^+ transmembrana; tanto en la etapa de secreción como en la de maduración, pero contrario a lo que se pensaba, la expresión de NCX1 permanece sin cambios significativos en ambas etapas, mientras que NCX3 disminuye durante la maduración del esmalte (1, 14, 33). Por consiguiente la comunidad científica se ha preocupado últimamente por identificar nuevos genes que expliquen como el ameloblasto maneja grandes cantidades de iones de calcio tanto para la señalización celular como para la mineralización extracelular, dejando en evidencia un nuevo gen transportador de Calcio: Slc24a4. (1, 2, 14).

El mismo codifica la proteína NCKX4, un tipo diferente de intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ que cotransporta K^+ y que es expresado de forma marcada durante las etapas de maduración media y tardía del ameloblasto (1, 14).

En vista de los hallazgos recientes relacionados con el transporte transcelular de calcio y la aparición de nuevos candidatos vinculados a la maduración del esmalte, cabe preguntarse ¿cómo es la expresión proteínica de TRPV5 y NCX1 en el

tejido dentario del ratón salvaje?, si ya han sido ampliamente identificados en otros tejidos y funcionalmente vinculados con el transporte de calcio.

Con el propósito de aproximar respuesta a estas interrogante, se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de las proteínas transportadoras de Calcio (TRPV5 y NCX1) a nivel dentario en el ratón salvaje, no manipulados genéticamente.

Objetivos específicos

Reconocer la expresión de la proteína TRPV5 en el ameloblasto, en etapa de maduración y, odontoblasto del ratón salvaje (+/+)

Identificar la expresión de la proteína NCX1 en el ameloblasto, en etapa de maduración y, odontoblasto del ratón salvaje (+/+)

Describir la localización en el ameloblasto y odontoblasto de la proteína TRPV5 en el ratón salvaje (+/+)

Describir la localización en el ameloblasto y odontoblasto de la proteína NCX1 en el ratón salvaje (+/+).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio constituye una investigación de tipo exploratoria, descriptiva.

Muestra.

Para efectos de esta investigación, la muestra está representada por 15 mandíbulas de ratones machos, de 90 días de nacidos, de la cepa Wild Type CD1 Swiss. De los cuales se tomaron 70 cortes histológicos, en donde se identificaron ameloblastos en etapa de maduración, de acuerdo a los siguientes criterios: células anchas y cortas, presencia de una única capa de células supraameloblásticas y una capa ancha de esmalte.

Todo esto, siguiendo las normas de Bioética reglamentadas por el Centro de Investigaciones de Cordeliers, el cual está certificado bajo el número n°A-7506-12 y se rigen por las normas del Consejo Europeo de 1985 y la convención STE 123.

Las muestras de mandíbula fueron fijados por perfusión con 4% de paraformaldehído, y luego diseccionados y descalcificados en una solución de PBS que contiene ácido etilendiaminotetraacetato (EDTA) al 4,13%, a pH 7,6 durante 4 a 6 semanas a 4 °C. La solución de descalcificación representa 10 veces el volumen del tejido y la solución fue cambiada al menos dos veces por semana.

Después de la desmineralización, las muestras se lavaron durante cuatro horas a 4 °C en PBS (0,15 M, pH 7,4), se deshidrataron en concentraciones crecientes de soluciones de etanol (70-85-95-100%) y luego impregnadas en parafina por inmersiones sucesivas a 65 °C en clearene, mezcla v/v clearene/parafina y parafina en moldes adecuados para enfriamiento a temperatura ambiente y luego a 4°C.

Una vez obtenido el bloque, se realizaron cortes sagitales seriados en micrótopo marca Reichert-Jung de 8 micrómetros de ancho, los cortes fueron colocados sobre láminas Superfrost plus, cuatro cortes por cada lámina.

Inmunohistoquímica

A través del microscopio óptico se seleccionaron los cortes que tuvieran esmalte en etapa de maduración, y por cada lámina se tomo un corte para el grupo control positivo (Calbindina D_{28k}), un corte para el grupo control negativo (suero bloqueante) y dos cortes para el grupo experimental (TRPV5 1/100 y NCX1 1/100).

Los cortes se desparafinaron en xilol 2 veces por cinco minutos cada vez, luego se rehidrataron en etanol a concentraciones decrecientes (100%, 70%) por 3 minutos cada uno y finalmente se aclararon en agua destilada y PBS (0,15 M, pH7,5).

Posteriormente, fueron procesados siguiendo las indicaciones del protocolo del Universal Quick Kit Vectastain, Vector Laboratories, England, sin embargo, los tiempos de bloqueo de la peroxidasa endógena y la incubación del anticuerpo primario fueron alargados, de 10 minutos y 1 hora, respectivamente, a 24 horas, para lograr la expresión de las proteínas en estudio.

Inicialmente los cortes se incubaron en la solución de trabajo del suero bloqueante del kit (Universal Quick Kit, Vectastain, Vector Laboratories, England) durante la noche a 4 °C, 24 horas después se retiró el exceso de suero de los cortes y fueron incubados en el anticuerpo primario (TRPV5 monoclonal, de conejo Abcam Laboratories,England, 1/100; NCX1 policlonal de conejo, Santa cruz, USA, 1/100; Calbindina D_{28k}, Swant, Bellinzona, Switzerland; 1/1000) diluido en PBS (0,15 M, pH 7,5) que contiene 1,5 % de suero bloqueante durante la noche a 4°C.

Al día siguiente, las láminas fueron lavadas por 5 minutos en PBS (0,15 M, pH 7,5), e incubadas en anticuerpo secundario biotinilado por 10 minutos y en streptavidin/peroxidasa por 5 minutos, a temperatura ambiente, para finalmente incubar en sustrato peroxidasa: Diaminobenzidine (Sistema Impact DAB, Nova Red; Vector Laboratories, England) por un tiempo máximo de 7 minutos. Después de cada incubación las láminas fueron lavadas en PBS (0,15 M, pH7,5) por 5 minutos.

Las observaciones y las fotografías se tomaron con un microscopio de luz Nikon Eclipse E600 y con una cámara CoolPix 995 acoplada al microscopio.

RESULTADOS

La inmunohistoquímica fue realizada para examinar el perfil de expresión y localización de las proteínas TRPV5 y NCX1 en las células del órgano dentario.

TRPV5

[Los datos de la presente investigación evidencian una distribución amplia de la proteína TRPV5 en mandíbula, la misma se identificó en lengua, músculo, en el órgano del esmalte, odontoblastos, ligamento periodontal y restos epiteliales de Malassez (Fig. 11 B.1, 12 B.1, 13 B.1), en comparación con la Calbindina D_{28k} que se localiza exclusivamente en las células del órgano dental (Fig. 11 A.1, 12 A.1, 13 A.1)

A nivel dentario, la proteína TRPV5 se presenta en el toda la extensión de la capa de ameloblasto y en la capa papilar supraameloblástica. Dentro del ameloblasto, la localización de la proteína fue principalmente citoplasmática y ocasionalmente concentrada a lo largo de la membrana basal (Fig. 11 B.3, 12 B.3, 13 B.3, 14). Adicionalmente, la proteína también fue localizada en odontoblastos, mostrando una distribución homogénea en cada tejido, de hecho se observa un marcaje continuo en el contorno del órgano dental, indicio de una localización citoplasmática. (Fig. 11 B.2, 12 B.2, 13 B.3).

Asímismo, aunque no es objeto de estudio, TRPV5 fue intensamente expresada en células del ligamento periodontal, pulpa, músculo esquelético y lengua (Fig. 11 B.1, 11 B.2, 12 B.1, 12 B.2, 13 B.1, 13 B.2)

Los patrones de expresión mostraron un perfil similar entre los tejidos a nivel dentario, ligeramente menos intensa si se compara con músculo, lengua y los ameloblastos de la calbindina D_{28k}.

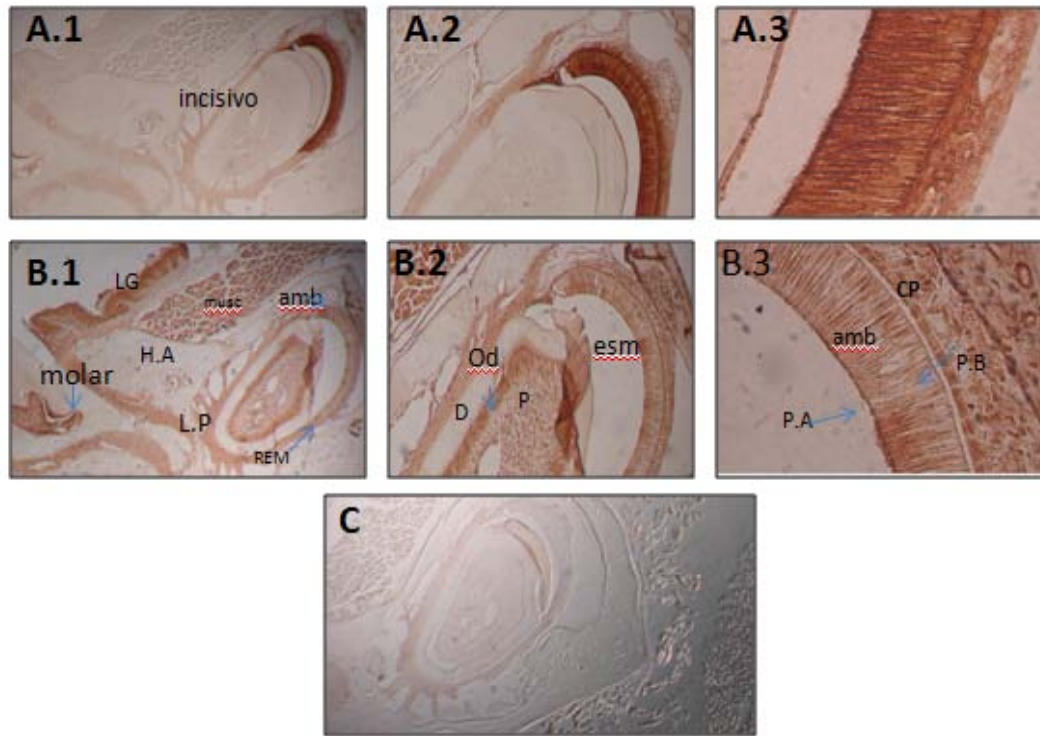


Figura 11. Inmunohistoquímica de TRPV5. A Control + (CALBINDINA D28k) A.1Obj 4X, A.2 Obj. 10X, A.3 Obj.40X marcaje intenso de los ameloblastos. B TRPV5 1/100. B.1 Obj. 4X, B.2. Obj 10X, B.3 Obj. 40X. observese el marcaje a nivel de los ameloblastos (amb), capa papilar (C.P), a nivel pulpar (P), odontoblastos (Od), restos epiteliales de Malassez (REM), ligamento periodontal (L.P), músculo (musc) y lengua LG. C. Control - (suero bloqueante). Ausencia de coloración. Ameloblastos en etapa de maduración temprana. P.A=Polo apical, P.B=Polo Basal, H.A= Hueso Alveolar

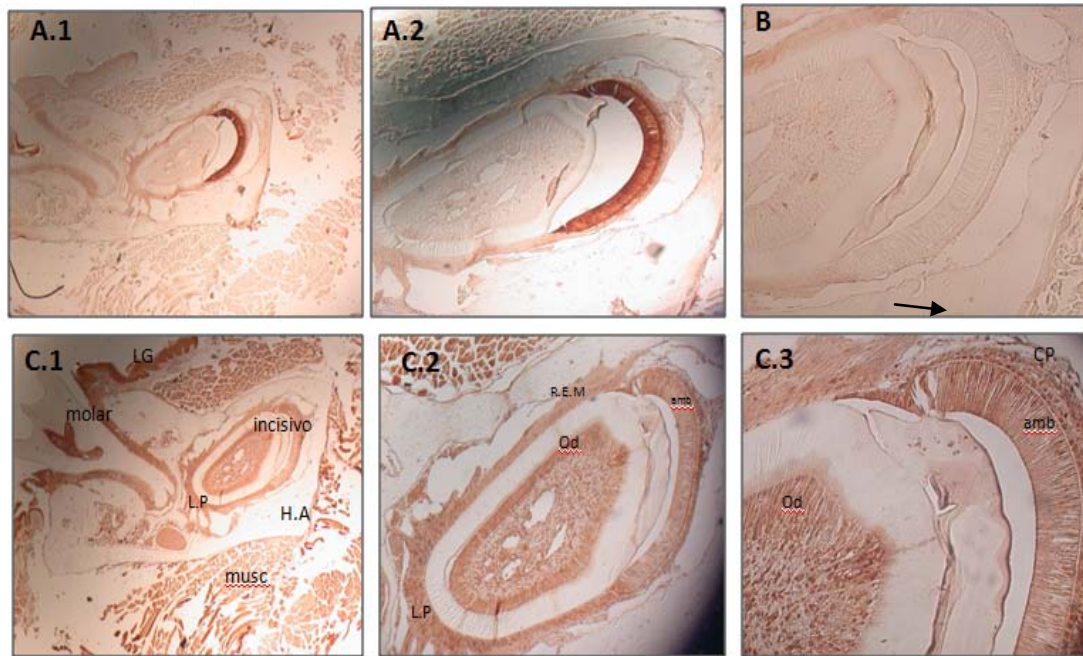


Figura 12. Inmunohistoquímica de TRPV5. A Control + (CALBINDINA D_{28k}) A.1 Obj 4X, A.2 Obj. 10X, marcaje intenso de los ameloblastos. B. Control – (suero bloqueante). Ausencia de coloración. C. TRPV5 1/100. C.1 Obj. 4X, C.2. Obj 10X, C.3 Obj. 40X. observe el marcaje a nivel de los ameloblastos (amb), capa papilar (C.P), a nivel pulpar (P), odontoblastos (Od), restos epiteliales de Malassez (REM), ligamento periodontal (L.P), músculo (musc) y lengua LG. Ameloblastos en etapa de maduración temprana. H.A= Hueso Alveolar

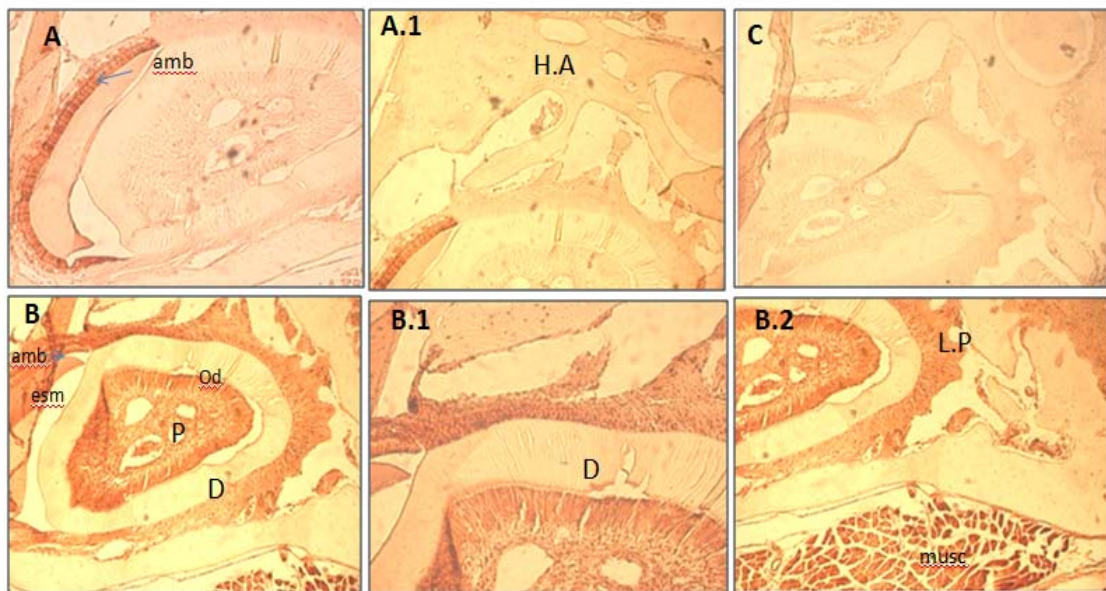


Figura 13. Inmunohistoquímica de TRPV5. A Control + (CALBINDINA D_{28k}) A. Obj 10X, A.1 Obj. 10X otra vista, notese el marcaje intenso de los ameloblastos. B, B.1, B.2 TRPV5 1/100. Obj. 10X, observe el marcaje a nivel de los ameloblastos (amb), capa papilar (C.P), a nivel pulpar (P), odontoblastos (Od), restos epiteliales de Malassez (REM), ligamento periodontal (L.P) y músculo (musc) C. Control - (suero bloqueante). Ausencia de coloración. Ameloblastos en etapa de maduración temprana. P.A=Polo apical, P.B=Polo Basal, H.A= Hueso Alveolar.

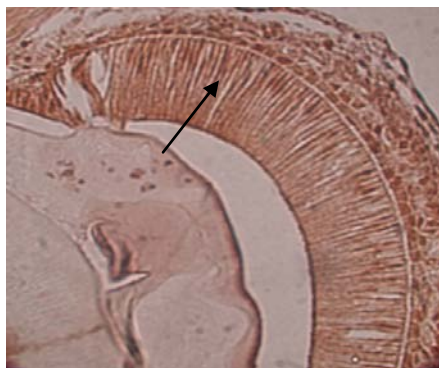


Figura 14. Inmunohistoquímica de TRPV5. Obj. 40X. Notese la tinción intensa de los ameloblastos en etapa de maduración y la capa papilar supraameloblástica. La flecha indica un patrón de expresión discretamente superior en el polo basal del ameloblasto.

NCX1

Nuestra data evidencia que NCX1 se expresó débilmente en ameloblastos, excepto en el borde apical en donde se observó un marcaje más oscuro (Fig. 15 B.3, 16 C.3).

En contraste, las células de la capa papilar del órgano del esmalte (Fig. 15 B.3 y 16 C.3), el músculo y la lengua (Fig. 15 B.1 y 16 C.1) mostraron una fuerte tinción, tan intensa como observa en la Calbindina D_{28k} a nivel del ameloblasto (Fig. 15 A.1, A.2, A.3 y 16 A.1, A.2).

A nivel del odontoblasto se observa una tinción más intensa que en el ameloblasto (Fig. 15 B.2 y 16 C.2), siendo mayor hacia el borde apical de la célula; pero no tan fuerte como el control positivo.

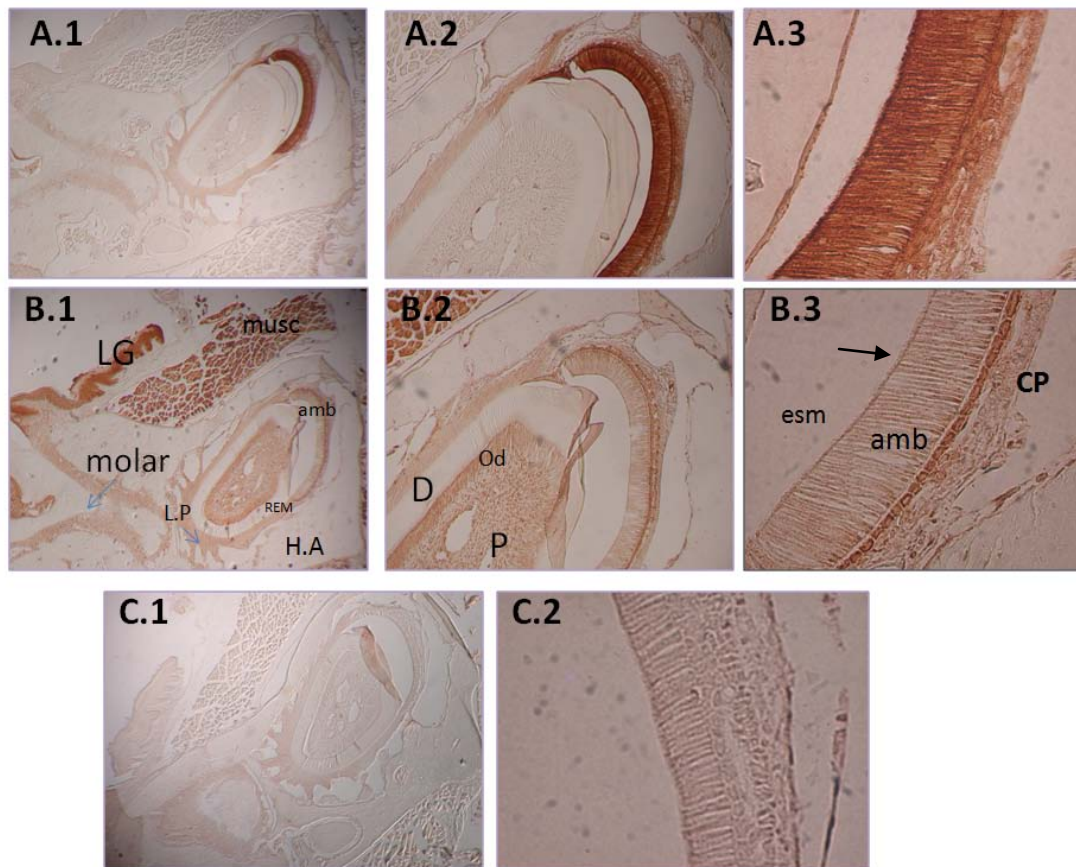


Figura 15. Inmunohistoquímica de NCX1. A Control + (CALBINDINA D_{28k}) A.1 Obj 4X, A.2 Obj. 10X, A.3 Obj.40X marcaje intenso de los ameloblastos. B NCX1 1/100. B.1 Obj. 4X, B.2. Obj 10X, B.3 Obj. 40X. observese el leve marcaje a nivel de los ameloblastos (amb), pulpa (P), restos epiteliales de Malassez (REM), ligamento periodontal (L.P), la coloración se incrementa a nivel de los odontoblastos (Od) y se hace más intensa en la Capa papilar del órgano del esmalte, músculo (musc) y lengua LG. C. Control – (suero bloqueante). C.1 Obj 4X, C.2 Obj. 40X, ausencia de coloración. Ameloblastos en etapa de maduración temprana. H.A= Hueso Alveolar.

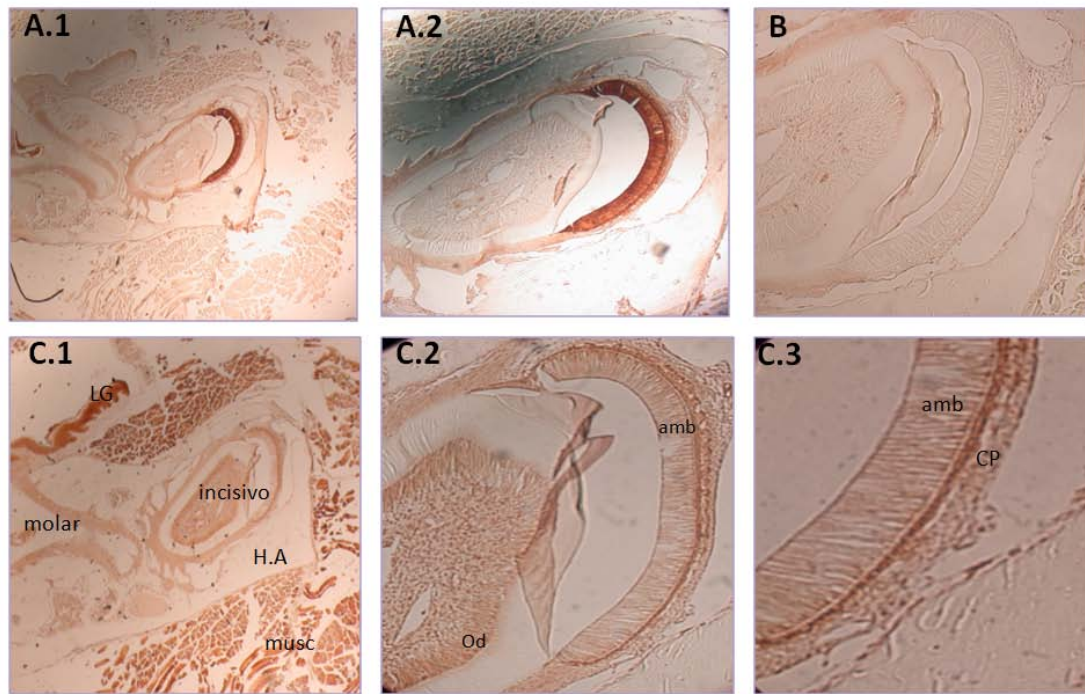


Figura 16. Inmunohistoquímica de NCX1. A Control + (CALBINDINA D_{28k}) A.1 Obj 4X, A.2 Obj. 10X, marcaje intenso de los ameloblastos. B. Control – (suero bloqueante). Ausencia de coloración. C.NCX1 1/100. C.1 Obj. 4X, C.2. Obj 10X, C.3 Obj. 40X. observe el leve marcaje a nivel de los ameloblastos (amb), pulpa (P), restos epiteliales de Malassez (REM) y ligamento periodontal (L.P), la coloración se incrementa a nivel de los odontoblastos (Od) y se hace más intensa en la Capa papilar del órgano del esmalte, músculo (musc) y lengua. Ameloblastos en etapa de maduración temprana. H.A= Hueso Alveolar

DISCUSIÓN

Las evidencias obtenidas en esta investigación, revelaron que ambas proteínas, en la etapa de maduración del ameloblasto, poseen una distribución amplia a nivel mandibular, aunque el perfil de expresión de TRPV5 fue más fuerte que el NCX1, especialmente en el órgano del esmalte y, la capa de odontoblastos. Mientras que TRPV5 se expresó tanto en los ameloblastos como en la capa papilar con la misma intensidad, NCX1 mostró un patrón de expresión heterogéneo, se mostró ligeramente en el citoplasma y polo basal y discretamente más fuerte en el polo apical del ameloblasto; resaltando el intenso patrón de expresión en la capa papilar.

Si bien es cierto, que los patrones de expresión confirman los resultados de estudios previos, en donde se demuestra la presencia de NCX1 en el polo apical y apico/lateral del ameloblasto (18) y en el polo distal del odontoblasto (36); la distribución de los patrones de expresión de NCX1 en el ameloblasto y la capa papilar son inversos a los resultados hallados por Okumura, Hu y colaboradores (18). Mientras que Hu y colaboradores reportan una significativa expresión en el polo apical del ameloblasto y una débil expresión en la capa papilar, en esta investigación se observó lo contrario, probablemente, la diferencia aquí evidenciada obedezca a variaciones en la aplicación del protocolo de Inmunohistoquímica, anticuerpos primarios utilizados, tiempo de incubación de los cortes y la manipulación de la muestra.

Otras proteínas fijadoras de iones también han sido descritas en la capa papilar del órgano del esmalte, tales como bombas $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ (5, 34), transportadores de HCO_3^- (5). La presencia de dichas proteínas, así como de NCX1 y TRPV5, aquí demostrados, sugieren un papel funcional indirecto de la capa papilar. Ciertamente, las células de la capa papilar no están capacitadas para el transporte de calcio hacia el frente de mineralización (2) pero podrían estar implicadas, en el mantenimiento de la homeostasis de Calcio intraorganela, o bien, en la exportación de calcio hacia el

ameloblasto, o bien, en la homeostasis del ambiente extracelular del ameloblasto, asegurando así las condiciones de gradiente de Na^+ , Ca^{2+} y control de pH, necesarios para el influjo/eflujo de calcio durante el transporte transcelular en la amelogénesis. Sin embargo, se necesitan más estudios para aclarar la importancia funcional de las proteínas NCX1 y TRPV5 en la capa papilar.

Por otro lado, la débil expresión de NCX1 en el ameloblasto en proceso de maduración, resultante en este estudio, en comparación con el control positivo (Calbindina $\text{D}_{28\text{K}}$) y la expresión de NCX1 en el odontoblasto, hacen pensar que definitivamente existe una proteína adicional, vinculada a la extrusión del calcio hacia el esmalte en formación. Estudios recientes han confirmado, la existencia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+} - \text{K}^+$ (NCXK4) en la membrana apical del ameloblasto, cuya regulación está asociada a un receptor de ionosiltrifosfato, localizado en la membrana del retículo endoplásmico, que controla la liberación de calcio de los depósitos intracelulares, por lo cual, le han adjudicado a NCXK4, un papel regulador en el transporte de calcio, cuando los niveles son críticos, como es el caso de la etapa de maduración del esmalte (13, 14, 36). Lo anterior, deja en entredicho, que el transporte de Calcio en el ameloblasto, sea un transporte, exclusivamente, transcelular.

En contraste, la expresión marcada de TRPV5 y NCX1 en el odontoblasto, confirman que el transporte transcelular, representa el principal mecanismo de exportación de calcio hacia la matriz de dentina (36). Ciertamente, durante la formación de la dentina, el calcio es transportado desde la red de vasos pulpares, a través, de la capa de odontoblastos, utilizando una ruta transcelular, para ser incorporado en la fase mineral, entre la pre dentina no mineralizada y la dentina mineralizada (22).

Estudios recientes se han enfocado a localizar y caracterizar el papel funcional de las TRPV en el odontoblasto. Los resultados sugieren que estímulos térmicos,

mecánicos, ósmóticos y el alargamiento del odontoblasto pueden activar a las TRPV1, TRPV2, TRPV3 y a la TRPV4, mediando la entrada de calcio al odontoblasto desde la dentina, y no el eflujo como se ha visto hasta ahora, vía NCX, por lo cual se cree que las TRPV1-4 están vinculadas con la sensibilidad dentinaria (26, 27). La exclusión de la proteína TRPV5 en el mecanismo descrito anteriormente, sugiere un papel funcional diferente, sin embargo, no se consiguieron antecedentes referentes a la expresión de TRPV5 en el tejido dentario. Por tanto, se cree que TRPV5 actúa en el diente, tal cual lo hace en el riñón.

A nivel renal, ha sido, ampliamente, demostrado la presencia de TRPV5 y su participación como el principal responsable de la reabsorción de calcio en el túbulo contorneado distal y el túbulo colector, con el fin, de mantener el balance en la concentración de calcio sistémico (7, 21, 24). Por tanto, la expresión de la proteína TRPV5 en el ameloblasto y odontoblasto, está relacionada con el transporte de calcio necesario para la mineralización de los tejidos dentarios.

La localización intracitoplásmica de la proteína, demostrada en este estudio, hace pensar que no solo se expresa en la membrana plasmática del ameloblasto y odontoblasto, sino que también está presente en la membrana de organelas intracelulares, regulando la homeostasis del calcio dentro de la organela celular (22).

En conclusión, la expresión de TRPV5 y NCX1 en el ameloblasto y odontoblasto, deja en evidencia que las mencionadas proteínas actúan como un sistema intrusor y extrusor de calcio, hacia el cristal de Hidroxiapatita y dentina en crecimiento; dando lugar, a un mecanismo de transporte direccionado.

Los resultados obtenidos indican que el transporte de calcio a través del ameloblasto y odontoblasto durante la etapa de maduración, se da por un proceso transcelular que puede ser complementado por transcitosis. Es así como, el calcio proveniente de la circulación sistémica, entra a la célula por el polo basal del ameloblasto y odontoblasto, a favor de un gradiente de concentración utilizando

canales de calcio (TRPV). Una vez, las concentraciones intracelulares de calcio aumentan, se induce la liberación de la calbindina, esta se desplaza hasta la membrana basal del ameloblasto para fijar iones de Ca_{2+} y trasladarlos a la membrana apical. Sin embargo, la localización exclusiva de la calbindina en el órgano del esmalte, sugiere la existencia de un mecanismo distinto en el odontoblasto, encargado de transportar el calcio de un lado a otro de la membrana.

En este sentido, la expresión intracitoplasmática de la proteína TRPV5 y NCX1 conlleva a presumir que tales iones también pueden ser captados y liberados por organelas intracitoplasmáticas, y ser extruidos a través de la membrana apical por intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ hacia el frente de mineralización del esmalte y la dentina.

Por tanto, alteraciones en la expresión de las proteínas estudiadas podrían ser responsables de amelogénesis o dentinogénesis imperfecta, aumentando la susceptibilidad del tejido dentario a ser afectado por patologías como la caries. Sin embargo, se recomienda continuar con esta línea de investigación, para poder establecer relaciones concretas entre la expresión de las proteínas estudiadas y genes relacionados con patologías asociadas al metabolismo del calcio, a nivel dentario, como el gen represor *Msx2*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lacruz R., Smith Ch., Chen YB, Hubbard MJ, Hacia JG, Paine M. Gene-expression analysis of early and late maturation stage rat enamel organ. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119 (Suppl. 1): 149–157
2. Lacruz R., Smith Ch., Bringas P, Smith SM, Sneal ML, Kurts I, Chen YB, Hubbard MJ, Hacia JG, Paine M. Identification of Novel Candidate Genes Involved in Mineralization of Dental Enamel by Genome-Wide Transcript Profiling. *J. Cell. Physiol.* 2012; 227: 2264–2275.
3. Bolaños A., Berdal A., Lezot F., Hotton D. Cartografía de la Expresión del Gen Msx2 en el Ratón. Análisis de las Alteraciones Relacionadas con la Invalidación del Gen Msx. *ODOUS científica.* 2008; 9:7-26
4. Bolaños A., Hotton D., Ferbus D., Loiodice S., Berdal A., Babajko S. Regulation of Calbindin-D28k Expression by Msx2 in the Dental Epithelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 2012; 60(8): 603–610
5. Josephsen K, Takano Y, Frische S, Praetorius J, Nielsen S, Aoba T, Fejerskov O. Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010: C1299-C1307.
6. Hubbard, M. Calcium transport across the Dental enamel epithelium. *Crit. Rev. Oral Biol.* 2000; Med.; 11; 437
7. Groot T, Bindels R, Joost G.J. Hoenderop J. TRPV5: an ingeniously controlled calcium channel. *Kidney International.* 2008; 74: 1241–1246.
8. Niemeyer B. Structure-function analysis of TRPV channel. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2005, 371: 285–294.
9. Beate D. Quednau · Debora A. Nicoll · Kenneth D. Philipson. The sodium/calcium exchanger family—SLC8. *Eur J Physiol.* 2004; 447, 543–548
10. Choi K, An B, Yang H, Jeung E. Regulation and molecular mechanisms of calcium transport genes: do they play a role in calcium transport in the uterine

endometrium? *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2011; 62 (5): 499-504.

11. Vanoevelen J , Janssens J, Huitema L, Hammond C, Metz J, Flik G, Voets T, Schulte-Merker S. Trpv5/6 is vital for epithelial calcium uptake and bone formation. *The FASEB Journal*.2011; 25 (9): 3197-207
12. Li J, Kajiya H, Okamoto F, Nakao A, Iwamoto T, Okabe K. Three Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) variants are expressed in mouse osteoclasts and mediate calcium transport during bone resorption. *Endocrinology*. 2007;148(5):2116-25
13. Lacruz R, Smith C, Kurtz I, Hubbard M, Paine M. New Paradigms on the Transport Functions of Maturation-stage Ameloblasts. *J Dent Res* 2013; 92(2): 122-129.
14. Hu P, Lacruz R.S, Smith C.E, Smith S, Kurtz I, Paine M. Expression of the Sodium/Calcium/Potassium Exchanger, NCKX4, in Ameloblasts. *CTO*. 2012
15. Lacruz R, Smith C, Moffat P, Chamg E, Bromage T, Bringas P, Nanci A, Baniwal S, Zabner J, Welsh M, Kurtz I, Paine M. Requirements for Ion and Solute Transport, and pH Regulation during Enamel Maturation.*Journal of Cellular Physiology* 2011; 1776-85.
16. Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, Krebsbach P, Yamada Y, Hammarstron L, Simmer J, Fincham A, Snead M, Smith C. Comparative Immunochemical Analyses of the Developmental Expression and Distribution of Ameloblastin and Amelogenin in Rat Incisors. *J Histochem Cytochem*. 1998; 46: 911-934.
17. Smith C. Cellular and Chemical Events During Enamel Maturation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9:128-161.
18. Okomura R., Shibukawa Y., Muramatsu T., Hashimoto S., Nakagawa K-I, Tazaki M., Shimono M. Sodium-Calcium Exchangers in Rat Ameloblasts. *J Pharmacol Sci*. 2010; **112**, 223 – 230.

19. Bolaños A. Régulation de l'expression de la Calbindine-D_{28k} par le gène Msx2 dans les cellules épithéliales. [These Doctorat]. 2010.
20. Aïoub M, Lézot F, Molla M, Castaneda B, Robert B, Goubin G, Néfussi JR, Berdal A. Msx2 ^{-/-} transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Epub* 2007;41(5):851-9.
21. Gkika D, Hsu Y-J, Van der Kemp A, Christakos S, Bindels R, Hoenderop J. Critical Role of the Epithelial Ca₂₊ Channel TRPV5 in Active Ca₂₊ Reabsorption as Revealed by TRPV5/Calbindin-D_{28K} Knockout Mice. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 3020–3027, 2006.
22. Linde A, Lundgren T. From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int.J. Dev. Biol*. 1995; 39: 213-222.
23. Linde A, Goldberg M. Dentinogénésis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1993; 4 (5): 679-728.
24. Van Abel, M., Goot, J, Hoenderop J, Bindels, R. The epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6: regulation and implications for disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2005; 371: 295–306.
25. Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channel. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Mol Pharmacol*. 2009; 75: 1262–1279.
26. Tsumura M, Sobhan U, Muramatsu T, Sato M, Ichikawa H, Sahara Y, Tazaki M, Shibukawa Y. TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts. *Cell Calcium*. 2012 ;52(2):124-36.
27. El Karim I, Linden G, Curtis T, About I, Mcgahon M, Irwin C. Human odontoblasts express functional thermo-sensitive TRP channels: implications for dentin sensitivity. *Pain*, 2011; 152 (10): 2211-23.
28. Lee D, Obukhov A, Shen Q, Liu Y, Dhawan P, Nowycky M, Christakos S.

- Calbindin-D28k decreases L-type calcium channel activity and modulates intracellular calcium homeostasis in response to K⁺ depolarization in a rat beta cell line RINr1046-38. *Cell Calcium*. 2006; 39: 475–485.
29. Berdal A, Nanci A, Smith C, Ahluwalia J, Thomasset M, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H. Differential Expression of Calbindin-D 28 kDa in Rat Incisor Ameloblasts Throughout Enamel Development. *The Anatomical Record*. 1991; 230: 149-163.
 30. Lambers T, Mahieu F., Oancea E, Hoofd L, Lange F, Mensenkam A. Calbindin-D_{28K} dynamically controls TRPV5-mediated Ca_{2p} transport. *The EMBO Journal*. 2006; 25: 2978–2988.
 31. Turnbull C, Looi K, Mangum J, Meyer M, Sayer R, Hubbard M. Calbindin Independence of Calcium Transport in Developing Teeth Contradicts the Calcium Ferry Dogma. *J Biol Chem*. 2004;279(53):55850-4.
 32. Lytton J. Na⁺/Ca²⁺ exchangers: three mammalian gene families control Ca²⁺ transport. *Biochem. J.*. 2007; 406: 365–382.
 33. Denis Noble, Andre Herchuel. Role of Na/Ca exchange and the plasma membrane Ca²⁺-ATPase in cell function. *EMBO reports*. 2007; 8 (3) 228-232.
 34. Lundquist P. Odontoblast phosphate and calcium transport in dentinogenesis. *Swed Dent J Suppl*. 2002;(154):1-52.
 35. Wen X, Lacruz RS, Smith CE, Paine ML. Gene-expression profile and localization of Na⁺/K⁺-ATPase in rat enamel organ cells. *Eur J Oral Sci* 2014; 122: 21–26.
 36. Tsumura M, Okumura R, Tatsuyama S, Ichikawa H, Muramatsu T, Matsuda T, Baba A, Suzuki K, Kajiya H, Sahara Y, Tokuda M, Tokuda M, Momose Y, Tazaki M, Shimono M, Shibukawa Y. Ca²⁺ extrusion via Na⁺-Ca²⁺ exchangers in rat odontoblasts. *J Endod*. 2010; 36 (4): p.668-74.
 37. Duan X. Ion Channels, Channelopathies, and Tooth Formation. *J Dent Res* 2014; 93(2):117-125.