





# Localización inmunohistoquímica de receptores de potencial transitorio tipo vaniloide 5 en ameloblastos de ratones Swiss

Víctor Simancas-Escorcía<sup>1\*</sup> ; Antonio Díaz-Caballero<sup>2</sup> ; Adel Martínez-Martínez<sup>2</sup> .

<sup>1</sup>Universidad del Sinú. Grupo de Investigación GENOMA. Cartagena, Colombia.

<sup>2</sup>Universidad de Cartagena, Facultad de Odontología, Grupo Interdisciplinario de Investigaciones y Tratamientos Odontológicos Universidad de Cartagena (GITOU), Cartagena, Colombia.

\*Correspondencia: [victor.simancas@unisinu.edu.co](mailto:victor.simancas@unisinu.edu.co)

Recibido: Febrero 2022; Aceptado: Agosto 2022; Publicado: Septiembre 2022.

## RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la localización de los receptores de potencial transitorio de tipo vaniloide-5 (TRPV5) en los ameloblastos de ratones Swiss. **Materiales y métodos.** Estudio experimental *In vitro* donde fueron analizados cortes en parafina de 12 incisivos de crecimiento continuo de ratones machos Swiss salvajes de 7 días de nacidos. Las etapas del desarrollo de la formación del esmalte dental se identificaron por medio de la coloración hematoxilina-eosina. La inmunodetección de los receptores de potencial transitorio de tipo vaniloide-5 fue efectuada por medio del anticuerpo primario policlonal anti-TRPV5. Las observaciones se llevaron a cabo mediante un microscopio Leica DM 500. **Resultados.** Se identificaron las diferentes etapas implicadas en la formación del esmalte dental, entre ellas, la etapa de secreción y maduración. En ellas, se evidenció que los ameloblastos eran células alargadas con núcleos ovalados en posición proximal y con áreas manifiestamente desarrolladas de secreción medial y distal. Fue visualizado un inmunomarcaje de TRPV5 en la membrana plasmática y citoplasma de los ameloblastos de secreción y maduración de todos los ratones analizados. Los TRPV5 también fueron inmunolocalizado en los odontoblastos, endotelio vascular y células pulpares. **Conclusiones.** Los receptores de potencial transitorio de tipo vaniloide-5 se localizan en los ameloblastos de secreción y maduración de ratones Swiss. Particularmente, los TRPV5 son inmunodetectados en los odontoblastos, endotelio vascular y células de la pulpa dental.

**Palabras clave:** Ameloblastos; canales catiónicos TRPV; canales de calcio; odontoblastos; esmalte dental; dentina (*Fuente: DeCS*).

## ABSTRACT

**Objective.** To determine the localization of transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) in the ameloblasts of Swiss mice. **Materials and methods.** In vitro experimental study where paraffin sections of 12 continuously growing incisors of 7-day-old male Swiss mice were analyzed. Developmental stages of dental enamel formation were identified by hematoxylin-eosin staining. Immunodetection of the transient receptor potential vanilloid 5 was performed using the primary polyclonal antibody anti-TRPV5. Observations were carried out using a Leica DM 500 microscope.

### Como citar (Vancouver).

Simancas-Escorcía V, Díaz-Caballero A, Martínez-Martínez A. Localización inmunohistoquímica de receptores de potencial transitorio tipo vaniloide 5 en ameloblastos de ratones Swiss. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(3):e2681. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2681>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

**Results.** The different stages involved in the formation of dental enamel were identified, including the secretory and maturation stages. In them, it was evidenced that the ameloblasts were elongated cells with oval nuclei in a proximal position and with developed areas of medial and distal secretion. TRPV5 immunolabeling was visualized in the cell membrane and cytoplasm of the secretory and maturation ameloblasts of all mice tested. TRPV5s were also immunolocalized in odontoblasts, vascular endothelium, and pulp cells. **Conclusions.** The transient receptor potential vanilloid 5 is located on the secretory and maturing ameloblasts of Swiss mice. In particular, TRPV5s are immunodetected in odontoblasts, vascular endothelium, and dental pulp cells.

**Keywords:** Ameloblasts; TRPV cation channels; calcium channels; odontoblasts; dental enamel; dentin (*Source: DeCS*).

## INTRODUCCIÓN

Los ameloblastos son células responsables de la secreción proteica y el mantenimiento de un medio ambiente extracelular que propicia la formación del tejido más mineralizado producido por los vertebrados, el esmalte dental. Los ameloblastos presentan un dinamismo particular, destacándose por la presencia de tres principales etapas de diferenciación: presecreción, secreción y maduración. En cada etapa, los ameloblastos tienen una actividad específica. En la presecreción, se inicia la formación del esmalte, quien será fino y con cristales integrados a la dentina que refuerzan su resistencia a presiones y choques. En la etapa de secreción, el esmalte se compone de una mezcla de cristales en formación, variedad de proteínas y de iones como el calcio. Finalmente, en la etapa de maduración, el esmalte aumenta la densidad mineral y ocurre la llegada masiva de fosfato y calcio (1).

Las modificaciones de los eventos fisiológicos en las etapas de diferenciación de los ameloblastos pueden suscitar alteraciones estructurales en la disposición de los cristales de hidroxiapatita que integraran el esmalte dental (2). Estas modificaciones podrían conducir a la disminución o pérdida de la dureza dental y función masticatoria. Por ello, resulta interesante dilucidar el rol de los ameloblastos y los diversos elementos constitucionales del esmalte dental durante su formación. Uno de ellos, es el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), elemento de la familia de metales alcalinotérreos cuya homeostasis es vital en todas las formas de vida. Este elemento es esencial para el esmalte dental. De hecho, el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta estructura, es significativamente elevado, comparado con órganos como el hígado o musculo (3).

En los últimos años, se había considerado que el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en los ameloblastos

ocurría como un proceso pasivo. Sin embargo, esta concepción se ha desvirtuado gracias a la identificación de canales que intervienen en su transporte celular (4). Se ha conocido que los ameloblastos son capaces de regular el transporte de iones y moléculas, facilitando que los cristales puedan crecer y tolerar el exceso de acidez mediante  $\text{HCO}_3^-$  (un subproducto de la formación de la hidroxiapatita) (5). Este proceso fisiológico ocurre gracias a la presencia canales con alta selectividad por el  $\text{Ca}^{2+}$  sobre otros cationes. Entre estos se destacan los canales epiteliales de calcio TRPV5, miembro del subgrupo ('V' por vaniloide) perteneciente a la familia de canales de receptor de potencial transitorio (TRP). Además de su especificidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ , los TRPV5 se localizan en la membrana apical de tejidos epiteliales y tienen capacidad de respuesta frente a la 1.25-dihydroxyvitamin D3 (1.25[OH]<sub>2</sub>D3), facilitando la entrada y transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel intestinal y renal (6).

Sin embargo, a nivel dental, particularmente en los ameloblastos, el estudio de los TRPV5 ha sido escasamente abordado. Ante ello, sería interesante conocer la localización de los TRPV5, evento que ayudará a dilucidar el rol de estos canales durante la formación del esmalte dental o amelogénesis. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la localización de los receptores de potencial transitorio de tipo vaniloide-5 (TRPV5) en los ameloblastos de ratones salvajes mediante un estudio inmunohistoquímico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Preparación de tejidos.** Fueron utilizados 12 incisivos de crecimiento continuo de ratones macho Swiss WT (Janvier, St Berthevin) de 7 días de nacidos. Estos fueron obtenidos a partir de mandíbulas mediante microdissección con la ayuda de un estereomicroscopio (Leica MZ FLIII,

Leica Microscopy Systems), previa anestesia y perfusión con 4% de paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich Co.). Inicialmente, la mandíbula fue aislada del hueso basal y luego, se realizó la extracción de los incisivos en erupción continua con una cureta Gracey (Hu-Friedy). Los dientes recuperados fueron lavados cuidadosamente en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X, Gibco™) y fijados por inmersión en paraformaldehído a 4% (PFA, Sigma-Aldrich Co.) y 0.1% de glutaraldehído (Sigma-Aldrich Co.) durante 24 horas. Acto seguido, los dientes fueron descalcificados en 10% de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) durante 4 semanas.

Posteriormente, se procedió a la deshidratación e inclusión en parafina. Una vez obtenido los bloques, estos fueron sometidos a cortes de 6 µm en un micrótopo Leica RM2125 RST. Luego, se identificaron y seleccionaron las láminas que contenían cortes de ameloblastos en la etapa de secreción/maduración con la ayuda de la coloración hematoxilina-eosina, previamente descrito por Simancas-Escorcía et al (7). Este trabajo tuvo presente los aspectos éticos contemplados en la resolución 008430 de 1993 de la República de Colombia y fue realizado de acuerdo con los principios internacionales de las 3R y pautas para el cuidado y uso de animales de laboratorio encontrados en la Guide for the care and use of laboratory Animals (8).

**Coloración hematoxilina-eosina.** Una vez sumergidos en baños de xileno (Leica Biosystems), los cortes de tejido dental fueron rehidratados en concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 95%, 80%, 60%, 30%) y luego coloreados con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos e inmediatamente lavados en agua. Después, se procedió a realizar una diferenciación ácido-alcohol durante 30 segundos seguida de una coloración con eosina durante 3 minutos. Finalmente, los cortes fueron deshidratados, lavados en xileno y montados en un medio de montaje anhidro (DPX).

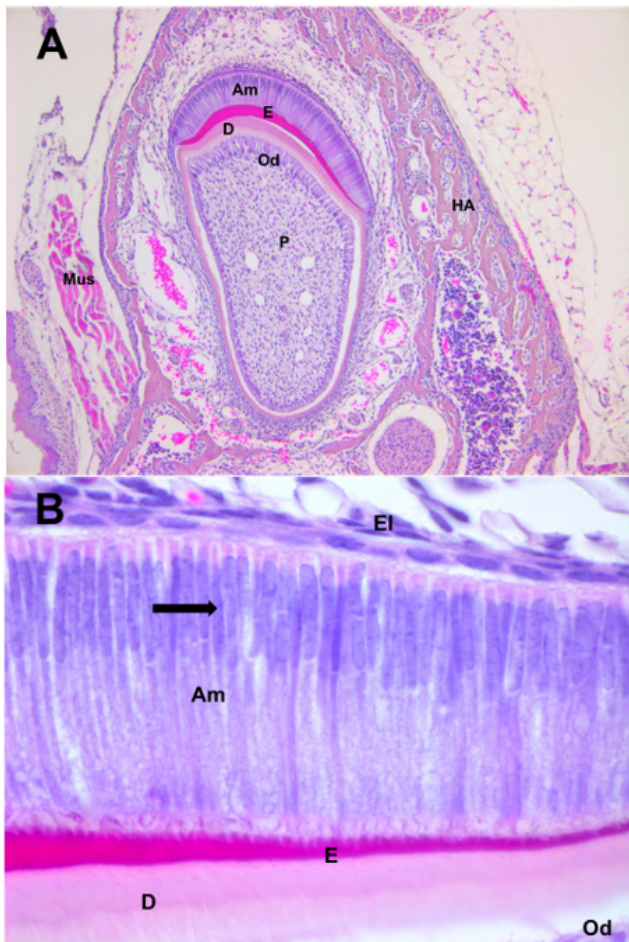
**Inmunohistoquímica.** Luego de seleccionar los cortes de incisivos, estos fueron desparafinados y rehidratados en baños de xileno y alcohol, respectivamente. La recuperación antigénica fue realizada por incubación de los cortes en un tampón de citrato pH6 por 20 minutos a 97°C. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó durante 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3%. Luego, los cortes fueron sumergidos en una solución de lavado (solución salina tamponada con Tris (TBS 1X, Gibco™) + monolaurato de

polioxietileno (20 sorbitano o Tween®20 a 0.05%) (3x5 minutos) y, se procedió a realizar el bloqueo de los sitios específicos con suero normal de caballo (Vector Laboratories) durante 20 minutos. A continuación, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti-TRPV5 (Rabbit Polyclonal, dilución 1:200, PA577320, Invitrogen) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, previo lavado, las láminas permanecieron en contacto durante 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado anti-Rabbit (Vector Laboratories) y con el sistema de peroxidasa R.T.U Vectastain® ABC (Vector Laboratories) por 30 minutos cada uno a temperatura ambiente. La reacción fue visualizada después de la incubación de los cortes con Diaminobenzidina (Sistema Impact DAB, Vector Laboratories) durante 4 minutos. La reacción fue detenida con lavados en agua destilada. Finalmente, los tejidos fueron contracolorados con hematoxilina de Mayer durante 30 segundos, deshidratados en etanol, seguido de xileno y montados con DPX.

La reacción de los TRPV5 fue considerada positiva al visualizar un marcaje color marrón. El control negativo fue realizado sin la presencia del anticuerpo primario, reemplazado por la solución bloqueadora. Todas las observaciones fueron realizadas en un microscopio Leica DM 500 acoplada a una cámara fotográfica.

## RESULTADOS

La coloración hematoxilina-eosina permitió la identificación de las diferentes estructuras que integran y rodean a los incisivos de crecimiento continuo de los ratones salvajes evaluados en el presente trabajo (Figura 1A). Fueron reconocidas las diferentes etapas implicadas en la formación del esmalte dental, entre ellas, la etapa de secreción y maduración. Allí, los ameloblastos eran células alargadas con núcleos ovalados en posición proximal y con un área notoriamente desarrollada de secreción medial y distal. En la extremidad superior de los ameloblastos de secreción se observó la presencia del estrato intermedio que desapareció en los ameloblastos de maduración. Una zona anatómica formada por capas de células planas con núcleos centrales de forma alargada. Igualmente, fue identificada la formación de una matriz del esmalte mineralizada bien definida y adyacente a la zona apical de los ameloblastos. Así mismo, se identificó en todas las muestras analizadas una zona intermedia entre el esmalte y la dentina, así como los odontoblastos situados en la zona periférica de la pulpa dental (Figura 1B).

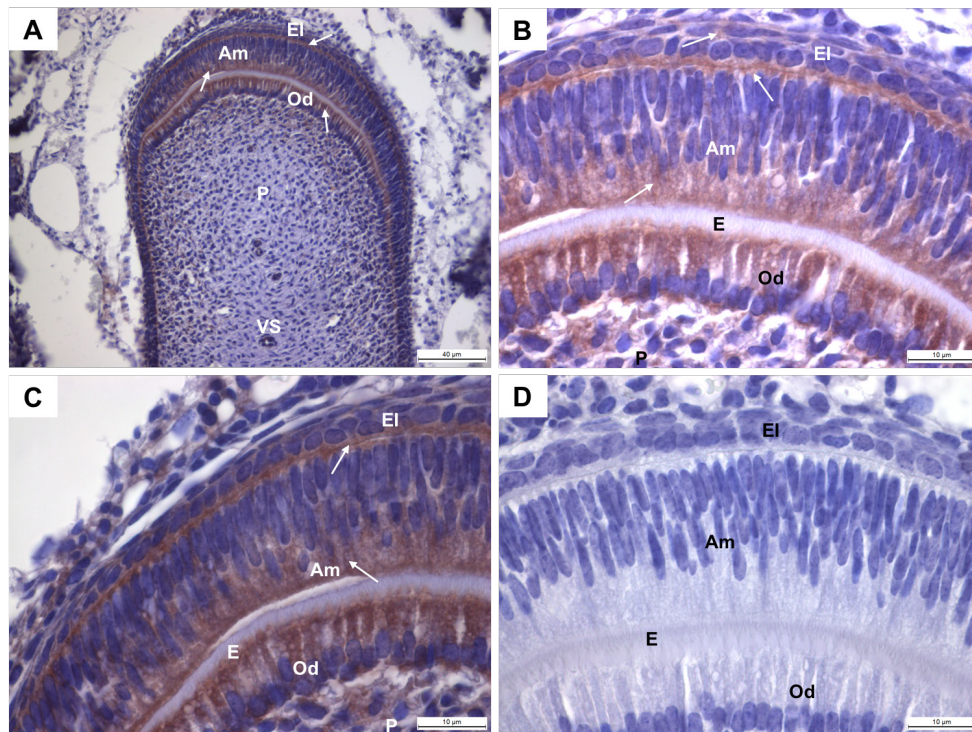


**Figura 1.** Corte histológico de incisivo en crecimiento continuo de ratón Swiss WT de 7 días. **(A)** Vista general de incisivo dental con estructuras adyacentes (25x). **(B)** Aspecto anatómico de ameloblastos rodeado de estrato intermedio (EI) y estructuras dentales mineralizadas (200x). **Mus:** musculo; **HA:** hueso alveolar; **Am:** ameloblastos; **E:** esmalte; **Od:** odontoblastos; **D:** dentina; **P:** pulpa. Coloración hematoxilina-eosina.

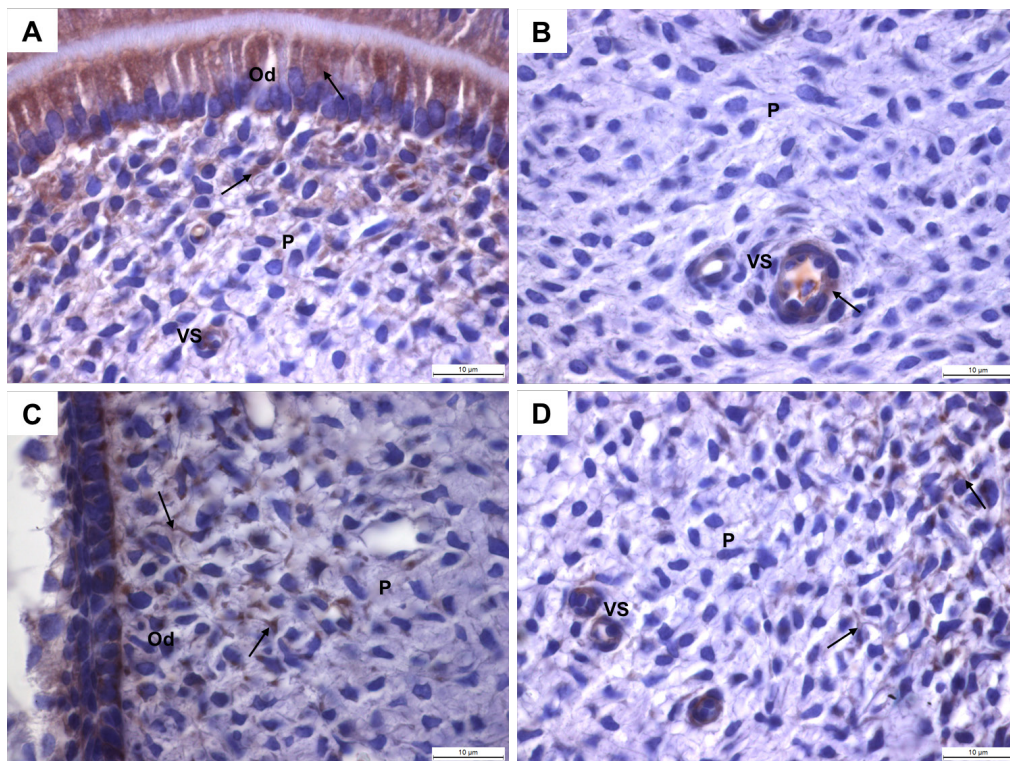
A través de la técnica de inmunohistoquímica se pudo constatar la localización de los TRPV5 en los incisivos de crecimiento continuo de los ratones Swiss WT de 7 días postnatal. La distribución de estos receptores fue identificada ampliamente en las estructuras dentales, pero también en musculo, ligamento periodontal y restos epiteliales de Malassez (Figura 2A). En todos los incisivos dentales analizados fue constante la inmunolocalización de los TRPV5 en la zona de los ameloblastos de secreción y maduración. Allí, su localización fue en la membrana plasmática y en el citoplasma con una distribución importante en la zona proximal que se encuentra en contacto con la matriz del esmalte y en la zona distal, limitando con el estrato intermedio. En esta última zona, los TRPV5 fueron detectados durante la etapa de secreción en el citoplasma de las células alargadas que la integran (Figura 2, B,C). Ningún marcaje inmunohistoquímico fue identificado en los cortes histológicos donde el anticuerpo primario anti-TRPV5 fue reemplazado por la solución de bloqueo (control negativo) (Figura 2D).

También se pudo constatar la inmunolocalización de los TRPV5 en la membrana plasmática y citoplasma de los odontoblastos. En ellos, los TRPV5 se distribuyeron en el polo apical secretor, incluyendo las zonas de prolongaciones odontoblásticas que se hallaban en contacto con la capa de matriz mineralizada o predentina (Figura 3, A). Una inmunodetección de los TRPV5 fue destacable en las células de la pulpa dental, incluyendo las células sub-odontoblástica de Höehl y fibroblastos pulpares. Por su parte, en la zona rica de células y la zona central de la pulpa dental. Particularmente, en las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos (Figura 3, B-D).





**Figura 2.** Localización inmunohistoquímica de los TRPV5 en ameloblastos de ratones Swiss WT **(A)** Microfotografía de incisivo en crecimiento continuo y estructuras circundantes. Nótese el marcaje de los TRPV5 de color marrón. **(B,C)** Inmunomarcaje de los TRPV5 en ameloblastos, estrato intermedio y odontoblastos (flechas). **(D)** Control negativo. **Am:** ameloblastos; **EI:** estrato intermedio; **E:** esmalte; **Od:** odontoblastos; **P:** pulpa; **VS:** vasos sanguíneos. Barra negra: 40  $\mu$ m (A); 10  $\mu$ m (B,C,D).



**Figura 3.** Inmunodetección de los TRPV5 en células pulpares de ratones Swiss WT de 7 días postnatales **(A)** Distribución del marcaje de los TRPV5 en odontoblastos y células adyacentes. **(B,C,D)** Inmunomarcaje de los TRPV5 en células endoteliales de vasos sanguíneos, células de Höehl y fibroblastos pulpares (flechas). **Od:** odontoblastos; **P:** pulpa; **VS:** vasos sanguíneos. Barra negra: 10  $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

Responder a preguntas fundamentales sobre el proceso de mineralización del esmalte dental, implica comprender los movimientos del calcio a lo largo de la formación de esta estructura. La identificación de las proteínas de membrana que forman los canales de calcio y participan en los movimientos de este ion en los ameloblastos de ratones salvajes, particularmente los TRPV5, fue objeto del presente trabajo de investigación. Los resultados obtenidos ponen en evidencian la expresión inequívoca de los TRPV5 en los ameloblastos de secreción y maduración de los incisivos en crecimiento continuo de ratones Swiss WT de 7 días postnatales. Esta expresión fue particularmente localizada a nivel citoplasmático y en la membrana plasmática de la zona proximal y distal de los ameloblastos. Estos hallazgos indicarían que TRPV5 podría desempeñar un rol esencial en los procesos conducente a la mineralización del esmalte dental.

La ubicación citoplasmática de los TRPV5 en los ameloblastos sugiere la implicación en funciones regulatorias del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelularmente. Estudios indican que estas proteínas se encuentran almacenadas al interior de las células a la espera de suplir las necesidades de  $\text{Ca}^{2+}$  requeridas (9). Por ejemplo, en los tubulos contorneados distales presentes en los riñones, los TRPV5 son los principales facilitadores de la absorción de  $\text{Ca}^{2+}$ . Incluso, los TRPV5 han sido reseñados como un elemento crítico para homeostasis de este elemento y de una mayor proliferación celular (10). En los ameloblastos, la relación entre la localización y el mecanismo fisiológico de TRPV5 no ha sido establecido. Sin embargo, es probablemente que los TRPV5 no solo faciliten la entrada de calcio a través de la membrana plasmática, sino que también tengan un rol intermediario potencial en la captación intracelular del calcio gracias a su almacenamiento en compartimientos como los endosomas. En ambas situaciones, los TRPV5 podría estar acompañados de otros facilitadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , como la bomba  $\text{ATPase Ca}^{2+}$  (PMCA1) y los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (11).

El modelo de crecimiento continuó observado en los incisivos de roedores y utilizado en la presente investigación, ha sido ampliamente utilizado en la comprensión de los procesos relacionados en la formación dental (12,13). Gracias a este modelo, se ha podido conocer la elevada tasa de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en los ameloblastos de

secreción y maduración durante la amelogénesis (14). Esta anotación fisiológica del calcio en los ameloblastos, justificaría la inmunolocalización de los TRPV5 en estas estructuras dentales tal y como se llevó a cabo en la presente investigación. Presumimos que modificaciones potenciales en estos canales podrían implicar cambios biológicos en el transporte del calcio/almacenamiento y en consecuencia, afectar la formación fisiológica del esmalte dental. Estos eventos serían los responsables de la presencia de defectos en el desarrollo y formación estructural del esmalte dental, incluyendo la amelogénesis imperfecta (AI)(15).

Aunque en la actualidad no se ha establecido una relación directa entre la disfuncionalidad de los TRPV5 y la AI. Recientemente, se ha señalado que la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  en el polo apical de los ameloblastos puede ser mediada también por otros transportadores. De hecho, un número variable de mutaciones en genes codificantes para proteínas involucradas en el transporte y regulación del calcio son responsables de la AI (7). Al día de hoy, no se reportan mutaciones patógenas de los TRPV5 en humanos, pero si se han informados de polimorfismos de nucleótidos. No es claro hasta donde estas variaciones genéticas afectarían la función de la proteína TRPV5 pero se cree que ella podrían disminuir la estabilidad de los canales de calcio (16). De hecho, estudios demuestran que los moduladores químicos y específicos de los TRPV5 tendrían el potencial de contribuir al tratamiento de trastornos en la homeostasis del calcio como la nefrolitiasis y la hipercalcemia (17). Justamente, la precipitación de calcio en la corteza renal o medula ha sido asociado a síndromes donde el fenotipo dental es compatible con defectos en la estructura del esmalte dental o amelogénesis imperfecta de tipo hipoplásico (18,19). Por eso, las implicaciones de posibles defectos estructurales y funcionales de los TRPV5 a nivel dental, es una pregunta que aún se encuentra sin resolver.

Otro hallazgo importante del presente estudio fue la localización de los TRPV5 en odontoblastos y células de la pulpa dental, incluyendo células del endotelio vascular. La identificación de marcadores TRP (TRPV1-4) en los odontoblastos (no especialmente TRPV5), están en relación con los numerosos canales iónicos y receptores neuronales presentes en los odontoblastos e implicados en la transducción del dolor dental (20). Los odontoblastos suelen presentar sensores mecánicos susceptibles de percibir



cambios en la concentración de calcio, estos sensores son canales iónicos mecano-sensibles que facilitan la traducción de estímulos mecánicos en señales eléctricas (21). Estudios recientes indican que los axones sensoriales pulpares adyacente a los odontoblastos expresan receptores de glutamato. Sugiriendo así, que los odontoblastos contienen glutamato como una sustancia neuroactiva necesaria para la activación de los axones pulpares (22). Por ello, no se descarta que los TRPV5 tengan un rol relacionado con la traducción de señales nerviosas en los odontoblastos y células de la pulpa dental. Sin embargo, estudios funcionales será útiles para esclarecer el rol de estas proteínas en las células pulpares.

Por otro lado, la identificación de los TRPV5 en la membrana citoplasmática y citoplasma de los odontoblastos, probablemente obedece a un flujo importante del calcio en la formación de la dentina como ha sido reportado en otras investigaciones (23). La identificación de los TRPV5 en los vasos sanguíneos también fue un hallazgo interesante. Aunque no existen reportes del rol de estas proteínas en los lechos vasculares, quizás su localización obedezca al transporte del calcio a través de ellos. Pero en las células endoteliales de los vasos sanguíneos pulpares, donde fueron identificados, probablemente sea una respuesta miogénica vascular, resultante de la despolarización de la membrana celular del músculo liso y el flujo de calcio a través de los canales. Estudios reportan que la activación de canales TRPV2 es responsable de la despolarización de la membrana plasmática y que ellos pueden contribuir al ingreso de calcio y estrechamiento o constricción de los vasos sanguíneos. Claramente, el rol fisiológico de los TRPV5 en células de la pulpa dental, incluyendo

odontoblastos, no se ha determinado pero la inmunolocalización descrita en el presente trabajo constituye un punto de partida para futuros estudios que pretendan dilucidar la función de esta proteína en las mencionadas estructuras dentales.

En conclusión, la expresión inmunohistoquímica de los TRPV5 fue identificada en la membrana plasmática y citoplasma de los ameloblastos de secreción y maduración de ratones Swiss de 7 días posnatales. Una expresión importante de los TRPV5 fue detectada en los odontoblastos, endotelio vascular y células de la pulpa dental. Ello indicaría que los TRPV5 podrían participar en el transporte y homeostasis del calcio durante la formación de estructuras mineralizadas a nivel dental.

Futuros estudios serán necesarios para establecer los mecanismos fisiológicos que involucra el transporte y regulación de la homeostasia del calcio por parte de los TRPV5 en los ameloblastos y odontoblastos. Lo anterior ayudaría a esclarecer el rol de los TRPV5 en la mineralización del esmalte dental, la dentina y su participación en los procesos patológicos en la formación de estas estructuras.

### Conflictos de intereses

Los autores manifiestan no tener ningún conflicto de intereses.

### Agradecimientos

Al programa Bolívar Gana con Ciencia de la Gobernación de Bolívar, Colombia y la Fundación Ceiba por el acompañamiento en este trabajo.

## REFERENCIAS

1. Thompson VP. The tooth: An analogue for biomimetic materials design and processing. *Dent Mater.* 2020; 36(1):25-42. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.08.106>
2. Bronckers AL. Ion Transport by Ameloblasts during Amelogenesis. *J Dent Res.* 2017; 96(3):243-253. <https://doi.org/10.1177/0022034516681768>
3. Eckstein M, Aulestia FJ, Nurbaeva MK, Lacruz RS. Altered Ca<sup>2+</sup> signaling in enamelopathies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018; 1865(11 Pt B):1778-1785. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.04.013>
4. Kim HE, Hong JH. The overview of channels, transporters, and calcium signaling molecules during amelogenesis. *Arch Oral Biol.* 2018; 93:47-55. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.05.014>

5. Simmer JP, Papagerakis P, Smith CE, Fisher DC, Rountrey AN, Zheng L, Hu JC. Regulation of dental enamel shape and hardness. *J Dent Res.* 2010; 89(10):1024-38. <https://doi.org/10.1177/0022034510375829>
6. Peng JB, Suzuki Y, Gyimesi G, Hediger MA. TRPV5 and TRPV6 Calcium-Selective Channels. In: Kozak JA, Putney JW Jr, editors. *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2018. <https://doi.org/10.1201/9781315152592-13>
7. Simancas-Escorcía V, Guarapo AEN, Camargo MGA de. Genes involucrados en la amelogenesis imperfecta. Parte I. *Rev Fac Odontol Univ Antioq.* 2018; 30(1):105-120. <https://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v30n1a10>
8. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. <https://doi.org/10.17226/12910>
9. Na T, Peng JB. TRPV5: a Ca(2+) channel for the fine-tuning of Ca(2+) reabsorption. *Handb Exp Pharmacol.* 2014; 222:321-357. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_13)
10. So CL, Milevskiy MJG, Monteith GR. Transient receptor potential cation channel subfamily V and breast cancer. *Lab Invest.* 2020; 100(2):199-206. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0348-0>
11. Robertson SYT, Wen X, Yin K, Chen J, Smith CE, Paine ML. Multiple Calcium Export Exchangers and Pumps Are a Prominent Feature of Enamel Organ Cells. *Front Physiol.* 2017; 8:336. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00336>
12. Harada H, Otsu K. Microdissection and Isolation of Mouse Dental Epithelial Cells of Continuously Growing Mouse Incisors. *Methods Mol Biol.* 2019; 1922:3-11. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_1)
13. Ida-Yonemochi H, Otsu K, Harada H, Ohshima H. Functional Expression of Sodium-Dependent Glucose Transporter in Amelogenesis. *J Dent Res.* 2020; 99(8):977-986. <https://doi.org/10.1177/0022034520916130>
14. Eckstein M, Lacruz RS. CRAC channels in dental enamel cells. *Cell Calcium.* 2018; 75:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.07.012>
15. Simancas-Escorcía V, Berdal A, Díaz-Caballero A. Caracterización fenotípica del síndrome amelogenesis imperfecta-nefrocalcinosis: una revisión. *Duazary.* 2019; 16(1):129. <https://doi.org/10.21676/2389783X.2531>
16. Van der Wijst J, van Goor MK, Schreuder MF, Hoenderop JG. TRPV5 in renal tubular calcium handling and its potential relevance for nephrolithiasis. *Kidney Int.* 2019; 96(6):1283-1291. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.05.029>
17. Nie M, Bal MS, Yang Z, Liu J, Rivera C, Wenzel A, Beck BB, Sakhaee K, Marciano DK, Wolf MT. Mucin-1 Increases Renal TRPV5 Activity In Vitro, and Urinary Level Associates with Calcium Nephrolithiasis in Patients. *J Am Soc Nephrol.* 2016; 27(11):3447-3458. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015101100>
18. Díaz Rojas KA, Simancas-Escorcía V. Caracterización fenotípica del Síndrome de Raine. *Cienc Salud Virtual.* 2019; 11(2):131-142. <https://doi.org/10.22519/21455333.1267>
19. Simancas-Escorcía VH, Natera-Guarapo AE, Acosta de Camargo MG. Genes involucrados en la Amelogenesis Imperfecta. Parte II. *Rev Fac Odontol Univ Antioquia.* 2019; 30(2). <https://doi.org/10.17533/udea.rfo.v30n2a9>
20. Hossain MZ, Bakri MM, Yahya F, Ando H, Unno S, Kitagawa J. The Role of Transient Receptor Potential (TRP) Channels in the Transduction of Dental Pain. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(3):526. <https://doi.org/10.3390/ijms20030526>
21. Simancas-Escorcía VH. Fisiopatología de los odontoblastos: una revisión. *Duazary.* 2019; 16(3):87-103. <https://doi.org/10.21676/2389783X.2971>
22. Cho YS, Ryu CH, Won JH, Vang H, Oh SB, Ro JY, Bae YC. Rat odontoblasts may use glutamate to signal dentin injury. *Neuroscience.* 2016; 335:54-63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.08.029>
23. Kim JH, Won J, Oh SB. Expression of CaV3.1 T-type Calcium Channels in Acutely Isolated Adult Rat Odontoblasts. *Arch Oral Biol.* 2020; 118:104864. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104864>
24. Baylie RL, Brayden JE. TRPV channels and vascular function. *Acta Physiol (Oxf).* 2011; 203(1):99-116. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02217.x>