

## EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA ASOCIADA A LISOSOMAS EN AMELOBLASTOS DE RATONES

**Recibido:**

**Aceptado:**

Víctor Simancas-Escorcia\*, Antonio Díaz-Caballero\*\*

### Resumen

**Introducción:** La formación del esmalte dental comprenden cambios morfofuncionales de los ameloblastos. Estas modificaciones involucran la participación activa de organelas celulares, entre ellas los lisosomas.

**Objetivo:** Identificar la distribución de la proteína de membrana asociada a lisosomas en los ameloblastos. **Materiales y métodos:** Incisivos en crecimiento continuo de ratones con edades de 7, 14 días y células epiteliales dentales de rata fueron utilizadas para identificar la proteína de membrana asociada a lisosomas tipo 1 (Lamp1) mediante la técnica de inmunohistoquímica. **Resultados:** Un marcaje citoplasmático de Lamp1 fue identificado en las células ameloblásticas durante todas las etapas del proceso de diferenciación de los ameloblastos, independientemente de sus edades. Lamp1 también fue detectado en las células epiteliales dentales. **Conclusiones:** Se evidencia la expresión de Lamp1 en los ameloblastos en incisivos de crecimiento continuo y células epiteliales dentales de rata. Próximos estudios deberían abordar el rol funcional de Lamp1 en la formación del esmalte.

Palabras clave: ameloblastos, esmalte dental, inmunohistoquímica, lisosomas.

\* Odontólogo. Magíster en Biología Celular, Fisiología y Patología. Universidad Paris-Diderot. Candidato a doctor en Fisiología y Patología, Universidad Paris-Diderot, Francia. Investigador del Grupo Interdisciplinario de Investigaciones y Tratamientos Odontológicos de la Universidad de Cartagena, Colombia (GITOU). Correo: vsimancasescorcia@hotmail.com

\*\*Odontólogo. Especialista en Periodoncia. Pontificia Universidad Javeriana. Doctor en Ciencias Biomédicas, Universidad de Cartagena. Profesor titular, Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena. Director del Grupo Interdisciplinario de Investigaciones y Tratamientos Odontológicos de la Universidad de Cartagena, Colombia (GITOU). Correo: adiazc1@unicartagena.edu.co

## IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF MEMBRANE PROTEIN ASSOCIATED WITH LYSOSOMES IN MICE'S AMELOBLASTS

Víctor Simancas-Escorcía\*, Antonio Díaz-Caballero\*\*

### Abstract

**Introduction:** Tooth enamel formation includes morphological changes in ameloblasts. These modifications involve the active participation of cellular organelles, including lysosomes. **Objective:** To identify the lysosomal membrane protein distribution in ameloblasts. **Materials and method:** The lysosomal membrane protein type 1 (Lamp 1) was identified in continuous growth incisor from mice (7, 14 days old) and epithelial rat's cells using the immunohistochemistry technic. **Results:** A cytoplasmic Lamp 1 marker was identified in ameloblast cells during all the stages of the process, no matter the age. Lamp 1 was detected, too, in the epithelial dental cells. **Conclusion:** It is evident the expression of Lamp 1 in ameloblasts of continuous growth incisor and epithelial dental rat's cells. Next studies must be done about the functional role of Lamp 1 in tooth enamel formation.

Keywords: Ameloblasts, immunohistochemical, lysosomes, tooth enamel.

## Introducción

Los dientes son órganos anatómicos responsables de múltiples funciones vitales, como la masticación, fonación, deglución y estética facial. Ellos están integrados por una corona dental compuesta de varios tejidos, entre ellos, el esmalte dental. El desarrollo dental inicia muy temprano durante la embriogénesis, mediante la formación de la lámina dental a la sexta semana de vida intrauterina. Esta lámina es el resultado de interacciones epitelio-mesenquimatosas entre el epitelio dental, que deriva del ectodermo, y un mesénquima que proviene de crestas neurales cefálicas, de origen ectodérmico. La invaginación de esta lámina induce la formación del órgano del esmalte a través de diferentes etapas en las que los ameloblastos, células epiteliales formadoras del esmalte dental, experimentan un proceso de diferenciación celular (1, 2).

El esmalte dental es una estructura no inervada, avascular y acelular cuya formación y organización es producto de la diferenciación terminal de los ameloblastos. En los humanos, este proceso fisiológico es limitado en el tiempo y único por cada diente. El esmalte dental está constituido mayoritariamente de una fase mineral (alrededor de 98 %) y de una fase orgánica que representa aproximadamente 2 %. La formación de su estructura, conocida también como la amelogénesis, puede ser estudiada detalladamente en modelos animales como los “incisivos de roedores”. Este modelo ha sido utilizado desde la década de 1960, debido a la presencia de incisivos en crecimiento continuo que son capa-

ces de modelizar las distintas etapas de los ameloblastos durante el proceso de la formación del esmalte dental (3, 4).

La evidencia científica ha dado constancia de la similitud fundamental en la composición básica y la formación del esmalte dental entre los incisivos de roedores y la dentición humana (4). Durante la amelogénesis, la secreción de una matriz proteica y mantenimiento de un medioambiente extracelular que favorece la síntesis de mineral de los ameloblastos permite inicialmente la formación de un esmalte parcialmente mineralizado con un espesor completo. Seguidamente, una degradación del contenido orgánico del esmalte dental es reemplazado por minerales. En este proceso, los ameloblastos (células con un marcado dinamismo) sufren diferentes cambios que corresponden a su estado de diferenciación. En consecuencia, los ameloblastos existirán en tres formas principales correspondiente a una actividad específica: ameloblastos presecretorios, ameloblastos secretorios y ameloblastos de maduración (5, 6).

El paso de los ameloblastos de secreción a ameloblastos de maduración implica cambios morfofuncionales importantes para la formación del esmalte dental. Los ameloblastos precursores de la matriz o secretorios sintetizan las proteínas del esmalte a nivel del retículo endoplasmático y posteriormente llevan a cabo la secreción de estas proteínas al medio extracelular donde ellas finalmente formarán la matriz del esmalte (7). En la etapa de maduración, los ameloblastos cambian de función. Luego de haber sido responsables de producir la matriz del

esmalte, los ameloblastos se convierten en transportadores de los efectores de la formación del esmalte, mientras que la matriz orgánica es destruida por proteólisis y, en consecuencia, las proteínas del esmalte son fragmentadas extracelularmente (8, 9).

Los fragmentos de proteínas del esmalte son transportados por los ameloblastos para su posterior degradación en el aparato endosomal-lisosomal (10). La exploración estructural mediante biología computacional ha puesto de manifiesto la unión de las proteínas del esmalte con proteínas transmembranales involucradas en la endocitosis (11). Por lo tanto, se ha sugerido que la eliminación de las proteínas del esmalte, proceso clave en la formación del esmalte dental, es mediada a través de la vía endosómica/lisosomal. Sin embargo, parte de los estudios realizados solo se han interesado en la difusión e internalización de las proteínas del esmalte en el espacio extracelular durante la formación del esmalte (11, 12).

Aunque la información sobre el transporte de las proteínas del esmalte, luego de su degradación en el proceso de la formación dental, es objeto de dilucidación por la comunidad científica. Se ha sugerido que probablemente diversas organelas participan en la destrucción de las proteínas del esmalte, entre ellas los lisosomas. Por ello, inicialmente sería de gran interés identificar la distribución funcional de los lisosomas en los ameloblastos durante el proceso de la amelogenesis. De esta manera, haciendo uso de la inmunohistoquímica, el propósito del presente trabajo es visualizar

la distribución específica de la proteína de membrana asociada a lisosomas en los ameloblastos.

## Materiales y métodos

### Preparación animales y tejidos

Se utilizaron ratones machos Swiss WT (Janvier, St Berthevin) de 7 y 14 días de edad. Los incisivos de los ratones fueron microdisecados bajo estereomicroscopio (Leica MZ FLIII, Leica Microscopy Systems, Ltd., Heerbrugg, Suiza). Durante la disección de las mandíbulas, los tejidos blandos fueron removidos delicadamente luego de la extracción de los dientes formados con una cureta Gracey (Hu-Friedy). La disección se inició en la parte posterior de la mandíbula aislando primeramente el hueso basal. A continuación, el hueso alveolar situado debajo de los dientes fue realizado seguido de la extracción de los incisivos en erupción continua. Para evitar la contaminación de los tejidos obtenidos, estos fueron cuidadosamente lavados en solución salina amortiguada por fosfatos - Dulbecco (DPBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.).

Después de la disección, los incisivos fueron fijados durante 24 horas por inmersión en una solución de DPBS con paraformaldehído a 4% (PFA, Sigma-Aldrich Co.) y 0,1% de glutaraldehído (Sigma-Aldrich Co.) antes de ser lavadas en PBS durante 1 hora. Las muestras fueron deshidratadas e incluidas en parafina y posteriormente cortadas en secciones de 5-7  $\mu\text{m}$ . Los ensayos fueron realizados en colaboración con el laboratorio de histología de

ciencias de la salud de la Universidad de Cartagena.

### **Coloración hematoxilina-eosina**

La hematoxilina de Mayer es una coloración clásica que colorea los núcleos en azul violeta, mientras que la eosina colorea el citoplasma y la matriz extracelular de color rosa. Luego de la fijación y deshidratación en baños de clearene (Leica Biosystems Richmond, Inc.), los cortes fueron rehidratados al ser sumergidos en alcohol absoluto. A continuación, los cortes fueron coloreados en hematoxilina de Mayer durante 1 minuto e inmediatamente lavados con agua destilada. Una diferenciación alcohol-ácido fue realizada en pocos segundos seguida de la coloración de la eosina durante 30 segundos. Los cortes fueron deshidratados nuevamente, lavados con clearene y después montados entre lamina y laminillas con un medio de montaje en resina DPX.

### **Preparación celular**

Células epiteliales dentales originadas del asa cervical de incisivos de rata descritas por Kawano et al. (13) fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda que contenía 5 % de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) Gibco™, 10 % de Suero Fetal Bovino-SFB (Gibco™), 1 % de penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL) (Gibco™), 0,5 de Anfotericina B (Gibco™). El medio de cultivo fue reemplazado tres veces por semana hasta la obtención de células a una confluencia entre 80-90 %.

### **Inmunohistoquímica**

En los cortes de incisivos de crecimiento continuo de ratones, luego de la desparafinación y rehidratación, se realizó una permeabilización durante 10 minutos en 1 % de Tritón X-100 (Thermo Fisher Scientific Inc). A continuación, los cortes fueron enjuagados tres veces en PBS durante 5 minutos bajo agitación. Los sitios de unión no específicos se bloquearon mediante incubación de los cortes de tejido durante 30 minutos en 1 % de albúmina de suero bovino (BSA, Euromedex) diluida en PBS.

En cuanto a las células epiteliales dentales de rata, una vez se hallaban cerca del 90 % de confluencia, fueron fijadas en una solución de PBS1X (Gibco™) a 4 % de paraformaldehído (Sigma-Aldrich®) durante 15 minutos. Acto seguido, las células fueron permeabilizadas con 0.5 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) y luego incubadas 20 minutos en PBS1X que contenía 1 % de BSA (Sigma-Aldrich®) / 1 % de glicina (Sigma-Aldrich®).

Los cortes de los incisivos y las células epiteliales dentales de rata fueron incubados durante una noche a 4°C con el anticuerpo anti-Lamp1 (Thermo Fisher Scientific). Después, estos fueron lavados con PBS y estuvieron en contacto con el anticuerpo secundarios Alexa Fluor 594 de cabra (Thermo Fisher Scientific Inc) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Finalmente, se llevó a cabo la tinción nuclear con DAPI (Sigma-Aldrich Co) y se procedió al montaje de las secciones de cortes y de las células epiteliales

utilizando un medio de montaje acuoso Immu-Mount™ (Thermo Scientific). La observación y las fotografías fueron realizadas en un microscopio Fluorescente Zeiss AxioSkop.

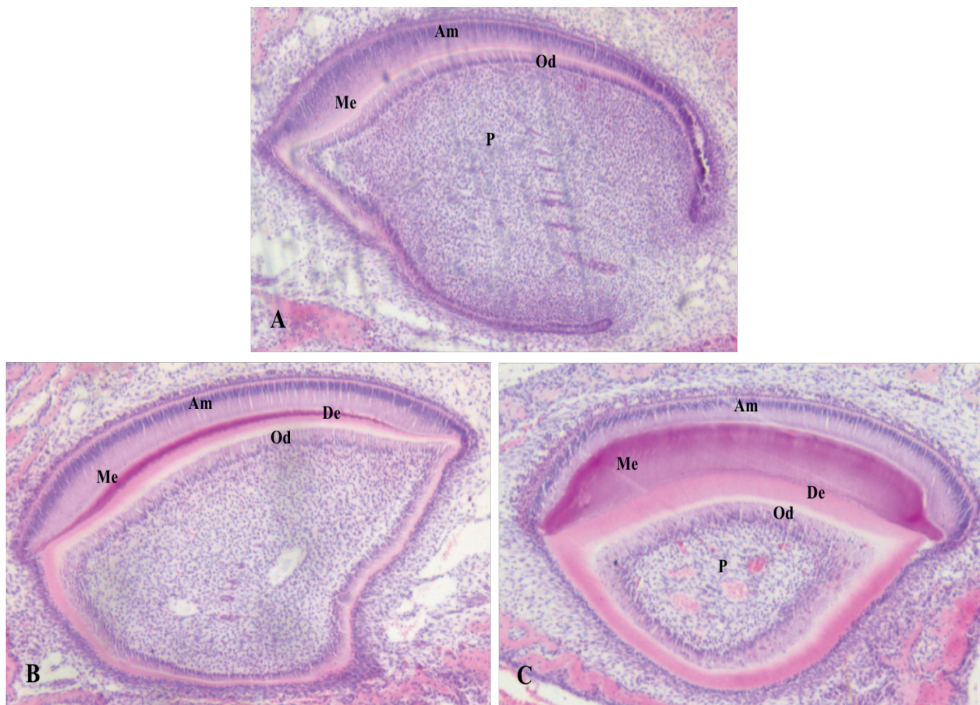
### Declaración de aspectos éticos

El protocolo de experimentación animal tuvo en cuenta los procedimientos de recolección de muestras científicas, administrativos y éticos contemplados en la Ley 84 de 1989. Los experimentos se realizaron siguiendo con absoluto rigor los principios internacionales de las 3R y guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio inscritos en la

Guide for the care and use of laboratory animals (14).

## Resultados

El presente trabajo tuvo como propósito identificar la organela involucrada en la degradación de material intracelular y extracelular de los ameloblastos. Inicialmente, en incisivos de crecimiento continuo de ratones de 7 días de nacidos, se pudieron constatar morfológicamente las tres etapas principales de diferenciación de los ameloblastos: ameloblastos de presecreción, secreción y maduración (figura 1).



**Figura 1.** Cortes histológicas sagitales de incisivo en crecimiento continuo de ratón Swiss WT de 7 días

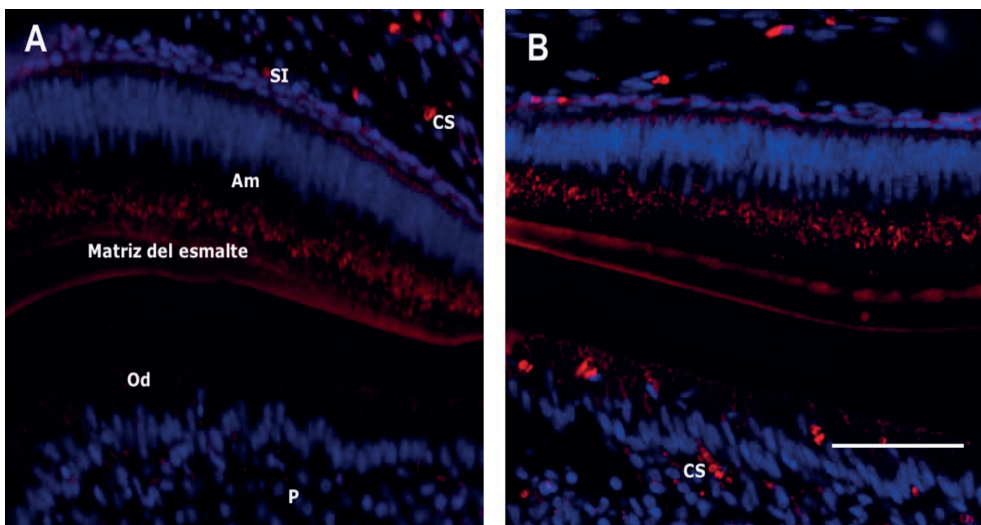
(A) Visualización de ameloblastos de presecreción. (B) Identificación de ameloblastos de secreción. (C) Observación de ameloblastos de maduración. Am: ameloblastos; Me: matriz del esmalte; Od: odontoblastos; De: dentina; P: pulpa. Coloración hematoxilina-eosina.

Los ameloblastos presecretorios se distinguieron por ser alargados, con núcleos visibles proyectados hacia la zona del estrato intermedio mientras que en su extremo apical se observó una serie de prolongaciones en contacto con la zona de matriz del esmalte que inicia su formación (figura 1,A). Los ameloblastos de secreción fueron de gran tamaño, sus núcleos se encontraron ubicados en posición proximal y a un mismo nivel. Igualmente, se pudo constatar una zona distal en plena producción de la matriz amelar (figura 1,B). Por su parte, en los ameloblastos de maduración, fue evidente una reducción de tamaño y volumen de estas células. Sus núcleos fueron más reducidos y de forma ovalada, en comparación con los ameloblastos de secreción. Se identificó la pérdida de prolongaciones en la zona distal de los ameloblastos, pasando de un borde

con prolongaciones plisadas a un borde completamente liso (figura 1,C).

La inmunolocalización de la proteína de membrana asociada a lisosomas (Lamp1) fue evidente de manera clara y uniforme en el citoplasma de las células ameloblásticas durante todas las etapas del proceso de diferenciación de los ameloblastos. Independiente de la edad de los ratones, la expresión de Lamp1 siempre estuvo presente.

Sin embargo, una detección más importante fue observada en los ameloblastos de secreción de los ratones de 7 días y 14 días de vida posnatal. Este marcaje fue también evidente hacia la zona de la membrana citoplasmática de los ameloblastos. Igualmente, Lamp1 (en rojo) fue observado en los odontoblastos y células sanguíneas (figura 2.A, B).

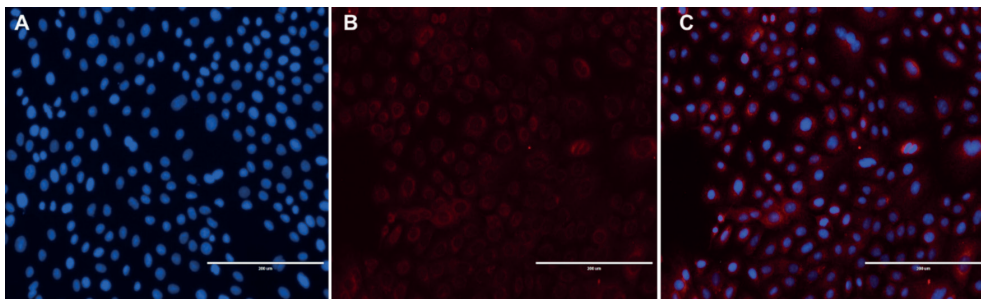


**Figura 2.** Inmunolocalización de Lamp1 en ameloblastos de presecreción y secretorios

Expresión Lamp1 (en rojo) en ameloblastos ratones de 7 días (A) y ameloblastos de ratones de 14 días de vida posnatal (B). SI: estrato intermedio. Am: ameloblastos. Od: odontoblastos. P: pulpa dental. CS: células sanguíneas. Barra blanca: 200  $\mu$ m.

La inmunodetección de Lamp1 fue identificada en las células epiteliales dentales de rata. Los resultados revelaron la presencia de un marcaje lisosomal citoplasmático importante en las células

cultivadas durante una semana. En algunas células fue notoria la presencia de Lamp1 cerca de la zona de la membrana citoplasmática (figura 3).



**Figura 3.** Inmunodetección de Lamp1 en células epiteliales dentales de rata

(A). Distribución nuclear observada gracias a la coloración DAPI. (B) Expresión citoplasmática de Lamp1. (C) Marcaje nuclear con DAPI (azul) y de Lamp1 (rojo). Barra blanca: 200  $\mu$ m

## Discusión

Los lisosomas son organelas celulares vesiculares descritas por en 1955 por Christian de Duve mediante técnicas de centrifugación (15). Gracias a la presencia de enzimas hidrolíticas, los lisosomas hacen posible la degradación de varios sustratos, entre ellos, proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y macromoléculas provenientes del medio extracelular o del medio citoplasmático (16). Por su importante rol en el funcionamiento de cualquier célula, el presente trabajo pretendió identificar y conocer su distribución en los ameloblastos.

La identificación de las diferentes etapas del proceso de diferenciación de los ameloblastos nos permite constatar que el incisivo de crecimiento continuo es un modelo adecuado en el estudio de la amelogénesis tal como ha sido reportado anteriormente (17). Pudimos consta-

tar como los ameloblastos presecretores van alargándose y su núcleo migra en posición del estrato intermedio.

Estos hallazgos, corresponden a los cambios iniciales que experimentan los ameloblastos y que luego los ayudará a convertirse en células polarizadas. Esta observación permite inferir que los ameloblastos presecretores han comenzado el proceso de secreción inicial de proteínas del esmalte. De acuerdo con Pérez (18), esas primeras proteínas de la matriz juegan un rol primordial en la morfogénesis y diferenciación de los ameloblastos.

Por su parte, la disposición bien alineada de los ameloblastos secretores suele indicar que su organización intracelular está apta para llevar a cabo la regulación funcional del esmalte en formación. En efecto, los ameloblastos cuentan en este periodo con un importante retículo



endoplásmico, aparato de Golgi y lisosomas que contribuirán a las modificaciones necesarias para el ensamblaje de gránulos de secreción. Estos gránulos migrarán continuamente y serán secretados en la matriz extracelular donde van a dar lugar a la formación del esmalte dental. Así, el esmalte va a estar compuesto de una mezcla de cristales en formación y numerosas proteínas, entre ellas, la amelogenina (19).

Los ameloblastos de maduración, redujeron ostensiblemente su tamaño y volumen, haciendo prever que el proceso de formación del esmalte ha llegado a su final. Se estima que durante este periodo además de los cambios morfológicos, cerca del 25 % de los ameloblastos morirán. Se ha reportado que los ameloblastos de esta etapa eliminan la matriz orgánica y el agua con el objetivo de incrementar la densidad del mineral del esmalte dental con la llegada masiva de iones de calcio y fosfato (5, 18). Esto indica que los ameloblastos presentaran una actividad endocítica muy importante con la presencia marcada de lisosomas, tal como se pudo constatar en nuestro trabajo.

La proteína de membrana asociada a lisosomas tipo 1 (Lamp1), una proteína con un dominio luminal, transmembranal y C-terminal citoplasmática, es altamente expresada en endosomas tardíos y lisosomas (20). Lamp1 fue plenamente identificada en todas las etapas de la diferenciación de los ameloblastos de manera independiente a la edad de los ratones y en las células epiteliales dentales de rata, estas últimas, concebidas como modelo celular de los ameloblastos (21). Lo an-

terior es indicativo de que los lisosomas están plenamente involucrados en el proceso de la amelogénesis dental y seguramente son muy activos en las funciones de degradación y señalización celular.

El presente trabajo también puso en evidencia la inmunodetección de Lamp1 en la membrana plasmática de los ameloblastos, en los odontoblastos y vasos sanguíneos. Estos resultados confirman la presencia de un dominio transmembranal de Lamp1 y sugieren su rol como intermediario de la superficie celular durante la endocitosis, como también su contribución en la deposición y mineralización del esmalte dental. Así mismo, nuestros resultados permiten constatar que la expresión de Lamp1 fue positiva en células sanguíneas. Estos resultados son acordes a los hallazgos publicados por Södergren et al. (22) y Lettau et al. (23), quienes identificaron Lamp1 en células sanguíneas circulantes como las plaquetas o linfocitos.

Si bien nuestro trabajo se limitó a la identificación de lisosomas en los ameloblastos, futuros estudios nos ayudarán a mejorar la comprensión espacial y funcional de estas organelas en la formación del esmalte dental. En efecto, resultaría interesante describir cómo los lisosomas realizan su función en los ameloblastos. Funciones que involucrarían la vía clásica que comprende la fusión de lisosomas entre ellos y con el material por degradar; la internalización por endocitosis de las moléculas extracelulares y el reciclaje de los componentes internos celulares cuando las organelas o componentes de las células se encuentran alterados o en condiciones de estrés nutritivo (24).

Adicional a la función conocida en la degradación de macromoléculas intracelulares y extracelulares de los lisosomas, sería prometedor dilucidar el papel de estas organelas en la regulación de vías de señalización en los ameloblastos. Este nuevo concepto funcional de los lisosomas ha sido estudiado recientemente y contempla que los lisosomas son un centro de señalización metabólico, clave en la dinámica de transporte de nutrientes y su regulación.

Por ejemplo, en condiciones normales el complejo mTORC1 (mammalian Target of Rapamycin complex 1) activo y localizado en la membrana citosólica de los lisosomas, es capaz de fosforilar el factor de transcripción TFEB (Transcription Factor EB), también presente en el citoplasma. Sin embargo, ante una disminución de los nutrientes en la célula, el complejo mTORC1 se inactiva y en consecuencia TFEB no es fosforilado. En este escenario, TFEB puede ingresar al núcleo y contribuir a la transcripción de genes codantes para proteínas implicadas en funciones de autofagia y funciones lisosomales (25, 26).

En notorio que la consideración de los lisosomas como vesículas llenas de en-

zimas digestivas encargadas de degradar elementos celulares y extracelulares, así como el papel de estas organelas en el control transcripcional durante la amelogénesis, requiere ser estudiada. Estas investigaciones deberían aparecer luego de identificar las moléculas que trabajan con Lamp1 durante la amelogénesis y que tengan implicación en los mecanismos de señalización inductores de cambios fenotípicos y funcionales de los ameloblastos.

En conclusión, el presente trabajo dejó en evidencia la expresión de la proteína de membrana asociada a lisosomas en los ameloblastos en incisivos de crecimiento continuo y células epiteliales dentales de rata.

## Agradecimiento

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

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## Referencias bibliográficas

1. Khuu C, Nirvani M, Utheim TP, Sehic A. MicroRNAs: Modulators of Tooth Development. *Microna*. 2016;5(2):132-9 <https://doi.org/10.2174/2211536605666160706003256>
2. Balic A, Thesleff I. Chapter Seven. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. In: Chai Y, editor. *Craniofacial Development*. Academic Press; 2015. p. 157-86. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.006>
3. Nirvani M, Khuu C, Utheim TP, Hollingen HS, Amundsen SF, Sand LP, et al. Circadian rhythms and gene expression during mouse molar tooth development. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2017;75(2):144-53. <https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1271999>
4. Suzuki M., Bartlett J.D. Rodent Dental Fluorosis Model: Extraction of Enamel Organ from Rat Incisors. In: Papagerakis P. (eds.). *Odontogenesis. Methods in Molecular Biology*; 2019; vol. 1922. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9012-2_30)
5. Elsharkawy S, Al-Jawad M, Pantano M, Tejada-Montes E, Mehta K, et al. Protein disorder–order interplay to guide the growth of hierarchical mineralized structures. *Nat. Commun*. 2018;9,2145. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04319-0>
6. Nakamura T, Jimenez-Rojo L, Koyama E, Pacifici M, de Vega S, Iwamoto M, et al. Epiprofin Regulates Enamel Formation and Tooth Morphogenesis by Controlling Epithelial-Mesenchymal Interactions During Tooth Development. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2017;32(3):601-10. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3024>
7. Simancas-Escorcia V, Natera A, Acosta-de-Camargo MG. Genes involved in amelogenesis imperfecta. Part I. *Rev Fac Odontol Univ Antioq*. 2018;30(1): 105-120. <http://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v30n1a10>
8. Núñez SM, Chun Y-HP, Ganss B, Hu Y, Richardson AS, Schmitz JE, et al. Maturation stage enamel malformations in Amtn and Klk4 null mice. *Matrix Biology*. 2016;52-54:219-33. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.11.007>
9. Hu Y, Smith CE, Richardson AS, Bartlett JD, Hu JCC, Simmer JP. MMP20, KLK4, and MMP20/KLK4 double null mice define roles for matrix proteases during dental enamel formation. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*. 2016;4(2):178-96. <https://doi.org/10.1002/mgg3.194>
10. Pham C-D, Smith CE, Hu Y, Hu JC-C, Simmer JP, Chun Y-HP. Endocytosis and Enamel Formation. *Frontiers in Physiology*. 2017;8:529. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00529>
11. Yin K, Lin W, Guo J, Sugiyama T, Snead M, Hacia J, Paine M. MiR-153 Regulates Amelogenesis by Targeting Endocytotic and Endosomal/Lysosomal Pathways—Novel Insight into the Origins of Enamel Pathologies. *Sci Rep*. 2017; 7: 44118. <https://doi.org/10.1038/srep44118>
12. Okubo M, Chiba R, Karakida T, Yamazaki H, Yamamoto R, Kobayashi S, et al. Potential function of TGF- $\beta$  isoforms in maturation-stage ameloblasts. *Journal of Oral Biosciences*. 2019;61(1):43-54. <https://doi.org/10.1016/j.job.2018.12.002>
13. Kawano S, Morotomi T, Toyono T, Nakamura N, Uchida T, Ohishi M, et al. Establishment of dental epithelial cell line (HAT-7) and the cell differentiation dependent on Notch signaling pathway. *Connect Tissue Res*. 2002;43(2-3):409-12. <https://doi.org/10.1080/03008200290000637>
14. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edn). Udo Albus, 2012. <https://journals-sagepub-com.gate2.inist.fr/doi/full/10.1258/la.2012.150312>

15. Duve C de, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R, Appelmans F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*. 1955 Aug;60(4):604. <https://doi.org/10.1042/bj0600604>
16. Cabukusta B, Neefjes J. Mechanisms of lysosomal positioning and movement. *Traffic*. 2018;19(10):761-9. <https://doi.org/10.1111/tra.12587>
17. Irizarry AR, Yan G, Zeng Q, Lucchesi J, Hamang MJ, Ma YL, et al. (2017) Defective enamel and bone development in sodium-dependent citrate transporter (NaCT) *Slc13a5* deficient mice. *PLoS ONE*. 12(4):e0175465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175465>
18. Perez VA, Mangum JE, Hubbard MJ. Direct evidence that KLK4 is a hydroxyapatite-binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;495(2):1896-900. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.040>
19. Guo J, Lyaruu DM, Takano Y, Gibson CW, DenBesten PK, Bronckers ALJJ. Amelogenins as potential buffers during secretory-stage amelogenesis. *J Dent Res*. 2015 Mar;94(3):412-20. <https://doi.org/10.1177/0022034514564186>
20. Terasawa K, Tomabechi Y, Ikeda M, Ehara H, Kukimoto-Niino M, Wakiyama M, et al. Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2016;479(3):489-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.093>
21. Bori E, Guo J, Rácz R, Burghardt B, Földes A, Kerémi B, et al. Evidence for Bicarbonate Secretion by Ameloblasts in a Novel Cellular Model. *J Dent Res*. 2016 May;95(5):588-96. <https://doi.org/10.1177/0022034515625939>
22. Södergren AL, Holm A-CBS, Ramström S, Lindström EG, Grenegård M, Öllinger K. Thrombin-induced lysosomal exocytosis in human platelets is dependent on secondary activation by ADP and regulated by endothelial-derived substances. *Platelets*. 2016;27(1):86-92. <https://doi-org.gate2.inist.fr/10.3109/09537104.2015.1042446>
23. Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. Lysosome-Related Effector Vesicles in T Lymphocytes and NK Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2015;82(3):235-43. <https://doi.org/10.1111/sji.12337>
24. Saffi GT, Botelho RJ. Lysosome Fission: Planning for an Exit. *Trends in Cell Biology*. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.05.003>
25. Perera RM, Zoncu R. The Lysosome as a Regulatory Hub. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2016;32(1):223-53. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125125>
26. Sha Y, Rao L, Settembre C, Ballabio A, Eissa NT. STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway. *The EMBO Journal*. 2017;36(17):2544-52. <https://doi-org.gate2.inist.fr/10.15252/emboj.201796699>