

06-G.1.2 "INCORPORAÇÃO "IN VITRO" DE  $^{125}\text{I}$ -AMELOGENINA EM MATRIZ DO ESMALTE E AMELOBLASTOS SECRETORES, VISUALIZADA ATRAVÉS DE RADIOAUTOGRAFIA". Guilherme Blumen (Departamento de Morfologia, FOP/UNICAMP), Colin Robinson (Department of Oral Biology, University of Leeds, England), José Merzel (Bolsista, CNPq-FOP/UNICAMP), Tereza L.S. Barrichello (Departamento de Morfologia, FOP/UNICAMP), Jaime Aparecido Cury (Departamento de Bioquímica, FOP/UNICAMP), Gilberto A. Fernandes (Laboratório de Fisiologia Clínica Experimental - UNICAMP), Vania C. Borghi (Divisão de Radiologia - IPEN-CNEN-USP).

Uma das características do esmalte jovem ou imaturo é uma rápida renovação do material orgânico de sua matriz. Este material orgânico é representado em grande parte por um grupo de proteínas, as amelogeninas, cuja característica é seu baixo peso molecular e sua relação topográfica com os ameloblastos secretores. Blumen & Merzel (1972, 1982) estudaram por radioautografia após a injeção de vários precursores da matriz, a cinética destes componentes orgânicos durante o estágio secretor dos ameloblastos. A dificuldade destes estudos, feitos "in vivo", era acompanhar a secreção e remoção do material proteico com a migração das estruturas que ocorre nos dentes de crescimento contínuo. Como foi demonstrado por McKee et al. (1986), que a matriz jovem do esmalte "incorpora" proteínas íntegras como albumina (68 Kd); fator de crescimento epidermal (61 Kd); insulina (5,7 Kd);  $^{125}\text{I}$  Calcitonina (3,6 Kd) a idéia foi tentar introduzir "in vitro" as próprias proteínas do esmalte marcadas e observar o seu destino.

A amelogenina usada neste experimento foi isolada da matriz do esmalte de incisivos inferiores de ratos Wistar, pelo método de Termite et al (1980), e iodada com  $^{125}\text{I}$  pelo método de Hunter & Greenwood (1962). De outro grupo de ratos Wistar, incisivos inferiores foram removidos de suas hemimandíbulas e com auxílio de um bisturi com lâmina nº 10, sob lupa estereoscópica, foi recortado e retirado da face labial um bloco de aproximadamente 8 mm de extensão contendo o esmalte jovem e o órgão de esmalte correspondente, a semelhança do procedimento descrito por Robinson et al. (1974). O material foi imediatamente colocado sobre uma tira de papel de filtro esterilizado, com a matriz do esmalte voltada para o papel. Em lâminas escavadas, as cavidades foram preenchidas com 0,3 ml de uma solução contendo partes iguais de  $^{125}\text{I}$ -Amelogenina, (A.E.=1,8 $\mu\text{Ci/ml}$ ) e de meio mínimo essencial de Eagle (modificado, com sais de Hanks, glutamina e bicarbonato de sódio) e mais 0,1 ml de antibiótico (estreptomomicina 300mg + Penicilina G Potássica 198,1 mg + diluente). Sobre esta solução o conjunto tecido + papel de filtro foi deixado fluir durante 1h, em câmara úmida (placas de Petri, com papel de filtro umedecido) à 37°C. Em seguida o conjunto tecido + papel de filtro, foi transferido para uma solução contendo apenas o meio nutritivo + antibiótico nas mesmas condições. Após 1h do meio contendo a amelogenina marcada e em seguida após 1,2,4,6,8 e 10h em solução nutritiva os tecidos foram lavados em meio de Eagle, fixados em glutaraldeído à 2,5% por 6h e processados para serem incluídas em resina polibed 812. Cortes de 1 $\mu\text{m}$  de espessura foram cobertos com emulsão Ilford K5D. Após 50 dias de exposição à 4°C, os preparados foram revelados, fixados, corados com azul de toluidina à 0,5% por 20 minutos montados e examinados. Em todos os tempos analisados, a matriz apresentou uma reação radioautográfica difusa típica, desde o limite amelodentinário em direção aos ameloblastos; estes e células do estrato intermédio mostraram-se também marcadas indicando a passagem de material radioativo da matriz para as células (Fig. 1).

Os dados do presente trabalho confirmam os estudos anteriores feitos por Blumen & Merzel (1972, 1982) e mais recentemente os de outros autores (Nancy et al., 1987; Smith et al., 1989) os quais mostram que os ameloblastos secretores, com efeito, são capazes de remover amelogenina durante o processo de amelogenese.

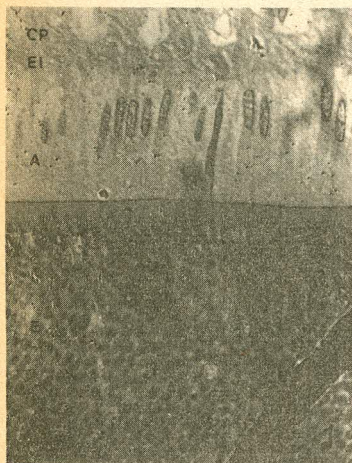


Fig. 1 - Radioautografia do órgão do esmalte, onde podemos visualizar os grãos de Ag devido a  $^{125}\text{I}$ -Amelogenina difusa sobre o esmalte (E), Ameloblastos (A), estrato intermédio (EI) e camada papilar (CP), após 1 hora de incubação. Azul de Toluidina 0,5%. X380.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLUMEN, G. and MERZEL, J. The decrease in the concentration of organic material in the course of formation of the enamel matrix. *Experientia*, 28: 545-548, 1972.
- BLUMEN, G. and MERZEL, J. Autoradiographic study with  $^{35}\text{S}$ -sodium sulphate of loss of sulphated glycosaminoglycans during amelogenesis in the guinea-pig. *Archs. oral Biol.*, 21: 513-521, 1976.

- BLUMEN, G. and MERZEL, J. New evidences for the role of secretory ameloblasts in the removal of proline labelled proteins from the young enamel as visualized by autoradiography. *Jour. Biol. Buccale*, 10: 73-83, 1982.
- HUNTER, W.M. and GREENWOOD, F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 194: 495-496, 1962.
- MCKEE, M.D.; MARTINEAU-DOIZE, B.; WARSHAWSKY, H. Penetration of various molecular-weight proteins into the enamel organ and enamel of the rat incisor. *Arch. oral Biol.*, 31: 287-296, 1986.
- NANCY, A.; SLAVKIN, H.C.; SMITH, C.E. Immunocytochemical and Radioautographic evidence for secretion and intracellular degradation of enamel proteins by ameloblasts during the maturation stage of amelogenesis in rat incisors. *Anat. Rec.*, 217: 107-123, 1987.
- ROBINSON, C.; HILLER, C.R.; WEATHERELL, J.A. Uptake of <sup>32</sup>P-labelled phosphate into developing rat incisor enamel. *Calcif. Tissue Res.*, 15: 143-152, 1974.
- SMITH, C.E.; POMPURA, J.R.; BORENSTEIN, S.; FAZEL, A.; NANCY, A. Degradation and loss of matrix proteins from developing enamel. *Anat. Rec.*, 224: 292-316, 1989.
- TERMINE, J.D.; BELCOURT, A.B.; CHRISTNER, P.J.; CONN, K.M.; NYLEN, M.U. Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. 1. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J. biol. Chem.*, 255: 9760-9768, 1980.