



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

FRANCISCO MARQUES DE MELO NETTO

**Análise de focos de γ -H2AX, PCNA e CASPASE-3
em mucosa gengival de indivíduos submetidos ao
exame radiográfico panorâmico digital.**

Araçatuba

2016

FRANCISCO MARQUES DE MELO NETTO

**Análise de focos de γ -H2AX, PCNA e CASPASE-3
em mucosa gengival de indivíduos submetidos ao
exame radiográfico panorâmico digital.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof.^a Ass. Dr.^a Alaíde Gonçalves

Araçatuba

2016

Dedicatória

À Mirian e Rosmiro, meus pais, pelo apoio, carinho e compreensão ao longo destes anos difíceis de graduação;

À Geni e Francisco, meus avós, pelas incansáveis horas me ouvindo reclamar e me trazendo para Araçatuba;

À Daniel César, meu tio, que muito me ajudou não só financeiramente mas para que me tornasse uma pessoa melhor e chegasse onde estou;

À Izabela Soares Minari, que sempre esteve do meu lado me ouvindo reclamar e me ajudando a enxergar uma solução quando eu não enxergava nenhuma, obrigado por todos os momentos inesquecíveis que você me proporcionou ao longo desses 5 anos de amizade, obrigado por ser essa pessoa especial, por ser minha amiga e conselheira;

À Cassio Messias Beija Flor Figueiredo, pelos longos anos de amizade e conselhos durante a graduação, e por me suportar ao longo de todo esse tempo.

À Guilherme Felício de Biaggi, por me ajudar na elaboração deste trabalho do começo ao fim, não sei o que seria de mim sem você;

Aos meus colegas da Republica “K-Zona”, por me acolherem no primeiro ano, me mostrarem que a odontologia era um curso excelente e não me deixarem desistir;

Aos meus amigos da Republica “Sua Mãe”, por me acolherem no último ano, pelas risadas e companheirismo.

À turma 58, por proporcionar o melhor convívio acadêmico e me dar muitos colegas de profissão com quem posso contar;

A todos os estagiários, pós-graduandos, funcionários e professores do departamento de Ciências Básicas que estiveram presentes durante meu estágio no departamento e no projeto de extensão Praticando Ciências.

Agradecimientos

À minha família, por ter me dado todo suporte necessário para que eu chegasse até aqui.

À Prof.^a Ass. Dr.^a Alaíde Gonçalves, que, nos anos de convivência, muito me ensinou, teve paciência para me orientar e corrigir meus erros, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual;

A todos os professores da faculdade, por me mostrarem a odontologia, por sua amizade e por todas as conversas esclarecedoras não somente sobre os assuntos de suas aulas;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tít. Wilson Roberto Poi e do vice-diretor Prof. Tít. João Eduardo Gomes Filho;

À Guilherme Felício, por me cobrar todos os dias para escrever este trabalho, e me ajudar em todos os passos sem você não sei se este estaria pronto.

Aos meus amigos Ermanno, Marcelo, Izabela, Cássio, Marina, Janayna, Gabriela, Carlos, Mariana, Leila, Michelle por serem meus amigos ao logo de todos esses anos, sem vocês não chegaria até aqui.

Aos Professores André Bertoz, Ana Paula Farnezi Bassi, Eloi Dezan, João Eduardo Gomes Filho, Paulo Roberto Botacin, Renato Bigliuzzi, Renato Hopp, Wilson Roberto Poi e Wirley Gonçalves Assunção, por me fazerem acreditar na odontologia e seguir meus sonhos, cada um de vocês foram especiais para que eu concluísse minha graduação.

À Gestter Ché, Alaíde Gonçalves e Cláudio Aparecido Casatti, por aceitarem gentilmente comporem a banca examinadora deste trabalho, o enriquecendo ainda mais.

À Pró-reitoria de Pesquisa (PROPe-UNESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de Bolsa de Iniciação Científica (2015-2016).

À Disciplina de Histologia e Embriologia, representada pelos docentes Prof. Adj. Cláudio Aparecido Casatti, Prof. Dr. Edilson Ervolino, Profa. Dra. Alaide Gonçalves e Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto, pelo acolhimento e aceitação, pela possibilidade de participação em projetos de pesquisa e extensão universitária, que permitiram meu crescimento pessoal, profissional e contribuíram para minha formação.

Epigrafe

“Hoje, enfrentamos muitos problemas. Alguns criados por nós em consequência de diferenças ideológicas, religiosas, raciais, econômicas. Entretanto, chegou o momento de pensarmos em um nível mais profundo, em nível humano, e a partir daí apreciar e respeitar essa mesma condição nos outros seres humanos. Devemos construir relacionamentos mais próximos, de confiança mútua, compreensão e ajuda. Todos queremos a felicidade e evitar o sofrimento. Todos temos o mesmo direito de ser felizes, e aí reside a nossa igualdade fundamental. Não é necessário seguir filosofias complicadas. Nosso próprio cérebro, nosso próprio coração é o nosso templo. A filosofia é a bondade.”

Dalai Lama

Resumo

MELO – NETTO, F. M. **Análise de focos de γ -H2AX, PCNA e CASPASE-3 em mucosa gengival de indivíduos submetidos ao exame radiográfico panorâmico digital.** 2016. X f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

Estudos demonstraram preocupação com o aumento progressivo do número de pessoas que são expostas a radiação ionizante não natural (RI) e devido a associação destes com o risco de câncer. A RI, dependendo da quantidade e intensidade da dose, é capaz de causar mutações genéticas e danos irreversíveis às células, e a exposição contínua a radiação ionizante pode causar lesões na molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN). Nos consultórios odontológicos, nas suas diferentes especialidades os pacientes são expostos à várias doses de radiação X, seja para obtenção de radiografia panorâmica, periapical, oclusal e/ou interproximal.

O presente trabalho analisou espécimes da mucosa gengival coletados de 12 indivíduos adultos jovens, expostos à radiação X para obtenção de radiografia panorâmica, nos períodos de 2 horas, 5 horas e cerca de 30 dias após à exposição. Lâminas histológicas foram confeccionadas para análise morfológica microscópica dos espécimes, corados em hematoxilina e eosina (H.E.), e imunomarcadas para a análise das proteínas histona γ -H2AX, Caspase 3 e PCNA, envolvidas na identificação de quebra da fita do DNA, apoptose e na proliferação celular, respectivamente. Análises comparativas dos valores da frequência de queratinócitos γ -H2AX-positivo, de Caspase 3-positivo e de PCNA-positivo, no epitélio gengival, entre os grupos experimentais não

mostraram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). A expressão das proteínas Histona γ -H2AX, Caspase 3 e PCNA, no epitélio gengival não diferiram no período de duas horas, cinco horas e 30 dias de exposição à radiação X em aparelhos radiográficos com dose radioativa média entre 0,084 e 0,086 Gray.

Palavras-chave: Radiação ionizante, Imunoistoquímica, Histona γ -H2AX, PCNA, Caspase 3, Mucosa gengival, Raios-X

Abstract

MELO – NETTO, F. M. **Analysis of γ -H2AX, PCNA and CASPASE-3 foci in oral mucosa of patients undergoing digital panoramic radiographs.** 2016. X f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Studies have shown concern with the progressive increase in the number of people who are exposed to ionizing radiation not natural (IR) and because of their association with cancer risk. The IR, depending on the quantity and dose intensity, is capable of causing genetic mutations and irreversible cell damage and, continuous exposure to ionizing radiation can cause damage to the deoxyribonucleic acid (DNA) molecule. In dental offices, in their different specialties patients are exposed to various doses of radiation X to obtain panoramic radiograph, periapical, occlusal and / or interproximal.

This study examined specimens of the gingival mucosa collected from 12 subjects young adults exposed to X-rays to obtain panoramic radiograph, in periods of 2 hours, 5 hours and about 30 days after exposure. Histological slides were prepared for microscopic morphological analysis of specimens stained with hematoxylin and eosin (HE), and immunostained for the analysis of γ -H2AX histone proteins, Caspase 3 and PCNA involved in identifying DNA double strand break, apoptosis and cell proliferation, respectively. Comparative analysis of the values of the frequency γ -H2AX positive keratinocytes, Caspase-3-positive and PCNA positive in gingival epithelium between the experimental groups not showed statistically significant differences ($p > 0,05$). The expression of proteins Histone γ -H2AX, PCNA and caspase 3 at the gingival epithelium did not differ in the two-hour period, five hours and 30 days of exposure to

X-radiation in X-ray devices with radioactive average dose between 0.084 and 0.086 Gray.

Keywords: ionizing radiation, immunohistochemistry, Histone γ H2AX, PCNA, Caspase 3, buccal mucosa, X-rays

Lista de

Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomicrografia evidenciando o aspecto histológico do tecido epitelial e do tecido conjuntivo dos espécimes coletados. Em A observar a mucosa gengival com epitélio (ep) e tecido conjuntivo (tc) apresentando características bem preservadas. Em B, um aumento do epitélio mostrando as suas diferentes camadas teciduais: 1, camada basal, 2, camada espinhosa, 3, camada granulosa, 4, camada superficial. Coloração HE. Aumento 100x (A); 400x (B). 47
- Figura 2** - Fotomicrografia mostrando o padrão de Imunomarcagem para γ -H2AX (C) e caspase 3 (D), no epitélio da mucosa gengival. Células γ -H2AX-positivas com núcleo da célula apresentando pontos individuais corados (focos pontuais) (D). Células Caspase 3-positivas com coloração citoplasmática de cor marrom. Abreviações e símbolos: ep, epitélio; tc, tecido conjuntivo; setas, células imunomarcadas. Contracoloração: Fast Green (C); Hematoxilina de Harris (D); Aumento original 400x (C-D). 48
- Figura 3** - **Figura 3** - Fotomicrografia mostrando a imunomarcagem para PCNA no epitélio da mucosa gengival. Observar o padrão de imunomarcagem com núcleos celulares de cor marrom escura tanto na camada basal como na camada espinhosa do epitélio (E,G). Ausência total de marcação no controle negativo (F) e imunomarcagem PCNA-positiva (G), Abreviações e símbolos: ep, epitélio; tc, tecido conjuntivo; setas, células imunomarcadas. Contracoloração: Fast Green (E-G); Aumento original 400x (E); 100x (F-G). 49

*Lista de
Tabelas*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Grupo de Biópsias gengivais humanas coletadas cerca de 2 horas e cerca de 30 dias após a exposição à radiação panorâmica. 50
- Tabela 2 -** Grupo de Biópsias gengivais humanas coletadas cerca de 5 horas e cerca de 30 dias após a exposição à radiação panorâmica. 50
- Tabela 3 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival γ -H2AX-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de duas horas após a exposição do indivíduo à radiação X. 50
- Tabela 4 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival γ -H2AX-positivos / μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de 30 dias após a exposição do indivíduo à radiação X. 51
- Tabela 5 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival γ -H2AX-positivos / μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de cinco horas após a exposição do indivíduo à radiação X. 51
- Tabela 6 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival γ -H2AX-positivos / μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de 30 dias após a exposição do indivíduo à radiação X. 52
- Tabela 7 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival Caspase 3-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de duas horas após a exposição do indivíduo à radiação. 52

- Tabela 8 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival 53
Caspase 3-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de trinta dias após a exposição do indivíduo à radiação.
- Tabela 9 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival 53
Caspase 3-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de cinco horas após a exposição do indivíduo à radiação.
- Tabela 10 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival 54
Caspase 3-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de trinta dias após a exposição do indivíduo à radiação.
- Tabela 11 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival 54
PCNA-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de duas horas após a exposição do indivíduo à radiação X.
- Tabela 12 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival 55
PCNA-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de 30 dias após a exposição do indivíduo à radiação X.
- Tabela 13 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival 55
PCNA-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime coletado cerca de cinco horas após a exposição do indivíduo à radiação X.
- Tabela 14 -** Frequência de queratinócitos da mucosa gengival 56
PCNA-positivos/ μm^2 de indivíduos expostos aos raios X, para obtenção de radiografia panorâmica. Espécime

coletado cerca de 30 dias após a exposição do indivíduo à radiação X.

*Lista de
Abreviatura*

LISTA DE ABREVIATURAS

± =	Mais ou Menos
% =	Porcentagem
γ-H2AX =	Histona H2AX Fosforilada
µm² =	Micrômetros Quadrados
ADN =	Ácido Desoxirribonucleico
ARNs =	Ácidos Ribonucleicos
CASPASE 3 =	Protease Cisteína – Ácido Aspártico 3
CONEP =	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA =	<i>Deoxyribonucleic Acid Molecule</i>
DSB =	Ruptura da Dupla Fita ou <i>Double Strand Break</i>
EROs =	Espécies Reativas de Oxigênio
FOA =	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
H.E. =	Hematoxilina e Eosina
IR =	<i>Ionizing Radiation Not Natural</i>
OH =	Radical Hidroxila ou <i>Hydoxyl Radical</i>
PCNA =	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
RI =	Radiação Ionizante Não Natural
ROS =	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SSB =	Quebra de Cadeia Simples ou <i>Single-Stranded Breaks</i>
UNESP =	Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho"
USA =	Estados Unidos da América ou <i>United States of America</i>

Sumário

Sumário

1. Introdução	27
2. Objetivos	31
3. Metodologia	33
3.1. Delineamento Experimental	34
3.2. Processamento Histológico das Amostras	34
3.3. Análise Histológica.....	35
3.4. Análise Imunoistoquímica	35
3.5. Análise Estatística dos Dados	36
4. Resultados	37
4.1. Análise Histológica da Gengiva.....	38
4.2. Padrão de Imunomarcação	38
4.2.1. γ -H2AX no Epitélio da Mucosa Gengival (Região de Terceiro-Molar).....	38
4.2.2. CASPASE3 no Epitélio da Mucosa Gengival (Região de Terceiro-Molar)	39
4.2.3. PCNA no Epitélio da Mucosa Gengival (Região de Terceiro-Molar)	39
5. Discussão	40
6. Conclusão	44
Figuras e Tabelas	46
Referências	57
Anexos	61
Anexo A – Certificado da Comissão de Ética.....	62

Introdução

1. Introdução

Existe uma preocupação geral com o progressivo aumento do número de pessoas que são expostas à radiação ionizante não natural (RI).^[1]

A odontologia, em suas diferentes especialidades, faz o uso rotineiro de exames radiográficos para auxiliar no diagnóstico, planejamento e controle terapêutico das doenças dentais e dos maxilares. A maioria dos cirurgiões-dentistas solicitam esse exame complementar no início dos tratamentos odontológicos e também como uma importante forma de controle desses tratamentos. Desde o diagnóstico até a finalização dos procedimentos, o paciente é submetido com frequência, a várias exposições de radiação X para obtenção de diversos tipos de radiografias. No período de um ano, do ponto de vista do paciente, adicionado às possíveis exposições de outros exames de imagens, como por exemplo tomografia computadorizada, ele pode estar sendo exposto a doses consideráveis de RI.^[1] Apesar das incertezas e divergências consideráveis sobre os efeitos biológicos na saúde e na expectativa de vida das pessoas, estudos sobre o risco da exposição a baixas doses permanecem como temas de debates constantes na comunidade científica.^[2] A quantificação deste risco é difícil de ser verificada, mas sabe-se que o risco é proporcional à dose irradiada, a duração da exposição e do tipo de tecido que recebeu a radiação.^[3,4]

A exposição RI causa severas lesões nas células devido a ionização direta e, indiretamente, pela ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas moléculas do ácido desoxirribonucleico (ADN) levando à quebras e mutações gênicas.^[5-7]

Trabalhos verificaram que células expostas à baixas doses de radiação ionizante podem apresentar mecanismos de resposta de natureza epigenética, ou seja, não há evidência de mutação no material genético mas ocorrem mudanças no metabolismo do ADN com alteração no nível de metilação, modificações e modulações nas histonas e na regulação de ácidos ribonucleicos (ARNs) não codificantes.^[8-11] As

mudanças na cromatina podem prejudicar a capacidade da célula em realizar sua função e pode aumentar significativamente a probabilidade de formação de tumores. [12, 13]

O tecido irradiado nem sempre segue um comportamento linear em relação a dose de radiação. Existem evidências da presença de células radio-resistentes e de células com hiper-radiossensibilidade. [14 - 16] Em termos gerais, danos provocados ao ADN pela exposição a RI incluem danos por oxidações, ligações cruzadas entre as bases de pirimidinas, deleções de bases nitrogenadas, emparelhamento errôneo de nucleotídeos, ruptura de uma fita do ADN (*Simple Strand Break* - SSB), ou ruptura da dupla fita do ADN (*Double Strand Break* - DSB), entre outros. [17, 18] A DSB representa uma lesão grave ao material genético por possibilitar o aparecimento de aberrações cromossômicas. A falta de reparo DSB ou reparo errôneo resulta quase sempre em morte celular ou em mudanças cromossômicas como deleções, translocações e fusões de cromossomos. [12, 19]

A detecção da proteína histona H2AX fosforilada (γ -H2AX), por imunistoquímica permite visualizar morfologicamente a ruptura da dupla fita do ADN apresentando-se no núcleo da célula como pontos individuais corados (focos pontuais), pela concentração das proteínas γ -H2AX. [20, 21] O período de permanência desses focos nas células demonstra a eficiência ou não do processo de reparo do ADN, uma vez que a histona γ -H2AX, logo após o reparo, é desfosforilada e as imunomarcações não são mais evidenciadas. [22]

A detecção da protease cisteína – ácido aspártico 3 (CASPASE 3) por imunistoquímica permite visualizar morfologicamente a apoptose celular, uma vez que a CASPASE 3 é ativada na apoptose por ambas as vias extrínseca ou intrínseca. [23, 24] Um zimogênio de CASPASE 3 (pro-caspase 3) é necessário porque, se não regulada, a atividade das caspases poderiam matar as células indiscriminadamente. [25] Como uma caspase executora, a pro-caspase 3 não tem nenhuma atividade até ser clivada por uma caspase iniciadora após a ocorrência dos eventos de sinalização de apoptose. [26]

A detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por imunohistoquímica permite visualizar a proliferação celular. A PCNA é um homotrímero atingindo sua atividade circundando o ADN e atua recrutando as proteínas envolvidas na replicação do ADN.^[27]

A análise da resposta celular após exposição a baixas doses de radiação ionizante em tecidos que apresentam células com diferentes capacidades proliferativas, como o epitélio da mucosa gengival, pode contribuir para a observação do comportamento celular quanto ao grau de rádio sensibilidade, bem como quanto à presença de efeitos biológicos e/ou efeitos adversos tardios induzidos pela RI in vivo.

Objetivos

2. Objetivos

O presente trabalho objetivou analisar espécimes da mucosa gengival coletados de doze (n=12) indivíduos adultos jovens expostos à radiação X, para obtenção de radiografia panorâmica, nos períodos de duas horas (2h), cinco horas (5h) e cerca de 30 dias após à exposição. As avaliações consistiram na obtenção de lâminas histológicas parafinadas para análise morfológica microscópica da mucosa, coradas em H.E. e análise imunoistoquímica (método da peroxidase) utilizando-se os biomarcadores proteicos γ -H2AX, PCNA e Caspase 3.

Metodologia

3. METODOLOGIA

3.1. Delineamento Experimental

Foram selecionados pacientes que tinham a necessidade de exodontia dos quatro terceiros molares permanentes inclusos, sendo necessário que estes pacientes fossem submetidos à radiografia panorâmica para auxiliar no planejamento cirúrgico do caso.

As radiografias foram realizadas nos períodos de duas ou cinco horas antes do procedimento cirúrgico (Tabelas 1 e 2), e as cirurgias foram realizadas em duas etapas, sendo que em uma primeira etapa foi feita a exodontia de um dos lados da face do paciente e, cerca de 30 dias após, a exodontia dos molares do lado oposto.

Logo após a exodontia dos terceiros molares em cada uma das fases, foram coletados espécimes gengivais da região e, estes eram imersos em fixador a 4% de formaldeído (Sigma Chemical®).

Este estudo foi submetido ao Comitê de ética em Pesquisa da FOA-UNESP por meio do sistema Plataforma Brasil para registro na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde do Ministério de Saúde (CAAE: 06008413.9.0000.5420).

3.2. Processamento Histológico das Amostras

Os espécimes gengivais foram submetidos ao processamento histológico convencional, incluídos em parafina, e seccionados em micrótomo com quatro micrômetros (μm) de espessura. Foram coletados cortes semi-seriados para análise histológica e contra coradas com hematoxilina-eosina (H.E.). Para análise imunoistoquímica, as secções histológicas foram submetidas à técnica da imunoperoxidase indireta

empregando-se os seguintes anticorpos primários: anti- γ -H2AX de humano policlonal, gerado em coelho (1:100; sc 101696 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA); anti-antígeno Nuclear de proliferação nuclear (PCNA) gerado em camundongo (1:200; VP p980 – Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) e anti-caspase 3 gerado em camundongo (1:100; sc 271759 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). (Figuras 2 e 3)

3.3. Análise histológica

Foram utilizadas quatro secções histológicas da mucosa gengival para se efetuar a análise histológica do epitélio. Selecionou-se seis áreas histológicas próximas à camada basal do epitélio para efetuar as análises imunoistoquímica. Para a análise microscópica considerou-se os seguintes parâmetros: padrão de celularidade, estruturação das camadas epiteliais e de integridade do tecido epitelial; padrão de celularidade, estruturação e integridade do tecido conjuntivo. As imagens foram capturadas utilizando-se de câmara digital (AxioCam, Carl Zeiss) acoplada ao microscópio óptico (AxioLab®) e conectada a um microcomputador.

3.4. Análise Imunoistoquímica

Imagens da camada basal do tecido epitelial gengival das secções histológicas imunomarcadas com Caspase-3, γ -H2AX e PCNA foram adquiridas. Com auxílio do programa de análise de imagens (ImageJ) foi realizada a mensuração de seis áreas histológicas de 100 micrômetros quadrados (μm^2) cada e a quantificação das células com imunomarcação positiva. Tais valores foram expressos por μm^2 sob a forma de média \pm

(mais ou menos) erro padrão. Todas as análises foram realizadas por um histologista previamente calibrado por meio de um teste cego.

3.5. Análise Estatística dos Dados

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 5. Foram empregados os testes de Shapiro-Wilk e pós-teste de Mann Whitney para o estabelecimento das comparações entre os diferentes grupos experimentais e períodos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 *Análise Histológica da Gengiva*

Pode-se observar a mucosa gengival com epitélio estratificado pavimentoso sobreposto ao tecido conjuntivo ambos apresentando características bem preservadas, seguindo os padrões de celularidade, estruturação e integridade tecidual. No epitélio pode-se observar nitidamente, as diferentes camadas celulares: basal, espinhosa, granulosa e superficial (Figura 1).

4.2. *Padrão de Imunomarcação*

A técnica imunoistoquímica empregada para detecção de γ -H2AX, Caspase 3 e PCNA mostrou especificidade na detecção de tais proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação (Figuras 2 e 3). As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escura confinada ao núcleo para PCNA e para γ -H2AX. A imunomarcação para caspase-3 estava localizada no citoplasma das células.

4.2.1. *γ -H2AX no Epitélio da Mucosa Gengival (Região de Terceiro-Molar)*

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de duas horas (2h) e 30 dias ($p=0,0921$) (Tabela 3 e 4) e, cinco horas (5h) e 30 dias ($p=0,37$) (Tabela 5 e 6) (Figura 2).

4.2.2. PCNA no Epitélio da Mucosa Gengival (Região de Terceiro-Molar)

A quantidade de células PCNA-positivas no epitélio da mucosa gengival não apresentou diferença estatística significativa quando se comparou os grupos de duas horas (2h) e 30 dias ($p=0,46$) (Tabela 7 e 8), e cinco horas (5h) e 30 dias ($p=0,37$) (Tabela 9 e 10) entre si (Figura 3).

4.2.3. CASPASE 3 no Epitélio da Mucosa Gengival (Região de Terceiro-Molar)

A quantidade de células Caspase-3-positivas não diferiu estatisticamente nos grupos de duas horas (2h) ($p=0,22$) e de cinco horas (5h) ($p=0,87$) quando comparados com os grupos de 30 dias (Tabela 11 - 14) (Figura 2).

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo verificou a ocorrência de focos de imunomarcacão da proteína histona γ -H2AX, em biópsias de mucosa gengival de indivíduos expostos à radiação X para obtenção de radiografia panorâmica. Os valores da frequência de queratinócitos γ -H2AX-positivos no epitélio gengival, entre os grupos experimentais, não demonstraram diferenças estatisticamente significantes quando comparados entre si. Tanto para o grupo avaliado no período de duas horas e trinta dias ($p= 0,0921$) (Tabelas 3 – 4), quanto aos grupos do período de cinco horas e trinta dias ($p= 0,29$) (Tabelas 5 - 6). Neste estudo, a comparação pelo teste estatístico Mann Whitney, para os grupos de duas horas e 30 dias, revelou valor de p relativamente próximo ao valor de significância e mostrou uma tendência de os queratinócitos apresentarem maior frequência de γ -H2AX-positivos no grupo de duas horas.

No presente trabalho, quando a média da frequência dos valores absolutos de queratinócitos γ -H2AX-positivo são representados em porcentagem, observamos aumento de 62% na frequência dos mesmos, no período de duas horas quando comparado ao período de trinta dias (Tabelas 3 – 4). *Isto demonstra* que o pequeno número de amostras analisadas pode ter influenciado os resultados para esse grupo, além de deixar em evidência a variação no perfil de resposta que é próprio de cada indivíduo, no que se refere ao biomarcador em análise.

Existem trabalhos na literatura demonstrando a eficiência da proteína histona γ -H2AX como marcador para biomonitoramento de dano no ADN em mucosa gengival em cultura in vitro. ^[29,30].

Um estudo preliminar desenvolvido por nosso grupo de pesquisa verificou por imunistoquímica, os queratinócitos esfoliados da mucosa gengival de 14 indivíduos, demonstrando já na primeira hora após a exposição desses indivíduos à radiação X, aumento estatisticamente significativo na frequência dos queratinócitos com focos γ -H2AX-positivos

quando comparados com os não irradiados, coletados do mesmo indivíduo antes da exposição.

O presente estudo verificou também a ocorrência de queratinócitos PCNA-positivos e, Caspase 3-positivos, ambos biomarcadores envolvidos no processo de replicação do material genético da célula e nas vias de morte celular programada, respectivamente.

No presente trabalho foram ainda investigados, no epitélio gengival a proteína PCNA para observar o quanto a radiação pode interferir no ciclo celular. Os resultados em nosso estudo também não foram estatisticamente significantes. Grupo de duas horas e 30 dias ($p=0,46$) (Tabela 7 e 8), e cinco horas e 30 dias ($p=0,37$) (Tabela 9 e 10) entre si (Figura 3). Os resultados da análise da frequência de queratinócitos imunomarcados para a caspase 3, não demonstraram aumento estatisticamente significativo entre os grupos. O período de duas horas quando comparado com o de trinta dias revelou valor de $p=0,222$ (Tabelas 11 e 12), e o período de cinco horas e trinta dias, valor de $p=0,87$ (Tabelas 13 e 14) (figura 2).

Estudos demonstram que doses de radiação menores de 0,3 Gray podem levar a célula à morte celular por apoptose ^[29,30]. No presente estudo, os valores médios das doses de radiação emitida pelo aparelho de raios X mostraram-se bem inferiores que 0,3 Gray e semelhantes entre os grupos: duas horas (0,084 Gray), e cinco horas (0,086 Gray) (Tabelas 1 e 2). Como se sabe, a resposta celular mediante a baixas doses de radiação tem relação direta com a fase do ciclo celular e com mecanismos de reparo ao dano no material genético da célula.

Em nosso estudo mesmo apresentando uma tendência no aumento da proteína γ -H2AX que se apresenta como um biomarcador de quebra da fita do ADN, não observamos aumento de apoptose de queratinócitos Caspase 3-positivos mediante à dose de radiação emitida pelo aparelho odontológico.

Alessio e colaboradores (2014) demonstraram que células mesenquimais da medula óssea quando expostas a baixas doses de

radiação, apresentaram um desvio para aumento de células em senescência ao invés de apoptose celular.

Estudos realizados por Marples e Collis (2008), demonstraram que as células podem responder de maneira antagônica e dose-dependente não linear, com fase de resposta de hiper radiosensibilidade seguida de uma fase de radiorresistência aumentada em estudos sobre a resposta celular a radiação de baixas doses que variaram entre 0,01 a 0,6 Gray.

Estudos demonstram que dependendo da fase do ciclo celular (G1, S, G2 e M) as células podem apresentar respostas diferenciadas à baixas doses de radiação. ^[29,30]. Uma vez observado o dano no material genético da célula, a mesma induz a ativação de diferentes proteínas mediadoras (ATM, ATR, γ -H2AX) que levam a parada do ciclo celular como um mecanismo de frenagem para dar tempo ao reparo do dano.

No presente estudo mesmo não observando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos quanto à frequência de queratinócitos PCN-positivo, γ -H2AX-positivo e Caspase 3-positivo no epitélio gengival, mais estudos são necessários para melhor compreensão da complexidade do dano celular e do comportamento das células mediante exposição à RI.

No momento existe ainda a preocupação para que os profissionais da área odontológica indiquem exames radiográficos mediante real necessidade.

Conclusão

7. CONCLUSÃO

Através da análise dos dados de 12 amostras de mucosa gengival de indivíduos adultos jovens expostos a radiação X para obtenção de radiografia panorâmica, pode-se concluir:

- a) A expressão da histona γ -H2AX no epitélio gengival não diferiu no período de duas horas, cinco horas e 30 dias de exposição aos raios x;
- b) A expressão da proteína Caspase 3 no epitélio gengival não diferiu no período de duas horas, cinco horas e 30 dias de exposição aos raios x;
- c) A expressão da proteína PCNA no epitélio gengival não diferiu no período de duas horas, cinco horas e 30 dias de exposição aos raios x;

Figuras e

Tabelas

FIGURAS E TABELAS

FIGURAS E TABELAS

Figura 1

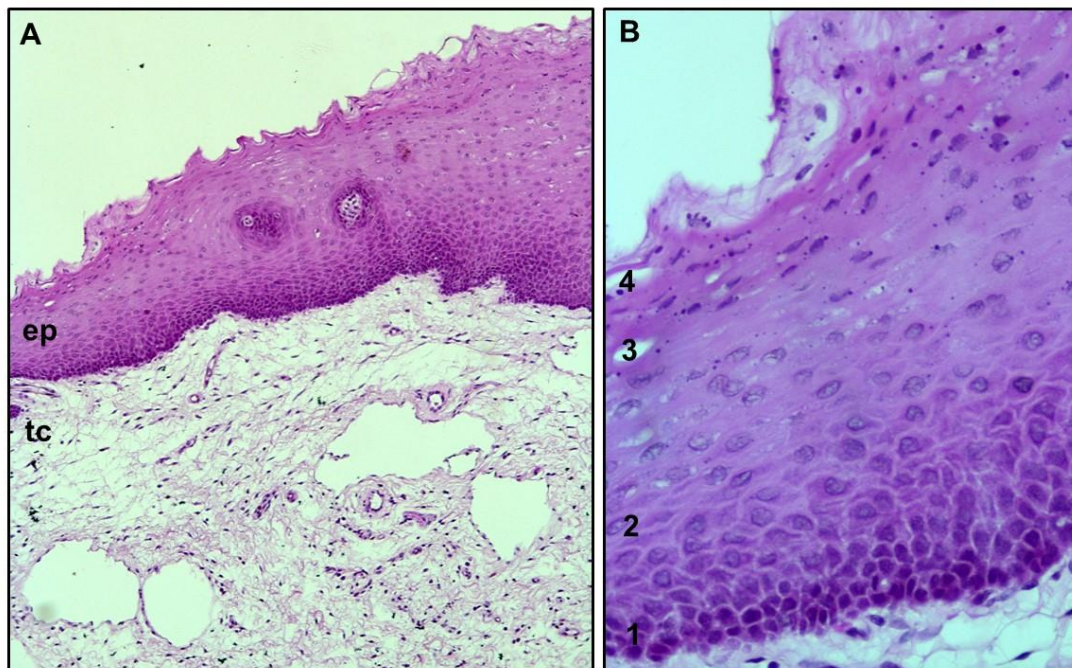


Figura 1 - Fotomicrografia evidenciando o aspecto histológico do tecido epitelial e do tecido conjuntivo dos espécimes coletados. Em A observar a mucosa gengival com epitélio (ep) e tecido conjuntivo (tc) apresentando características bem preservadas. Em B, um aumento do epitélio mostrando as suas diferentes camadas teciduais: 1, camada basal, 2, camada espinhosa, 3, camada granulosa, 4, camada superficial. Coloração HE. Aumento 100x (A); 400x (B)

Figura 2

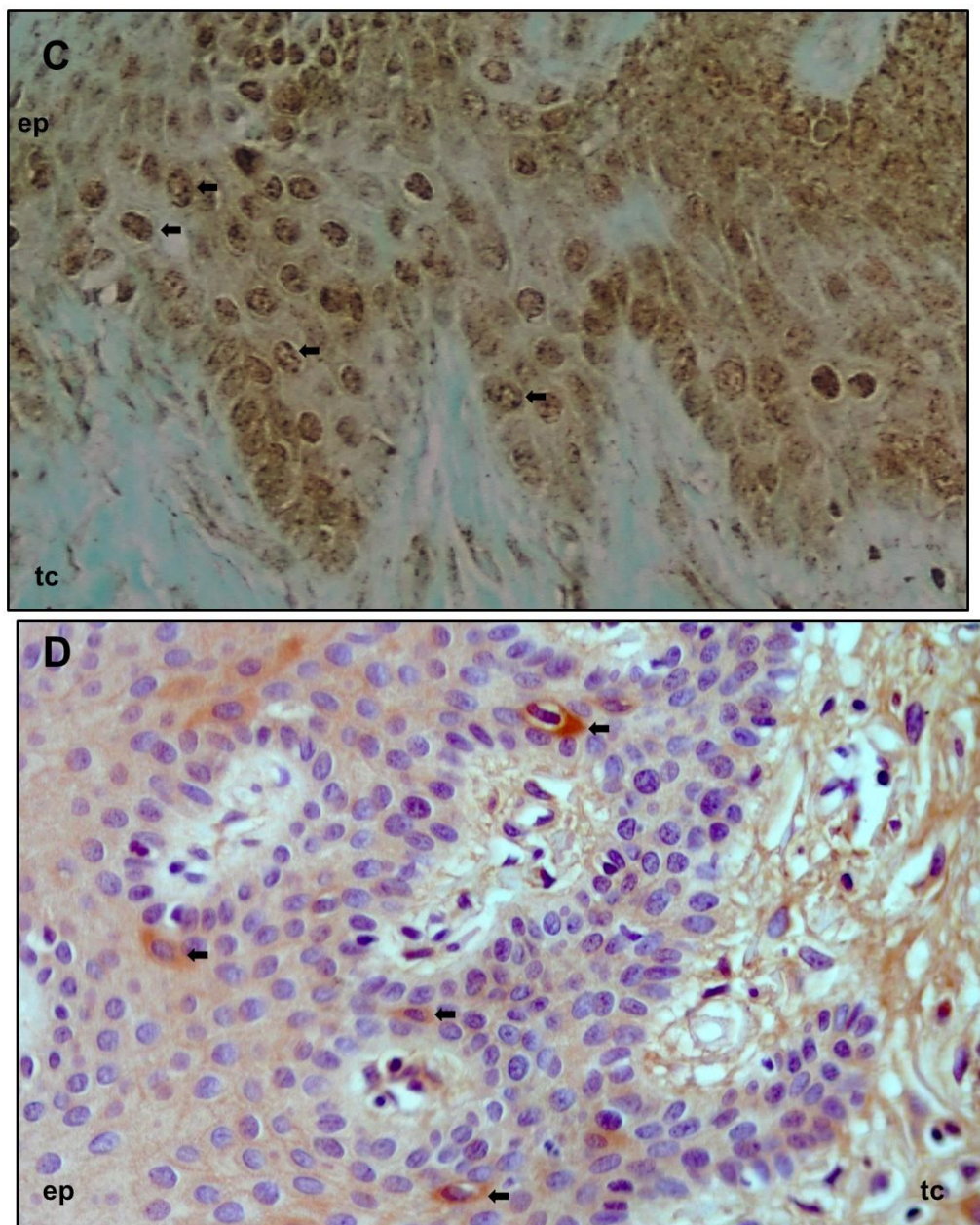


Figura 2 - Fotomicrografia mostrando o padrão de Imunomarcção para γ -H2AX (C) e caspase 3 (D), no epitélio da mucosa gengival. Células γ -H2AX-positivas com núcleo da célula apresentando pontos individuais corados (focos pontuais) (D). Células Caspase 3-positivas com coloração citoplasmática de cor marrom. Abreviações e símbolos: ep, epitélio; tc, tecido conjuntivo; setas, células imunomarcadas. Contracoloração: Fast Green (C); Hematoxilina de Harris (D); Aumento original 400x (C-D).

Figura 3

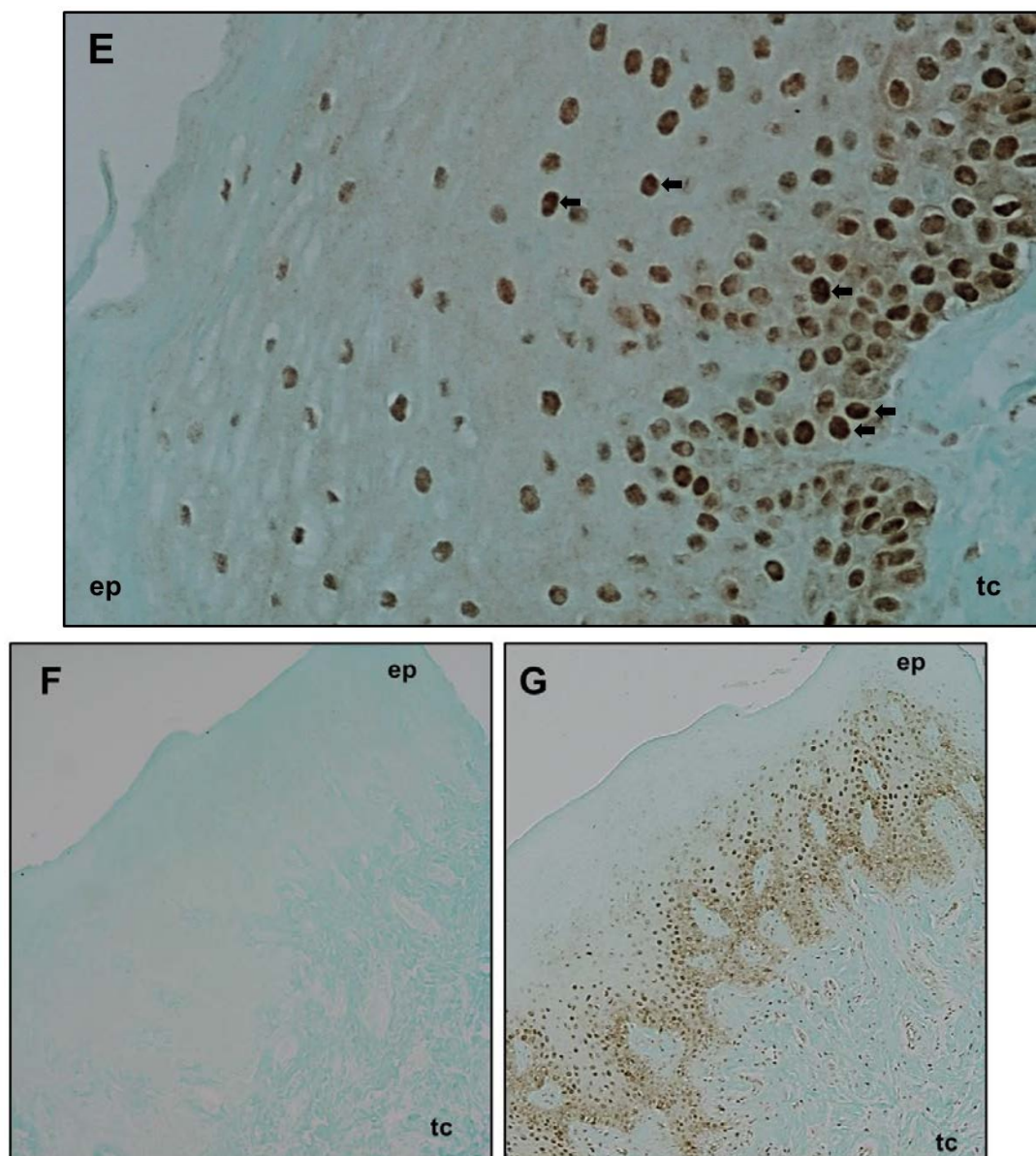


Figura 3 - Fotomicrografia mostrando a imunomarcção para PCNA no epitólio da mucosa gengival. Observar o padrõ de imunomarcção com núcleos celulares de cor marrom escura tanto na camada basal como na camada espinhosa do epitólio (E,G). Ausência total de marcção no controle negativo (F) e imunomarcção PCNA-positiva (G). Abreviações e símbolos: ep, epitólio; tc, tecido conjuntivo; setas, células imunomarcadas. Contracoloração: Fast Green (E-G); Aumento original 400x (E); 100x (F-G).

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 - Mettler FA, Bhargavan M, Faulkner K, Gilley DB, Gray JE, Ibbott GS, Lipoti JA, Mahesh M, McCrohan JL, Stabin MG, Thomadsen BR and Yoshizumi TT (2009) Radiologic and nuclear medicine studies in the United States and worldwide: frequency, radiation dose, and comparison with other radiation source 1950–2007. *Radiology* 253:520–531.
- 2 - Hamada N, Maeda M, Otsuka K and Tomita M (2011) Signaling pathways underpinning the manifestations of ionizing radiation-induced bystander effects. *Curr Mol Pharmacol* 4:79-95.
- 3 - González AB and Darby S (2004) Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. *Lancet* 363:345–51.
- 4 - Alessio N, Gaudio SD, Capasso S, Di BeARNrdo G, Cappabianca S, Cipollaro M, Peluso G and Galderisi U (2014) Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget* 6:8155-8166.
- 5 - Rothkamm K and Löbrich M (2003) Evidence for a lack of ADN double-strand break repair in human cells exposed to very low X-Ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5057-62.
- 6 - O'Neill P, Wardman P (2009) Radiation chemistry comes before radiation biology. *Int J Radiat Biol* 85:9-25.
- 7 - Azzam Ei , Gerin JPJ and Pain D (2012) Clonizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Letters* 327:48–60.
- 8 - Morgan WF and Sowa MB (2007) Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation *Mutation Research* 616:159–164.
- 9 - Ilnytskyy Y, Koturbash I and Kovalchuk O (2009) Radiation-Induced Bystander Effects In vivo are Epigenetically Regulated in a Tissue-Specific Manner *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50:105-113.
- 10 - Girardi C, DE Pitta C, Casara S, Sales G, Lanfranchi G, Celotti L and Mognato M (2012) Analysis of iARN and mARN Expression Profiles Highlights Alterations in Ionizing Radiation Response of Human Lymphocytes under Modeled Microgravity. *PLoS One* 7:31293.

- 11 - Merrifield M and Kovalchuk O (2013) Epigenetics in radiation biology: a new research frontier *Frontiers in genetics* 4:1-16.
- 12 - Asaithamby A, Hu B and Chen DJ (2011) Unrepaired clustered ADN lesions induce chromosome breakage in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:8293-8298.
- 13 - Hudson D, Kovalchuk I, Koturbash I, KOLB B, Martin O A and Kovalchuk O (2011) Induction and persistence of radiation-induced ADN damage is more pronounced in young animals than in old animals. *Aging* 3:609-620.
- 14 - Wouters BG and Skarsgard LD (1997) Low-dose radiation sensitivity and induced radioresistance to cell killing in HT-29 cells is distinct from the “adaptive response” and cannot be explained by a subpopulation of sensitive cells. *Radiation research*. 148:435–442.
- 15 - Joiner MC, Marples B, Lambin P, Short SC and Turesson I (2001) Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 49:379–389.
- 16 - Martin LM, Marples B, Lynch TH, Hollywood D and Marignol L (2013) Exposure to low dose ionising radiation: molecular and clinical consequences. *Cancer letters* 338:209–218.
- 17 - Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J, Ravanat J and Sauvaigo S (1999) Hydroxyl radicals and ADN base damage. *Mutat Res* 424:9–21.
- 18 - Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J and Sage E (2003) Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of ADN damage involved in the genotoxic effect of solar. *Biochemistry* 42:9221-9226.
- 19 - Tanaka T, Halicka H D, Huang X, Traganos F and Darzynkiewicz Z (2006) Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of ADN damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle* 5:1940-1945.
- 20 - Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner Cu, Gellert M and Bonner WM (2000) A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after ADN damage. *Curr Biol* 10:886–895.

- 21 - Mah LJ, Orlowski C, Ververis K, S Vasireddy R S, El-Osta A and Karagiannis TC (2011) Evaluation of the efficacy of radiation-modifying compounds using γ H2AX as a molecular marker of ADN double-strand breaks. *Genome Integrity* 2:3-11.
- 22 - Kao J, Milano MT, Javaheri A, Garofalo MC, Chmura SJ and Weichselbaum RR (2006) Gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 6:197-205, 2006.
- 23 - Salvesen GS (2002). "Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows". *Cell Death and Differentiation*. 9 (1): 3–5
- 24 - Ghavami S, Hashemi M, Ande SR, Yeganeh B, Xiao W, Eshraghi M, Bus CJ, Kadkhoda K, Wiechec E, Halayko AJ, Los M (2009). "Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes". *JouARNI of Medical Genetics*. 46 (8): 497–510.
- 25 - Boatright KM, Salvesen GS (2003). "Mechanisms of caspase activation". *Current Opinion in Cell Biology*. 15 (6): 725–731.
- 26 - Walters J, Pop C, Scott FL, Drag M, Swartz P, Mattos C, Salvesen GS, Clark AC (December 2009)."A constitutively active and uninhibitable caspase-3 zymogen efficiently induces apoptosis". *The Biochemical JouARNI*. 424 (3): 335–345.
- 27 - Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S (2007). "PCNA, the maestro of the replication fork.". *Cell*.129 (4): 665–679
- 28 - Gonzalez J E, Roch-Lefevre S H, Mandina T, Garcia O and Roy L (2010) Induction of γ H2AX foci in human exfoliated buccal after in vitro exposure to ionising radiation. *Int F Radiat Biol* 86:752-759.
- 29 - Alessio N, Del Gaudio S, Capasso S, Di Bernardo G, Cappabianca S, Cipollaro M, Peluso G, Galderisi U. Low dose radiation induced senescence of human mesenchymal stromal cells and impaired the autophagy process. *Oncotarget*. 2015;6:8155–66.
- 30 - Marples B, Collis SJ. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. *Int J Radiat Onco Biol Phys*.2008;70:1310–1318.

Anexas

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE FOCOS DE γ -H2AX EM CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS SUBMETIDOS AO EXAME RADIOGRÁFICO DE DIAGNÓSTICO

Pesquisador: ALAIDE GONÇALVES

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 08008413.9.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.039.659

Data da Relatoria: 24/04/2015

Apresentação do Projeto:

O protocolo de pesquisa inicialmente apresentado e aprovado por este CEP no ano de 2013, tinha por objetivo demonstrar se a dose de irradiação emitida pelos aparelhos de diagnósticos pode induzir quebra na fita do DNA das células da mucosa bucal de grupos de indivíduos irradiados e observar se as quebras podem ser reparadas. Para tanto seriam coletadas células da mucosa de 30 indivíduos adultos em diferentes idades, antes da exposição(0 hora) à radiografia panorâmica e, 1, 5 e 24 horas após, por meio de raspagem superficial com escovas apropriadas. As células seriam montadas em lâminas histológicas e imunomarcadas para a histona H2AX fosforilada (γ H2AX), considerado marcador de identificação de focos de quebra da fita do DNA. Na emenda hora analisada a pesquisadora responsável alega dificuldades "em completar todos os períodos de coletas de esfregaços de mucosa bucal dos participantes da pesquisa. Os períodos de coletas, de 5 e 24 horas após o exame radiográfico, por desistência do participante, não está sendo obtido. O participante teria que ficar na instituição num período de 5 horas para realizarmos a coleta e retornar no dia seguinte, para a coleta de 24 horas após." e solicita "a inclusão de coletas de biópsias de mucosa bucal humana para continuarmos o estudo no tecido epitelial. Para isto, os participantes dessa pesquisa serão aqueles indicados pelos Cirurgiões Dentistas para fazerem exame radiográfico de diagnóstico na Faculdade de Odontologia de Araçatuba–UNESP, com

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONÇA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br