

Guilherme Felício de Biaggi

**EXPRESSÃO DA PROTEÍNA γ H2AX e 8-OHdG EM GLÂNDULA
SALIVAR PARÓTIDA DE RATOS EXPOSTOS A RADIAÇÃO X**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual “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

2018

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

À Aurea e Paulo, meus pais, por todo amor, e apoio que me deram, por serem minha inspiração e motivação para superar todos os obstáculos, por tudo o que me ensinaram, fazem por mim e permitirem essa minha jornada, sem eles eu não estaria aqui.

À Giulia, minha irmã, por me aguentar durante todos esses anos, sempre me ajudando.

À Prof.^a Ass. Dr.^a Alaíde Gonçalves, que me permitiu a experiência no laboratório desde o meu primeiro ano e em todos esses anos de convivência, muito me ensinou, teve paciência para me orientar e corrigir meus erros, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

À Francisco Netto por ter me apresentado a Prof.^a Ass. Dr.^a Alaíde Gonçalves, me permitindo tudo isso, todos esses anos de amizade, companheirismo, um irmão que a faculdade me deu.

Aos meus amigos da “DP”, Gustavo, Débora, Karen, Bruna, Leticia, Gabriela, Caio, Lourenço, Murilo, Nathalia, Sylvio, por momentos inesquecíveis, todos os momentos de diversão e risadas, todo o apoio nos momentos mais difíceis, minha segunda família.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À minha família, que apoiou e incentivou, sem eles eu não estaria aqui.

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

À Prof.^a Ass. Dr.^a Leda Maria Pescinini Salzedas, pela grande ajuda neste trabalho, com a parte da irradiação dos animais, pelo apoio e possibilidade de execução da parte experimental do presente trabalho.

Aos meus colegas da Republica “*Rep Hour*”, por me acolherem no primeiro ano e me mostrarem como é morar longe da família.

Aos meus colegas da Republica “Sua Mãe”, por todas as brincadeiras, todos os momentos juntos, sendo eles bons ou ruins, são verdadeiros irmãos.

A todos os amigos que fiz durante a minha jornada aqui, mesmo se cada um seguir para um caminho diferente, todos fazem parte da minha vida, levarei para sempre os momentos que tivemos.

Aos membros da Atlético, que me acolheram como uma família, me ensinaram muito, não só sobre esportes, sobre a vida, como ajudar e incentivar o próximo.

Aos membros do Handebol da faculdade, que nesse ultimo ano me permitiram experiencias incríveis.

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

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, e em especial à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, nas pessoas do senhor diretor Prof. Tit. Wilson Roberto Poi e do senhor vice-diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho, pela oportunidade de realizar o curso de graduação e esta pesquisa.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

EPÍGRAFE

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

Biaggi, G. F. **Expressão da proteína γ H2AX e 8-OHdG em glândula salivar parótida de ratos expostos a radiação X.** 2018. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

Resumo

A glândula salivar parótida é um órgão sensível à radiação e, com frequência, encontra-se incidentalmente exposta na área de estudos radiográficos e tomográficos de cabeça e pescoço. A exposição à baixa dose de radiação ionizante, pode causar lesões nas células levando alterações ao material genético. Danos de ruptura da dupla fita do DNA são observados por imuno-histoquímica, pela presença da proteína histona H2AX fosforilada (γ H2AX), no núcleo da célula. Morfologicamente, visualiza-se pontos individuais (focos pontuais) corados, pela concentração das proteínas γ H2AX. O período de permanência desses focos pontuais nas células demonstra a eficiência ou não do processo de reparo da fita do DNA. A exposição à radiação também pode causar danos indiretos, pela ação de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROS lesam a fita do DNA por formarem as moléculas oxidadas de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). O objetivo do presente trabalho foi analisar a radiosensibilidade da glândula parótida de ratos expostos à radiação X, emitida pelo aparelho radiográfico odontológico, na dosagem correspondente a 0,1 Gray. Os grupos de análise foram constituídos de grupo controle (antes da exposição à radiação), duas horas, 24 horas e uma semana após a exposição à radiação X. Biópsias teciduais foram blocadas em parafina para confecção de lâminas histológicas e análise imunoistoquímica das proteínas γ H2AX e 8-OHdG. As células ductais do parênquima da glândula parótida após a exposição à baixa dose de radiação X, mostraram no grupo duas horas, radiosensibilidade significativa que no decorrer do período de análise, se reestabeleceram não diferindo, os grupos de 24 horas e o de uma semana, quando comparados com o grupo controle. A imunorreatividade da proteína 8-OHdG nas células ductais também apresentou efeito similar entre os grupos experimentais. As células dos ductos glandulares (intercalares, estriados e excretores), células endoteliais, mostraram maior radiosensibilidade para as proteínas γ H2AX e 8-OHdG, em relação às células acinosas glandulares. Dentro dos limites do presente estudo, conclui-se que a

glândula parótida de ratos expostos a baixa dose de radiação X (0,1 Gray), não mostrou danos no DNA nuclear e nem danos oxidativos nucleares, pela imunorreatividade de γ -H2AX e 8-OHdG, utilizando análise imunoistoquímica, método da peroxidase.

Palavras-chave: Radiação ionizante, Imunoistoquímica, Histona γ -H2AX, 8-OHdG, Glândula Parótida, Glândula salivar, Raios-X.

ABSTRACT

Biaggi, G. F. Expression of γ H2AX and 8-OHdG protein in parotid salivary gland of rats exposed to X radiation. 2018. 51f. Course Completion Work (Bachelor) - Faculty of Dentistry, Paulista State University, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

The parotid salivary gland is a radiation-sensitive organ and is often found to be incidentally exposed in the area of x-ray and tomography studies of the head and neck. Exposure to low dose ionizing radiation can cause cell damage leading to changes in genetic material. Double strand ruptured DNA damage is observed by immunohistochemistry, by the presence of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX) protein in the cell nucleus. Morphologically, individual dots (punctual focal points) are visualized by the concentration of γ H2AX proteins. The residence time of these pooled foci in cells demonstrates the efficiency or otherwise of the DNA tape repair process. Exposure to radiation can also cause indirect damage by the action of reactive oxygen species (ROS). EROS lesions the DNA strand by forming the oxidized 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) molecules. The objective of the present study was to analyze the radiosensitivity of the parotid gland of rats exposed to X radiation, emitted by the radiographic dental apparatus, in the dose corresponding to 0.1 Gray. The test groups consisted of a control group (before exposure to radiation), two hours, 24 hours and one week after X-ray exposure. Tissue biopsies were paraffin-embedded for the preparation of histological slides and immunohistochemical analysis of γ H2AX and 8-OHdG. The ductal cells of the parenchyma of the parotid gland after exposure to the low dose of X radiation showed in the group two hours, significant radiosensitivity that, during the analysis period, reestablished the groups of 24 hours and one week, when compared to the control group. The immunoreactivity of 8-OHdG protein in ductal cells also showed a similar effect between the experimental groups. The cells of the glandular ducts (intercalated, striated and excretory), endothelial cells, showed higher radiosensitivity for γ H2AX and 8-OHdG proteins, in relation

to glandular acinar cells. Within the limits of the present study, it was concluded that the parotid gland of rats exposed to low dose of X radiation (0.1 Gray) showed no nuclear DNA damage and no nuclear oxidative damage, by the immunoreactivity of γ -H2AX and 8-OHdG, using immunohistochemical analysis, peroxidase method;

Keywords: Ionizing Radiation, Immunohistochemistry, Histone γ -H2AX, 8-OHdG, Parotid Gland, Salivary Gland, X-Ray.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografias em microscopia de luz evidenciando o aspecto histológico da glândula parótida de um rato do grupo 2 h (A, C e E) e outro, do grupo 24 h (B, D e F), em vários aumentos e corados com H.E.. O parênquima das glândulas apresenta lóbulos envolvidos por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado. Os ácinos serosos e os diferentes ductos (intercalares, estriados e excretores), apresentam-se bem preservados com integridade tecidual. Setas: seta azul - lóbulo glandular; seta vermelha - tecido conjuntivo; seta laranja - ducto excretor; seta preta - ducto estriado; seta branca - ducto intercalar; seta verde - ácinos serosos; seta amarela - vasos sanguíneos. Aumento original: (A-B), 50X; (C-D), 100X; (E-F), 400X. Barras de escala: 200 μ m (A-B); 100 μ m (C-D); 25 μ m (E-F) **40**
- Figura 2.** Fotomicrografias em microscopia de luz da glândula parótida do rato mostrando a imunorreatividade positiva para as proteínas histona γ -H2AX e 8-OHdG (A-B). Nas imagens C e D, o anticorpo primário foi omitido para o controle da reação e especificidade da reação de imunoistoquímica. Setas pretas, ductos estriados apresentando células imunomarcadas; Setas vermelhas, ausência de células ductais imunomarcadas. **41**
- Figura 3.** Fotomicrografias em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a histona γ -H2AX na glândula parótida de rato. Observar que a imunorreatividade para histona γ -H2AX está visível nos ductos (intercalar, estriado e/ou excretor). As células apresentam imunorreatividade tanto no citoplasma (grupo controle e 2 h), como no núcleo (grupo 24 h e 1S) desses ductos. Observa-se também imunorreatividade no núcleo de células dos ácinos (G-H), e núcleo de células endoteliais (E-G). Aumento original (A-C-E-G), 100X; (B-D-F-H), 400X. Barras de escala: 100 μ m (A-C-E-G); 25 μ m (B-D-F-H). Contra-coloração: Fast green. **42**
- Figura 4.** Fotomicrografias em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a 8-OHdG na glândula parótida. Observar que a imunorreatividade para 8-OHdG está visível no citoplasma de ácinos e de ductos (intercalar, estriado e/ou excretor) (A-H). As células apresentam imunorreatividade no núcleo de células vasculares (B-E-F). (grupos controle, 2h e 24h). Aumento original (A-C-E-G), 100X; (B-D-F-H), 400X. Barras de escala: 100 μ m (A-C-E-G); 25 μ m (B-D-F-H). Contra-coloração: Fast green. **43**
- Figura 5.** Gráfico apresentando a comparação das densidades de marcação por área, em percentagem média, da proteína γ H2AX no parênquima glandular dos diferentes grupos experimentais. (**), diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$). **44**

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de anticorpos 8-OHdG-positivos na glândula parótida de ratos.	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

$\pm$ =	Mais ou Menos
% =	Porcentagem
< =	Menor
1S =	Uma Semana
2h =	Duas Horas
24h =	Vinte e Quatro Horas
8-OHdG=	8-hidroxi-2'desoxiguanina ou <i>8-hydroxyguanine</i>
γ -H2AX =	Histona H2AX Fosforilada
μ m =	Micrômetros
μ m ² =	Micrômetros Quadrados
μ g/Kg =	Microgramas por Quilograma
μ g/ml =	Microgramas por Mililitro
g =	Gramas
CEUA =	Comissão de Ética no Uso de Animais
DNA =	Ácido Desoxirribonucleico ou <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
G =	Base Guanina
Gy =	Gray
H.E. =	Hematoxilina e Eosina
IR =	Ionizing Radiation
OH =	Radical Hidroxila ou Hydroxyl Radical
RID=	Radiação Ionizante Diagnóstica
RI =	Radiação Ionizante
RNAs =	Ácidos Ribonucleicos ou <i>Ribonucleic Acids</i>
ROS =	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SSB =	Quebra de Cadeia Simples ou <i>Single-Stranded Breaks</i>
UNESP =	Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho"
T	Base Timina
USA =	Estados Unidos da América ou <i>United States of America</i>

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
2.	OBJETIVOS	25
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1.	Animais	28
3.2.	Delineamento Experimental	28
3.2.1.	Anestesia	28
3.2.2.	Exposição à Radiação X	28
3.2.3.	Grupos Experimentais	29
3.3.	Procedimentos Histológicos das Amostras	29
3.4.	Análise Imunoistoquímica	30
3.5.	Observação Histológica dos Espécimes Glandulares nos Períodos Experimentais	31
3.6.	Análise Estatística dos Dados	31
4.	RESULTADOS	32
4.1.	Padrão de Imunomarcacão	33
4.1.1.	γ -H2AX no parênquima glandular	33
4.1.2.	8-OHdG no parênquima glandular	33
5.	DISCUSSÃO	34
6.	CONCLUSÃO	37
	FIGURAS E TABELAS	39
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXOS	49
	Anexo A – Certificado da Comissão de Ética	50

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O número de pessoas expostas à radiação ionizante diagnóstica (RID) na área médica tem aumentado cada vez mais, e com isso, a preocupação com os efeitos da radiação ao indivíduo, ao longo do tempo. Na odontologia não é diferente, o uso rotineiro desses exames radiográficos para auxiliar no diagnóstico, no planejamento e controle terapêutico das diferentes doenças odontológicas, com o custo menor desses exames e a facilidade de acesso a diferentes tipos de exames de imagens, sejam radiografias ou tomografias, faz com que o indivíduo num período de atendimento ao profissional, seja exposto à doses de radiação diagnósticas consideráveis (METTLER et al., 2009).

Estudos sobre os efeitos biológicos da radiação ionizante de baixa dose, (menores que um Gray), permanecem em constantes temas de debates, pois a quantificação dos riscos que a RID pode causar na qualidade de vida e na saúde do indivíduo ao longo do tempo é difícil de ser analisado. Sabe-se que os efeitos e riscos são diretamente proporcionais à dose irradiada, a duração da exposição, a frequência de exposição (pelo efeito acumulativo da radiação no organismo), a extensão da área exposta e a radiosensibilidade do tecido irradiado (GONZÁLEZ and DARBY, 2004; HAMADA et al., 2011; ALESSIO et al., 2014)

A glândula salivar parótida é um órgão sensível à radiação e, com frequência, encontra-se incidentalmente exposta na área de estudos radiográficos e tomográficos de cabeça e pescoço. Mais de um terço de todas as tomografias computadorizadas realizadas envolvem a região da cabeça e pescoço. A exposição à baixa dose de radiação ionizante, pode causar lesões nas células levando alterações ao material genético (ASAITHAMBY et al, 2011; HUDSON et al, 2011).

Os danos de ruptura da dupla fita do DNA (DSB) representam uma lesão grave ao material genético da célula por possibilitar o aparecimento de aberrações cromossômicas. A falta de reparo das DSB ou reparo errôneo dessas lesões resulta quase sempre em morte celular ou em mudanças

cromossômicas como deleções, translocações e fusões de cromossomos (TANAKA et al., 2006; ASAITHAMBY et al, 2011).

As DSB são observadas por imuno-histoquímica, pela presença da proteína histona H2AX fosforilada (γ H2AX), no núcleo da célula. Morfologicamente, visualiza-se pontos individuais (focos pontuais) corados, pela concentração das proteínas γ H2AX. O período de permanência desses focos pontuais nas células demonstra a eficiência ou não do processo de reparo da fita do DNA (PAULL et al., 2000; KAO et al., 2006; MAH et al., 2011).

A radiação ionizante (RI) tanto em alta como em baixas doses, representa um dos mutágenos mais eficiente em induzir diferentes tipos de danos ao material genético da célula. A exposição à radiação ionizante causa severas lesões nas células por causa da ionização direta e, indiretamente, pela ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que agem nas moléculas do DNA levando à quebras e mutações gênicas (ROTHKANN and LÖBRICH, 2003; O'NEILL and WARDMAN, 2009; AZZAM et al, 2012). Os danos nas bases nitrogenadas do DNA oxidadas pelas EROs formam as moléculas 8-hidroxi-2'desoxiguanosina e 8-hydroxyguanina (8-OHdG), conhecidas como marcadores de dano oxidativo para RNA e DNA e capazes de induzir transversão ou mudança de G (guanina) para T (timina) no DNA (AZZAM et al, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi verificar ao longo do período de uma semana, por meio de análise imunoistoquímica, a radiosensibilidade da glândula parótida de ratos expostos à baixa dose de radiação X, emitida pelo aparelho radiográfico odontológico, na dosagem correspondente a 0,1 Gray.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi analisar espécimes da glândula salivar parótida coletados de ratos adultos jovens expostos à baixa dose de radiação X (0,1 Gray), nos períodos de duas horas (2h), vinte e quatro horas (24h) e sete dias (1S), após à exposição.

As avaliações consistiram na obtenção de lâminas histológicas parafinadas para visualização morfológica microscópica dos ácinos e ductos da glândula salivar, coradas em H.E. e verificação da presença e da capacidade das células acinosas e ductais em reparar possíveis danos no DNA (quebra da dupla fita e danos oxidativos), pela análise imunoistoquímica (método da peroxidase) utilizando-se os biomarcadores proteicos γ -H2AX e 8-OHdG.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

No presente estudo foram utilizados 25 ratos albinos Wistar (*Rattus norvegicus*), com três meses de idade, e peso corporal de 300 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA-UNESP. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” e o protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOA – UNESP (PROCESSO CEUA Nº 00459-2015).

3.2. Delineamento experimental

3.2.1. Anestesia

Para todos os procedimentos experimentais (exposição à radiação e eutanásia), os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/Kg, Francotar®, Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil).

3.2.2. Exposição à radiação X

Os animais foram distribuídos em grupos e após a anestesia geral, cada um, foi posicionado, em decúbito dorsal, em suporte apropriado para a exposição à radiação X na região da cabeça.



Figura 1. Esquema do posicionamento do aparelho de raios X para emissão dos raios X, na cabeça do animal em decúbito dorsal. O tubo de raios X, em posição estática em torno da cabeça do rato, emitindo um feixe colimado de raios X, por segundos.

O período de exposição aos Raios X foi o mesmo para os diferentes grupos experimentais correspondendo a 0,1 Gray ou 10 rad, utilizando o aparelho de raios X (Dabi, de uso odontológico).

3.2.3. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais composto de cinco animais cada um. O grupo C – controle, animais jovens submetidos ao ambiente e manipulado de maneira semelhante aos grupos irradiados, mas sem exposição à radiação X. Grupo 2 horas (2 h), grupo 24 horas (24 h), e, grupo uma semana (1S). Os animais destes três grupos (2h, 24h e 1S), foram expostos à radiação X (0,1 Gray) e eutanasiados nesses diferentes períodos. Cada animal que foi submetido à exposição à radiação X recebeu anestesia geral por meio de injeção intramuscular do anestésico Quetamina a 1% (Francotar, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil)

Após as exposições à radiação X, os animais, e os do grupo C, foram novamente anestesiados, via intramuscular com soluções anestésicas e submetidos a perfusão transcardíaca com solução salina 0,9 %, heparinizada, seguida de solução fixadora (400ml) com 4% de formaldeído (Sigma, Saint Louis, MO, USA) em 0,1 M de tampão PBS. As glândulas parótidas dos animais foram removidas e pós-fixadas em solução fixadora de formaldeído a 4% por 48 horas.

3.3. Procedimentos histológicos das amostras

Todos os espécimes foram lavados em água corrente por 24 horas e processados em banhos de álcool (70, 80, 95 e 100%), álcool/xilol 50% e 3 banhos com xilol (LabSynth, Diadema, SP, Brasil) para desidratação e blocagem em parafina (Histosec® Merck, Darmstadt, Alemanha). Cortes semi-seriados de 5µm de espessura dos espécimes foram realizados para observação qualitativa (descrição morfológica) dos tecidos corados em H.E. (hematoxilina e eosina) (figuras A, B, C e D).

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas pela técnica da estreptavidina-biotina e as lâminas fixadas foram submetidas aos anticorpos primários policlonais γH2AX (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) para avaliar a frequência de ruptura da dupla fita do DNA e seu reparo nos diferentes períodos. Os anticorpos primários anti-8OHdG (Santa Cruz Biotechnology), foram utilizados para análise do nível de oxidação celular. Os cortes

histológicos em lâminas de vidro silanizadas foram colocados em banhos rápidos de xilol para a remoção da parafina, e depois, em um banho com tampão KPBS (Phosphate buffer solution). As lâminas receberam tratamento de recuperação antigênica, em solução de tampão citrato (Merck, Darmstadt, Alemanha) e foram imediatamente lavadas duas vezes, em tampão KPBS, em leite e depois, em solução de peróxido de hidrogênio, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual e lavados em três banhos com solução de PBS e Triton X100, para incubação com o anticorpo. Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o sistema o kit LSAB+ (Dako Cytomation, Inc., Carpinteria, Carpinteria, USA) e reações de revelação pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468). Os cortes foram contra-corados com *Fast Green FCF* (INLAB, Brasil) a 1%. Para controle negativo, foi omitido o anticorpo primário. Ao final, as lâminas foram montadas com lamínulas.

3.4. Análise imunoistoquímica

Foram adquiridas imagens, em aumentos de 40X, da glândula parótida das secções histológicas imunomarcadas com γ -H2AX e 8-OHdG, por meio de câmara digital (AxioCam, Carl Zeiss) acoplada a microscópio de óptico e conectado a um microcomputador. Com o auxílio do programa de análise de imagens (ImageJ) foi realizada a mensuração da área pela densidade ocupada pela imunomarcação. Os valores foram expressos por percentagem de densidade da área imunomarcada entres os grupos experimentais. A determinação dos níveis de imunomarcação para o anticorpo 8-OHdG foi realizada de modo semi-quantitativo, utilizando-se escores de 1 a 4 (1 = ausente a 4 = intenso), de acordo com Pedrosa Jr. et al. (2009).

3.5. Observação Histológica dos espécimes glandulares nos períodos experimentais.

Os grupos apresentaram o parênquima glandular bem estruturado com lobos e lóbulos envolvidos por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado. Os ácinos e os diferentes ductos (intercalares, estriados e excretores), estavam

bem preservados e apresentando integridade tecidual nos diferentes períodos experimentais (Figura 1).

3.6. Análise estatística dos dados

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil). Foram empregados os testes de Análise de Variância (ANOVA) para estabelecimento das comparações entre os diferentes grupos experimentais e períodos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Padrão de imunomarcacão

A técnica imunoistoquímica empregada para detecção de γ -H2AX e 8-OHdG, mostraram especificidade na detecção dessas proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação no controle negativo da reação (Figura 2). As células imunorreativas para a proteína γ -H2AX apresentaram coloração marrom escura confinada ao núcleo e ao citoplasma da célula. A imunomarcacão para 8-OHdG, estava localizada no citoplasma das células (Figura 2).

4.1.1. γ -H2AX no parênquima glandular

As imunomarcacões foram bem evidentes no citoplasma dos ductos da glândula, em todos os grupos experimentais quando comparados ao grupo controle. A imunorreatividade apresentou especificidade peculiar neste protocolo de estudo, uma vez que o anticorpo γ -H2AX apresenta predomínio de marcação nuclear. Houve acentuada imunomarcacão no grupo 2h, com percentagem de densidade de imunomarcacão, estatisticamente significativa, em relação aos demais grupos e ao controle ($p < 0,01$) (Figura 3 e 5). A imunorreatividade da proteína γ -H2AX, no núcleo dos ductos e, dos ácinos glandulares, foram observados em alguns animais do grupo de 24 h (Figura 3 e 5). Não foi observado imunoreatividade da proteína γ -H2AX no citoplasma dos ácinos glandulares. Em todos os grupos observou-se imunorreatividade no núcleo das células do tecido conjuntivo e no núcleo das células endoteliais.

4.1.2. 8-OHdG no parênquima glandular

A imunorreatividade do anticorpo 8-OHdG, predominou no citoplasma dos ductos glandulares apresentando maior intensidade no grupo 2 h, quando comparado com os demais grupos (Tabela 1). A imunorreatividade no citoplasma dos ácinos glandulares foi difusa e de baixa intensidade nos grupos experimentais (Tabela 1) (Figura 4). Em todos os grupos

observou-se a imunorreatividade no núcleo e no citoplasma das células do tecido conjuntivo e no núcleo das células endoteliais (Tabela 1)(Figura 4).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo verificou a ocorrência de focos de imunomarcacão da proteína histona γ -H2AX, em glândulas salivares parótida de ratos expostos à baixa dose de radiação X (0,1 Gy). Os valores da percentagem de células γ H2AX-positivo no tecido glandular, demonstraram diferenças estatisticamente significantes na densidade de imunorreatividade dessa proteína no grupo 2h em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$) (Figura 5). Quando os demais grupos de análise (24 h e uma semana), foram comparados com o grupo controle a densidade de imunomarcacão não foi significativa.

Neste estudo, verificou-se que a imunomarcacão da proteína γ -H2AX apresentou localização predominantemente citoplasmática, fato este peculiar por ser uma proteína de marcação nuclear. Nos diferentes períodos analisados não se observou diferença significativa de marcação nuclear, seja em núcleos de ductos ou, de ácinos ou núcleos de células presentes no estroma glandular.

Os resultados do presente estudo demonstraram que a baixa dose de radiação X, emitida na região da cabeça dos animais, não induziu dano ao material genético das células da glândula parótida, no que se refere ao rompimento ou quebra da dupla fita do DNA nuclear. Vários trabalhos na literatura demonstraram a eficiência da proteína histona γ -H2AX como marcador de biomonitoramento de dano no DNA, em diferentes protocolos de estudos (Cadet et al., 1999; Douki, et al., 2003)

Deve-se ressaltar que existem outros tipos de danos ao DNA provocados pela exposição à radiação ionizante, incluindo danos por oxidações às bases nitrogenadas do DNA, por ligações cruzadas entre as bases de pirimidinas, deleções de bases nitrogenadas, emparelhamento errôneo de nucleotídeos, ruptura de uma fita do DNA e ruptura da dupla fita do DNA, que foi o foco do presente estudo (Marples and Collis, 2008; Alessio et al., 2015;).

No nosso estudo, a localização da imunorreatividade da proteína γ -H2AX no citoplasma das células ductais pode ser explicada pela presença de grande quantidade de mitocôndrias nessas células. Choi e colaboradores (2011), demonstraram por meio de estudos de proteômica mitocondrial, a presença de proteínas histonas H2A e H2B na mitocôndria. Foi demonstrado que estas histonas e outras histonas similares às histonas nucleares, estão

presentes na membrana mitocondrial como proteínas integrais de membrana, no interior da organela e não diretamente ligadas ao DNA mitocondrial (mtDNA) (CHOI et al., 2011).

No presente estudo verificou-se também a ocorrência de imunorreatividade do anticorpo 8-OHdG no parênquima parotídeo dos ratos, nos períodos experimentais, para observar possíveis presença de danos oxidativos nos ácidos nucleicos celulares. A imunorreatividade do anticorpo 8-OHdG, por meio de análise semiquantitativa, apresentou-se com maior intensidade no grupo 2 h, quando comparado com os demais grupos (Tabela 1) (Figura 4).

Nossos resultados relativos à imunorreatividade citoplasmática do anticorpo 8-OHdG também pode ser justificada pela grande quantidade de mitocôndrias no citoplasma das células ductais já que existem nucleotídeos e mtDNAs no interior da mitocôndria. A imunorreatividade citoplasmática do anticorpo 8-OHdG nos períodos experimentais de 24 h e de uma semana, não permaneceu elevada quando comparado ao grupo 2h, demonstrando que as células dos ductos glandulares no decorrer do período de análise, puderam reparar as possíveis oxidações nos nucleotídeos guanina e se reestabeleceram progressivamente, apresentando imunoreatividade similar ao do grupo controle.

Estudos sugerem que o mtDNA, empacotado em nucleóides no interior da mitocôndria pode estar protegido contra os efeitos nocivos da radiação ionizante e da geração de espécies reativas de oxigênio (GULYAEVA et al., 2006; HENSEN et al, 2014;).

Por outro lado, existem trabalhos na literatura mostrando vários aspectos da disfunção mitocondrial e seu papel no envelhecimento do organismo e no desenvolvimento de patologias associadas à idade (RAIMUNDO 2014; SCHIAVI e VENTURA 2014 ; BRATIC e LARSSON, 2013).

No presente trabalho mesmo não observando imunorreatividade do anticorpo 8-OHdG e da proteína γ -H2AX no núcleo das células do parênquima da glândula parótida entre os grupos experimentais, mais estudos são necessários para melhor compreensão da complexidade dos possíveis danos mitocondriais e celulares e do comportamento das células mediante exposição à baixa dose de radiação ionizante.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, conclui-se que a glândula parótida de ratos expostos a baixa dose de radiação X (0,1 Gray), não mostrou danos no DNA nuclear e nem danos oxidativos nucleares, pela imunorreatividade de γ -H2AX e 8-OHdG, utilizando análise imunoistoquímica, método da peroxidase;

FIGURAS E TABELAS

FIGURAS E TABELAS

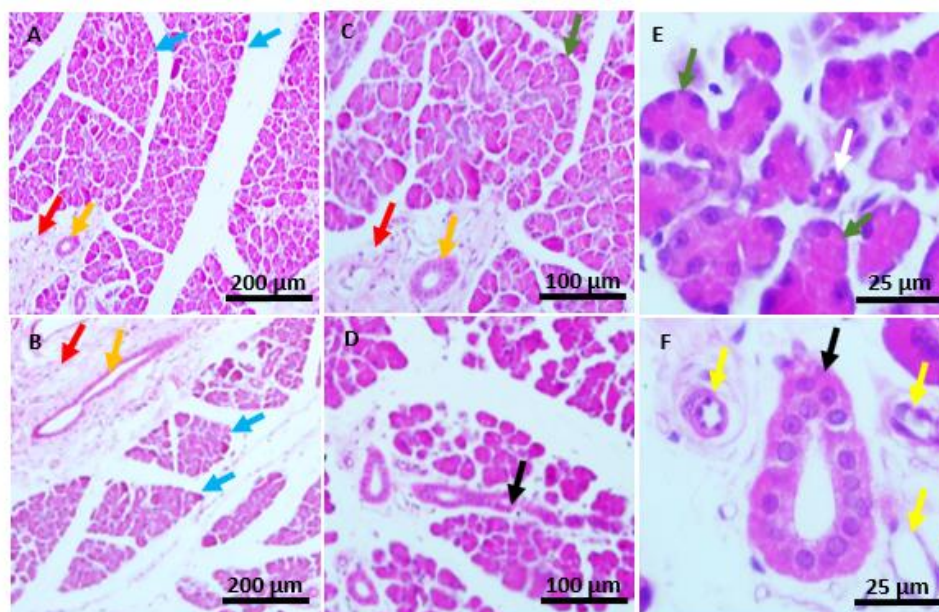


Figura 1. Fotomicrografias em microscopia de luz evidenciando o aspecto histológico da glândula parótida de um rato do grupo 2 h (A, C e E) e outro, do grupo 24 h (B, D e F), em vários aumentos e corados com H.E.. O parênquima das glândulas apresenta lóbulos envolvidos por tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado. Os ácinos serosos e os diferentes ductos (intercalares, estriados e excretorios), apresentam-se bem preservados com integridade tecidual. Setas: seta azul - lóbulo glandular; seta vermelha - tecido conjuntivo; seta laranja - ducto excretor; seta preta - ducto estriado; seta branca - ducto intercalar; seta verde - ácinos serosos; seta amarela - vasos sanguíneos. Aumento original: (A-B), 50X; (C-D), 100X; (E-F), 400X. Barras de escala: 200 µm (A-B); 100 µm (C-D); 25 µm (E-F)

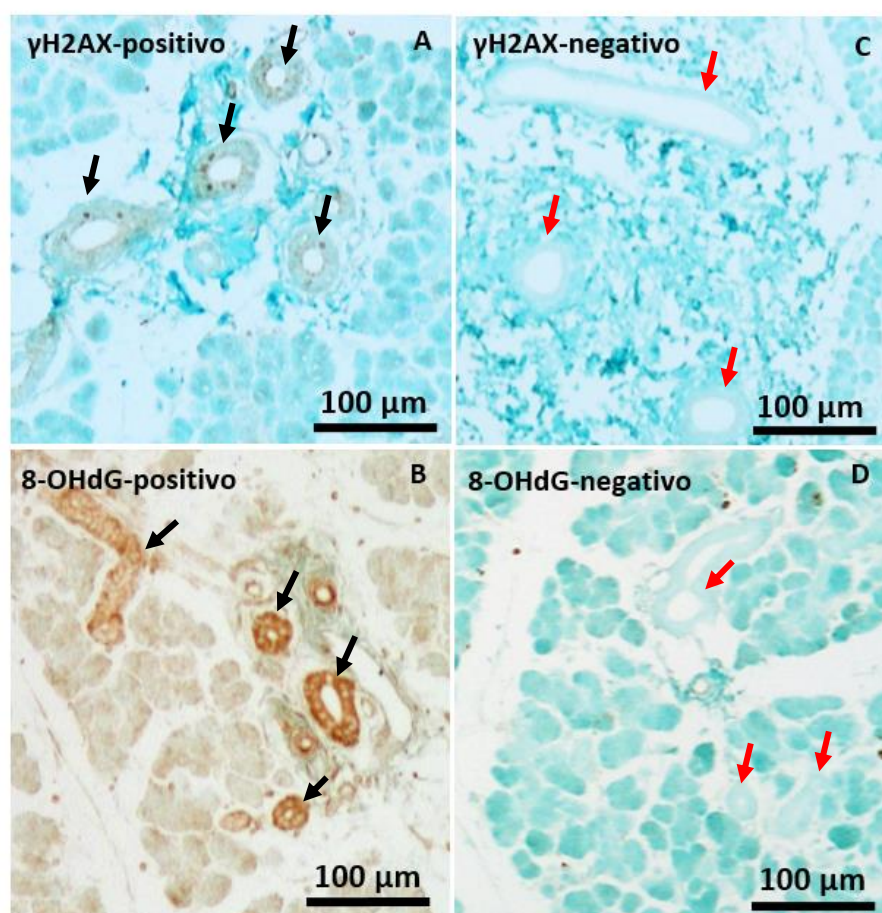


Figura 2. Fotomicrografias em microscopia de luz da glândula parótida do rato mostrando a imunorreatividade positiva para as proteínas histona γ -H2AX e 8-OHdG (A-B). Nas imagens C e D, o anticorpo primário foi omitido para o controle da reação e especificidade da reação de imunoistoquímica. Setas pretas, ductos estriados apresentando células imunomarcadas; Setas vermelhas, ausência de células ductais imunomarcadas.

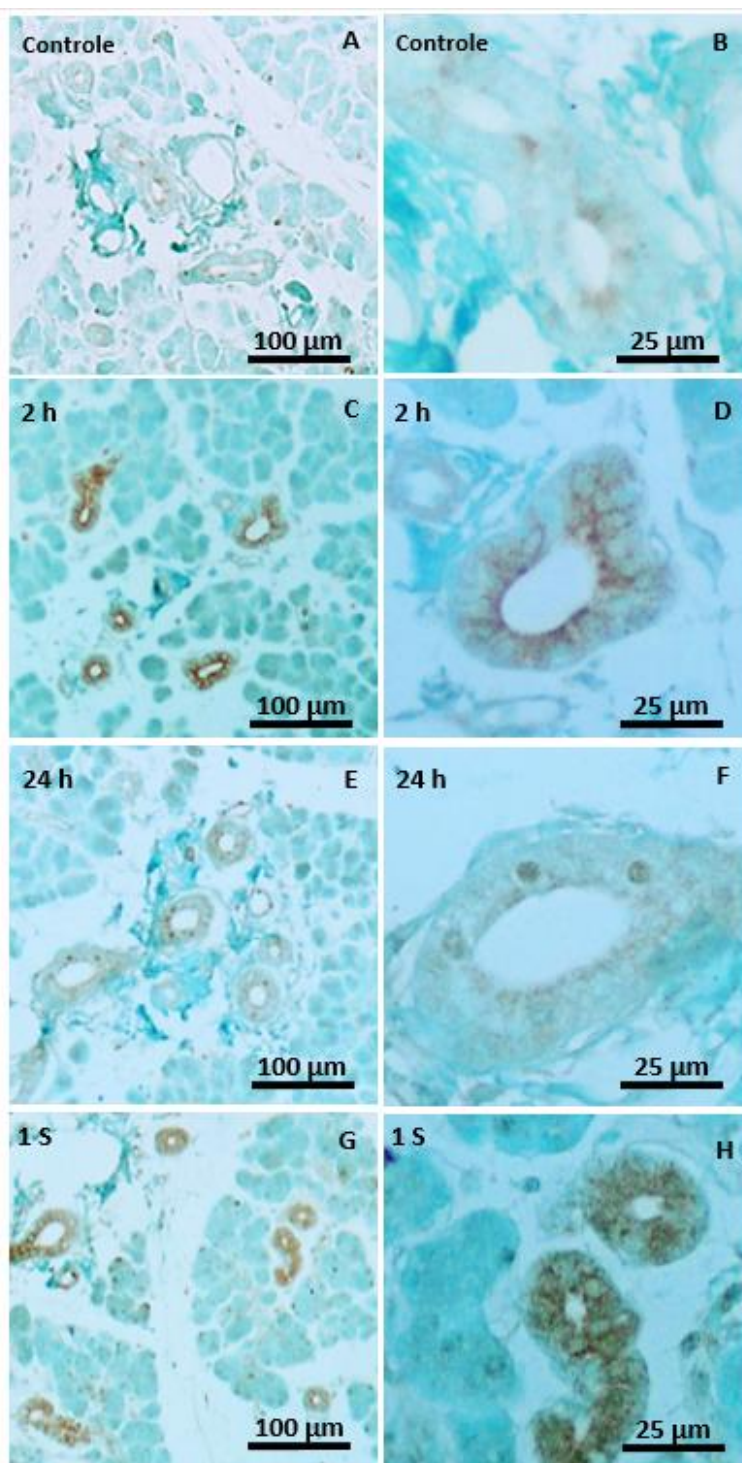


Figura. 3 Fotomicrografias em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a histona γ -H2AX na glândula parótida de rato. Observar que a imunorreatividade para histona γ -H2AX está visível nos ductos (intercalar, estriado e/ou excretor). As células apresentam imunorreatividade tanto no citoplasma (grupo controle e 2 h), como no núcleo (grupo 24 h e 1S) desses ductos. Observa-se também imunorreatividade no núcleo de células dos ácinos (G-H), e núcleo de células endoteliais (E-G). Aumento original (A-C-E-G), 100X; (B-D-F-H), 400X. Barras de escala: 100 μ m (A-C-E-G); 25 μ m (B-D-F-H). Contra-coloração: Fast green.

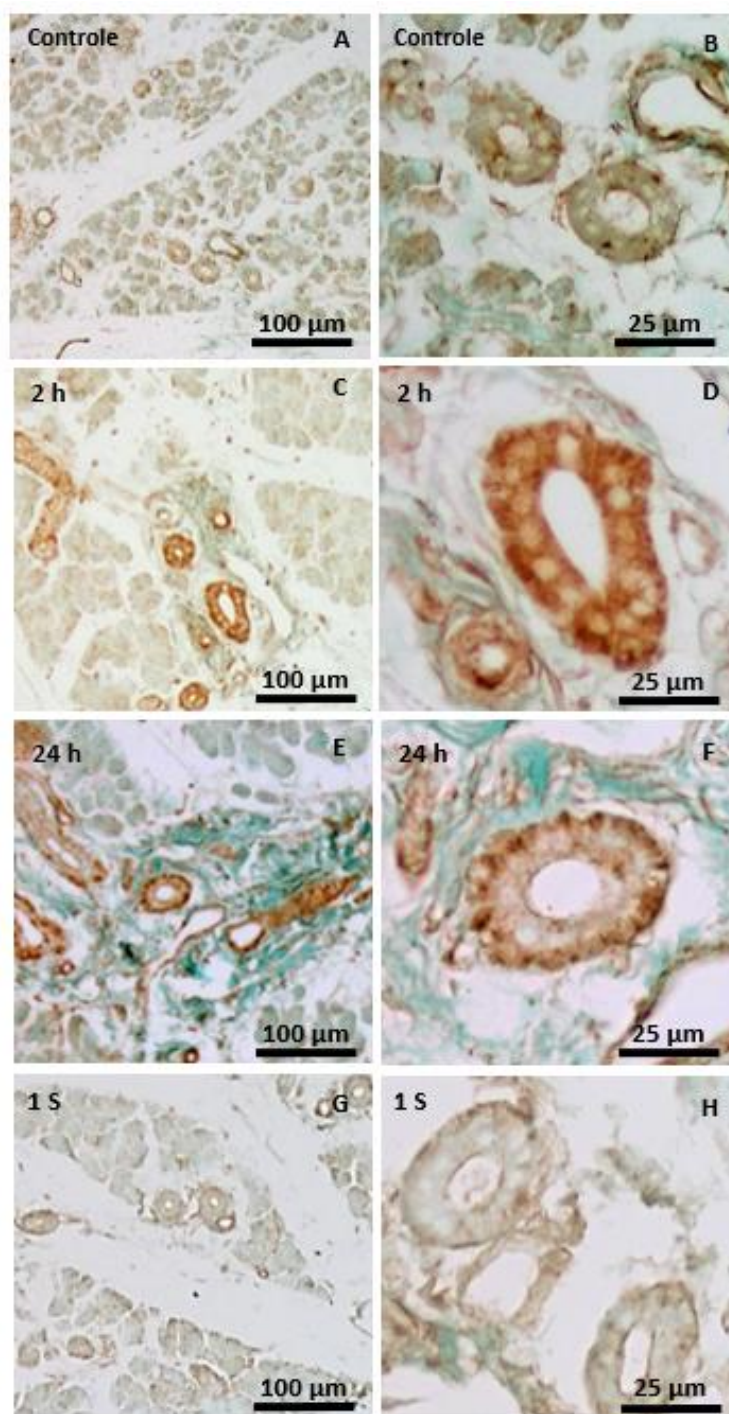


Figura 4. Fotomicrografias em microscopia de luz mostrando a imunorreatividade para a 8-OHdG na glândula parótida. Observar que a imunorreatividade para 8-OHdG está visível no citoplasma de ácinos e de ductos (intercalar, estriado e/ou excretor) (A-H). As células apresentam imunorreatividade no núcleo de células vasculares (B-E-F). (grupos controle, 2h e 24h). Aumento original (A-C-E-G), 100X; (B-D-F-H), 400X. Barras de escala: 100 µm (A-C-E-G); 25 µm (B-D-F-H). Contra-coloração: Fast green.

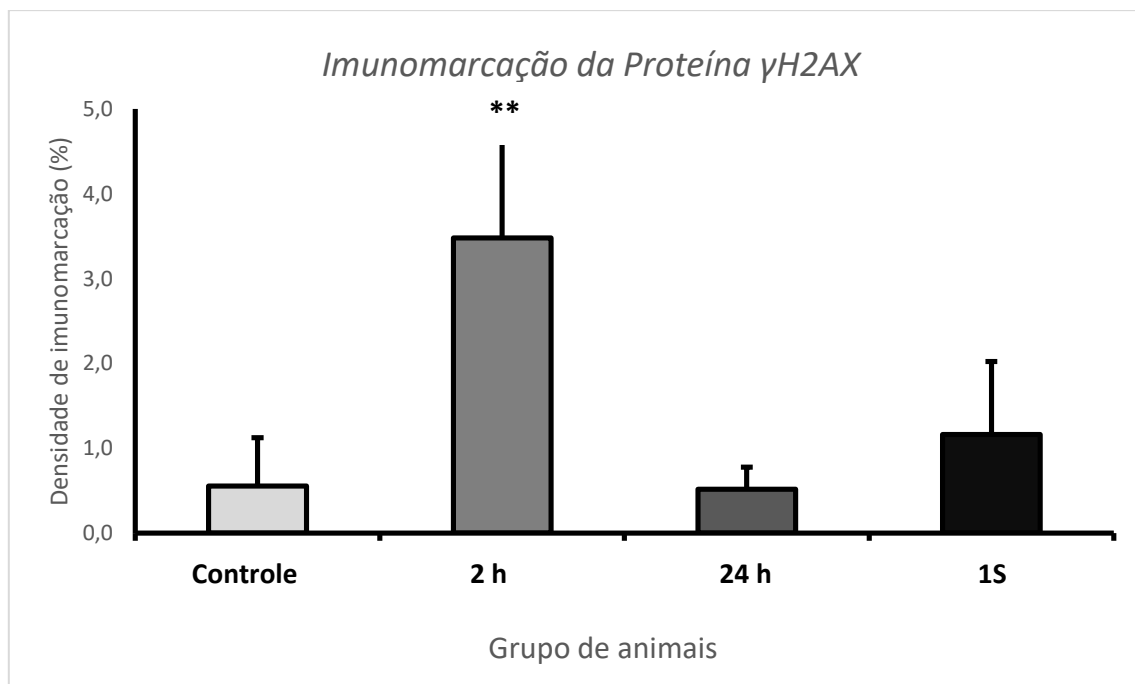


Figura 5. Gráfico apresentando a comparação das densidades de marcação por área, em percentagem média, da proteína γ H2AX no parênquima glandular dos diferentes grupos experimentais. (* *), diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,001$).

Tabela 1. Distribuição de anticorpos 8-OHdG-positivos na glândula parótida de ratos.

PARÂMETRO DE ANÁLISE E ESCORES IMUNOMARCAÇÃO – SEMI-QUANTITATIVO	(Grupos experimentais)			
	C	2 h	24 h	1 S
(0) presença em núcleos do estroma glandular (fibroblasto e endotélio vascular)	3	4	3	3
(1) presença em núcleo de ductos glandulares	1	1	1	1
(2) presença em citoplasma de ductos glandulares	2	4	3	2
(3) presença em núcleos de ácinos secretores	1	1	1	1
(4) presença em citoplasma de ácinos secretores	3	2	2	1

(1) ausência de imunomarcação; **(2)** células 8-OHdG-positivas - fraca marcação; **(3)** células 8-OHdG-positivas - moderada marcação; **(4)** células 8-OHdG-positivas - intensa marcação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Alessio N, Gaudio SD, Capasso S, Di BeARNrdo 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** 6:8155-8166. 2014.
- Bratic A, Larsson NG. The role of mitochondria in aging. **J Clin Invest** 123:951–957. 2003
- Asaithamby A, Hu B; Chen DJ. Unrepaired clustered ADN lesions induce chromosome breakage in human cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 108:8293-8298. 2011.
- Azzam Ei , Gerin JPJ and Pain D. Clonizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. **Cancer Letters** 327:48–60. 2012.
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J, Ravanat J and Sauvaigo S. Hydroxyl radicals and ADN base damage. **Mutat Res** 424:9. 1999.
- Choi YS, Hoon JJ, Min HK et al. Shot-gun proteomic analysis of mitochondrial D-loop DNA binding proteins: identification of mitochondrial histones. **Mol Bio Syst** 7:1523–1536. 2011.
- Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J and Sage E. Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of ADN damage involved in the genotoxic effect of solar. **Biochemistry** 42:92219226. 2003.
- Georgoulis A, . Vorgias, C E, . ChrousosG P, Rogakou EP. Genome Instability and γH2AX. **Int. J. Mol. Sci.** doi:10.3390/ijms18091979. 2017.
- Girardi C, DE Pitta C, Casara S, Sales G, Lanfranchi G, Celotti L; Mognato M. Analysis of iARN and mARN Expression Profiles Highlights Alterations in Ionizing Radiation Response of Human Lymphocytes under Modeled **Microgravity**. **PLoS One** 7:31293. 2012.
- González AB; Darby S. Risk of cancer from diagnostic Xrays: estimates for the UK and 14 other countries. **Lancet** 363:345–51. 2004.
- Hamada N, Maeda M, Otsuka K; Tomita M. Signaling pathways underpinning the manifestations of ionizing radiation-induced bystander effects. **Curr Mol Pharmacol** 4:79-95. 2011.
- Hudson D, Kovalchuk I, Koturbash I, KOLB B, Martin O A; Kovalchuk O. Induction and persistence of radiation-induced ADN damage is more pronounced in young animals than in old animals. **Aging** 3:609-620. 2011.
- Ilnytskyy Y, Koturbash I; Kovalchuk O. Radiation-Induced Bystander Effects In vivo are Epigenetically Regulated in a Tissue-Specific Manner **Environmental and Molecular Mutagenesis** 50:105-113. 2009.

Kao J, Milano MT, Javaheri A, Garofalo MC, Chmura SJ; Weichselbaum RR; Gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. **Curr Cancer Drug Targets** 6:197-205, 2006.

Mah LJ, Orlowski C, Ververis K, S Vasireddy R S, El-Osta A; Karagiannis TC. 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. 2011.

Mettler FA, Bhargavan M, Faulkner K, Gilley DB, Gray JE, Ibbott GS, Lipoti JA, Mahesh M, Mccrohan JL, Stabin MG, Thomadsen BR; Yoshizumi TT. 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. 2009.

Marples B, Collis SJ. Low-dose hyper-radiosensitivity: past, present, and future. **Int J Radiat Onco Biol Phys**. 70:1310–1318.2008.

Morgan WF; Sowa MB. Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation **Mutation Research** 616:159–164.2007.

O'Neill P, Wardman P. Radiation chemistry comes before radiation biology. **Int J Radiat Biol** 85:9-25. 2009.

Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner Cu, Gellert M; Bonner WM. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after ADN damage. **Curr Biol** 10:886–895. 2000.

Raimundo N. Mitochondrial pathology: stress signals from the energy factory. **Trends Mol Med**. doi:10.1016/j..2014.

Rothkamm K; Löbrich M. Evidence for a lack of ADN doublestrand break repair in human cells exposed to very low X-Ray doses. **Proc Natl Acad Sci USA** 100:5057-62. 2003.

Schiavi A, Ventura N. The interplay between mitochondria and autophagy and its role in the aging process. **Exp Gerontol**. doi:10.1016/j.exger.2014.02.015

Tanaka T, Halicka H D, Huang X, Traganos F; Darzynkiewicz Z Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of ADN damage by endogenous oxidants. **Cell Cycle** 5:19401945. 2006.

ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Análise imunoistoquímica das proteínas YH2AX, PCNA, Caspase 3 e 8-OHdG em tecidos orofaciais de ratos expostos a doses de radiação X diagnóstica e radioterápica**", Processo FOA nº 2015-00459, sob responsabilidade de Alaíde Gonçalves apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Outubro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Junho de 2017.

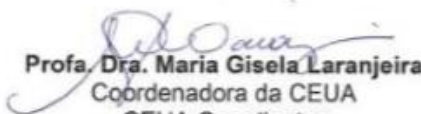
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Julho de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Response evaluation of orofacial tissues of rats exposed to diagnostic X-radiation doses and radiotherapy**", Protocol FOA nº 2015-00459, under the supervision of Alaíde Gonçalves presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 14, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 30, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 30, 2017.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator