IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS METALOPROTEINASES MMP-2 E 9 NA PELE DE RATOS SUBMETIDOS À DOSE ÚNICA DE RADIAÇÃO NA REGIÃO DA CABEÇA E PESCOÇO

Matheus da Silva Santin (PIBIC/Fundação Araucária), José Koehler, José Rosa Gomes (Orientador), e-mail: 1967jrgomes@gmail.com.
Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética.

Morfologia; Citologia e Biologia Celular

Palavras-chave: Radiação X, matriz extracelular, metaloproteinases de matriz.

Resumo
A radioterapia, apesar de eficiente no tratamento de neoplasias, resulta em efeitos colaterais em diferentes tecidos, porém, existem poucas descrições na literatura quanto às alterações morfológicas desse tratamento na pele. Neste estudo, se propôs a mostrar os efeitos da radiação X sobre a expressão das metaloproteinases de matriz 2 e 9 na pele de ratos. Vinte ratos Wistar foram distribuídos em grupos, por tempos após a aplicação da radiação (em 4, 9, 13 e 25 dias) e um grupo controle (não irradiado). A radiação foi aplicada na dose de 1537 miligrays direcionada para a cabeça do animal após serem previamente anestesiados. A pele foi coletada e processada para inclusão em parafina. Cortes semisseriados foram submetidos à imunohistoquimica. A radiação resultou na diminuição do número de células MMP-9 positivas nos tempos de 9 dias, 13 dias e 25 dias após a aplicação de radiação X quando em comparação com o grupo controle. Observou-se um aumento da MMP-2 em determinadas regiões da estrutura da pele nos animais com 4 dias reduzindo gradativamente até o 25º dia. Conclui-se que a irradiação alterou a expressão das metaloproteinases presentes na matriz da pele de ratos.

Introdução
A aplicação de radiação X é um importante método terapêutico, porém causa instabilidade química nos tecidos levando à degeneração de células tumorais e saudáveis. Os efeitos secundários da radioterapia, nas células saudáveis, ainda são um problema que precisa ser abordado, sendo que até 95% dos pacientes submetidos à radioterapia desenvolvem algum tipo de reação dérmica aguda.
A pele é formada por duas camadas diferentes denominadas de epiderme e derme. Na pele também são encontradas estruturas denominadas de anexos epidérmicos, como as glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas e os pelos.
A derme é um tecido conjuntivo e possui diferentes tipos celulares como linfócitos, macrófagos, além dos fibroblastos que sintetizam diferentes tipos de moléculas que compõem a matriz extracelular da derme. Além da proteína elastina, encontra-se na matriz extracelular, em grande quantidade, a proteína colágeno, cuja função é fornecer resistência a outros componentes como glândulas, vasos e nervos, também presentes na derme.
A proteína colágeno pode se organizar em diferentes níveis para formar fibrilas, fibras ou feixes de colágeno, sendo que na derme, predominam os tipos de colágeno I e colágeno III. O colágeno presente na pele, é um dos componentes que sofre rápida remodelação tanto em estado normal quanto durante um processo lesivo. Esse processo de remodelação do colágeno está correlacionado com diversas enzimas, dentre as quais destacam-se as metaloproteinases de matriz (MMP).

As MMPs são enzimas proteolíticas responsáveis pelo processo de remodelação da matriz extracelular, sendo capazes de degradar todos os seus componentes. A desnaturação do colágeno ocorre pelas metaloproteinases denominadas de colagenases, seguida pela degradação final pelas gelatinases (MMP-2 e MMP-9).
Em nossos estudos realizados no PIBIC 2014/15 e PIBIC 2015/16 pode-se perceber que a irradiação X resultou em alterações visíveis das fibras colágenas na região da derme. As fibras de colágeno tornaram-se mais delgadas e com aspecto amorfo. A estatística obtida pela análise do Picrosirius mostrou que a quantidade de fibras colágenas do tipo III foi significativamente maior no tempo de 25 dias em comparação com a data de 13 dias, indicando, possivelmente, um aumento da síntese de colágeno tipo III após a radiação.
Como a radiação não causa o aparecimento de processo inflamatório durante essas alterações da matriz extracelular; interessante é questionar sobre a expressão de enzimas presentes na pele, responsáveis pela remodelagem dos componentes da matriz extracelular, especialmente MMP-2 e MMP-9, que degradam colágeno, sendo esse o enfoque da continuidade dessa linha de pesquisa sobre os efeitos da radiação X na pele.

Materiais e Métodos

Comitê de ética

O projeto faz parte de uma linha mais ampla: “estudo da regeneração da região odontogênica do dente incisivo, do epitélio intestinal, do tecido neural e testicular de ratos submetidos à radiação X” aprovado nos âmbitos do DEBIOGEM/SEBISA/UEPG e CEUA/UEPG sob o processo CEUA 036-2016.

Animais

Foram utilizados 20 ratos Wistar (peso 250g a 300g) com 2,5 meses de vida, mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas e alimentação e água *ad libitum*.

Aplicação da radiação

Estes animais receberam dose única de 1537 miligrays de radiação X na região da cabeça. As aplicações de radiação X foram realizadas no ISPON, por pessoal habilitado, acompanhado dos realizadores da pesquisa. Antes da aplicação da radiação os animais foram anestesiados via intraperitoneal com 1,0 ml/kg de Cloridrato de Ketamina e 1,5 ml/kg de Cloridrato de Xylasina. Os ratos foram sacrificados, por deslocamento cervical, com 4, 9, 13 e 25 dias após a irradiação e três ratos sem irradiação foram utilizados como controle.

Processamento histológico

Fragmentos da pele da região da cabeça foram coletados, fixados por 48 horas em solução de formaldeído 2%, desidratados em soluções crescentes de concentração de álcool etílico (à partir de 70% até 100%), diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes semisseriados de 5µm que foram montados em lâminas e posteriormente submetidos às técnicas histológicas descritos a seguir.

Avaliação das metaloproteinases de matriz 2 e 9

Cortes foram submetidos à recuperação com solução de EDTA 10mM em pH 8,0 por 8 horas. O bloqueio da peroxidases endógenas foi realizado em 3 banhos de 10 minutos em peróxido de hidrogênio 20 volumes e posteriormente com solução de BSA 1% em tampão fosfato. O anticorpo primário para MMP-2 e MMP-9 foi diluído na concentração de 1:200, em solução de tampão fosfato contendo 1% de BSA. A revelação foi realizada com 25mg de diaminobenzidina (DAB) diluída em 80mL em PBS. Após a revelação, os cortes foram lavados em água corrente, água destilada, contra-corados com hematoxilina, desidratados e cobertos com lamínulas.

Análise quantitativa das metaloproteinases de matriz 2 e 9

Foi realizada contagem de células com marcação positiva no citoplasma para MMP-9 em 10 campos com aumento de 400x em todos os 20 animais. Para análise da MMP-2 foram fotomicrografados 5 campos no aumento de 400x. A expressão da MMP-2 foi avaliada visualmente comparando a marcação na epiderme, anexos da pele e matriz da derme.

Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de significância ($p<0.05$) pelo método ANOVA com pós-teste Bonferroni.

Resultados e Discussão

A MMP-9 foi localizada em nível celular, no citoplasma das células presentes na região mais profunda da derme no limite com o tecido muscular. As células apresentavam morfologia semelhante a fibroblastos com núcleo oval. A figura 1 mostra o resultado da contagem de células MMP-9 positivas. Quando em comparação com o grupo controle, os grupos de 9 dias, 13 dias e 25 dias apresentaram uma redução da quantidade de células expressando MMP-9. Comparando-se com o grupo de 4 dias, em 9 dias e 25 dias foi possível encontrar uma diminuição da quantidade média de células marcadas. A comparação entre os demais grupos não apresentou significância estatística.

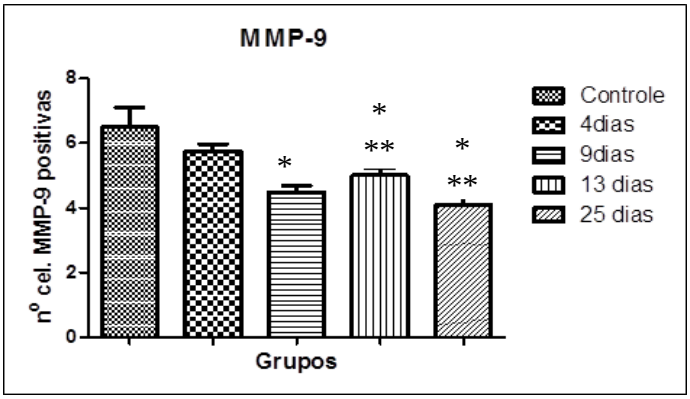


Figura 1 – Média ± desvio padrão do número de células apresentando expressão de MMP-9 em seu citoplasma por grupo de experimentação. *Significância estatística ($p<0,05$) em comparação com controle. **Significância estatística quando em comparação com grupo de 4 dias.

A MMP-2 foi expressa no grupo controle de forma menos intensa nas células da glândula sebácea, no epitélio e na derme. Com 4 dias a MMP-2 já foi identificada com mais intensidade no epitélio e no citoplasma das células das glândulas sebáceas e com menos intensidade na matriz extracelular da derme. Com 9 dias a MMP-2 é identificada na derme, glândulas sebáceas e menos no epitelio. Com 13 dias a intensidade de MMP-2 é menor em todas as regiões onde foi identificada nos tempos anteriores. Com 25 dias a expressão da MMP-2 assemelha-se a encontrada no grupo controle. Considerando as duas MMPs observa-se que a expressão de ambas responde de forma parecida ao efeito da irradiação com maior expressão nos primeiros tempos reduzindo no ultimo tempo semelhando-se ao grupo controle.

Não foram encontrados, na literatura, trabalhos que envolvessem a análise de metaloproteinases na pele após tratamento com radiação X para podermos comparar com os obtidos nesse trabalho. Araújo *et al.* (2011), em um artigo de revisão, correlacionaram as metaloproteinases com diversas patologias, em diversos tecidos. Acredita-se, por exemplo, que as MMPs estejam envolvidas na remodelação

vascular pulmonar, o que poderia implicar em hipertensão pulmonar crônica. Outros estudos ainda apontam uma correlação entre MMP-9 e prognóstico de pacientes após infarto agudo do miocárdio. Esses pacientes passariam a apresentar uma maior expressão dessas enzimas com a evolução temporal da necrose. Quanto ao estudo da pele, as MMP estão comumente relacionadas com o processo de cicatrização, porém esse processo não se deve ser comparado com o dano lesivo causado pela radiação, tendo em vista que existe uma fisiopatologia completamente diferentes, sendo que inexiste processo inflamatório na irradiação, diferentemente da cicatrização tecidual.

Os nossos resultados mostraram que nos grupos irradiados quando comparados com o controle ocorre uma redução das células expressando MMP. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que a irradiação, como mostrado em nossos resultados anteriores, induz uma alteração morfológica de alguns componentes, o que poderia também afetar o metabolismo celular reduzindo a expressão de MMP-9 nos animais irradiados.

Conclusões

Pode-se concluir que a irradiação causou uma redução da expressão de MMP-9 no citoplasma das células presentes no tecido conjuntivo da pele de ratos e um aumento de MMP-2 nos dias iniciais após a irradiação retornando ao nível do controle com 25 dias, entretanto mais estudos são necessários para confirmar os resultados encontrados.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos departamentos responsáveis pelo laboratório de histologia (DEBIOGEM) e de microscopias (DEODONTO e DEMAT), ao complexo de laboratórios multiusuário (CLABMU), ao Instituto Sul Paranaense de Oncologia (ISPON). À Fundação Araucária pela concessão de bolsa PIBIC para a realização dessa pesquisa

Referências

Araújo R. V. S., Silva, F. O., Melo-Jr, M. R., Porto, A. L. (2011). Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. R. Ci. md. biol. 10(1). 82-88

Campos, A. C. L., Borges-Branco, A., Groth, A. K. (2007) Cicatrização de feridas. Arq Bras Cir Dig. 20(1). 51-58.

Carpena, A. B. P., Francisco, A. A. M., Bonamigo, R. R. (2008). As metaloproteinases-2 e -9 da matriz e o carcinoma espinocelular: uma análise da literatura. Med Cutan Iber Lat Am. 36(6). 285-290

Chen, X., Peng, L. H., Li, N., et al. (2012). The healing and anti-scar effects os astragaloside IV on the wound repair in vitro and in vivo. J Ethnopharmacol. 139(3). 721-727.

Esco, R., Valencia, J., Polo, S. (2004). Radioterapia e citoprotección: Estado actual. Rev. oncol. (Barc.). 27(7). 40-46.

Fukushi, Y., Kitajima, M., Itaki, C., et al. (2014). Changes in the Skin Surface Temperature and Erythema Intensity during and after Radiotherapy for Breast Cancer Patients. Radiation Emergency Medicine. 3(2). 47-51

Gomes, J. R. (2010). MT1-MMP, MMP-2, MMP-9, TIMP-1,-2,-3 e a proliferação celular da região odontogênica de dentes incisivos de ratos adultos: efeito da doxiciclina em condição acelerada de proliferação celular. Tese de doutorado

Kiyohara, S., Sakurai, T., Kashima, I. (2003). Early detection of radiation-induced structural changes in rat trabecular bone. Dentomaxillofac Radiol. 32. 30-38.

Pires, A. M. T., Segreto, R. A., Segreto, H. R. C. (2008). Avaliação das reações agudas da pele e seus fatores de risco em pacientes com câncer de mama submetidas à radioterapia. Rev Latino-am Enfermagem. 16(5). 1-7.

Silva, W. G. (2014). Avaliação das alterações morfológicas, da expressão imunohistoquímica de metaloproteinases de matriz e da atividade gelatinolítica em dentes expostos à radioterapia na região de cabeça e pescoço. Tese de mestrado. UNICAMP