

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

YASMIN FIDLER

EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE X NA EXPRESSÃO DE MMP-9 E NA
MORFOLOGIA DO CEREBELO DE RATOS

PONTA GROSSA
2021

YASMIN FIDLER

EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE X NA EXPRESSÃO DE MMP-9 E NA
MORFOLOGIA DO CEREBELO DE RATOS

Dissertação apresentada para obtenção
do título de mestre na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, Área de
Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes

PONTA GROSSA
2021

F451 Fidler, Yasmin
Efeitos da radiação ionizante X na expressão de MMP-9 e na morfologia do cerebelo de ratos / Yasmin Fidler. Ponta Grossa, 2021.
59 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. José Rosa Gomes.

1. Radioterapia. 2. Metaloproteinase. 3. Cerebelo. 4. Células de purkinje. I. Gomes, José Rosa. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Celular e Molecular. III.T.

CDD: 574.87



Universidade Estadual
de Ponta Grossa



ATA NÚMERO 01 DE 2021 REFERENTE A DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOLOGIA CELULAR, DA MESTRANDA YASMIN FIDLER, REALIZADA NO DIA 05 MARÇO DE 2021, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos cinco dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e um, as nove horas, por via remota, em sessão pública da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), sob a presidência do **Professor Dr. José Rosa Gomes**, reuniu-se a Banca Examinadora da dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **YASMIN FIDLER** na área de concentração em **BIOLOGIA CELULAR**, constituída pelas demais Doutoradas (membros titulares): **Professora Dra MICHELE DIETRICH MOURA COSTA (UEPG/PR)** e **Professora Dra. MARIMELIA PORCIONATTO (UNIFESP/SP)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa. O título da dissertação avaliada foi: **“EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE X NA EXPRESSÃO DE MMP-9 E NA MORFOLOGIA DO CEREBELO DE RATOS”** Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como **APROVADA**, considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

DR JOSÉ ROSA GOMES- Presidente

DRA.MICHELE DIETRICH MOURA COSTA- Titular

DRA. MARIMELIA PORCIONATTO – Titular.

Ponta Grossa, 05 de março de 2021.

RESUMO

A metaloproteinase-9 (MMP-9) é uma enzima que está presente no sistema nervoso central e periférico, atuando na remodelação dos tecidos, seja em condições patológicas ou durante o processo de morfogênese. Os níveis de MMP-9 podem ser aumentados no SNC após alguma injúria. Porém, pouco se sabe sobre a expressão dessa metaloproteinase em lesões no SNC, causadas por radioterapia na região de cabeça e pescoço, que apesar de destruir células neoplásicas pode atingir tecidos saudáveis adjacentes. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a expressão da MMP-9 e a morfologia do cerebelo de ratos que receberam dose única de radiação X na cabeça. Para isso, trinta ratos machos Wistar foram divididos em seis grupos: um como controle e os demais irradiados. Os cerebelos foram coletados e avaliados nos tempos de 4, 9, 14, 25 e 60 dias após dose única de /radiação de 15,75 grays. As amostras coletadas foram submetidas à imunohistoquímica para MMP-9, e histoquímica de Feulgen para análises morfológicas do córtex cerebelar e dos núcleos das células de Purkinje. Os resultados da imunohistoquímica mostraram um aumento na expressão de MMP-9 em 4, 9 e 14 dias. A MMP-9 foi imunolocalizada em prolongamentos de neurônios na camada molecular e ao redor das células de Purkinje. As análises histológicas permitiram estabelecer que as alterações no córtex cerebelar ocorrem a partir de 4 dias e são evidentes até 60 dias. Além disso, foi demonstrado que área e o número de células de Purkinje são reduzidos após radiação. A análise da densidade óptica demonstrou que os animais irradiados possuem uma cromatina mais condensada ou fragmentada. Conclui-se que o dano causado por uma dose de radiação X de 15,75 Gy na região cefálica do rato provoca um aumento na expressão de MMP-9, mudanças na morfologia normal do córtex cerebelar, redução da área nuclear e do número de células de Purkinje, assim como a compactação da cromatina.

Palavras-chave: radioterapia, metaloproteinase, cerebelo, células de Purkinje.

ABSTRACT

The metalloproteinase-9 (MMP-9) is an enzyme that is present in the central and peripheral nervous system, acting on tissue remodeling, either in pathological conditions or during the process of morphogenesis. MMP-9 levels can be increased in the CNS after some injury. However, little is known about the expression of this metalloproteinase in CNS lesions, caused by cranial radiotherapy, which despite destroying neoplastic cells can reach adjacent healthy tissues. Therefore, the aim of this study was to evaluate the expression of MMP-9 and the cerebellum morphology of rats that received a single dose of X radiation to the head. For this, thirty male Wistar rats were divided into six groups: one as a control and the others irradiated. The cerebellums were collected and evaluated at 4, 9, 14, 25 and 60 days after a single radiation dose of 15.75 grays. The collected samples were submitted to immunohistochemistry for MMP-9, and Feulgen's histochemistry for morphological analysis of the cerebellar cortex and the nuclei of Purkinje cells. The results of immunohistochemistry showed an increase in MMP-9 expression at 4, 9 and 14 days. MMP-9 was immunolocalized in neuron extensions in the molecular layer and around Purkinje cells. Histological analyzes allowed to establish that changes in the cerebellar cortex occur after 4 days and are evident up to 60 days. In addition, it has been shown that the area and the number of Purkinje cells are reduced after radiation. The optical density analysis showed that the irradiated animals have a more condensed or fragmented chromatin. We conclude that the damage caused by a dose of X radiation of 15.75 Gy in the cephalic region of the rat, leads to an increase in the expression of MMP-9, changes in the normal morphology of the cerebellar cortex, reduction of the nuclear area and the number of Purkinje cells, as well as chromatin condensation.

Keywords: radiotherapy, metalloproteinase, cerebellum, Purkinje cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Divisão lobular do cerebelo	12
Figura 2 - Histologia e células do córtex cerebelar	15
Figura 3 - Esquemas dos volumes de tratamento de radioterapia	19
Figura 4 - Esquema da estrutura e domínios da MMP-9	24
Figura 5 - Grupos experimentais	30
Figura 6 - Imunohistoquímica para MMP-9 em cerebelo.	36
Figura 7 - Estimativa do número de células de Purkinje	38
Figura 8 - Análise morfológica e morfométrica	40
Figura 9 - Área nuclear das células de Purkinje	42

LISTA DE ABREVIATURAS

BBB	Barreira hematoencefálica
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albumina serica bovina
CG	Camada Granulosa
CM	Camada Molecular
CP	Camada de Purkinje
CTV	Volume alvo da irradiação
Cys99	Resíduo de cisteína
DAB	Diaminobenzidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FN2	Fibronectina tipo II
Gy	Gray
GTV	Volume tumoral
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCl	Ácido Clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase
NaCl	Cloreto de Sódio
NGF	Fator de crescimento neuronal
NO	Óxido nítrico
O ⁻²	Ânion superóxido
OH	Radical Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
P	Célula de Purkinje
PBS	Tampão fosfato-salino
PTV	Volume de panejamento

SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TIMPS	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
8-OHdG	8-hidróxi-2'-deoxiguanosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 MORFOLOGIA DO CEREBELO	11
2.1.1 Substância Cinzenta	13
2.1.1.1 Camada molecular	13
2.1.1.2 Camada de células de Purkinje	13
2.1.1.3 Camada granular	14
2.1.2 Substância Branca	16
2.2 RADIAÇÃO IONIZANTE	16
2.3 RADIOTERAPIA	17
2.4 CEREBELO E RADIAÇÃO IONIZANTE	19
2.5 MATRIZ METALOPROTEINASES	22
2.5.1 MMP-9	23
2.5.2 Matriz Metaloproteinases e Sistema Nervoso	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 ANIMAIS, DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	30
4.2 APLICAÇÃO DA RADIAÇÃO	30
4.3 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS	31
4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS RATOS IRRADIADOS ..	31
4.4.1 Análise Morfológica	31
4.4.2 Estimativa do Número de Células de Purkinje	32
4.4.3 Análise da Área e do Fenótipo do Núcleo das Células de Purkinje	32
4.4.4 Análise da Expressão de MMP-9	33
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 RESULTADOS	35
5.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MMP-9	35
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO CEREBELO	37
5.2.1 Estimativa do Número de Células de Purkinje	37
5.2.2 Análise da Área e do Fenótipo Nuclear das Células de Purkinje	38
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

As metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencem a uma ampla família de endopeptidases dependentes de zinco. Sabe-se que MMPs são enzimas-chave que regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização por meio da degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e apresentam funções importantes em diversos processos biológicos, como morfogênese, cicatrização, reparação tecidual e em processos patológicos (NAGASE *et al.*, 2006).

A metaloproteinase-9 (MMP-9), ou gelatinase B, é uma colagenase do tipo IV que é expressa por diferentes tipos de células e está envolvida em muitos processos biológicos como por exemplo na progressão tumoral, fibroses, escleroses, processos inflamatórios, desenvolvimento pulmonar, desenvolvimento renal (AYOUB *et al.*, 2005). Também está expressa no Sistema Nervoso Central (SNC), envolvendo regiões do córtex cerebral, cerebelo e hipocampo, desempenhando funções que auxiliam no desenvolvimento neuronal e na homeostase do tecido nervoso (YOUNG, 2005).

Em processos oncológicos, um dos tratamentos utilizados consiste na aplicação de radiação ionizante com o objetivo de destruir células cancerosas. Após o tratamento com radiação ionizante em tecidos tumorais o aumento da atividade de MMP-9 já foi documentado (KUNIGAL *et al.*, 2008). A radioterapia quando aplicada a órgãos próximos do SNC atinge tecidos adjacentes saudáveis, o que pode trazer sequelas temporárias ou permanentes ao paciente (JADHAV; MOHANAM, 2006), porém até o momento, o papel e mecanismo de ação da MMP-9 em lesões causadas pela radiação em tecidos não tumorais do SNC ainda não foram elucidados.

Entre os órgãos do SNC, o cerebelo que será o foco deste trabalho, é descrito na literatura por possuir uma sensibilidade à radiação ionizante, a qual produz mudanças na sua citoarquitetura, morfologia e, conseqüentemente, no comprometimento da função motora (GUELMAN, 2003). Portanto, antes do desenvolvimento de estratégias profiláticas ou protocolos de tratamento, é imprescindível uma compreensão detalhada dos danos morfofisiológicos no SNC induzidos pela radioterapia.

Dessa forma, no presente trabalho nós avaliamos o efeito da radiação X na

expressão da MMP-9 e morfologia do cerebelo. Análises de alterações no fenótipo nuclear das células de Purkinje também foram realizadas a fim de evidenciar morte celular em decorrência da aplicação da radiação ionizante.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O cerebelo, que significa “pequeno cérebro”, é uma estrutura do sistema nervoso central. Embora represente apenas 10% do volume total do cérebro, o cerebelo maduro contém mais da metade dos neurônios do SNC (WANG; SOGHBI, 2001).

Embora o cerebelo se desenvolva a partir de uma região “sensorial” (o lábio rômico), ele é classicamente considerado uma região envolvida no processamento motor, (BUCKNER, 2013; MERCHANT, *et al.*, 2014; AFIFI; BERGMAN, 2008) mas também tem sido implicada em funções não motoras, como o processamento sensorial (GAO *et al.*, 1996), mecanismos atencionais (POPE; MIALL, 2012), conteúdo afetivo (GUNDEL *et al.*, 2003) e no processamento somatossensorial, incluindo nocicepção (SAAB; WILLIS, 2003).

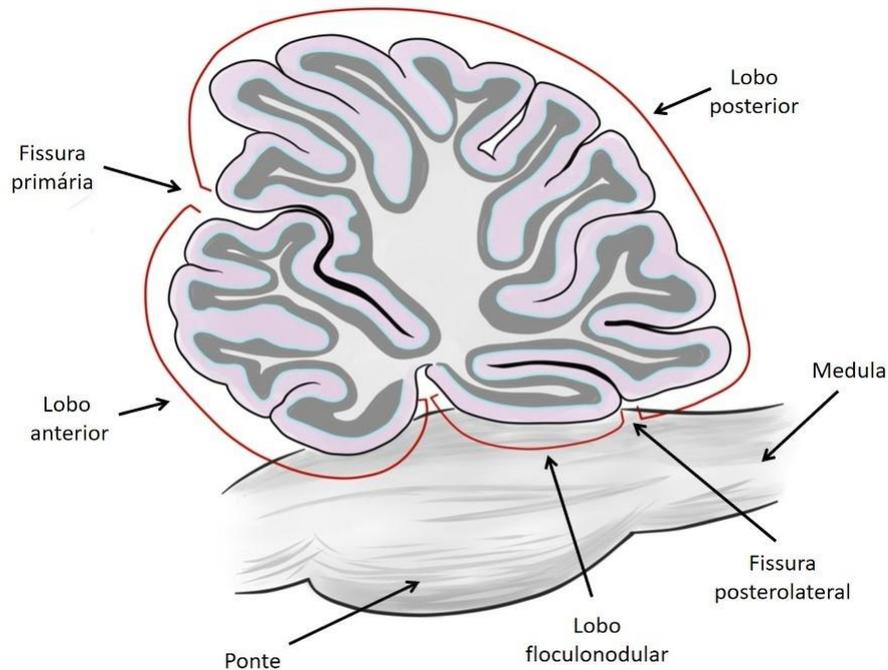
2.1 MORFOLOGIA DO CEREBELO

O cerebelo encontra-se localizado na fossa craniana posterior, dorsalmente à ponte e ao bulbo. Nessa posição anatômica, participa do teto do IV^o ventrículo e se encontra separado, superiormente, do lobo occipital cerebral, por uma prega da dura-máter, conhecida como tentório ou tenda cerebelar (MACHADO, 2005).

O cerebelo de mamífero é dividido em três zonas longitudinais, baseadas no arranjo das projeções do córtex cerebelar para os núcleos do cerebelo, caracterizado por um verme na zona mediana, paraverme na zona intermediária e lateral nos hemisférios (AFIFI; BERGMAN, 2008).

Dobras e fissuras dividem o cerebelo em lóbulos, lóbulos e folhas. O cerebelo de mamíferos e aves é convencionalmente dividido em 3 lobos: lobo anterior, posterior e floclonodular, demonstrado na figura 1, que são subdivididos em 10 lóbulos (I-X) (GLICKSTEIN *et al.*, 2009).

Figura 1 - Divisão lobular do cerebello



Fonte: ALTMAN, J.; BAYER, S. A. **Development of the Cerebellar System in relation to its evolution, structure and functions**. 1 ed. Florida: CRC Press, 1997.

O cerebello é composto por oito tipos diferentes de populações neuronais, as quais seis foram descritas em 1911 por Ramón y Cajal: células de Golgi, células de Purkinje, células granulares, células estreladas e células de Lugaro, e duas populações descritas posteriormente, células em escovas unipolares (que são mais numerosas nos lóbulos ventrais e dorsais) e células em candelabro (LAINÉ; AXELRAD, 1994; HAINES; MANTO, 2015).

A estrutura anatômica do cerebello de mamíferos adultos apresenta um córtex de substância cinzenta (onde predomina os corpos celulares de neurônios mas também as células da neuroglia) organizado em três camadas e uma região central denominada substancia branca onde se encontram núcleos neuronais além de células da neuroglia e axônios. Da superfície para o interior, as camadas são denominadas de molecular, de Purkinje e granular. A região mais interna é formada pela substância branca onde predominam os axônios tanto de neurônios do próprio órgão como de outras partes do sistema nervoso (ALTMAN; BAYER, 1997). A figura 2C mostra esquematicamente a organização das células do córtex cerebelar e suas fibras ascendentes.

2.1.1 Substância Cinzenta

2.1.1.1 Camada molecular

A Camada Molecular é a mais superficial do cerebelo e é composta, como mostra a figura 2B e 2C, essencialmente pelas células estreladas, células em cesto e fibras paralelas. As fibras paralelas são formadas por axônios das células granulares, as quais ao atingirem a camada molecular, bifurcam-se em T estabelecendo sinapses excitatórias com os dendritos das células de Purkinje, das células estreladas e das células em cesto (AFIFI; BERGMAN, 2008).

Células em cesto e estreladas são tipos de interneurônios inibitórios Gabaérgicos. Os axônios desses neurônios realizam sinapse inibitória com os dendritos das células de Purkinje. O bom funcionamento dessas células é essencial para a atividade da rede neural, e sua disfunção tem sido associada à ocorrência de problemas cognitivos (ROSSIGNOL, 2011).

O corpo celular das células estreladas situa-se na parte superficial do estrato molecular, enquanto que as células em cesto situam-se na metade ou terço inferior dessa camada (ALTMAN; BAYER, 1997). Elas recebem uma entrada sináptica excitatória dos axônios das células granulares (fibras paralelas) e seus axônios estabelecem uma sinapse inibitória com as células de Purkinje (CAMERON *et al.*, 2009).

As células em cesto e estreladas podem ser consideradas pertencentes a mesma família. A diferença reside no fato de que as células estreladas estabelecem sinapse com apenas os dendritos das células de Purkinje, ao passo que as células em cesto são assim denominadas pois estabelecem contato com dendritos, pericários e axônios das células de Purkinje à maneira de um cesto (MACHADO, 2005; AFIFI; BERGMAN, 2008).

2.1.1.2 Camada de células de Purkinje

Os corpos das células de Purkinje estão arranjados em uma linha única na zona limite entre os estratos granular e molecular (AFIFI; BERGMAN, 2008; ALTMAN; BAYER, 1997) como mostrado na figura 2B.

As células de Purkinje tem formato piriforme e se destacam no córtex

cerebelar, em um corte histológico. As células de Purkinje são dotadas de dendritos, que se ramificam na camada molecular e estabelecem sinapses excitatórias com as fibras paralelas e sinapses inibitórias com as células estreladas e em cesto, e de um axônio que sai em direção oposta, terminando nos núcleos centrais do cerebelo e os núcleos reticulares do tronco, onde exercem ação inibitória. Esses axônios constituem as únicas fibras eferentes do córtex do cerebelo (MACHADO, 2005).

Conforme mostrado na figura 2C, os dois principais sistemas aferentes que conduzem informações para o córtex cerebelar especificamente para as células de Purkinje, são as fibras trepadeiras e as fibras musgosas (MACHADO, 2005). As fibras trepadeiras oriundas do complexo olivar inferior, em seu trajeto ascendente ao cerebelo, atravessam as camadas do córtex cerebelar para terminarem em sinapses com os dendritos das células de Purkinje na camada molecular. As fibras musgosas são oriundas do tronco encefálico, núcleos cerebelares profundos e núcleos da medula espinal. Essas fibras interagem indiretamente com as células de Purkinje através dos axônios das células granulares que se estendem na camada molecular, chamados de fibras paralelas (AFIFI; BERGMAN, 2008; CAMERON, 2009).

2.1.1.3 Camada granular

Os principais neurônios da camada granular do cerebelo são as células granulares. São as únicas células excitatórias do cerebelo. As células dos grânulos cerebelares são as menores e mais abundantes SNC humano (AZEVEDO *et al.*, 2009). Os pequenos corpos celulares são compactados na camada granular com cerca de 4-5 dendritos que recebem entrada aferente cerebelar (GOLDOWITZ *et al.*, 1997; CHÉDOTAL, 2010).

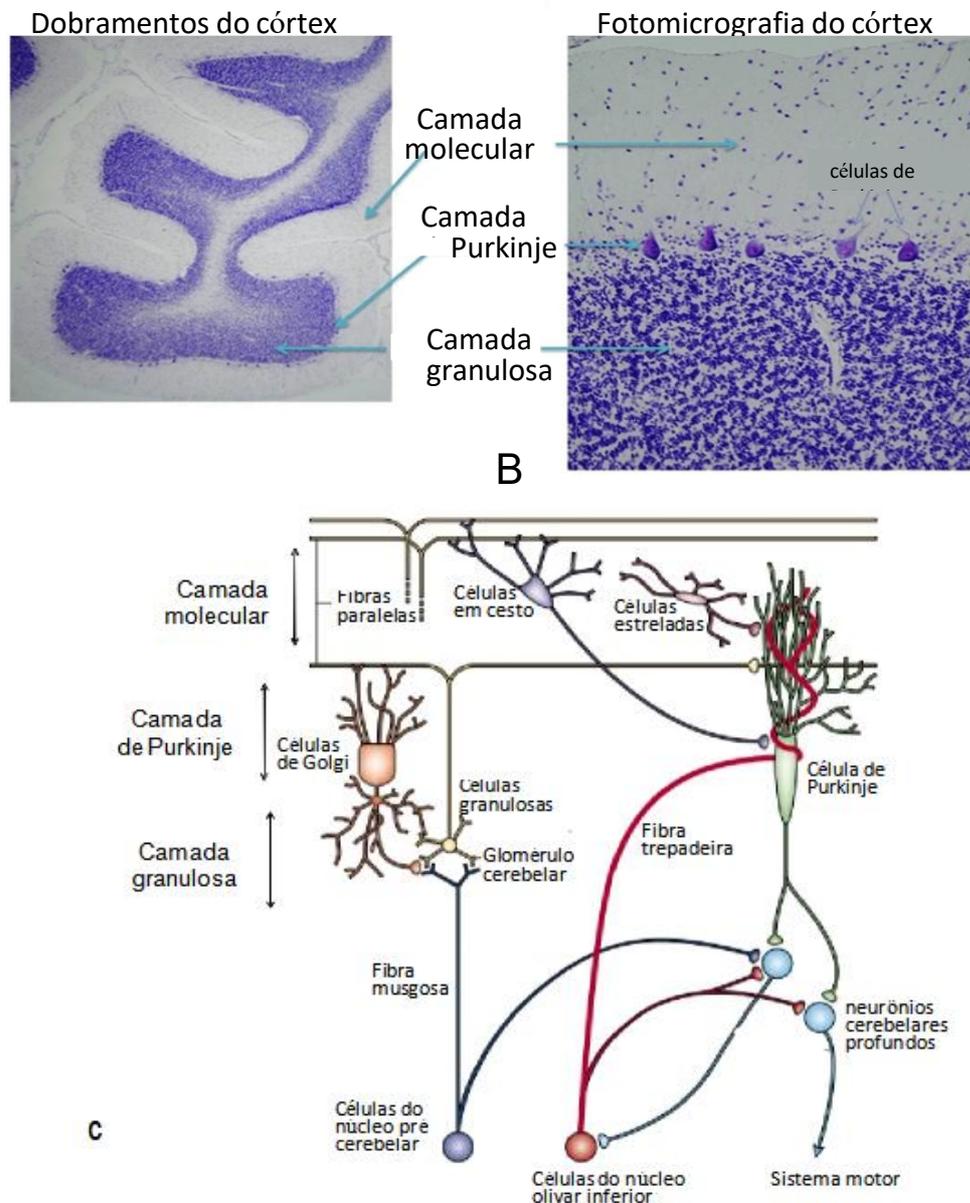
Os axônios das células granulares ascendem no estrato granuloso, de Purkinje e molecular, onde se bifurcam em forma de T e correm paralelos à superfície para formar um sistema paralelo de fibras (AFIFI; BERGMAN, 2008). Na camada granular existe ainda outro tipo de neurônio, as células de Golgi, com ramificações muito amplas. Essas células, entretanto, são menos numerosas que as granulares (MACHADO, 2005).

As células granulares apresentam vários dendritos, em sinapses excitatórias com os ramos das fibras musgosas do cerebelo e em sinapses inibitórias com os

axônios das células de Golgi, constituindo o glomérulo cerebelar.

As células de Golgi articulam-se, conforme mostra a figura 2C, através de seus dendritos, com as fibras musgosas, trepadoras e paralelas, em sinapses excitatórias, enquanto seus respectivos axônios se distribuem na camada das células de Purkinje e na própria camada granular, em sinapses inibitórias, com os dendritos das células granulares (AFIFI; BERGMAN, 2008).

Figura 2 - Histologia e células do córtex cerebelar



Fonte: A e B: Adaptado de <https://sisu.ut.ee/histology/cerebellum>. C: Fonte: Adaptado de Wang, V. Y.; Zoghbi, H. Y. Genetic regulation of cerebellar development. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 7, p. 484-491, 2001.

2.1.2 Substância Branca

Na substancia branca são encontrados 4 pares de núcleos do cerebelares: (A) núcleo denteado, (B) núcleo emboliforme, (C) núcleo globoso e (D) núcleo do fastígio. Os núcleos cerebelares são compostos de vários tipos neuronais: neurônios glutamatérgicos excitatórios, que se projetam em diferentes partes do cérebro, neurônios GABAérgicos inibitórios (RUIGROK, 1997) e interneurônios GABAérgicos e glicinérgicos inibitórios (UUSISAARI; KNÖPFEL, 2012).

Estudos mostram que o cerebelo possui os circuitos nervosos mais bem padronizado quando comparado com os de outras estruturas do sistema nervoso central, o que pode ser essencial para organizar o grande número de circuitos zonais funcionais e topográficos (REEBER *et al.*, 2013). Estudos sobre padrões de expressão gênica em neurônios do núcleo cerebelar também revelaram heterogeneidade molecular que pode refletir a complexidade molecular do córtex cerebelar (CHUNG *et al.*, 2009). Entretanto, ainda que bem conhecido, várias funções cerebelares ainda precisam ser melhor estudadas.

2.2 RADIAÇÃO IONIZANTE

Conceitualmente, radiação ionizante é a radiação eletromagnética ou partícula de alta energia que, ao interagir com o meio absorvedor, tem a propriedade de transferir, integral ou parcialmente, energia para os átomos e moléculas deste meio, resultando no fenômeno conhecido como ionização (KAPLAN, 1978). Nos organismos vivos, a incidência dessa radiação promove danos às células, por ação direta ou indireta (DOWD; TILSON, 1999).

A ação direta consiste na incidência da radiação ionizante diretamente nas macromoléculas biológicas como o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). Essa interação promove a fragmentação dessas moléculas, principalmente durante a duplicação do DNA (DOWD; TILSON, 1999).

Na ação indireta a interação da radiação com as moléculas presentes no interior celular provoca a hidrólise da água desencadeando uma cascata de eventos que geram moléculas ionizadas ou excitadas decompostas em hidrogênio e radicais livres (ANDERSON, 1996; POMPELLA, 1997), resultando nas espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas moléculas reagem aleatoriamente com enzimas,

DNA e RNA de forma a romper ou desorganizar seus nucleotídeos ou sequências de aminoácidos (DOWD; TILSON, 1999). Essa ação é mais frequente que a interação direta, devido à abundância de água presente no meio intracelular (METTLER JUNIOR; UPTON, 1995).

As EROs são espécies químicas instáveis formadas por um átomo de oxigênio extremamente reativo, possuindo um ou mais elétrons não pareados em sua órbita mais externa. Isso confere um alto grau de instabilidade energética e cinética, pois para se manterem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Como mecanismo central de dano induzido pela γ irradiação, o estresse oxidativo é provocado pela interação da radiação ionizante diretamente com as moléculas de água, gerando várias espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O^-), e espécies reativas de nitrogênio como peroxinitrito ($ONOO^-$) e óxido nítrico (NO) (WEISS; KUMAR, 1988). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, alterações bioquímicas, cuja manifestação é o dano oxidativo e peroxidação lipídica potencial contra células e tecidos (ABOU-ZEID *et al.*, 2018).

2.3 RADIOTERAPIA

Uma das principais aplicações médicas do efeito da radiação sobre os tecidos é o tratamento de tumores malignos. A destruição completa destes tumores requer a aplicação de doses elevadas de radiação para as células sadias do corpo humano, podendo comprometer esses tecidos vizinhos ao tumor. Para muitos casos a dose necessária para dar uma chance razoável de cura (controle do tumor local) é muito próxima da dose que irá causar complicações sérias nos tecidos sadios (CUCCURULLO *et al.*, 2019). Além disso, a formação dos radicais livres pela radiólise da água nos tecidos atingidos pela radiação, promovem o aumento do potencial lesivo da radioterapia (PEREIRA, 2000).

Para desenvolver um plano de tratamento adequado a cada paciente, primeiramente, é necessário definir a localização das células cancerosas no organismo e também delimitar a região de risco. Posteriormente, a intensidade da

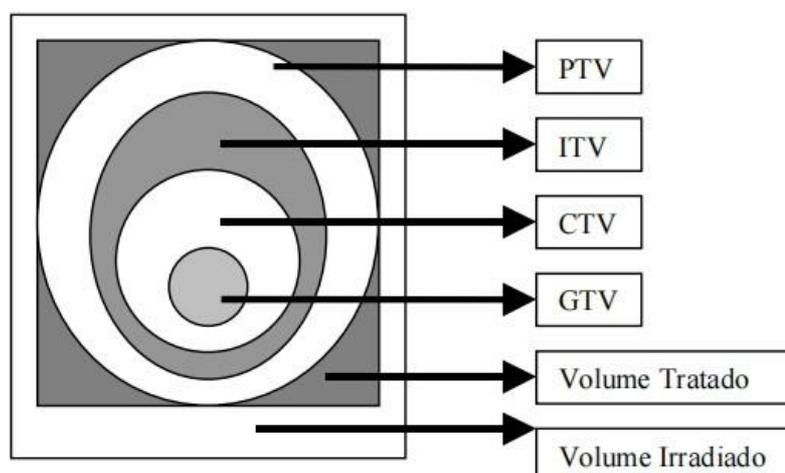
dose de radiação é calculada conforme as particularidades do paciente a ser irradiado (BARBOZA, 2006).

Os três parâmetros para descrever um tratamento com radiações ionizantes são: volume tratado, dose de radiação e técnica utilizada. Segundo a norma ICRU-50 (Internacional Commission on Radiation Units and Measurements), publicada em 1993, o processo de determinação do volume de tratamento consiste de várias etapas. Dois volumes devem ser definidos antes de se começar o planejamento, o GTV (volume tumoral) e o CTV (volume alvo). O GTV é o volume palpável ou visível do tumor. Esse volume corresponde à parte da doença onde existe a maior concentração de células malignas. E o CTV corresponde ao volume de tecido que contém um GTV visível e/ou doença maligna microscópica subclínica (PEREIRA *et al.*, 2000).

Durante o processo de planejamento, mais dois parâmetros são definidos: o PTV (volume de planejamento) e os órgãos de risco. O PTV é o CTV mais as margens de erros, incluindo o movimento do tecido que contém o CTV (ex.: respiração) e também o movimento do paciente; diferentes níveis de repleção, e as variações das características geométricas do feixe de radiação. A quantidade de radiação absorvida pelos tecidos é expressa em Gray (Gy), que equivale a 1 joule de energia por quilograma (PEREIRA *et al.*, 2000).

Com os resultados do planejamento, passam a existir mais dois volumes: o volume tratado onde a dose é definida pelo radioterapeuta como sendo apropriada para se alcançar a proposta do tratamento; e o volume irradiado que indica o volume de tecido que recebe uma dose considerada significativa em relação a tolerância dos tecidos normais (PEREIRA *et al.*, 2000).

Figura 3 - Esquemas dos volumes de tratamento de radioterapia



Fonte: PEREIRA, A. J.; DANILIAUSKAS, M.; LOPES, R. M. G.; HADDAD, G. P.; CRUZ, J. C.; MARTINS, H. L. **Programa de qualidade em radioterapia: curso para técnicos em radioterapia.** Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2000.

A dose utilizada durante o processo de radiação é um dos principais determinantes da gravidade de toxicidade aguda e tardia do tecido. Por esse motivo, a dose ótima desejada de radiação é definida como a dose que possa causar um dano considerável ao tumor, impedindo a sua evolução e, ao mesmo tempo, que cause o menor dano possível aos tecidos normais circundantes (SHADAD *et al.*, 2013).

2.4 CEREBELO E RADIAÇÃO IONIZANTE

Mais de 600.000 casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados no mundo a cada ano (McGUIRE *et al.*, 2014) e a prevalência de câncer na região da cabeça e pescoço é de 29,2 a cada 100.000 pessoas segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US National Cancer Institute, 2013).

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o Brasil registra cerca de 41 mil novos casos de câncer de cabeça e pescoço a cada ano. O plano de tratamento para um paciente individual depende de vários fatores, incluindo a localização exata do tumor, o estágio do câncer, a idade da pessoa e seu estado geral de saúde. Atualmente diferentes tratamentos têm sido usados para o controle de tumores malignos, podendo incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia

direcionada ou uma combinação de tratamentos. Aproximadamente 50-60% dos pacientes com câncer recebem radioterapia externa em algum estágio de sua doença (POROCK; KRISTJANSON, 1999; KANTOR *et al.*, 2008).

A resposta à radiação é dinâmica, estendendo-se além do volume do tumor alvo e influenciando o tecido normal. Embora a dose fornecida pela radioterapia seja focal, algumas estruturas neuroanatômicas críticas podem ser afetadas por doses moderadas ou baixas de radiação, mesmo que remotas ao tumor, resultando em efeitos a órgãos adjacentes saudáveis. Dessa forma, estudos que demonstram os efeitos da radiação ionizante envolvendo órgãos do SNC, como cérebro e cerebelo, são de grande importância para um melhor entendimento da recuperação do paciente.

Em relação ao sistema nervoso central, estudos em animais e humanos revelaram que o dano induzido por irradiação X é multifatorial, estando ligado a dose total administrada, dose por fração, volume do tumor, duração da radiação e estritamente dependente de interações entre múltiplos tipos de células, como células endoteliais, neurônios, astrócitos e microglia (LI *et al.*, 2002; LI, *et al.*, 2006). Além disso, a presença de fatores neurotóxicos que alteram a integridade microvascular ou a barreira hematoencefálica (BBB), como drogas citotóxicas (cisplatina ou fluorouracil), idade avançada e doenças concomitantes, incluindo diabetes, distúrbios neurológicos ou doenças vasculares, podem aumentar o risco de dano cerebral induzido por radiação (MURRAY; MCBRIDE; SCHWARTZ, 2014).

Todas as formas de radiação ionizante, variando de fótons de baixa energia a partículas com carga pesada, como prótons ou íons de carbono, têm o potencial de produzir toxicidade no SNC. As partículas de raios X têm a capacidade física de gerar radicais livres que podem causar danos diretos ou indiretos ao DNA, mas também podem fornecer uma fonte de estresse metabólico ao qual o SNC é particularmente suscetível em comparação com outros tipos de tecido (FURDUI, 2014).

Embora o dano envolvendo a quebra de fita dupla de DNA levando a danos mitóticos seja um mecanismo de morte celular induzida por radiação, acredita-se que esse seja mais relevante em células em divisão celular ativa. No SNC maduro normal, onde o potencial mitótico é limitado, há evidências crescentes que sugerem que outros mecanismos de dano induzido por radiação, como a oxidação

das alterações da bicamada lipídica na permeabilidade microvascular, rearranjos do complexo juncional célula-célula e alterações mitocondriais induzindo oxidação adicional estresse são provavelmente alvos subcelulares mais importantes para a radiação ionizante (CUCCURULLO *et al.*, 2019).

Através da combinação de danos ao DNA e alterações subcelulares, a radiação tem a capacidade de alterar o microambiente tumoral, a arquitetura celular, a permeabilidade da vasculatura tumoral e a permeação de drogas no SNC, que têm o potencial de aumentar e reduzir simultaneamente as toxicidades induzidas pelo tratamento com radiação. A irradiação do cérebro pode afetar não apenas a vasculatura e os progenitores O-2A (Células progenitoras de astrócitos oligodendrócitos tipo 2), mas também astrócitos, microglia, neurônios e células-tronco neurais recentemente identificadas. Como sugerido, a resposta do tecido neural à irradiação também envolve estresse de oxigênio, resposta inflamatória, processos reativos secundários e expressão aumentada do gene de citocinas (SUZUKI, 2015).

Pesquisas demonstram que durante o desenvolvimento, a exposição de mamíferos à irradiação X resulta em várias alterações morfológicas e funcionais no SNC (GUELMAN *et al.*, 1993), incluindo a redução do tamanho, malformações foliares/lobulares e danos de longa duração à barreira hematoencefálica de ratos jovens (SANDOR *et al.*, 2014), podendo bloquear a geração de novas células no cérebro e causar neuroinflamação (GREENE-SCHLOESSER *et al.*, 2013).

As exposições à radiação X tem como consequência elevar as EROs e nitrogênio, que têm o potencial de iniciar as mudanças no equilíbrio redox do microambiente do SNC (LIMOLI *et al.*, 2004). A exposição aguda de radiação tem efeitos múltiplos no cérebro e nas funções cognitivas (LOGANOVSKY, 2009), que pode atuar e manipular diretamente o sistema nervoso e indiretamente danificar os demais sistemas por meio da reatividade do SNC (SHARMA *et al.*, 2018). Tanto doses baixas quanto altas de radiação podem alterar a função do SNC por estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e degradação de proteínas, levando à senescência ou morte celular apoptótica que pode causar defeitos que levam a doenças neurodegenerativas (SHARMA *et al.*, 2018).

A exposição de ratos neonatais a uma dose única de 5 Gy de radiação X induz anormalidades permanentes na citoarquitetura do córtex cerebelar,

demonstrando um desarranjo das células de Purkinje, redução da espessura do córtex granular e aumento neuroquímico nos níveis de noradrenalina e marcha atáxica da função motora (GUELMAN *et al.*, 2000).

Em camundongos adultos, a radiação com dose subletal mostra que o dano oxidativo é detectado nas células de Purkinje, nos corpos celulares e em seus dendritos, 1 dia após a radiação; e é observada a morte tardia dos neurônios de Purkinje. Nesse sentido, é conhecido que o estresse oxidativo, e a resposta inflamatória estão envolvidos no dano neuronal induzido por radiação (CUI *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2006).

Em humanos, complicações agudas e de longo prazo podem ocorrer em pacientes recebendo terapia de radiação. Nesse sentido, torna-se necessário um melhor entendimento da patologia cerebelar induzida pela radiação ionizante X para desenvolver novas estratégias a fim de minimizar seus efeitos colaterais.

2.5 MATRIZ METALOPROTEINASES

A matriz extracelular (MEC) é definida como uma mistura heterogênea de macromoléculas (incluindo colágeno e glicoproteínas não colagênicas, fibras elásticas e proteoglicanos) capaz de se automodelar propiciando suporte mecânico para as células e reservatório de fatores de crescimento que atuam cooperativamente para regular a ampla variedade de processos celulares. A degradação da MEC é mediada por algumas famílias de proteinases extracelulares que incluem as serina-proteases, cisteína-proteases e metaloproteinases dependente de zinco (MMPs) (PUPA *et al.*, 2002).

As metaloproteinases de matriz pertencem a uma ampla família de endopeptidases que contém Zn^{2+} no seu sítio ativo. As MMPS são enzimas-chave que regulam uma grande variedade de processos fisiológicos e eventos de sinalização por meio da degradação dos componentes da matriz extracelular. Essas endopeptidases proteolíticas catalisam a degradação de todos os constituintes proteicos da MEC, medeiam as interações célula-célula/célula-MEC e modulam a atividade dos receptores associados à membrana (ITOH; NAGASE, 2002).

Existem 28 membros da MMP em mamíferos (MMP 1-28), que são classificados de acordo com a estrutura, função e especificidade de substrato,

dividindo-se em: colagenases (MMP-1, -8, -13 e -18); gelatinases (MMP-2 e -9); estromelinas (MMP-3, -10 e -11); matrilisinas (MMP-7 e -26); ligadas à membrana (MMP-MT-14, -15, -16, -17, -23, -24 e -25); e subgrupos não classificados (MMP-12, -19, -20, -21, -27 e -28) (LU *et al.*, 2011).

As MMPs têm a sua expressão e atividade reguladas por inibidores endógenos como a α -2 macroglobulina, pequenas moléculas com domínios “TIMP-like”, glicoproteína de membrana RECK e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs - Tissue inhibitor of metalloproteinase) (OVERALL; LOPEZ-OTIN, 2002; DZWONEK *et al.* 2004). As TIMPs são pequenas proteínas (20-22 kDa), que são identificadas em quatro tipos (TIMP-1 a TIMP-4). Essas proteínas inibidoras podem vincular as MMPs de maneira não covalente e bloquear suas atividades (NAGASE *et al.*, 1999). Esta inibição ocorre através da ligação entre o domínio N-terminal e resíduos de valina e cisteína presentes nas TIMPs e o sítio catalítico das MMPs, quelando o átomo de zinco. Portanto, a atividade das MMPs são determinadas pelos níveis de MMP e a expressão das TIMPs (MURPHY; NAGASE, 2008). O desequilíbrio entre MMPs e TIMP está associado a inúmeras doenças do SNC (MOORE; CROCKER, 2012).

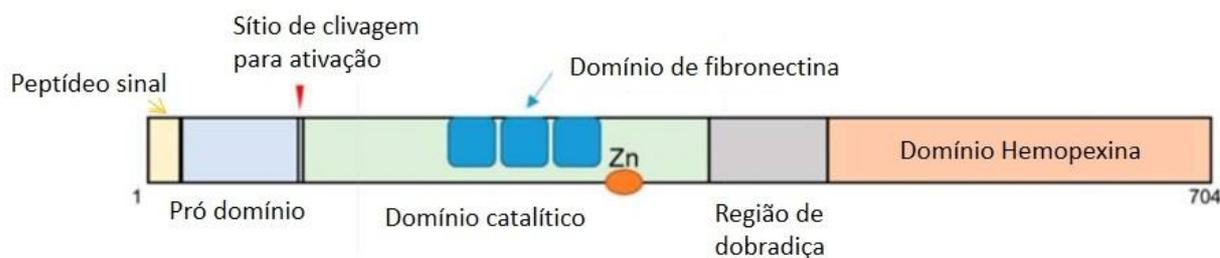
2.5.1 MMP-9

A MMP-9 (ou gelatinase B) é uma colagenase do tipo IV, proteína de 92 kDa, pertencente a uma família de endopeptidase dependente de zinco e que é codificada por um gene no cromossomo 20 (em humanos). A proteína MMP-9 contém um domínio C-terminal do tipo hemopexina, um domínio N-terminal catalítico, um peptídeo sinal, região de dobradiça e região de pró domínio (Figura 4) (NAGASE *et al.*, 2006; VANDOOREN *et al.*, 2013). O domínio catalítico da MMP-9 contém três repetições de fibronectina tipo II (FN2), local ativo e região de ligação ao zinco, importante por desempenhar ligação com proteínas de matriz e para a degradação de substrato (LAUER-FIELDS *et al.*, 2008).

Esta proteína contém dois sítios de ligação para íons de zinco e cinco sítios de ligação para íons de cálcio. Como membro das endopeptidases dependentes de zinco, a MMP-9 requer íon zinco para sua atividade catalítica (VANDOOREN *et al.*, 2013; VAN DEN STEEN *et al.*, 2002). Como um inibidor natural da MMP-9, o TIMP-1 pode se ligar ao domínio hemopexina do pro-MMP-9 para formar um complexo que

pode impedir a ativação dessa metaloproteinase (ETHELL; ETHELL, 2007; NAGASE *et al.*, 2006).

Figura 4 - Esquema da estrutura e domínios da MMP-9



Fonte: Adaptado de HUANG, H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9. **Biosensors**, v.19, n. 3249, 2018.

A MMP-9 é sintetizada por uma ampla variedade de células, incluindo: macrófagos, fibroblastos, neutrófilos, granulócitos, células T, células dendríticas, células epiteliais, queratinócitos, osteoblastos, mastócitos e possivelmente outras (MITTAL *et al.*, 2016). A MMP-9 é sintetizada como uma pré-proenzima com peptídeos de sinal N-terminal de 19 aminoácidos dentro das células. Em seguida, é secretada para o ambiente extracelular como pró-MMP-9 inativa (cerca de 92 kDa). A ativação da MMP-9 requer clivagem por outras proteases (VANDOOREN; VAN DEN STEEN; OPDENAKKER, 2013; VAN DEN STEEN, 2002). A clivagem da pró-MMP-9 inativa remove a região de propeptídeo N-terminal gerando a MMP-9 ativa (cerca de 82 kDa) (KNAUPER, *et al.*, 1997). Além disso, uma troca de cisteína é vital para a ativação de MMP-9. Um resíduo de cisteína (Cys99) no propeptídeo da pró-MMP-9 pode interagir com o íon zinco catalítico desta proteína. Essa interação é necessária na manutenção da latência do MMP. A remoção proteolítica da região do propeptídeo interrompe completamente essa interação. Após a ativação, a MMP-9 pode clivar seus substratos. Além da ativação proteolítica, alguns agentes também podem afetar a atividade da MMP-9, como algumas EROs e óxido nítrico (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996; GU *et al.*, 2002). As EROs podem perturbar a interação entre o íon zinco catalítico e Cys99, o que pode causar a ativação de MMP-9 (STAWARSKI *et al.*, 2014; HUANG, 2018).

Devido à sua atividade de clivagem proteolítica no ambiente extracelular, a MMP-9 está envolvida em muitos processos biológicos. Esta protease possui uma

ampla gama de substratos. Os substratos importantes da MMP-9 incluem, mas não estão limitados a gelatina, colágenos, agreganos, entactina e elastina. A MMP-9 pode clivar muitas proteínas da matriz extracelular para regular a remodelação da MEC, promover alteração das interações célula-célula e célula-MEC, clivagem de proteínas da superfície celular e clivagem de proteínas em ambiente extracelular (VANDOOREN *et al.*, 2014; FARINA; MACKAY, 2014; HUANG, 2018).

Além disso, a MMP-9 participa de processos como diferenciação e migração celular, cicatrização e remodelação de tecidos, secreção de citocinas, regulação da atividade de fatores de crescimento e regulação entre processos pró e anti-inflamatórios e entre os processos de sobrevivência e apoptose e de processos patológicos (VERSLEGERS *et al.*, 2013; KLEIN; BISCHOFF, 2011). A MMP-9 desempenha um papel na degradação da membrana basal, uma vez que a membrana basal contém colágenos, incluindo o colágeno tipo IV (MISKO *et al.*, 2002).

Como a MMP-9 desempenha um papel importante na remodelação da MEC e na clivagem da proteína da membrana, ela está amplamente associada às patologias do câncer. Verificou-se que MMP-9 desempenha um papel na invasão tumoral, metástase e angiogênese e medeia o microambiente tumoral (HUANG, 2018). A MMP-9 promove o desenvolvimento e progressão do câncer na maioria dos casos, e também pode desempenhar um papel supressor na progressão do câncer em alguns casos específicos (KESSENBROCK *et al.*, 2010). Portanto, a MMP-9 é um biomarcador potencial para vários cânceres (LIANG; CHANG, 2018; SHAO *et al.*, 2011; ROY; YANG; MOSES, 2009; LI *et al.*, 2013).

Além dos cânceres, a MMP-9 também está associada às patologias de algumas outras doenças, incluindo doenças autoimunes e doenças cardiovasculares, patologia da aprendizagem e memória, dependência e doenças psiquiátricas (esquizofrenia, transtorno bipolar e distúrbios cognitivos), bem como em doenças inflamatórias e neurodegenerativas, como a esclerose múltipla, isquemia cerebral e esquizofrenia (RIVERA *et al.*, 2010). O papel da MMP-9 também foi relatado na diferenciação de oligodendrócitos, migração de células de Schwann ou degradação do Fator de Crescimento Neuronal (NGF) ativo (MANTUANO *et al.*, 2008, HUANG, 2018).

2.5.2 Matriz Metaloproteinases e Sistema Nervoso

As MMPs estão envolvidas em vários processos fisiológicos normais e patológicos, tanto durante o desenvolvimento de órgãos associados a doenças malignas, inflamatórias e degenerativas (YONG, 2005). Embora muitas metaloproteinases tenham efeitos prejudiciais quando superexpressas em lesões do SNC, elas também podem desempenhar papéis na neurogênese, crescimento axonal, produção de mielina e reparo tecidual. Essas funções benéficas ocorrem não apenas durante o desenvolvimento, mas também na recuperação do SNC após insulto em animais adultos (YONG, 2005).

A atividade das MMPs está localizada nos cones de crescimento dos neurônios, e a inibição da sua atividade reduz a motilidade do cone de crescimento (SHEFFIELD *et al.*, 1994).

A MMP-9 neuronal participa da plasticidade sináptica, controlando a forma das espinhas dendríticas e a função das sinapses excitatórias, desempenhando um papel na aprendizagem, memória e plasticidade cortical (VAFADARI; SALAMIAN; KACZMAREK, 2016). Sua relevância para o sistema nervoso foi demonstrado por Mantuano *et al.* (2008), que mostraram que o domínio hemopexina da MMP-9 poderia se ligar à proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRP-1) para promover a migração de células de Schwann por ativação da sinalização celular. Da mesma forma, foi observado o crescimento de neuritos de neurônios tratados com o domínio hemopexina MMP-9 (YAMAUCHI *et al.*, 2013).

Outras pesquisas evidenciam que as MMP-9 e -12 estão envolvidas na maturação de células precursoras de oligodendrócitos e a extensão de seus processos. Sabe-se que MMP-9 e -12 influenciam a formação de mielina durante o desenvolvimento, pois há uma deficiência de mielinização no desenvolvimento de camundongos nocautes para o gene *MMP-9* e -12 (YONG, 2005). No cerebelo, estudos demonstram que as MMPs e TIMPs regulam diversas funções neuronais, incluindo migração, extensão de processo e plasticidade sináptica. MMP-2, -3, -9, TIMP-1, -2 e -3 são expressas no cerebelo em desenvolvimento. O padrão espaço-temporal de expressão e atividade dessas enzimas sugere que elas desempenham um papel no desenvolvimento do córtex cerebelar. Estudos com camundongos knockout para MMP-2 e -9, indicam que essas metaloproteinases participam da regulação da morfogênese do cerebelo (LUO, 2005).

A expressão de metaloproteinases após lesões no SNC pode aumentar como resultado das contribuições de várias fontes celulares, como a sinalização de integrinas, citocinas, quimiocinas e alterações de moléculas da matriz extracelular. Em estudos *in vitro*, a interleucina-1 (IL-01), uma citocina inflamatória, é um forte indutor da expressão de metaloproteinases, e a região promotora de muitos genes de metaloproteinase contém elementos de ligação a fatores de transcrição regulados por IL-01 (VECIL *et al.*, 2000).

A interação das metaloproteinases com outras moléculas nos locais das lesões também é importante. A produção de óxido nítrico é aumentada nos locais das lesões, onde pode contribuir para a evolução de uma lesão. Significativamente, o óxido nítrico ativa a MMP-9 por meio da nitrosilação S e o produto resultante é neurotóxico. Da mesma forma, as quimiocinas também estão presentes nos locais das lesões havendo uma interação complexa entre elas e as MMPs (GU *et al.*, 2002).

Um aumento na expressão da gelatinase B, ou MMP-9, foi bem documentada em insultos ao SNC. Em distúrbios cerebrais, a MMP-9 desencadeia um mecanismo de ação envolvido em respostas imunitárias/inflamatórias, com a capacidade de ativar citocinas e quimiocinas e contribuir para a ruptura da barreira hematoencefálica, facilitando o extravasamento de leucócitos para o parênquima cerebral (VAFADARI; SALAMIAN; KACZMAREK, 2016). Em camundongos nocaute para o gene *MMP-9*, foram relatados um atraso na migração e uma diminuição da apoptose das células dos grânulos cerebelares (VAILLANT *et al.*, 2003).

Quando a MMP-9 é expressa indevidamente, pode ocorrer danos nos tecidos, contribuindo para uma variedade de distúrbios cerebrais. Exemplos desses distúrbios são epilepsia, esquizofrenia, TEA (Transtorno do Espectro Autista), lesão cerebral, AVC, neurodegeneração, dor e tumores cerebrais (VAFADARI; SALAMIAN; KACZMAREK, 2016).

Pesquisas recentes em tecidos tumorais de um modelo de xenoinxerto ortotópico mostraram que após o tratamento com irradiação, a expressão de MMP-9 aumentou significativamente *in vivo e in vitro* (ZHOU *et al.*, 2019).

Dada a conhecida correspondência nos estágios de desenvolvimento cerebelar entre roedores e humanos, esse modelo de estudos traz implicações relacionadas à saúde, considerando a exposição acidental ou terapêutica de seres humanos à radiação ionizante. Portanto, visto que não foram encontrados trabalhos

sobre a expressão de metaloproteinases em cerebelo irradiado, estudos que busquem estabelecer seu papel nesse tipo de injúria poderão contribuir para um melhor entendimento da função das MMPs no SNC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da radiação ionizante X na expressão de MMP-9 e morfologia do cerebelo de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por Imunohistoquímica a expressão da MMP-9 no córtex cerebelar de ratos irradiados;
- Analisar os efeitos da radiação sobre a morfologia das células de Purkinje.

4 MATERIAL E MÉTODOS

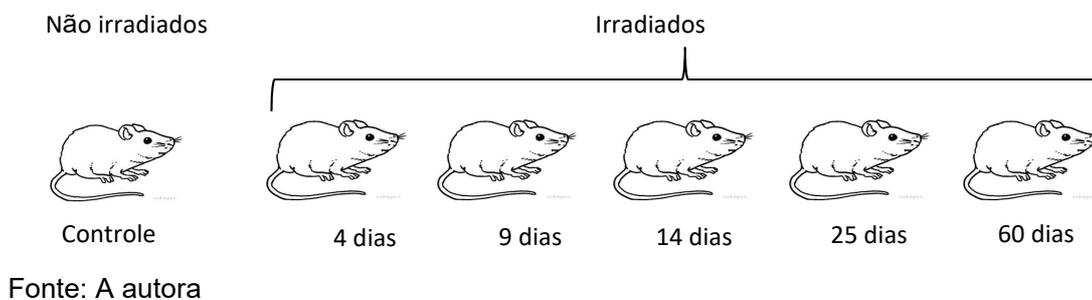
O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA/UEPG, processo nº 036/2016 conforme estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.1 ANIMAIS, DELINEAMENTO E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 30 ratos machos linhagem Wistar com 90 dias de vida e peso entre 280 a 320 g, fornecidos pelo biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Os animais foram mantidos em caixas feitas de polipropileno forradas com aparas de madeira, em grupos de 4, em ambiente climatizado ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) com ciclode claro/escuro de 12 h. Água e ração fornecidas *ad libitum*.

Os 30 ratos foram divididos em 6 grupos de 5 animais cada: 1 grupo controle e 5 grupos expostos à radiação X (sacrificados 4, 9, 14, 25 e 60 dias após a exposição).

Figura 5 - Grupos experimentais



4.2 APLICAÇÃO DA RADIAÇÃO

A radiação X foi realizada na clínica ISPON na dose de 15.75 Gy durante 1 minuto (previamente calculada pelo físico da clínica considerando parâmetros anatômicos dos animais como o peso e altura de ratos machos adultos) na cabeça de todos os ratos dos grupos experimentais, colocados em decúbito ventral, usando uma distância focal de 100 cm e um campo de colimação de 40×40 cm com um acelerador linear 600C/D-6MV. Antes da irradiação os animais foram anestesiados com 1,0ml/kg de cloridrato de cetamina e 1,5 ml/kg de cloridrato de

xilasina.

4.3 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

Para a extração dos órgãos, os animais foram anestesiados com cloral hidratado 10% e mortos por deslocamento cervical. O cerebelo dos animais foi extraído, seccionado com um corte sagital mediano. Uma porção do hemisfério do cerebelo de cada animal foi lavado em 1XPBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 21 mM; KH₂PO₄ 1,47mM, pH 7,4) gelado e foi fixada em paraformaldeído 2% por 72 horas, desidratada em série alcoólica crescente, diafanizada em xilol e incluídas em parafina, para obtenção de cortes semisseriados de 10µm por rato e tempo, que foram montados em duas lâminas silanizadas que continham cada uma 3 cortes.

4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DOS RATOS IRRADIADOS

As lâminas contendo cortes de cerebelo foram submetidas à reação de Feulgen, para evidenciar cromatina. Para essa reação, as lâminas foram desparafinizadas em xilol, reidratadas em soluções alcoólicas decrescentes (100% a 70%) e hidrolisadas em HCl 1N, a 60°C durante 1 hora. Posteriormente, foram mergulhadas em água destilada fria para deter a hidrólise. Os cortes foram corados com reativo de Schiff durante 1 hora e lavados com 3 banhos sucessivos, de 2 minutos cada, em água sulforosa. Posteriormente os cortes foram contracorados com Fast Green 1%. Após a coloração as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas com lamínulae Permout para as seguintes análises:

4.4.1 Análise Morfológica

Foram obtidas imagens em microscópio de luz acoplado a câmera fotográfica, em aumento de 40x para análise visual da morfologia dos núcleos dos neurônios que formam as camadas do cerebelo.

4.4.2 Estimativa do Número de Células de Purkinje

A contagem do número de células de Purkinje foi realizada em 12 campos aleatórios por corte, no aumento de 100x. Para abranger todas as regiões do cerebelo, foram selecionados 6 campos na região apical das folhas do cerebelo e 6 regiões do sulco do córtex cerebelar, totalizando os 12 campos. Os campos aleatórios incluíam todos os lobos cerebelares: lobo anterior, posterior e floclonodular. Foram utilizados 3 cortes por animal. As células de Purkinje das 12 regiões por corte foram somadas e comparadas entre os tempos analisados.

4.4.3 Análise da Área e do Fenótipo do Núcleo das Células de Purkinje

O princípio da reação é a hidrólise ácida moderada para romper a ligação das bases purínicas do DNA com a desoxirribose (depurinação), expondo os seus gruposaldeídos que se coram pelo Schiff na cor magenta. Dessa forma, é possível a partir dessa reação, fazer a análise do fenótipo da composição geral do núcleo pela medida colorimétrica da reação expressa em pixel. Essa análise permite, por exemplo, avaliar fenotipicamente a fragmentação ou condensação da cromatina em células submetidas a condições patológicas (VIDAL *et al.*, 1998; MARIA *et al.*, 2000; MORAES *et al.*, 2005). Assim, para essa análise, imagens dos núcleos das células de Purkinje foram obtidas utilizando 10 campos por lâmina, em aumento de 1000x, em fotomicroscópio.

A intensidade da reação de Feulgen foi medida com o uso de ferramentas do programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov>) de domínio público. O método assume uma relação linear entre a intensidade da coloração e a quantidade de luz que ela absorve (absorbância). Nesse caso, a intensidade da coloração é determinada com base na média dos níveis de cinza por núcleo (convertido posteriormente em densidade óptica, $DO=absorbância$). A primeira etapa da análise da imagem compreende na transformação da imagem capturada em imagem numerizada, o que é feito mediante atribuição de graduações de níveis cinza (0 a 255) para cada pixel de imagem. A conversão dos níveis de cinza em absorbância foi feita através do uso da ferramenta “Optical Density Calibration” de acordo com informações obtidas no website do software (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>).

Posteriormente as fotomicrografias foram convertidas em 8-bit, para a leitura

do valor médio de cinza dentro da seleção. O valor médio de cinza é a soma dos valores de cinza de todos os pixels na seleção dividida pelo número de pixels. Sendo assim, valores próximos a 255 (menor DO) indicam uma cromatina descondensada, enquanto que valores próximos a 0 (maior DO) demonstram uma cromatina mais compactada ou possivelmente fragmentada compactação do DNA (ALDROVANI *et al.*; 2006). A área dos núcleos foi medida a partir da seleção manual por todo o perímetro nuclear através da ferramenta “freehand selections”, e a área média foi expressa em pixels.

4.4.4 Análise da Expressão de MMP-9

Três lâminas de cada tempo avaliado, contendo 3 cortes com 10µm de espessura foram desparafinadas em xilol, reidratadas em soluções alcoólicas decrescentes (100% a 70%) e submetidas à recuperação antigênica em solução de ácido cítrico 10mM pH 6,0 a 98°C por 20 minutos. Em seguida, para a inibição da peroxidase endógena, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio (20 volumes), 3 vezes por 10 minutos cada. Os cortes foram lavados em água e 1xPBS e posteriormente incubados por 14 horas com anticorpo primários anti-MMP-9 na concentração de 1:500 diluídos em 1xPBS contendo 1% de Albumina serica bovina (BSA).

Os cortes foram lavados em 1xPBS e incubados com anticorpo secundário utilizando DAKO (kit Universal LSAB) durante 30 min a 37°C. Após lavagem em 1xPBS, os cortes foram incubados em uma solução de 80 ml de 1xPBS contendo 25mg de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich), 1 ml de H₂O₂ 20 volumes e 1 ml de DMSO. O tempo de reação foi 5 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente os cortes foram lavados em água destilada e contracolorados com hematoxilina de Harris por 1 minuto. Após coloração, os cortes foram desidratados e montados com lamínulas usando Permount.

Em cada lâmina dois cortes foram incubados com anticorpo e um corte foi usado como controle negativo, omitindo o anticorpo primário.

Para avaliar a expressão da MMP-9, imagens de 10 campos contendo as células de Purkinje foram obtidos em fotomicroscópio no aumento de 1000x, e a intensidade da marcação foi avaliada usando a ferramenta colour deconvolution do programa ImageJ para separar o sinal DAB da coloração com hematoxilina.

A partir da deconvolução de cores, a marcação DAB foi evidenciada, para se obter a absorbância individual, a partir da graduação dos pixels da imagem em escala de 0 a 255. Valores próximos de 0 correspondem ao balanço de preto e próximos de 255 ao balanço de branco. Sendo assim, a partir da análise quantitativa, valores mais próximos 0 representam uma marcação de MMP-9 mais intensa, e valores próximos de 255, uma marcação de MMP-9 menos acentuada indicando maior ou menor expressão dessa MMP, respectivamente.

Além disso, foi realizada uma análise visual da localização da imunomarcação de MMP-9 nas camadas do córtex cerebelar.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e avaliados com auxílio do programa GraphPad Prism® 5.01. As análises estatísticas dos parâmetros avaliados entre o grupo controle e os tempos de animais irradiados foram feitas pelo método de Análise de Variância Simples (One Way ANOVA), com pós teste de Tukey. Para a verificação de diferenças estatísticas dos parâmetros avaliados foi adotado como critério de significância no nível de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MMP-9

A figura 6A mostra as fotomicrografias que representam a imunomarcação de MMP-9 no cerebelo dos ratos controle e nos tempos de 4, 9, 14, 25 e 60 dias após serem expostos à radiação.

A análise visual mostrou que no grupo controle a imunomarcação para MMP-9 se localiza ao redor das células de Purkinje (P) e em prolongamentos de axônios localizados na camada molecular (CM).

Nos tempos de 4, 9 e 14 dias, a MMP-9 foi evidenciada nos prolongamentos de neurônios na CM e em prolongamentos ao redor das células de Purkinje. Nesses animais, a imunomarcação para MMP-9 estava mais evidente nos prolongamentos de neurônios da camada molecular quando comparados com os controles.

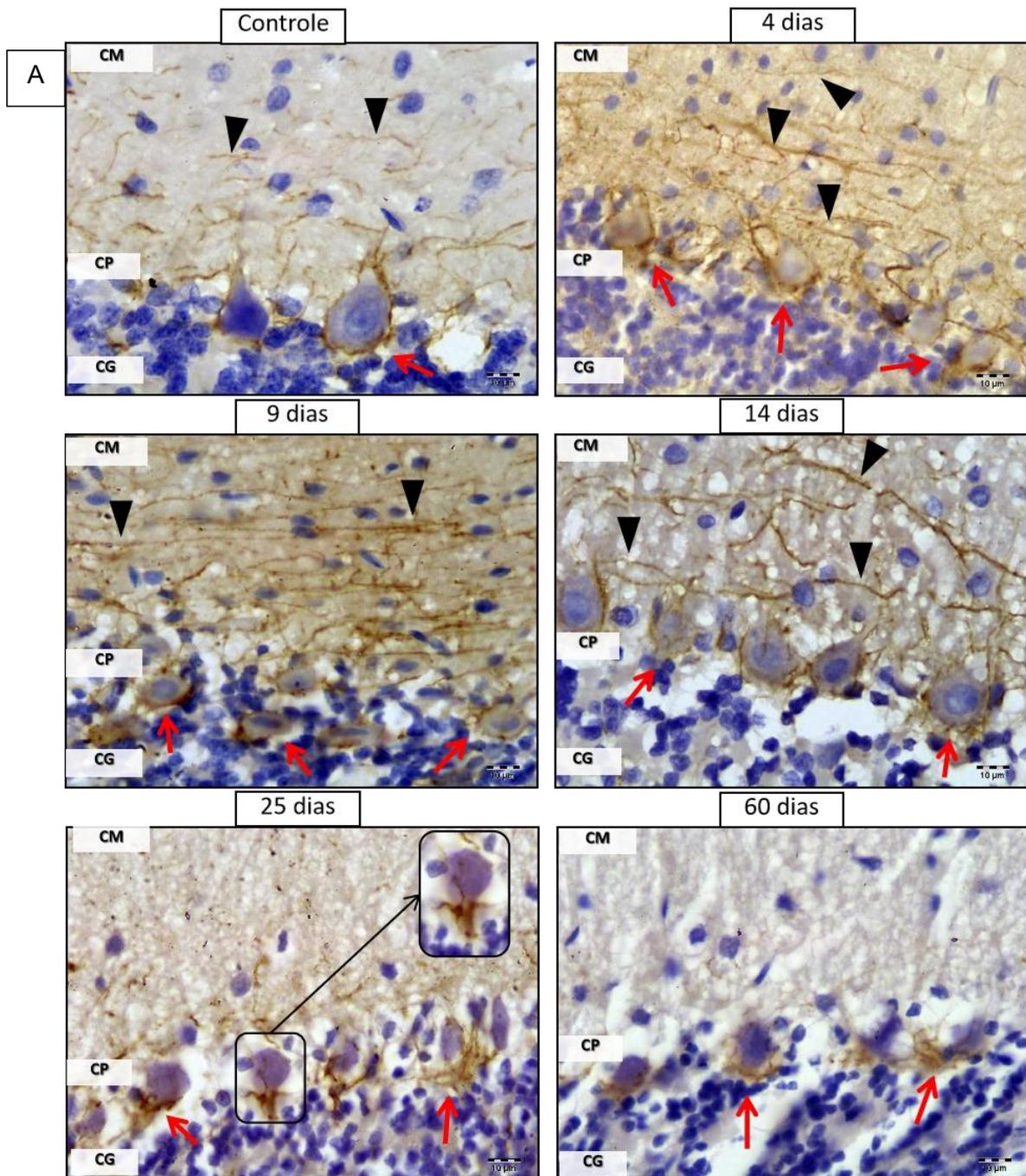
No tempo de 25 dias, a MMP-9 foi detectada principalmente nos prolongamentos ao redor do corpo das células de Purkinje. Nesse grupo, a imunomarcação para MMP-9 na camada molecular foi menor quando comparada com os demais tempos avaliados. No tempo de 60 dias, a MMP-9 foi detectada apenas nos prolongamentos ao redor das células de Purkinje.

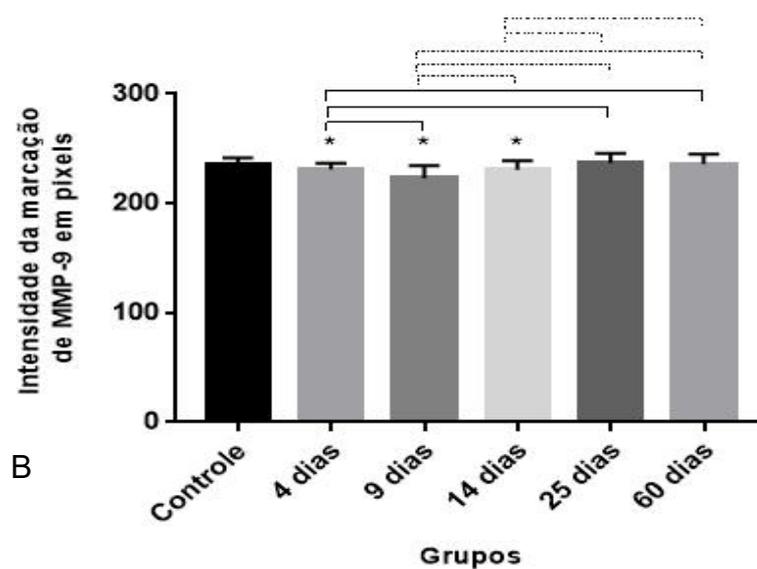
A camada granulosa (CG) não apresentou marcações específicas para MMP-9 nas células granulares, prolongamentos de neurônios ou na matriz extracelular, no tempo controle e nos tempos avaliados após a irradiação.

Está representado na figura 6B a análise estatística da marcação de MMP-9 avaliada a partir da intensidade dos pixels da marcação no tecido cerebelar. Essa medida indica que valores mais próximos de 0 representam uma marcação de MMP-9 mais forte, e valores próximos de 255 uma marcação de MMP-9 mais fraca.

Os resultados mostraram um aumento significativo ($P < 0.05$) da imunodeteção para MMP-9 após a irradiação nos tempos de 4, 9 e 14 dias quando comparados ao grupo controle. Também foi observado aumento significativo de MMP-9 nos tempos de 4 dias quando comparado com 25 e 60 dias; 9 dias quando comparado com 4, 14, 25 e 60 dias; e 14 dias quando comparado com 25 e 60 dias.

Figura 6 - Imunohistoquímica para MMP-9 em cerebelo. (A) Fotomicrografia da imunohistoquímica para MMP-9 no cerebelo de ratos controle e sacrificados em 4, 9, 14, 25 e 60 dias após a exposição à radiação. CM: Camada Molecular; CP: Camada de Purkinje; CG: Camada Granulosa; ponta de seta: prolongamentos de neurônios na CM; seta: prolongamentos de neurônios na CP. (B) Média \pm desvio padrão da distribuição da imunoposição tecidual de MMP-9 de acordo com a intensidade dos pixels da marcação. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o controle. (colchetes) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos.





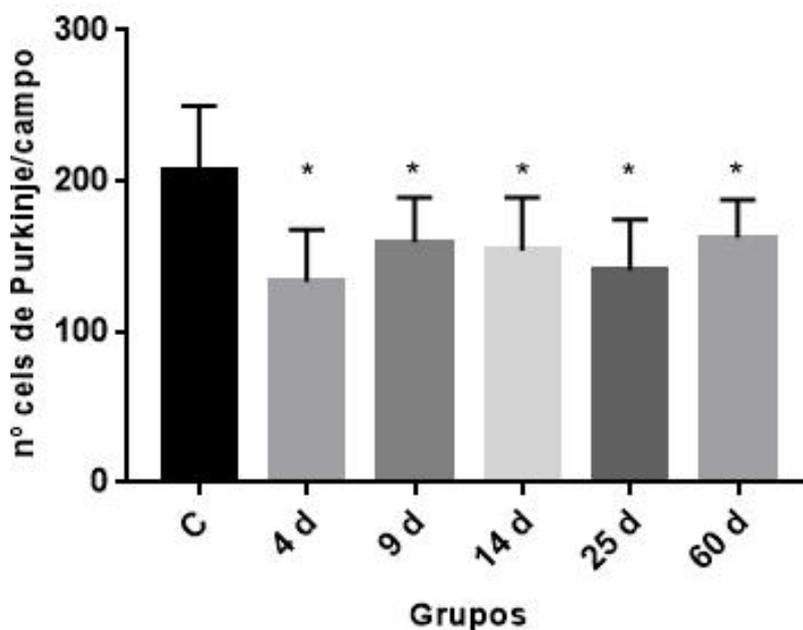
5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO CEREBELO

5.2.1 Estimativa do Número de Células de Purkinje

A figura 7 mostra a estimativa do número de células de Purkinje no cerebelo dos ratos avaliados nos tempos de 4, 9, 14, 25 e 60 dias após radiação, e no grupo controle.

O número de células de Purkinje reduziu significativamente ($P < 0,05$) nos animais irradiados, em todos os tempos avaliados quando comparados ao grupo controle. Entre os animais irradiados, não houve diferença no número de células de Purkinje.

Figura 7 - Estimativa do número de células de Purkinje. Média \pm desvio padrão do número de células de Purkinje por área analisada. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o controle.



5.2.2. Análise da Área e do Fenótipo Nuclear das Células de Purkinje

Na figura 8A, são apresentadas as fotomicrografias do córtex cerebelar após a reação de Feulgen. No grupo controle, as camadas do cerebelo possuem uma morfologia organizada. As células de Purkinje apresentam formato piriforme sendo visível dendritos que se direcionam para a camada molecular. O núcleo é esférico com cromatina clara e nucléolo evidente. Além disso, é possível observar que as células de Purkinje estão organizadas de forma linear e com poucos espaços entre as células. Também é observada a organização normal, em forma de glomérulos, dos neurônios que compõem a camada granulosa.

Já nos tempos de 4, 9, 14, 25 e 60 dias, ocorre uma desorganização das camadas do córtex cerebelar. No tempo de 4 dias pode ser observado alteração na morfologia das células e dos núcleos. Algumas células de Purkinje perdem o formato piriforme e algumas possuem o núcleo reduzido com aspecto de cromatina mais condensada ou fragmentada. Em outras células de Purkinje os núcleos estão completamente ausentes. Além disso, ocorrem espaços mais evidentes entre essas células, bem como se observa que as células da camada granulosa invadem a camada de Purkinje, o que não é visível no grupo controle. Essas alterações foram

visíveis também em todos os demais tempos avaliados nos animais irradiados, principalmente mudanças na morfologia das CP.

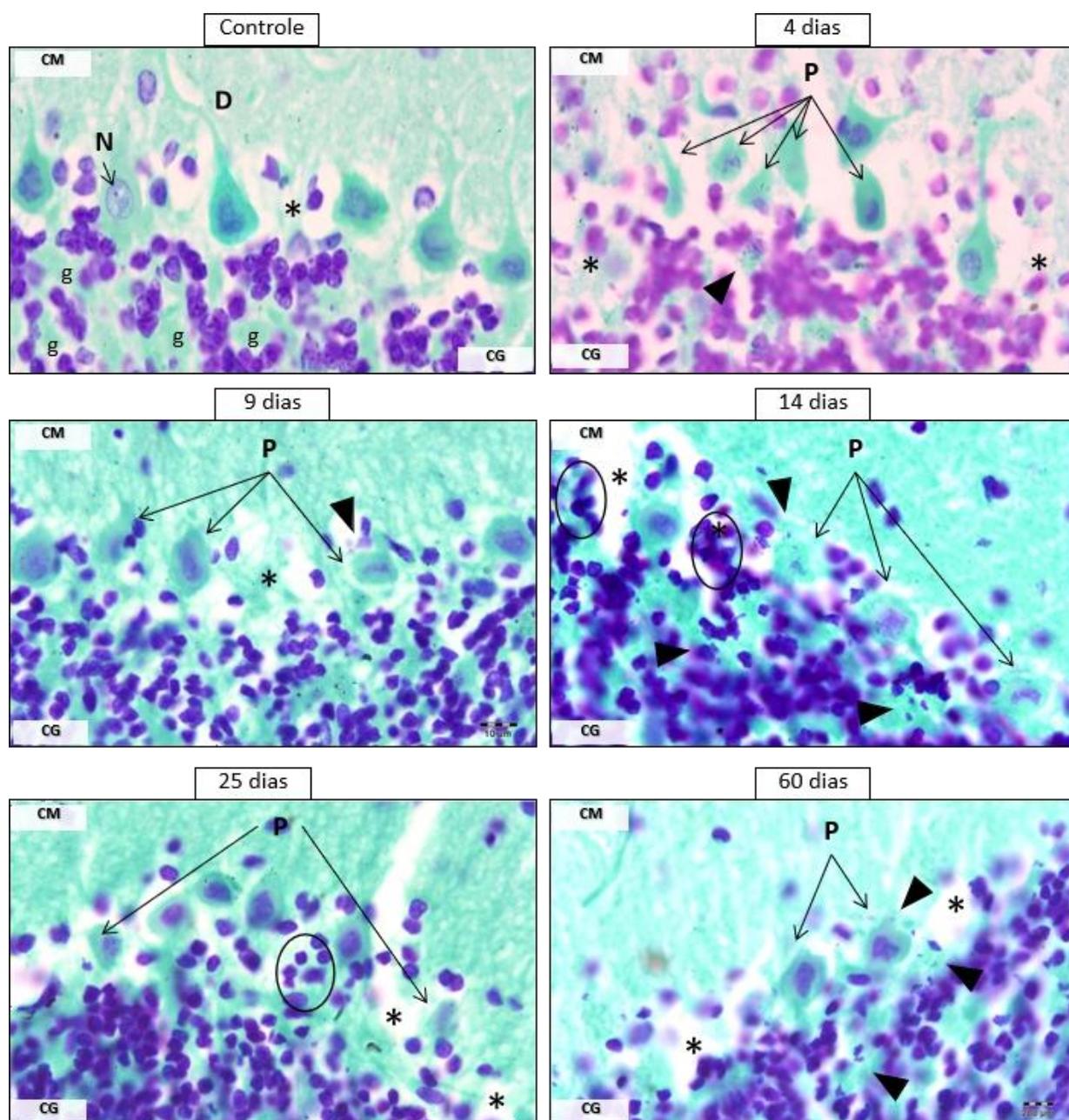
Alterações morfológicas também foram observadas na camada granulosa dos grupos irradiados. Além da invasão dessas células em direção à camada de Purkinje, as células da granulosa perdem sua organização espacial de glomérulo, pela ausência dos espaços entre os agrupamentos desses neurônios. Nos animais irradiados alterações nucleares também foram observadas na camada granulosa. Como indicado no tempo de 14 dias, as células da granulosa apresentaram formato e tamanho variados, com núcleos pequenos e cromatina condensada com aspecto de grumos. Em outros locais da granulosa os núcleos aparecem fragmentados, características não observadas no grupo controle.

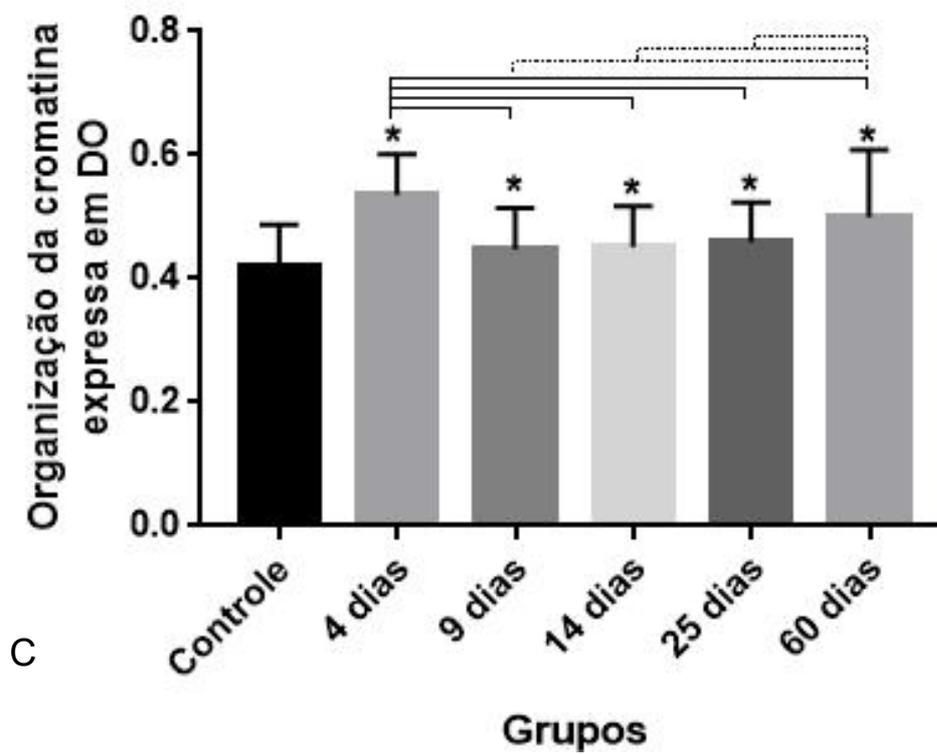
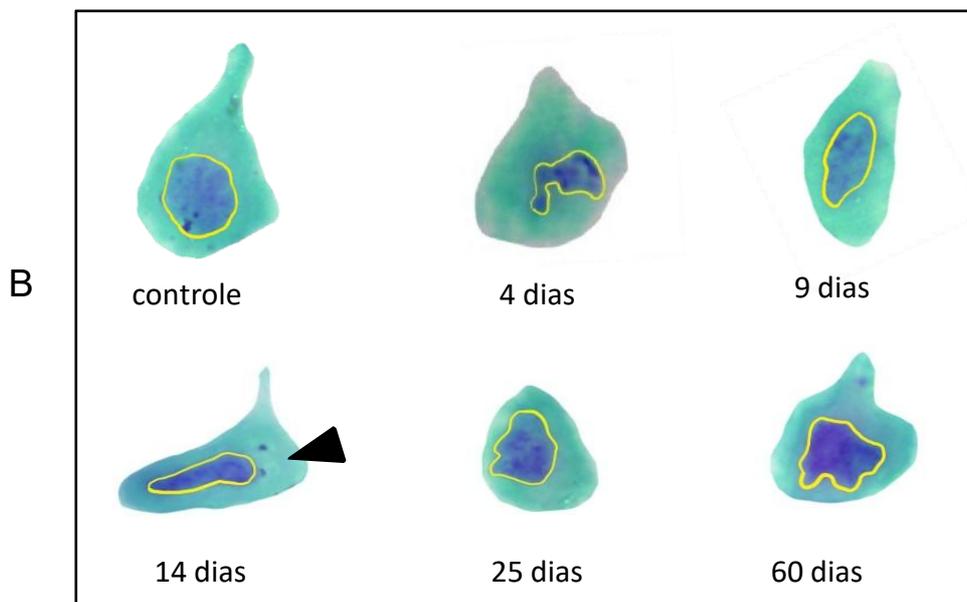
A figura 8B mostra com detalhes as alterações morfológicas e o contorno dos núcleos das células de Purkinje para a seleção da área. No grupo controle, as células de Purkinje apresentam um formato piriforme e núcleo grande com cromatina visualmente descondensada. Nos animais irradiados as células de Purkinje perdem seu formato característico e os núcleos apresentam uma coloração mais escura. No grupo de 14 dias observa-se uma possível fragmentação de DNA.

A figura 8C apresenta os resultados da análise densitométrica dos núcleos das células de Purkinje, obtidos a partir da intensidade média da reação de Feulgen, medida e expressa em densidade óptica (DO) a partir de pixels de tons de cinza, pelo programa ImageJ. Essa medida, indica o nível de organização da cromatina em termos de sua compactação, sendo assim, valores de DO maiores indicam maior intensidade e valores de DO menores indicam menor intensidade da reação Feulgen x cromatina.

Os resultados mostraram que a medida de densidade óptica da reação de Feulgen é significativamente maior ($P < 0.05$) nos tempos de 4, 9, 14, 25 e 60 dias quando comparados ao grupo controle. Um aumento significativo ($P < 0.05$) da densidade óptica foi observado nos tempos de 4 dias quando comparado com 9, 14, 25 e 60 dias; e no tempo de 60 dias quando comparado com 9, 14 e 25 dias.

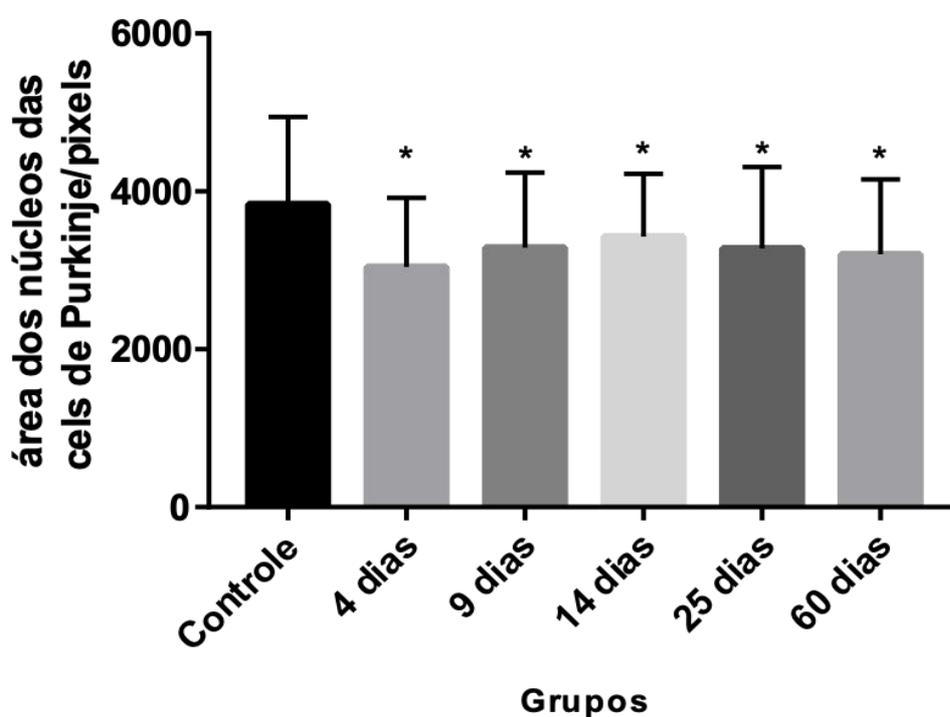
Figura 8 - Análise morfológica e morfométrica. (A) Fotomicrografia do córtex cerebelar corado com a reação de Feulgen. CM: Camada Molecular; CP: Células de Purkinje; CG: Camada Granulosa; D: Dendrito; N: Nucléolo; g: glomérulo cerebelar; *: espaços entre as células de Purkinje; setas: células de Purkinje com núcleo ou forma alterada; cabeça de seta: fragmentos de células. (B) Fenótipo nuclear das células de Purkinje.; seta: fragmento nuclear (C) Média \pm desvio padrão da intensidade da Reação de Feulgen nos núcleos das células de Purkinje de acordo com a densidade óptica. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o controle. (colchetes) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos.





A figura 9 mostra os valores da área nuclear das células de Purkinje expressas em pixels. A análise estatística mostrou uma redução significativa ($P < 0,05$) da área dos núcleos de células de Purkinje nos tempos de 4, 9, 14, 25 e 60 dias quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os tempos dos grupos irradiados.

Figura 9 - Área nuclear das células de Purkinje. (A) Morfologia e seleção da área dos núcleos de Purkinje. (B) Média \pm desvio padrão da área do núcleos das células de Purkinje. (*) indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o controle.



6 DISCUSSÃO

A metaloproteinase-9 é uma endopeptidase dependente de Zn^{2+} expressa no Sistema Nervoso Central e Periférico, podendo controlar a sinaptogênese, o crescimento axonal, a mielinização durante o desenvolvimento e a reestruturação de redes sinápticas em indivíduos adultos (ETHELL; ETHELL, 2007). A desregulação da atividade da enzima está implicada em uma série de distúrbios neurodegenerativos, incluindo lesão cerebral traumática, esclerose múltipla e doença de Alzheimer (REINHARD; RAZAK; ETHELL, 2015; RANA; MUSTO, 2018).

Além disso, existem estudos envolvendo a atividade da MMP-9 em tratamento radioterápico em alguns tipos de câncer (KUNIGAL *et al.*, 2008; DANO *et al.*, 1999). Em processos oncológicos na região da cabeça e pescoço, a radiação craniana profilática é um tratamento de risco que pode ser prejudicial para tecidos não tumorais do SNC (FUKUDA *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2019), acarretando em funções neurocognitivas alteradas. A eficácia da radioterapia no tratamento de tumores é limitada por efeitos colaterais tóxicos, que impedem o aumento da dose. Além disso, a radiação pode induzir a proliferação e repovoamento das células tumorais, e as células cancerosas podem desenvolver mecanismos de radiorresistência que estão relacionados à resposta de reparo do DNA (KUNIGAL *et al.*, 2008).

A radioterapia pode estimular várias vias de transdução de sinal simultaneamente e, por sua vez, essas vias podem alterar a expressão de moléculas pró-angiogênicas, como a MMP-9, aumentando a atividade dessa enzima, favorecendo a sobrevivência de células tumorais e a invasão do tumor (JADHAV; MOHANAM, 2006). Estudos envolvendo a MMP-9 em tratamento com radiação em câncer de mama por exemplo, demonstram que essa enzima leva ao aumento do crescimento tumoral (COUSSENS *et al.*, 2000), metástase (JADHAV; MOHANAM, 2006), regulação da apoptose e angiogênese (BERGERS *et al.*, 2000). A ausência de MMP-9 retarda a angiogênese e reduz a frequência de tumores (COUSSENS *et al.*, 2000). Esses dados indicam que a MMP-9 possui importante papel durante o tratamento oncológico com radiação ionizante mas com mecanismos de ação que ainda não estão bem elucidados, assim necessitando de mais estudos.

Sendo assim, para investigar a expressão de MMP-9 após a radiação em um

tecido não tumoral, foi realizada uma Imunohistoquímica para MMP-9 em cerebelode ratos.

Os resultados da análise visual da imunomarcaçãode MMP-9 no córtex cerebelar (figura 6A) mostraram um aumento na intensidade da expressãode MMP-9 nos grupos de 4, 9 e 14 dias, quando comparados com o grupo controle. A camada molecular, que apresentou intensa marcaçãode para a MMP-9, é um local de intensa atividade sináptica, onde operam as sinapses de fibras paralelas, células estreladas, células em cesto e dendritos das células de Purkinje (MOREIRA, 2017). A camada de Purkinje apresentou marcaçãode para a MMP-9 em prolongamentos ao redor das células de células de Purkinje, que condizem com as características morfológicas das células em cesto, as quais estabelecem contato sináptico inibitório com o corpo celular do neurônio de Purkinje. Em 25 e 60 dias, a marcaçãode ficou evidente apenas ao redor das células de Purkinje e em poucos prolongamentos na camada molecular, se assemelhando ao grupo controle. No cerebelo, os neurônios que possuem essa característica morfofuncional são as células em cesto.

Os resultados aqui apresentados demonstram que após a exposiçãode à radiação ionizante há um aumento visual da MMP-9 no cerebelo de um tecido não tumoral. Segundo Stetler-Stevenson e Yu (2001), as MMPs podem degradar os componentes da matriz e atuar em localizaçãode específica nos tecidos a fim de favorecer a metástase e inibiçãode da apoptose de células cancerosas.

Pesquisas demonstram que após a irradiaçãode do tecido, a degradaçãode da matriz extracelular desempenha um papel importante na metástase tumoral e nos processos de remodelaçãode do tecido não neoplásico, um componente necessário da invasão (KUNIGAL *et al.*, 2008; DANO *et al.*, 1999). Em tecidos tumorais, os componentes dos sistemas de protease que degradam a matriz (ativadores de plasminogênio e MMPs) podem ser expressos pelas células não neoplásicas, pelas células cancerosas ou por ambas (DANO *et al.*, 1999).

O aumento visual da expressãode de MMP-9 é confirmado estatisticamente a partir dos resultados da análise da intensidade da marcaçãode em pixels na figura 6B, demonstrando um aumento significativo nos níveis de MMP-9 nos animais irradiados até o 14º dia. O aumento da expressãode de MMP-9 também pode estar relacionado com a produçãode de radicais livres após dose única de radiaçãode. Em lesões cerebrais induzidas por radiaçãode, foi identificado que o estresse oxidativo e a via inflamatória são os principais responsáveis pelos danos gerados (BALUNA;

ENG; THOMAS, 2006; DENHAM; HAUER-JENSEN, 2002). Além disso, as EROs produzidas após lesões do SNC também podem contribuir para a indução e ativação de MMPs (YONG *et al.*, 2001; CUI *et al.*, 2010), ampliando os níveis da lesão devido a maior vulnerabilidade dos tecidos neuronais (MANDA *et al.*, 2007). Assim, a regulação rigorosa da atividade da MMP-9 é crítica para a ativação e remodelação especificado tecido, com efeitos espaciais e temporais.

Para avaliar possíveis perdas celulares após radiação, foi realizada a estimativa do número de células de Purkinje. A análise estatística (figura 7) demonstrou que o número de células de Purkinje no córtex cerebelar reduziu significativamente em todos os grupos de animais expostos à radiação ionizante, quando comparados com o tecido cerebelar não irradiado. Este resultado corrobora com pesquisas semelhantes que demonstraram que em cerebelos irradiados de camundongos adultos e recém-nascidos, há uma perda linear de células de Purkinje por necrose ou apoptose (CUI *et al.*, 2010; MANDA *et al.*, 2007).

Os radicais livres gerados como consequência da irradiação podem acelerar o dano celular. O tecido cerebral é altamente vulnerável aos danos dos radicais livres pela sua alta utilização de oxigênio, alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e baixa concentração de antioxidantes citosólicos e metais de transição, tais como ferro (REITER *et al.*; 2001)

Para analisar alterações morfológicas cerebelares, os cortes de cerebelo foram submetidos à histoquímica de Feulgen. A análise de imagem de núcleos corados com Feulgen usando parâmetros densitométricos e texturais podem ser considerados uma ferramenta sensível para a avaliação de mudanças no fenótipo nuclear devido à fragmentação ou condensação da cromatina em diferentes tipos de células e sob várias condições patológicas (VIDAL *et al.*, 1998; MARIA *et al.*, 2000; MORAES *et al.*, 2005).

A análise morfológica do córtex cerebelar corado com Feulgen (figura 8A) demonstrou que após uma única dose de irradiação X aplicada à cabeça de ratos houve uma desorganização da citoarquitetura cerebelar. As análises histológicas permitiram estabelecer que a partir de 4 dias e nos tempos subsequentes houve mudanças na distribuição espacial das células de Purkinje, que perderam a organização linear. Estudos onde ratos neonatais foram expostos à radiação ionizante demonstraram semelhanças com os resultados aqui apresentados, sugerindo que a radiação X induziu anormalidades permanentes na

citoarquitetura do córtex cerebelar (ZHOU *et al.*, 2019; GUELMAN *et al.*, 2003; GUELMAN *et al.*, 2011)

Em nossos resultados, as células de Purkinje dos animais irradiados apresentaram o dendrito primário desarranjado ou não aparente, concordantes com estudos que mostram que após a radiação de cerebelos neonatais, a arborização dendrítica das células de Purkinje é modificada (ZUBILETE *et al.*, 2011). Além disso, observou-se alterações morfológicas como por exemplo a perda do formato piriforme, retração citoplasmática e nuclear, e núcleo com aspecto de cromatina condensada, sendo também possível observar a presença de fragmentos nucleares encontrados na camada granular e na camada de Purkinje, sem a presença de células inflamatórias. Segundo Lossi e Gambino (2008) essas características morfológicas encontradas podem representar a primeira evidência de morte celular.

Apesar da maioria das células de Purkinje apresentarem alterações morfológicas nos animais irradiados, outras se assemelham às células do grupo controle, com núcleo redondo e cromatina descondensada, sugerindo que essas células estão desempenhando suas funções metabólicas para a manutenção do cerebelo.

A presença de espaços evidentes entre as células de Purkinje nos tempos dos animais irradiados pode estar correlacionada com a perda significativa de células de Purkinje, como demonstrado na figura 7. Além disso, a desorganização na camada granular provocou a mudanças na morfologia glomerular. Os glomérulos cerebelares são regiões de contato sináptico entre as fibras musgosas, dendritos das células granulares, terminais axonais das células de golgi e partes proximais das células de Golgi. Estudos semelhantes, *in vitro* e *in vivo*, mostram que a exposição neonatal à radiação ionizante induziu a perda de células granulares e células granulares externas devido à apoptose (ZHOU *et al.*, 2019; FUKUDA *et al.*, 2004) e a espessura da camada granular foi reduzida em decorrência da radiação ionizante, onde o dano induzido por radiação em células granulares cerebelares imaturas foi mediado principalmente pelo acúmulo de EROs (GUELMAN *et al.*, 2005).

Para verificar as mudanças no fenótipo nuclear das células de Purkinje, as fotomicrografias do córtex cerebelar foram submetidas à análise de densidade óptica após a histoquímica de Feulgen. Houve um aumento da densidade óptica em

todos os tempos dos animais irradiados quando comparados com o grupo controle (figura 8C). Esses resultados sugerem que o núcleo do grupo controle apresentou uma cromatina descondensada, como também pode ser observado na análise visual, e em todos os grupos de animais irradiados houve uma mudança morfológica nuclear, representando a possível condensação de cromatina e fragmentação do DNA.

Esses resultados complementam a análise visual (figura 8A). O grupo de 4 dias foi o qual apresentou níveis de compactação mais altos, seguido dos animais de 60 dias, podendo inferir que os danos causados pela radiação ocasionam prejuízos de curto e médio prazo. Segundo pesquisas anteriormente realizadas, a radiação ionizante atua através da indução de quebras de fita dupla no DNA, a fim de induzir a eliminação de células cancerosas e também saudáveis por apoptose (LI; STORY; LAGERSKI, 2001).

Segundo Maria e colaboradores (2000) e Vidal e colaboradores (1998), as células em estágios avançados de apoptose exibem alterações morfológicas através mudanças nucleares e citoplasmáticas caracterizadas pela condensação e fragmentação celular em corpos apoptóticos (MARIA *et al.*, 2000; VIDAL *et al.*, 1998). Em condições fisiológicas normais, os neurônios são encontrados em um estado quiescente no sistema nervoso adulto. Nesse caso, eles irão apresentar um núcleo com cromatina mais descondensada, como também observamos em nossos resultados. Os neurônios são geralmente considerados células pós-mitóticas, porém quando submetidos a insultos agudos, como privação do fator neurotrófico, excitotoxicidade, dano ao DNA e estresse oxidativo, podem entrar em morte celular.

Os mecanismos precisos por trás da morte neuronal em lesões degenerativas ainda não estão estabelecidas. Contudo, estudos demonstram que a morte celular pode ocorrer através de ambas as formas de apoptose e necrose. No processo de apoptose em células granulares cerebelares, é descrito que esses neurônios podem sofrer um processo de reentrada no ciclo celular ativando um gatilho de apoptose neuronal que desencadeia uma série de vias de sinalização (indução da via Bax/ caspase-3 e da via Cdk1/FOXO1/Bad) seguido da morte neuronal (FRADE; OVEJERO-BENITO, 2005). Embora os processos de necrose e apoptose sejam diferentes e divergentes, podem agir de forma sobreposta de maneira a causar a morte neuronal. Dessa forma, a morte neuronal pode ser

bifásica, começando com necrose e mostrando apoptose retardada (WOLOZIN; BEHL, 2000; MUKHERJEE; SWARNAKAR, 2015).

Além disso, na figura 9 é demonstrado uma redução na área dos núcleos das células de Purkinje em todos os grupos de ratos irradiados. Esse resultado é complementar à alteração do fenótipo nuclear (figura 8B). Nesse sentido, as mudanças morfológicas nucleares encontradas são possíveis alterações na estrutura do DNA e cromatina, que causam retração nuclear, podendo ser uma característica do processo de morte celular. Segundo Lossi e Gambino (2008), em processos apoptóticos a célula e seu núcleo assumem uma forma mais irregular.

Os dados coletados neste trabalho demonstraram alterações na citoarquitetura do córtex e das células de Purkinje do cerebelo e indicam um possível papel da MMP-9 em tecido cerebelar não tumoral irradiado. Entretanto esse papel ainda precisa ser melhor investigado. Assim, pesquisas complementares são necessárias para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos com o intuito da projeção de estratégias terapêuticas futuras, para redução de danos ocasionados durante tratamento radioterápico no cerebelo.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se, pelos resultados obtidos neste trabalho, que a radiação ionizante em dose única de 15,75 Gy na região craniana de ratos:

- Aumentou os níveis de MMP-9 no cerebelo até o 14º dia, principalmente na camada molecular e ao redor das células de Purkinje;
- Provocou alterações morfológicas no córtex cerebelar em curto e médio prazo;
- Ocasinou redução significativa no número de células de Purkinje no cerebelo;
- Resultou na redução da área nuclear e cromatina mais condensada das células de Purkinje.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ZEID, S.M.; EL-BIALY, B.E.; EL-BORAI, N.B.; ABUBAKR, H.O.; ELHADARY, A.M.A. Radioprotective effect of date syrup on radiation-induced damage in rats. **Sci Rep**, v. 8, p.1-10, 2018.
- AFIFI, A. K.; BERGMAN, R. A. **Neuroanatomia funcional: texto e atlas**. 2 ed. Editora Roca, v.1, p. 526, 2008.
- ALTMAN, J.; BAYER, S. A. **Development of the Cerebellar System in relation to its evolution, structure and functions**. 1 ed. Florida: CRC Press, 1997.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutat Res**, v. 350 n.1, p. 103-108, 1996.
- AZEVEDO, F. A., CARVALHO, L. R., GRINBERG, L. T., FARFEL, J. M., FERRETTI, R. E., LEITE, R. E., ET A. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. **J. Comp. Neurol.** v. 513, p.532–541, 2009.
- AYOUB, A.E., CAI, T.Q., KAPLAN, R.A., LUO, J. Developmental expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and their potential role in the histogenesis of the cerebellar cortex. **J Comp Neurol**.v. 481, p 403–415, 2005.
- BARBOZA, C. B.; OLIVEIRA, A. R. L. Planejamento do tratamento por radioterapia através de métodos de pontos interiores. **Revista Brasileira de Pesquisa Operacional**. v. 26, n.1, p.1-24. 2006.
- BALUNA, R. G.; ENG, T. Y.; THOMAS, C. R. Adhesion molecules in radiotherapy. **Radiat Res**, v. 166, n. 6, p. 819-831, 2006.
- BERGERS, G.; BREKKEN, R.; MCMAHON, G.; VU, T.H.; ITOH, T.; TAMAKI, K.; TANZAWA, K.; THORPE, P.; ITOHARA, S.; WERB, Z.; HANAHAN, D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nature cell biology**, v. 2, n. 10, p. 737-744, 2000.
- BRKIC, M.; BALUSU, S.; LIBERT, C.; VANDENBROUCKE, R. E. Friends or Foes: Matrix Metalloproteinases and Their Multifaceted Roles in Neurodegenerative Diseases. **Mediators of Inflammation**. 2015
- BUCKNER, R. L. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. **Neuron**, v. 80, p. 807–815, 2013.
- CAMERON, D. B.; KASAI, K.; JIANG, Y.; HU, T.; SAEKI, Y.; KOMURO, H. Four Distinct Phases of Basket/Stellate Cell Migration after Entering their Final Destination (the Molecular Layer) in the Developing Cerebellum. **Dev Biol**, v 2, p. 309–324, 2009.
- CHÉDOTAL, A. Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. **Trends Neurosci**, v. 33 p.163–172, 2010.

CHUNG, S. H.; MARZBAN, H.; HAWKES, R. Compartmentation of the cerebellar nuclei of the mouse. **Neuroscience**, v. 161, p.123–138, 2009.

COUSSENS, L. M.; TINKLE, C. L.; HANAHAN, D.; WERB, Z. MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. **Cell**, v. 103, p. 481-490, 2000.

CUCCURULLO, V.; DI STASIO, G.D.; CASCINI, G. L.; GATTA, G.; BIANCO, C. The Molecular Effects of Ionizing Radiations on Brain Cells: Radiation Necrosis vs. Tumor Recurrence. **Diagnostics**, v. 9, n.127, 2019.

CUI, L.; PIERCE, D.; LIGHT, K. E.; MELCHERT, R.; FU, B.Q.; KUMAR, K. S.; HAUER-JENSEN, MARTIN. Sublethal total body irradiation leads to early cerebellar damage and oxidative stress. **Curr Neurovasc Res**, v.7 p.125–135, 2010.

DANO, K.; ROMER, J.; NIELSEN, B. S.; BJORN, S.; PYKE, C.; RYGAARD, J.; LUND, L. R. Cancer invasion and tissue remodeling--cooperation of protease systems and cell types. **APMIS**, v. 107, n. 1, p. 120-127, 1999.

DENHAM, J. W.; HAUER-JENSEN, M. The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. **Radiother Oncol**, V. 63, n.2, p.129-45, 2002.

DOWD, S. B.; TILSON, E. R. **Practical radiation protection and applied radiobiology**. Saunders Company, v. 40, p. 30 - 38, 1999.

DZWONEK, J.; RYLSKI, M.; KACZMAREK, L. Matrix metalloproteinases e seus inibidores endógenos em neurônios fisiologia do cérebro adulto. **FEBS Lett**, V.597 , p.129-135, 2004.

ETHELL, I. M.; ETHELL, D. W. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets. **J. Neurosci. Res**. v. 85, p. 2813–2823, 2007.

FARINA, A. R.; MACKAY, A. R. Gelatinase b/MMP-9 in tumour pathogenesis and progression. **Cancers**, v. 6, p. 240–296, 2014.

FRADE, J. M.; OVEJERO-BENITO, M. C. Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. **Cell Cycle**, v. 14, n. 5, p. 712-720, 2015.

FUKUDA, H.; FUKUDA, A.; ZHU, C.; KORHONEN, L.; SWANPALMER, J.; HERTZMAN, S.; LEIST, M.; LANNERING, B.; LINDHOLM, D.; BJÖRK-ERIKSSON, T.; MARKY, I.; BLOMGREN, K. Irradiation-induced progenitor cell death in the developing brain is resistant to erythropoietin treatment and caspase inhibition. **Cell Death Differ**, V.11, n.11, p. 1166-1178, 2004.

FURDUI, C. M. Ionizing radiation: mechanisms and therapeutics. **Antioxid Redox Signal**, v. 21, p.218–220, 2014.

GAO, J.H.; PARSONS, L.M.; BOWER, J.M.; XIONG, J.; LI, J.; FOX, P.T.

Cerebellum implicated in sensory acquisition and discrimination rather than motor control. **Science**, v.7 p. 272:545, 1996.

GAWLAK, M.; GÓRKIEWICZ, T.; GORLEWICZ, A.; KONOPACKI, F. A.; KACZMAREK, L.; WILCZYNSKI, G. M. High resolution in situ zymography reveals matrix metalloproteinase activity at glutamatergic synapses. **Neuroscience**, v. 158, p.167–176, 2009.

GLICKSTEIN, M., STRATA, P., VOOGD, J.. Cerebellum: history. **Neuroscience**, v. 162, p. 549–559, 2009.

GOLDOWITZ, D., CUSHING, R. C., LAYWELL, E., D'ARCANGELO, G., SHELDON, M., SWEET, H. O., ET AL. Cerebellar disorganization characteristic of reeler in scrambler mutant mice despite presence of reelin. **J. Neuroscience**. v.17, p.8767–8777, 1997.

GREENE-SCHLOESSER, D.; MOORE, E.; ROBBINS, M. E. Molecular pathways: radiation-induced cognitive impairment. **Clin. Cancer Res**, v. 19, p.2294–2300, 2013.

GU, Z.; KAUL, M.; YAN, B.; KRIDEL, S.J.; CUI, J.; STRONGIN, A.; SMITH, J.W.; LIDDINGTON, R.C.; LIPTON, S.A. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: Signaling pathway to neuronal cell death. **Science**, v. 29p. 1186–1190, 2002.

GUELMAN, L. R.; CABANA, J. I.; PAGOTTO, R. M. L.; ZIEHER, L. M. Ionizing radiation-induced damage on developing cerebellar granule cells cultures can be prevented by an early amifostine post-treatment. **Int. J. Developmental Neuroscience**. V. 23, p. 1–7, 2005.

GUELMAN, L.; ZIEHER, L.; RIOS, H.; MAYO, J.; DOPICO, A. Motor abnormalities and changes in the noradrenaline content and the cytoarchitecture of developing cerebellum following X-irradiation at birth. **Mol. Chem. Neuropathol**. v 20, p. 45–57, 1993.

GUELMAN, L. R.; ZUBILETE, M. A. Z.; RIOS, H.; DOPICO, A. M.; ZIEHER, L.M. GM1 ganglioside treatment protects against long-term neurotoxic effects of neonatal X-irradiation on cerebellar cortex cytoarchitecture and motor function. **Brain Research**. v. 858, p. 303–311, 2000.

GUELMAN, L. R.; ZUBILETE, M. A. Z.; RIOS, H.; ZIEHER, L. M. WR-2721 (amifostina, ethylol ®) evita alterações motoras e morfológicas induzidas por radiação-X neonatal. **Neurochemistry International**. v. 42, n. 5, p. 385-391, 2003.

GUNDEL, H.; O'CONNOR, M.F.; LITTRELL, L.; FORT, C.; LANE, R.D. Functional neuroanatomy of grief: an fMRI study. **American J Psych**. v.160, p. 46-53, 2003.

HAINES, D. E.; MANTO, M. U. E. Mugnaini and A. Floris, the unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex, *J Comp Neurol*, 339:174-180, 1994: elucidating a cell of the cerebellar cortex that largely evaded detection.

Cerebellum, v. 14, n. 5, p. 475-483, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014> . Acesso em: 25 out. 2019.

ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochem**, v. 38, p. 21-36, 2002

JADHAV, U.; MOHANAM, S. Response of neuroblastoma cells to ionizing radiation: modulation of in vitro invasiveness and angiogenesis of human microvascular endothelial cells. **Int J Oncol**, v. 29, n. 6, p. 1525-1531, 2006.

JANUSZ, A.; MILEK, J.; PERYCZ, M.; PACINI, L.; BAGNI, C.; KACZMAREK, L.; DZIEMBOWSKA, M. The Fragile X mental retardation protein regulates matrix metalloproteinase 9 mRNA at synapses. **J Neurosci**. V. 33, n.46, p. 18234-18241, 2013.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; THOMAS, M.J. Principles of Neuroscience. 4th ed. New York: McGrawhill, 2000.

KANTOR, G; LAPRIE, A; HUCHET, A et al. Radiation therapy for glial tumors: technical aspects and clinical indications. **Cancer Radiothe**, v 12 p. 687–694,2008.

KAPLAN, I. **Física Nuclear**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1978.

KESSENBROCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix Metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. **Cell**. v. 141, n. 1, p. 52–67, 2010.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino Acids**. vol. 41, n. 2, p. 271– 290, 2011.

KNAUPER, V.; SMITH, B.; LOPEZ-OTIN, C.; MURPHY, G. Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). **Eur. J. Biochem**,v. 248, p. 369–373, 1997.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. (Ed). Berne & Levy: Fisiologia. Tradução Adriana Pitella Sudré [et al.]. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KUNIGAL, S.; LAKKA, S. S., JOSEPH, P.; ESTES, N.; RAO, J. S. Matrix metalloproteinase-9 inhibition down-regulates radiation-induced nuclear factor-kappa B activity leading to apoptosis in breast tumors. **Clin Cancer Res**, v. 1, n. 14, p. 3617-3626, 2008.

LAINÉ, J.; AXELRAD, H. The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. **J Comp Neurol**, v. 339, n.2, p. 159-173, 1994.

LAUER-FIELDS, J.L.; WHITEHEAD, J.K.; LI, S.; HAMMER, R.P.; BREW, K.; FIELDS, G. B. Selective modulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)

functions via exosome inhibition. **J. Biol. Chem**, v. 283, p. 20087–20095, 2008.

LI, H. P.; MIKI, T.; GU, H.; SATRIOTOMO, I.; MASTUMOTO, Y.; KUMA, H.; GONZALEZ, D.; BEDI, K. S.; SUWAKI, H.; TAKEUCHI, Y. The effect of the timing of prenatal X-irradiation on Purkinje cell numbers in rat cerebellum. **Dev. Brain Res.** v. 139, p. 159–166, 2002.

LI, H. P.; MIKI, T.; YOKOYAMA, T.; LEE, K. Y.; GU, H.; MATSUMOTO, Y.; WANG, Z. Y.; KAWANO, H.; TAKEUCHI, Y. Regional differences in vulnerability of the cerebellar foliations of rats exposed to neonatal X-irradiation. **Neuroscience Letters.** V. 402, p. 86–91, 2006.

LI, L.; STORY, M.; LEGERSKI, R. J. Cellular responses to ionizing radiation damage. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 49, n. 4, p. 1157–1162, 2001.

LI, L. N.; ZHOU, X.; GU, Y.; YAN, J. Prognostic value of MMP-9 in ovarian cancer: A meta-analysis. **Asian Pac. J. Cancer Prev**, v. 14, p. 4107–4113, 2013.

LIANG, S.; CHANG, L. Serum matrix metalloproteinase-9 level as a biomarker for colorectal cancer: A diagnostic meta-analysis. **Biomark. Med**, v. 12, p. 393–402, 2018.

LIMOLI, C. L.; GIEDZINSKI, E.; ROLA, R.; OTSUKA, S.; PALMER, T. D.; FIKE, J. R. Radiation response of neural precursor cells: linking cellular sensitivity to cell cycle checkpoints, apoptosis and oxidative stress. **Radiat. Res**, v. 161, p. 17–27, 2004.

LOGANOVSKY, K. Do low doses of ionizing radiation affect the human brain? **Data Sci. Journal**, v. 8, p. 1683–1470, 2009.

LOSSI, L.; GAMBINO, G. Apoptosis of the cerebellar neurons. **Histol Histopathol.** V. 23, p. 367–380, 2008.

LU, P.; TAKAI, K.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 3 p. 12, 2011.

LUO, J. The role of matrix metalloproteinases in the morphogenesis of the cerebellar cortex. **Cerebellum**, V. 4, p. 239–245, 2005.

MACHADO, A. B. M. Neuroanatomia funcional. **Livraria Atheneu**, v. 2 p. 363, 2005.

MANDA, K.; UENO, M.; MORITAKE, T.; ANZAI, K. alpha-Lipoic acid attenuates x-irradiation-induced oxidative stress in mice. **Cell Biol Toxicol**, v. 23, n. 2, p. 129–137, 2007.

MANTUANO E., INOUE G., LI X. Q., TAKAHASHI K., GAULTIER A., GONIAS S. L.; CAMPANA W. M. The hemopexin domain of matrix metalloproteinase-9 activates cell signaling and promotes migration of schwann cells by binding to low-density lipoprotein receptor-related protein. **J. Neurosci**, V. 28, p. 11571–11582, 2008.

MARIA, S. S.; VIDAL, B.C.; MELLO, M. L. S. Image analysis of dna fragmentation and loss in v79 cells under apoptosis. **Genet. Mol. Biol**, v.23, n.1, 2000.

McGUIRE, J.D. et al. Type IV collagen is a novel DEJ biomarker that is reduced byradiotherapy. **J Dent Res**. V.10, p. 28-34, 2014.

MERCHANT, T. E.; SHARMA, S.; XIONG, X.; WU, S; CONKLIN, H. Effect of cerebellum radiation dosimetry on cognitive outcomes in children with infratentorial ependymoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 90, p. 547–553, 2014.

METTLER JUNIOR, F.A.; UPTON, A.C. Medical effects of ionizing radiation. **Philadelphia, P. A: Saunders Company**, 2ed, 1995.

MISKO, A.; FERGUSON, T.; NOTTERPEK, L. Matrix metalloproteinase mediated degradation of basement membrane proteins in trembler j neuropathy nerves. **J. Neurochem**, v. 83, p. 885–894, 2002.

MITTAL, R.; PATEL, A. P.; DEBS, L. H.; NGUYEN, D.; PATEL, K.; GRATI, M'H.; MITTAL, J.; YAN, D.; CHAPAGAIN, P.; LIU, X. Z. Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological Conditions. **J Cell Physiol**, V. 231, p. 2599–2621, 2016.

MOORE, C.S.; CROCKER, S.J. An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. **The American Journal of Pathology**, V. 180, n. 1, p. 12–16, 2012.

MORAES, A. S.; VIDAL, B. C.; GUARALDO, A. M. A.; MELLO, M. L. S. Chromatin supraorganization and extensibility in mouse hepatocytes following starvation and refeeding. **Cytometry**. V.63, p. 94-107, 2005.

MUKHERJEE, A.; SWARNAKAR, S. Implication of matrix metalloproteinases in regulating neuronal disorder. **Mol Biol Rep**. V. 42, n. 1, p. 1-11, 2015.

MURRAY, D.; MCBRIDE, W. H.; SCHWARTZ, J. L. Radiation biology in the contextof changing patterns of radiotherapy. **Radiat. Res**, v. 182, p. 259–272, 2014.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Risk factors for cancer**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>. Acesso em: 13 dez. 2020.

NAGASE, H.; MENG, Q.; MALINOVSKII, V.; HUANG, W.; CHUNG, L.; BODE, W.; MASKO, S K.; BREW, K. Engineering of selective TIMPs. **Ann NY Acad Sci**. v. 878, p. 1–11, 1999.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and timps. **Cardiovasc. Res**. v. 69, p. 562–573, 2006.

NAYLOR, W.; MALLETT, J. Management of acute radiotherapy induced skin

reactions: a literature review. **European Journal of Oncology Nursing**. v. 5, n.4, p.221-233, 2001.

OKAMOTO, T.; AKAIKE, T.; SAWA, T.; MIYAMOTO, Y.; VAN DER VLIET, A.; MAEDA, H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein s-glutathiolation via disulfide s-oxide formation. **Journal of biological chemistry**. V. 276, n.31, p. 29596–29602, 2001.

OVERALL, C. M.; LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nature Rev. Cancer**. v. 2, p. 657–67, 2002.

PEREIRA, A. J.; DANILIAUSKAS, M.; LOPES, R. M. G.; HADDAD, G. P.; CRUZ, J. C.; MARTINS, H. L.; **Programa de qualidade em radioterapia: curso para técnicos em radioterapia**. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro: INCA, 2000.

POROCK, D.; KRISTJANSON, L. Skin reactions during radiotherapy for breast cancer: the use and impact of topical agents and dressings. **European Journal of Cancer Care**. V. 8, p. 143–153, 1999.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **Int J Vitam Nutr Res**.v. 67, p. 289-97, 1997.

POPE, P.A.; MIAL, R.C. Tasks-specific facilitation of cognition by cathodal transcranial direct current stimulation of the cerebellum. **Brain stimulation**. v.5, p. 84-94, 2012.

PUPA, S. M.; MÉNARD, S.; FORTI, S.; TAGLIABUE, E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. **Journal Cell Physiol**, v.193,n. 3, p. 259-267, 2002.

RAJAGOPALAN, S.; MENG, X.P.; RAMASAMY, S.; HARRISON, D.G.; GALIS, Z.S. Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. **J. Clin. Investig.** **1996**, *98*, 2572–2579.

RANA, A.; MUSTO, A.E. The role of inflammation in the development of epilepsy. **JNeuroinflammation**. v. 15, n.1, 2018.

REEBER, S. L.; OTIS, T. S.; SILLITOE, R. V. New roles for the cerebellum in health and disease. **Front. Syst. Neurosci**, v. 7:83, 2013.

REITER, R. J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; TAN, D.; BURKHARDT, S. Free radical-mediated molecular damage: Mechanism for the protective actions of Melatonin in the central nervous system **Ann. New York Acad. Sci.** 939 p. 200–215, 2001.

REINHARD, S. M.; RAZAK, K.; ETHELL, I. M. A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. **Front CellNeurosci**. v. 9, p. 280, 2015.

RIVERA, S.; KHRESTCHATISKY, M.; KACZMAREK, L.; ROSENBERG, G. A.;

JAWORSKI, D. M. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology?. **Journal of Neuroscience**. v. 30, n. 46, p. 15337–15357, 2010.

ROBERTSON, B.; SOUTHAN, A. K⁺ channel blockers and Ca²⁺ signals in basketcell terminals. **Journal of Physiology**. 520.1, 1999.

ROEB, E.; SCHLEINKOFER, K.; KERNEBECK, T.; POTSCH, S.; JANSEN, B.; BEHRMANN, I.; MATERN, S.; GROTZINGER, J. The matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. **J. Biol. Chem**. v. 277, p. 50326–50332, 2002.

ROSSIGNOL, E. Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. **Neural Plast**, 25p, 2011.

ROY, R.; YANG, J.; MOSES, M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **J. Clin. Oncol**, v. 27, 5287–5297, 2009.

RUIGROK, T. J. Cerebellar nuclei: the olivary connection. **Prog. Brain Res**. v. 114, p.167–192, 1997.

SAAB, C.Y.; WILLIS, W.D. The cerebellum: organization, functions and its role in nociception. **Brain Res. Rev**. V.42, p.85–95, 2003.

SÁNDOR, N.; WALTER, F. R.; BOCSIK, A.; SÁNTHA, P.; SCHILLING-TÓTH, B.; LÉNER, V.; VARGA, V.; KAHÁN, Z.; DELI, M. A.; , SÁFRÁNY, G.;HEGYESI, H. Low Dose Cranial Irradiation-Induced Cerebrovascular Damage Is Reversible in Mice. **PloS one**. V.9, 2014.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med**, v. 30, p. 1191-212, 2001.

SHAO, W.; WANG, W.; XIONG, X.G.; CAO, C.; YAN, T.D.; CHEN, G.; CHEN, H.; YIN, W.; LIU, J.; GU, Y.; et al. Prognostic impact of MMP-2 and MMP-9 expression in pathologic stage ia non-small cell lung cancer. **J. Surg. Oncol**, v. 104, p. 841–846, 2011.

SHARMA, N. K.; SHARMA, R.; MATHUR, D.; SHARAD, S.; MINHAS, G.; BHATIA, K.; ANAND, A.; GHOSH, S. P. Role of Ionizing Radiation in neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, n. 134, 2018

SHEFFIELD, J. B.; KRASNOPOLSKY, V.; DEHLINGER, E. Inhibition of retinal growth cone activity by specific metalloproteinase inhibitors *in vitro*. **Dev. Dyn**. v. 200,p. 79–88,1994.

SHADAD, A.K.; SULLIVAN, F.J.; MARTIN, J.D.; EGAN, L.J.; Gastrointestinal radiation injury: Symptoms, risk factors and mechanisms. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, n.2, p. 185-198, 2013.

STAWARSKI, M.;STEFANIUK,M.; WLODARCZYK, J. Matrix metalloproteinase-9 involvement in the structural plasticity of dendritic spines. **Front. Neuroanat.** V.8, n. 68, 2014.

STETLER-STEVENSON, W. G.;YU, A.E. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*, v. 11, p. 143-152, 2001.

SUZUKI, K. Neurotoxicity of radiation. **Brain Nerve**, v. 67, p. 63–71, 2015.

UUSISAARI, M. Y.; KNÖPFEL, T. Diversity of neuronal elements and circuitry in the cerebellar nuclei. **Cerebellum**. v. 11, p. 420–421, 2012.

VAFADARI; B.; SALAMIAN, A.; KACZMAREK, L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy. **Journal of Neurochemistry**. V. 139, 2, p. 91-114, 2016.

VAILLANT, C; MEISSIREL, C.; MUTIN,M.; BELIN, M. F.; LUND, L.R.; THOMASSET, N. MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 24, n. 2, p. 395–408, 2003.

VAN DEN STEEN, P. E.; DUBOIS, B.; NELISSEN, I.; RUDD, P. M.; DWEK, R. A.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and Molecular Biology of Gelatinase B or Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9). **Journal Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. V. 37, n.6, p. 375-536, 2002.

VANDOOREN J.; VANDAMME, J.; OPDENAKKER, G. On the structure and functions of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 in neuroinflammation. **Prog. Brain Res**. V. 214, p. 193–206, 2014.

VANDOOREN, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; OPDENAKKER, G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol**. V. 48, p. 222–272., 2013

VECIL, G. G. *et al.* Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma *in vivo*. **J. Neurosci. Res**. V. 61, p. 212–224, 2000.

VERSLEGERS, M.; LEMMENS,K.; VAN HOVE, I.; MOONS, L. Matrix metalloproteinase-2 and -9 as promising benefactors in development, plasticity and repair of the nervous system. **Progress in Neurobiology**. vol. 105, p. 60–78, 2013.

VIDAL, B. C.; RUSSO, J.; MELLO, M. L. S. DNA content and chromatin texture of benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells as assessed by image analysis. **Experimental Cell Research**. V. 244, p. 77-81, 1998.

Wang, V. Y.; Zoghbi, H. Y. Genetic regulation of cerebellar development. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 7, p. 484-491, 2001.

WEISS, J. F.; KUMAR, K. S. Antioxidant mechanisms in radiation injury and radioprotection. Cellular Antioxidant Defense. USA: CRC Press; p. 163-189, 1988.

WOLOZIN, B.; BEHL, C. Mechanisms of neurodegenerative disorders: Part 2: control of cell death. **Arch Neurol**. V. 57, n.6, p. 801-804, 2000.

YAMAUCHI K., YAMAUCHI T., MANTUANO E., MURAKAMI K., HENRY K., TAKAHASHI K. AND CAMPANA W. M. Low-density lipoprotein receptor related protein-1 (LRP1)-dependent cell signaling promotes neurotrophic activity in embryonic sensory neurons. **PLoS ONE**. v. 8, 2013.

YONG, V.W.; POWER, C.; FORSYTH, P.; EDWARDS, D.R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nat. Rev. Neurosci**. v. 2, p. 502–511. 2005.

ZHOU, W.; XUEJUAN, Y.; SUN, S.; ZHANG, X.; YANG, W.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; JIANG, Z. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 indicates poor prognosis in glioma recurrence. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. V. 118, 2019.

ZUBILETE, M. A. Z.; GUELMAN, L. R.; MAUR, D. G.; CACERES, L. G.; RIOS, H.; ZIEHER, L. M.; GENARO, A. M. Partial neuroprotection by 17- β -estradiol in neonatal gamma-irradiated rat cerebellum. **Neurochemistry International**. V. 58, n. 3, p. 273- 280, 2011.