

COMPORTAMENTO DAS METALOPROTEINASES (MMPs) EM CAPRINOS INFECTADOS OU NÃO PELO VÍRUS DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE)

Joanatha Vidal Gomes¹; Ângela Maria Xavier Eloy²

Raymundo Rizaldo Pinheiro³; Pedro Egberto Solon De Aguiar Neto⁴

Maria Luane da Silva Barroso⁵

¹Estudante do Curso de Mestrado, em Reprodução Animal - UVA. Vidalgomes2015@hotmail.com ²Pesquisadora da EMBRAPA Caprinos e Ovinos. Angela.elay@embrapa.br ⁵ Pesquisador da EMBRAPA Caprinos e Ovinos.

Rizaldo.pinheiro@embrapa.br ³Bolsista Iniciação Científica UNINTA/EMBRAPA Pedro_egberto@hotmail.com

⁵Estudante do Curso de Mestrado, em Reprodução Animal - UVA. Luansesilva62@hotmail.com

Resumo: A artrite encefalite caprina é uma doença que acomete caprinos de todas as idades. Para o diagnóstico métodos têm sido desenvolvidos para avaliação das formas ativas e latentes das enzimas proteolíticas em amostras biológicas, entre elas, a zimografia é um dos métodos mais usados. O objetivo desse trabalho foi a caracterização das metaloproteinasas em caprinos leiteiros infectados ou não pela CAE através dos testes WB, nPCR e Zimografia. O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos. Foram coletados plasma sanguíneo de seis 06 animais da raça Saanen, as amostras foram selecionadas e divididas em 2 grupos. Analisando o gel zimográfico, observa-se a presença das formas ativas MMP-2 (64- 66 kDa), MMP-9 (80-84 kDa), e a forma latente proMMP-9 (92 kDa) em todos os animais. O teste zimográfico pode vir a ser utilizado como teste de triagem para avaliar a sanidade do rebanho de forma geral.

Palavras-Chave: CAE; metaloproteinasas; zimografia.

INTRODUÇÃO

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma doença causada pelos Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPRs), da Família *Retroviridae*, similar ao vírus da Imunodeficiência humana (HIV)(QUINN et al., 2005), acomete caprinos de todas as idades. (LARA, 2002). É uma patologia de curso

progressivo com um longo período de incubação (CALLADO et al., 2001), proporcionando a não apresentação de sinais clínicos por meses ou anos pós infecção (STRAUB, 2004). A principal via de transmissão ocorre através da ingestão de colostro e leite contaminados, além do contato entre os animais por meio da saliva, secreções respiratórias e urogenitais e pelo sêmen além da transmissão vertical da mãe para o feto.

Para o diagnóstico dos lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR), os métodos sorológicos mais empregados são: o teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), o ensaio imunoenzimático indireto (Elisa-i), o Western Blotting (WB) e a Reação de Cadeia Polimerase (PCR). As metaloproteinases, por sua vez, são proteases presentes na matriz extracelular, as quais estão relacionadas às primeiras linhas de defesa do corpo, que são adquiridas a partir do nascimento, participando do sistema imune inato, estando envolvidas em processos fisiológicos como espermatogênese, ovulação, embriogênese e no processo de remodelamento celular. Além disso, estão relacionadas a infecções, como cancer e suas metástases, pneumonia, HIV, diabetes, sendo as MMP-2 e MMP-9 e suas formas latentes proMMP-2 e proMMP-9 (WOESSNER et al., 2000) diretamente envolvidas no processo.

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliação das formas ativas e latentes das enzimas proteolíticas em amostras biológicas. Entre elas, a zimografia é um dos métodos mais usados por ser o mais completo, capaz de detectar formas ativas e latentes das MMPs e quantificar a atividade enzimática, além de apresentar alta sensibilidade para diferentes classes de MMPs e baixo custo em comparação a outras técnicas (SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005). O objetivo desse trabalho foi a caracterização das metaloproteinases em caprinos leiteiros infectados ou não pela CAE através dos testes WB, nPCR e Zimografia.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Embrapa Caprinos e Ovinos, em Sobral, Ceará, na região Nordeste, no clima semiárido. Foram coletados plasma sanguíneo de seis (06) animais da raça Saanen, oriundo do banco de dados da Embrapa Caprinos e Ovinos. As amostras foram selecionadas e divididas em 2 grupos, sendo cada grupo composto de três amostras de animais positivos para WB e nPCR, e outro com 3 animais negativo para os testes WB e nPCR.

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método Bradford (1976), em triplicata, utilizando-se corante *Coomassie Brilliant Blue G250*, espectrofotômetro FP-901 (*Chemistry Analyser Labsystems*) pelo método de absorvância, cujo comprimento de onda foi 580 nanômetros (nm), usando a albumina sérica bovina (BSA) para desenvolvimento de uma curva padrão usando as concentrações de 0,3,5,8,10,13,18,15 e 20 mg. A quantificação proteica do plasma sanguíneo foi

obtida através de comparações entre os dados obtidos através do espectrofotômetro com os da curva padrão.

As padronizações do ensaio zimográfico com gelatina em plasma sanguíneo de caprinos sadios foram realizadas por Galiza (2016) usando diferentes quantidades de proteínas, variando de 4 µg a 32 µg, e identificando como padrão 20 µg. As amostras contendo plasma sanguíneo foram solubilizadas em tampão de amostra, no qual a quantidade de plasma final permaneceu em 2µg/µL (GALIZA, 2016). Em cada poço de gel de poliacrilamida a 12,5%, polimerizados com gelatina (2 mg/mL) (KUNPAI et al., 2010) foram adicionadas alíquotas de 10µL. As amostras foram submetidas à eletroforese (170V; 1A; 300W) no equipamento Mini-Protean II Cell®- Bio-Rad por 1 hora e 17 minutos (LAEMMELI, 1970). A amostra biológica, ou seja, o plasma sanguíneo, foi desnaturada por SDS. Após a corrida eletroforética o gel foi submetido a uma lavagem com o detergente Triton X-100 à 2,5%, (Heussen e Dowdle, 1980), sem propriedade iônica. Em seguida, o gel foi então incubado *overnight* em um tampão Tris, pH 7.8-8.0, NaCl e CaCl₂, à 37 °C, para renaturação das proteases presentes e digestão do substrato na zona ao redor de sua posição na eletroforese. Estas zonas foram visualizadas ao corar o gel com Coomassie Blue, (Troeberg & Nagase, 2003). A descoloração foi realizada com solução descorante (etanol a 30% e ácido acético a 7,5% em água Milli-Q), por um período de quarenta minutos. No final do processo, o gel zimográfico foi analisado através do programa *Gel Analyser* 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando o gel zimográfico, observa-se a presença das formas ativas MMP-2 (64- 66 kDa), MMP-9 (80-84 kDa), e a forma latente proMMP-9 (92 kDa) em todos os animais. No entanto, alguns caprinos apresentaram apenas a proMMP-9 e a MMP-9, independente de serem positivos ou negativos nos testes WB e nPCR. Com relação às MMP-2, estas foram expressas em todos os animais, independe dos resultados obtidos nos testes WB e nPCR. Galiza (2016) trabalhando com animais diagnosticado como negativo no WB, observou as mesmas MMPs dos animais soropositivos. Esses achados sugerem que a não reação do WB devido a possível não dectação de anticorpos, não interfere na atividade do sistema imune inato que continua sua atividade enzimática. As metaloproteinases, no entanto, não são atingidas pela latencia viral, uma vez que é um tipo de defesa inato. Pesquisadores trabalhando com zimografia já identificaram esse tipo de comportamento (GALIZA, 2016).

Na Tabela 1, encontra-se a distribuição das MMPs e os resultados dos testes WB e nPCR

Observa-se que a forma latente proMMP-2 estava ausente em todos os animais.

Tabela 1. MMPs encontradas nos geis zimográficos dos animais de acordo com pesos moleculares proMMP-9 (92 kDa), MMP-9 (80-84 kDa) e MMP-2 (64-66 kDa), onde a primeira descrevemos como a forma latente.

Animais	1	4	2	5	3	6
	Pro MMP-9				Pro MMP-9	Pro MMP-9
MMPs		MMP-9		MMP-9	MMP-9	
	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2
WB	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
nPCR	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg

Quanto a análise densitométrica das MMPs, observa-se uma maior atividade da enzima MMP-2 nos animais. Algumas pesquisas estudando a relação das MMPs com a CAE estão em andamento, mencionando-se o trabalho de Bezerra Júnior et al. (2015) e que também mostraram a 10MMP-2 em caprinos cronicamente infectados pela CAE. Esta protease apresenta diversas funções, destacando-se a migração celular e a degradação direta da membrana basal (KLEIN et al., 2011).

negativos para o WB e nPCR em relação aos positivos.

Algumas pesquisas estudando a relação das MMPs com a CAE estão em andamento, mencionando-se o trabalho de Bezerra Júnior et al. (2015) e que também mostraram a 10MMP-2 em caprinos cronicamente infectados pela CAE. Esta protease apresenta diversas funções, destacando-se a migração celular e a degradação direta da membrana basal (KLEIN et al., 2011).

Na Tabela 2 encontram-se os valores em *pixels* obtidos através do programa *Gel analyzer* versão 2010. Ressalva deve ser feita às outras MMPs que, por não estarem presentes nos animais (Tabela 1), não apresentaram atividade enzimática, obviamente.

Tabela 2. Valores em *Pixels* das proteases (proMMP-9, MMP-9 e MMP-2) encontradas no gel zimográfico do plasma sanguíneo dos animais positivos e negativos para CAE através do WB e nPCR.

Animais	WB	Npcr	ProMMP-9 <i>Pixels</i>	MMP-9 <i>Pixels</i>	MMP-2 <i>Pixels</i>
1	POS	POS	155	-	128
2	POS	POS	-	-	64
3	POS	POS	174	182	149
4	NEG	NEG	-	200	197
5	NEG	NEG	-	100	224
6	NEG	NEG	149	-	226

Aplicaram-se os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente. A comparação das médias entre os grupos positivos e negativos foi efetuada pela análise de variância, considerando-se o nível de significância até 5% ($p < 0,05$). Ao aplicar o teste de Tukey, observou-se que os animais positivos expressam uma atividade significativa das MMP-2 ($P < 0,05$) ($113,667^B \pm dp 128,000$), pois a mesma é medida em *pixels*, e esse valor elevado, dando indicio de que as proteínas do sistema imunológico estão em plena atividade.

No entanto, os animais negativos apresentaram média elevada ($215,667^A \pm dp 224,000$), quando comparados com os positivos. Possivelmente, os animais negativos para CAE através do WB e nPCR estivessem na fase latente do vírus, impossibilitando a detecção tanto do complexo antígeno-anticorpo como do DNA viral. A latência, parte do ciclo natural dos vírus, consiste na sua persistência em uma forma não infecciosa, onde o mesmo não consegue ser percebido pelo sistema imunológico, sendo esse processo utilizado por tempo alternado de reativação (SILVA, 2007).

Outra sugestão para esse aumento é que estamos lidando com proteínas do sistema imunológico inato, que por sua vez não apresenta uma especificidade como da imunidade adquirida, mas que consegue agir de maneira bem similar para todos os microrganismos. Então, como estão com a atividade aumentada, podemos justificar o aumento afirmando que os animais negativos para CAE (pelos testes de WB e nPCR), que expressaram alta atividade das MMP-2 podem sim estar sendo acometidos por processos inflamatórios como uma possível artrite ou outro tipo de infecção como linfadenite caseosa, causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, que através de

processos metabólicos do bacilo *I. he* permite sobreviver dentro dos macrófagos, (JONES et. al., 2000). Também pode-se mencionar uma broncopneumonia, pododermatite infecciosa, mastite, micoplasmose, entre outras enfermidades, que não necessariamente seja uma artrite encefalite caprina. Vale ressaltar que trata-se de animais de alta produção leiteira que, devido ao tipo de exploração são muito estimulados para produção e, portanto, são mais sensíveis à inflamações.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que dentre as metaloproteinases observadas, as MMP-2 apresentam maior atividade, sugerindo a presença de uma reação inflamatória presente, podendo ser viral ou não. O teste zimográfico pode vir a ser utilizado como teste de triagem para avaliar a sanidade do rebanho de forma geral.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos e Ovinos. A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

REFERÊNCIAS

BEZERRA JÚNIOR, R. Q. Análise proteômica do sêmen de reprodutores caprinos soropositivos para a artrite encefalite caprina. 2015. 108 f. Tese (Doutorado em ciências veterinárias)- Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. 2015.

CALLADO, A. K. C.; CASTRO, R. S.; TEIXEIRA, M. F. da S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.21, p.87-97, 2001.

GALIZA, Y. S. Comportamento das metaloproteinases no soro sanguíneo de caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina. 2016. Dissertação (Mestrado em zootecnia) – programa de pós-graduação em zootecnia - Universidade Vale do Acaraú, UVA, Sobral.

HEUSSEN, Christa; DOWDLE, Eugene B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. Analytical biochemistry, v. 102, n. 1, p. 196-202, 1980.

JONES T. C.; HUNT R. D.; KING, N. W. Patologia veterinária. São Paulo: Manole, 2000. 1353 p.

KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases.

Amino acids, v. 41, n. 2, p. 271-290, 2011

KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography.

Journal of Pharmacological and toxicological methods, v. 61, n. 2, p. 205-209, 2010.

LAEMMLI, Ulrich K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LARA, M. C. C. S. H. Artrite-encefalite dos Caprinos - Aspectos clínicos e epidemiológicos. 2002. 247 p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, FMVZ-USP, São Paulo.

QUINN, P. J. et al. Retroviridae. Grupo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes. In: *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, p. 346-357, 2005

SILVA, J.B.A.; LIMA, P.M. Lentivírus de Pequenos Ruminantes: caracterização etiológica, infectividade, controle, prevenção e diagnóstico. *Acta Veterinária Brasilica*, v.1, n.4, p.111-117, 2007.

STRAUB O. C. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, v. 27,p 1-5, 2004.

TROEBERG, Linda; NAGASE, Hideaki. Measurement of matrix metalloproteinase activities in the medium of cultured synoviocytes using zymography. *Inflammation Protocols*, p. 77-87, 2003.

WOESSNER, J. F.; NAGASE, H. *Matrix Metalloproteinases and TIMPs*. New York: Oxford University Press, p. 130-135, 2000.