

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

COMPORTAMENTO DAS METALOPROTEINASES NO SORO SANGUÍNEO DE
CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELO VÍRUS DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA

YLANA SANTOS DE GALIZA

SOBRAL – CE
DEZEMBRO – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

COMPORTAMENTO DAS METALOPROTEINASES NO SORO SANGUÍNEO DE
CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELO VÍRUS DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA

YLANA SANTOS DE GALIZA

SOBRAL – CE
DEZEMBRO – 2016

YLANA SANTOS DE GALIZA

COMPORTAMENTO DAS METALOPROTEINASES NO SORO SANGUÍNEO DE
CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELO VÍRUS DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Zootecnia, da Universidade
Estadual Vale do Acaraú, como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Reprodução Animal

ORIENTADORA:

Profa. Dra. ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY

CO-ORIENTADORA:

Profa. Dra. ALICE ANDRIOLI PINHEIRO

SOBRAL – CE
DEZEMBRO – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual Vale do Acaraú

Sistema de Bibliotecas

Galiza, Ylana Santos de

Comportamento das metaloproteinases no soro sanguíneo de caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da artrite encefalite caprina [recurso eletrônico] / Ylana Santos de Galiza. -- Sobral, 2016.

1 CD-ROM: il. ; 4 ³/₄ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato pdf do trabalho acadêmico com 54 folhas.

Orientação: Prof.^a Dra. Ângela Maria Xavier Eloy.

Co-Orientação: Prof.^a Dra. Alice Andrioli Pinheiro.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú / Centro de Ciências Agrárias e Biológicas

1. CAE. 2. MMPs. 3. Proteases. 4. Zimografia. I. Título.

YLANA SANTOS DE GALIZA

COMPORTAMENTO DAS METALOPROTEINASES NO SORO SANGUÍNEO DE
CAPRINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE PELO VÍRUS DA ARTRITE
ENCEFALITE CAPRINA

Dissertação defendida e aprovada em: 20 de dezembro de 2016 pela Comissão

Examinadora constituída por:

PROFa. DRa. ALICE ANDRIOLI PINHEIRO
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS
(CO-ORIRNTADORA E EXAMINADORA)

PROF. DR. RAYMUNDO RIZALDO PINHEIRO
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS
(EXAMINADOR)

João Garcia Alves Filho

DR. JOÃO GARCIA ALVES FILHO
FACULDADES INTA
(EXAMINADOR)

PROFa. DRa. ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS
(PRESIDENTE)

SOBRAL - CE
DEZEMBRO- 2016

Aos meus pais Maria da Conceição e João Damacio que estiveram presentes em todos os momentos dessa jornada, apoiando, incentivando e ofertando a melhor e verdadeira forma de amor.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por cada dia vivido, por todos os obstáculos ultrapassados, por me fazer forte a cada problema superado, por mostrar que a minha fé é bem maior do que imaginava, por ter me tornado uma pessoa melhor fazendo com que eu pudesse valorizar ainda, mas cada momento.

Aos meus pais, por toda confiança depositada apesar da distância, por cada palavra de conforto para que eu não desistisse dos meus objetivos, por cada ligação feita para saber como foi o meu dia, por sempre está ao meu lado, por cada abraço, cada beijo e amparo.

A minha família, de um modo geral aos meus avós, irmãos, sobrinhos, tios, que sempre torceram pelo meu sucesso, incentivando a cada etapa e aconselhando.

Ao meu namorado Diego por toda parceria e companheirismo, estando presente em todas as etapas deste mestrado e estendo a mão sempre que precisava.

A Dra. Ângela por ter esse coração gigantesco e me receber tão bem no CE. Obrigada por ser uma excelente orientadora e amiga, pela paciência, pelas conversas e conselhos, que Deus lhe dê o dobro de todo o bem que você fez e faz por mim. Espero que a parceria esteja apenas começando.

A minha co-orientadora Dra. Alice em aceitar essa missão e me ajudar sempre que preciso.

Aos laboratoristas da Embrapa Caprinos e Ovinos, em especial João Ricardo a quem eu devo tudo que aprendi no laboratório de proteômica, ao Nobrega pela paciência nas análises e a Osmarilda pela ajuda durante algumas etapas no experimento, muito obrigada!

Aos amigos Embrapianos Jéssica, Van, Kattyane, Milena, Rebeca, Lídia, Dalva, Laninha, Renato, Tatiana, Caio, que vivenciaram cada momento feliz e frustrante no decorrer do experimento, dando apoio, incentivo e conforto.

Aos amigos que o mestrado me deu Edilson, Anaclaudia, Grazy, Wellington, Clemente, Samuel, obrigada por tornarem meus dias mais felizes e menos dolorosos.

Em especial, quero agradecer as minhas grandes amigas Claudelice, Joice e Thays. Vocês foram meu melhor presente durante esses 2 anos de vivência em Sobral. Obrigada pelas conversas, risadas, puxões de orelhas, companheirismo, viagens, idas a Embrapa, lanches. Quero dizer que Deus foi muito bom comigo ao colocar vocês em meu caminho. Que esse laço de amizade seja eterno.

A Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) pela oportunidade de realização do Mestrado Acadêmico em Zootecnia.

A secretária da coordenação do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Acadêmico em Zootecnia, Joyce Sampaio, por toda ajuda e disposição sempre que era preciso.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Caprinos e Ovinos, pelo suporte dado para que fosse necessário o desenvolvimento dessa pesquisa.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado indispensável durante esses dois anos de estudo.

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS.....	XI
LISTAS DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XI
RESUMO GERAL.....	XIII
GENERAL ABSTRACT	
CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
CAPÍTULO I- REFERENCIAL TEÓRICO	17
1. Artrite Encefalite Caprina	18
2. Agente Etiológico.....	21
3. Resposta imune e diagnóstico da CAE.....	22
4. Proteômica.....	23
5. Proteases.....	23
6. Metaloproteinases da Matriz (MMPs).....	24
7. MMPs no soro sanguíneo.....	26
8. Zimografia.....	27
9. Referências Bibliográficas	29
CAPÍTULO II- ANÁLISE ZIMOGRÁFICA DAS METALOPROTEINASES NO SORO SANGUÍNEO DE CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS PELA CAE	35
RESUMO	36
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAL e MÉTODOS	39
2.1 Período e Local	39
2.2 Animais experimentais.....	39
2.3 Inoculação Viral	39
2.4 Coleta de Sangue.....	40
2.5 Experimento	40
2.6 Testes laboratoriais.....	40
2.6.1 Quantificação das proteínas totais do soro sanguíneo.....	40
2.6.2 Zimografia.....	41
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÃO	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS
CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Resultados do WB nas diferentes fases experimentais ne soro sanguíneo de reprodutores caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV)..... 42
- Tabela 2.** MMPs observadas no grupo controle através da zimografia em amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprinos (CAEV)..... 44
- Tabela 3.** MMPs observadas na primeira soroconversão através da zimografia em amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV)..... 44
- Tabela 4.** MMPs observadas na fase pós-soroconversão através da zimografia em amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV).)..... 46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Classificação das MMPs de acordo com os sítios de ligação.....25

CAPÍTULO II

Figura 2. Atividade enzimática das metaloproteinases no soro sanguíneo de caprinos experimentalmente infectados pela CAE. (A) Pré-infecção (F1); (B) Soroconversão (F2), (C) Pós-soroconversão (F3); (1-5) corresponde aos animais experimentais. Como padrão, utilizou-se o LMW-SDS marker kit (GE Healthcare - 94: fosfolipase b; albumina sérica bovina: 67; ovalbumina: 43; anidrase carbônica: 30; inibidor de tripsina de soja: 20,1; lactoalbumina: 14,4) para calibração da eletroforese.....43

Figura 3. Análise densitométrica das proteases presentes no soro sanguíneo de caprinos nas fases pré-infecção (F1), soroconversão (F2) e pós-infecção (F3) experimentalmente infectados pela CAE. Na figura A estão as bandas digeridas pelas gelatinases em gel de poliacrilamida 12,5% mostrando a atividade das MMPs (bandas claras); n fase pré-infecção (B) a atividade das MMPs no grupo de soroconversão e C a atividade das MMPs no grupo pós-soroconversão. Em D, representação esquemática do perfil densitométrico das proteases. Os números de 1 a 5 referem-se às amostras de soro sanguíneo de diferentes animais. Padrão utilizado com pesos (97, 66, 45 e 30kDa).....48

Figura 4. Volume médio em *pixels* das MMPs encontradas nas amostras de soro sanguíneo de caprinos experimentalmente infectados pela CAE. Volume médio em *pixels* das MMPs encontradas nas amostras de soro sanguíneo de caprinos experimentalmente infectados pela CAE..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

g – Grama
AE – Animal experimental
BSA – Albumina Sérica Bovina
Ca⁺⁺ - íons de cálcio
CaCl₂ – Cloreto de Cálcio
CAEV – Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CAEV-Cork – Cepa viral da Artrite Encefalite Caprina
CAE – Artrite Encefalite Caprina
CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CE – Ceará
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ECP – Cipionato de estradiol
EUA – Estados Unidos da América
FSH – Hormônio folículo estimulante
HBP-24 – Proteína de ligação à heparina
HCl – Ácido Clorídrico
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
IgG – Imunoglobulina G
IUBMB – União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
LVPRs – Lentivirus de pequenos ruminantes
MEC – Matriz extracelular
MEM – Meio Essencial Mínimo
MMPs – Metaloproteínas da matriz
MSC – Membrana sinovial caprina
MV – Maedi-Visna
NaCl – Cloreto de Sódio
PAD – Padrão utilizado com pesos
PS – Plasma Seminal
PS-Neg – Plasma seminal negativo
PS-Pos – Plasma seminal positivo
PCR – Reação de Cadeia Polimerase
PPO – Pneumonia Progressiva dos ovinos
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAm – Ácido Ribonucleico mensageiro
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB – Soro Fetal Bovino
SRLV – Small ruminant lentiviruses
SS – Soro sanguíneo
SS-Neg – Soro sanguíneo negativo
SS-Pos – Soro sanguíneo positivo
TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinases
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial
WB – Western Blotting
A - Ampere
CO₂ - Dióxido de carbono
% - Porcentagem
g – Grama
g/animal – Grama por animal

°C – Grau Célsius
kDa – Kilodalton
M - Molar
mL – Mililitro
mg – Miligrama
mM - Milimol
mg/mL – Miligrama por mililitro
nm - nanômetro
µg/µL – Micrograma por microlitro
V – Volts
W - Watt

RESUMO GERAL

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs) são um grupo de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais. São secretadas por pro-enzimas, e liberadas por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e pela membrana celular, podendo também ser ativadas por outras substâncias como as citocinas, quimiocinas, dentre outras, em resposta a uma variedade de estímulos, estando envolvidas nos processos patológicos como câncer e metástases, HIV, artrites, periodontites, doenças oftalmológicas, etc. Nesse contexto, as MMPs estão sendo investigadas como possíveis biomarcadores e sinalizadores de prognóstico na medicina humana. Em relação à medicina veterinária, estudos ainda são incipientes, em especial na espécie caprina. Objetivou-se nesse trabalho avaliar o comportamento e atividade das metaloproteinases no soro sanguíneo de caprinos experimentalmente infectados pelo vírus da CAE. Foram utilizados cinco reprodutores com idade média de 3 a 4 anos, os quais foram infectados pela cepa viral CAEV-Cork, título $10^{5,6}$ TCID₅₀/mL por via intravenosa. O sangue foi coletado através de punção da veia jugular e o soro sanguíneo obtido por centrifugação. As amostras foram coletadas antes da infecção (F1), e a cada semana pós-infecção, sendo a soroconversão detectada por Western Blotting (WB). Os géis de zimografia foram analisados através do software Gel Analyzer no qual foi possível identificar presença e ausência de bandas enzimáticas e calcular o valor do volume médio das bandas proteolíticas e sua intensidade (*pixels*). Analisando todas as fases, identificou-se as MMPs 9 e 2 e suas respectivas formas latentes, e a proMMP13. Analisando o perfil densitométrico de cada etapa, observou-se que antes da infecção os animais apresentaram baixa intensidade enzimática, indicando que as MMPs estão presentes nos animais sadios e desempenham funções fisiológicas inerentes ao desenvolvimento do organismo. Na fase da soroconversão (F2), pode-se observar comportamento enzimático diferente das MMPs quando comparado ao F1, já que houve maior intensidade enzimática frente à infecção. Na fase pós-soroconversão (F3) o perfil densitométrico do gel mostrou menor intensidade enzimática em relação à soroconversão e semelhante ao F1, levando-nos a sugerir que após a 23ª semana pós-infecção, as enzimas tendem a retornar ao seu ritmo de atividade normal. Em relação ao volume médio nas diferentes fases, observou-se maior volume da MMP-2 e de menor volume da MMP-9. Quanto às formas latentes, proMMP-2 e a proMM-9, foram produzidas apenas nas fases F1 e F3, controle e pós-soroconversão, respectivamente. A presença da proMMP-13 em todos os animais na F2 poderá ser um indicador da infecção devido ao seu comportamento de estimular a secreção das outras MMPs em caso de necessidade de defesa, pois nesta fase o organismo conseguiu detectar o vírus e iniciar a produção de anticorpos.

Palavras-chave: CAE, proteases, soro sanguíneo, zimografia

GENERAL ABSTRACT

The matrix metalloproteinases (MMPs) are a group of enzymes responsible for the degradation of extracellular matrix components and cells membranes. They are secreted by pro-enzymes, and released by neutrophils, monocytes, macrophages, fibroblasts and also by the cell membrane, and can also be activated by substances such as cytokines, chemokines, among others, in response to a variety of stimuli, being involved on pathological processes such as cancer and metastasis, HIV, arthritis, periodontitis, ophthalmological diseases, etc. In this context, they are being investigated as possible biomarkers and as prognostic signaling in human medicine. Regarding to veterinary medicine, studies are still incipient, especially in the caprine species. The objective of this study was to evaluate the behavior of metalloproteinases and their activities in blood serum of goats experimentally infected by CAE virus. Five animals with a mean age of 3 to 4 years were infected by the CAEV-Cork viral strain, titre $10^{5.6}$ TCID₅₀ / mL intravenously. Blood was collected by puncturing the jugular vein and the blood serum obtained by centrifugation. Samples were collected before infection (F1) and every week post-infection and the seroconversion detected by Western Blotting. It was identified in all groups the MMPs 9 and 2 and their respective latent forms, besides the proMMP-13. The gel densitometry analysis showed an enzymatic profile of each phase, in which the F1 showed low enzymatic intensity, indicating that MMPs are present in healthy goats and perform physiological functions inherent to the development of the organism. In the seroconversion phase (F2), it is possible to observe enzymatic different behavior of the MMPs when compared to F1, since there was a greater enzymatic intensity against the infection. In the post-seroconversion phase (F3) the densitometric profile of the gel showed lower enzymatic intensity in relation to the seroconversion (F2) and similar to F1, leading us to suggest that after the 23rd week of infection, the enzymes tend to return to their normal activity rhythm. In relation to the mean volume in the different phases, it was observed a larger volume of MMP-2 and a smaller volume of MMP-9. Concerning to latent forms, proMMP-2 and proMM-9, it were produced only in phases F1 and F3, control and post-seroconversion, respectively. The presence of proMMP-13 in all animals in F2 could be an indicator of the infection due to its behavior to stimulate the secretion of others MMPs in case of need of defense, once at this stage the organism was able to detect the virus and start the production of antibodies.

Keywords: CAE, proteases ,serum, zymography,

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A artrite encefalite caprina (CAE) é uma doença causada pelos Lentivirus de Pequenos Ruminantes (LVPRs) que acomete especialmente os rebanhos caprinos leiteiros. 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, pelo sêmen e transmissão vertical da matriz para o feto.

Dentre os mecanismos de proteção do organismo frente aos processos infecciosos, dois merecem destaque: a imunidade adquirida, que é aquela na qual o indivíduo recebe após ter tido contato com certo agente invasor ou microrganismos, produzindo antígeno, que por sua vez estimula a produção de imunoglobulinas ou anticorpos; e a proteção que já nasce com o indivíduo, sistema imune inato, no qual não há necessidade de um primeiro contato com substâncias ou estruturas exteriores ao organismo, pois este já reage imediatamente. Este mecanismo é acionado através de macrófagos, por meio da pele que funciona como uma barreira e por substâncias químicas nela encontradas, além de um complexo de proteínas. Dentre as proteínas destacam-se as proteases, e entre elas, as metaloproteinases (MMPs), que exercem papel importante nos processos fisiológicos como ovulação, espermatogênese e em processos infecciosos como nas doenças tumorais, odontológicas, diabetes e doenças virais, como por exemplo, o HIV.

As metaloproteinases consistem em um grupo de várias enzimas que são classificadas pela especificidade ao substrato e, principalmente, de acordo com a sua estrutura. As MMPs estudadas neste trabalho foram as formas ativas MMP-9 e MMP-2 e suas respectivas formas latentes (proMMP-9 e proMMP-2). Estas duas formas, cujas funções estão diretamente ligadas à remodelação da matriz extracelular, a formação de novos vasos sanguíneos, em processos de cicatrização e na formação de tecidos, foram recentemente encontradas em amostras de soro sanguíneo e plasma seminal de caprinos infectados cronicamente pela CAE.

Na medicina humana estas enzimas já estão em estudo avançado para monitoramento, controle e diagnóstico de doenças bacterianas, virais, diabetes, câncer e na sua progressão, entre outros. Como na medicina veterinária os estudos ainda são incipientes, este estudo visa conhecer o comportamento das MMPs em animais experimentalmente infectados pelo vírus da CAE, uma vez que esta doença ainda apresenta lacunas a serem esclarecidas quanto ao seu diagnóstico e patogenia.

O tema abordado será exposto e discutido ao longo de dois capítulos, nos quais serão estudados a presença e atividade das MMPs no soro sanguíneo de caprinos experimentalmente infectados pelo vírus da CAE e sua relação com a progressão inicial da doença. No capítulo I teremos considerações sobre a CAE, proteômica, metaloproteinases (MMPs) e zimografia. No capítulo II serão apresentados o comportamento das MMPs e suas relações com a CAE e definido o perfil zimográfico no soro sanguíneo de caprinos através da densitometria.

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

1. Artrite Encefalite Caprina

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença causada por um retrovírus tipo C da família *Lentivirinae* (RADOSTITS et al, 2002) antigenicamente relacionado com o vírus da Pneumonia Progressiva dos Ovinos (OPP) (PUGH, 2004). O vírus da CAE é envelopado, de cadeia simples de RNA, pertencente à família Retroviridae. Possui caráter infeccioso viral, com distribuição cosmopolita, acometendo caprinos de todas as idades, independente do sexo, raça e tipos de exploração (LARA, 2002).

O vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) foi descrito clinicamente pela primeira vez em 1959 na Suíça, quando caprinos adultos apresentaram artrite crônica (STÜNZI et al., 1964), posteriormente nos EUA o vírus foi isolado em amostras oriundas de caprinos por Cork et al. (1974), que identificaram a doença como uma leucoencefalomielite infecciosa de provável etiologia viral que se caracterizava por paralisia afebril em caprinos de um a quatro meses de idade. Em 1980 essa enfermidade, artrite encefalite caprina, foi reconhecida como virose ao observar caprinos adultos que apresentavam manifestações evidentes de artrite crônica, sendo assim seu agente incluso na família Retroviridae (CRAWFORD et al.,1980).

Na maioria dos casos estudados observa-se que a infecção pelo vírus da CAE é generalizada em raças de cabras leiteiras (PERETZ et al., 1993). Tal generalização tem sido atribuída à genética, práticas de manejo como administração de colostro e leite de uma única cabra para várias crias e também devido à introdução frequente de novos animais no rebanho. A maioria dos animais são infectados em tenra idade, entretanto, quando ocorrem manifestações clínicas, esses sinais se manifestam normalmente em estágios avançados da doença, facilitando a existência de portadores sadios que favorecem a disseminação do vírus no rebanho (SARDI et al, 2012).

A infecção já foi descrita em várias partes do mundo como Europa, África, Oceania e no Continente Americano, podendo ocorrer uma variação na soroprevalência entre países e dentro destes (RADOSTITS et al., 2002). No Brasil, o vírus foi constatado inicialmente no Rio Grande do Sul (MOOJEN et al., 1986). Na região Nordeste, o primeiro registro ocorreu no Estado do Ceará em animais de raças leiteiras no município de Sobral (PINHEIRO et al., 1989). Em um levantamento realizado por Melo e Franke (1997) a respeito da soroprevalência do CAEV em rebanhos leiteiros, foi observado na região metropolitana de Fortaleza-CE soroprevalência de 40,7%. Em outros estados da região Nordeste, pode-se observar prevalência de 13,40% na Bahia (ALMEIDA et al., 2003); 4,4% no Piauí (PINHEIRO et al.,

2001), de 11,0% no Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2005), de 50,6% no Maranhão (ALVES & PINHEIRO, 1997), e de 4,25% em Sergipe (MELO et al., 2003).

A principal via de transmissão acontece através da ingestão de colostro e leite contaminados, observando-se animais jovens infectados devido à presença de fêmeas positivas no rebanho (PINHEIRO et al., 2001; LARA et al., 2002; PREZIUSO et al., 2003). A transmissão também pode ser horizontal através do contato direto e prolongado dos animais com alimentos contaminados, água ou rações e forragens conspurcadas por secreções infectadas pelo vírus, fezes, salivas, secreções respiratórias, uso seriado de seringas, agulhas, tatuadores contaminados com sangue de caprinos infectados e secreções urogenitais (SMITH e SHERMAN, 1994). Nesse caso, o vírus é eliminado juntamente com secreções contendo monócitos/macrófagos, destacando-se aerossóis do trato respiratório (DAWSON, 1987; MOOJEN, 2001). Dentre as formas de transmissão conhecidas, estudos relatam que o sêmen pode ser contaminado pelo vírus que afeta diretamente os órgãos reprodutores ou pelo sangue e líquidos tissulares que o transportam para estes órgãos (HARE, 1985; THIBIER e GUÉRIN, 2000), tornando o sêmen um meio de transmissão do vírus. Geralmente lesões testiculares em animais infectados é um fator que influencia na presença do agente infeccioso (SOUZA, 2010).

Estudos comprovaram também a presença do vírus no sêmen em células não espermiáticas presentes no ejaculado de animais infectados e dentro do espermatozoide, representando risco para a transmissão viral, já que o sêmen é utilizado na monta natural ou nas biotecnias reprodutivas (ANDRIOLI et al., 1999; TRAVASSOS et al., 1999; PAULA et al., 2008).

A patogênese da CAE ainda não é totalmente compreendida. Estudos mostram que os macrófagos infectados com o vírus proveniente do colostro e do leite são absorvidos intactos através da mucosa intestinal, sendo a infecção posteriormente dispersada por todo o organismo através de células mononucleares infectadas. A replicação viral periódica e a maturação dos macrófagos induzem as lesões linfoproliferativas características nos tecidos alvos, tais como os pulmões, líquidos sinoviais, plexo coróide e úbere. A persistência do vírus da CAE no hospedeiro é facilitada pela sua capacidade de se tornar sequestrado como provírus nas células hospedeiras. A infecção induz uma forte resposta humoral e celular mediada pelo sistema imune (LOFSTEDT, 2014).

A evolução clínica da CAE é lenta e progressiva com um período de incubação longo, causando sintomas como artrite, mastite, encefalomielite e pneumonia intersticial

(CALLADO, 2001). O desenvolvimento, geralmente crônico, causa agravamento progressivo das lesões, perda de peso e debilidade, levando o indivíduo a morte, o que gera prejuízos aos rebanhos caprinos. Até o momento não existe tratamento ou vacina, sendo o diagnóstico a única forma de prevenção desta enfermidade (PINHEIRO et al., 2001, MARTINEZ et al., 2010).

A doença causa perdas na redução dos lotes de animais e do lucro, são perdas indiretas e ocorrem em decorrência da desvalorização dos rebanhos e devido às barreiras comerciais para produtos de multiplicação animal (matrizes, reprodutores, sêmen e embriões), dentre outras. De acordo com Brito (2009) e Carneiro (2011) a dispersão do CAEV vem causando aos rebanhos diminuição da vida produtiva, predisposição para infecções bacterianas, sobretudo na glândula mamária, crescimento deficiente e aumento da taxa de mortalidade das crias. Segundo Castro (1998), as perdas causadas pela CAE estão relacionadas com a prevalência da infecção, distribuição do efetivo caprino e sua organização produtiva.

A melhor forma de evitar as perdas e combater a doença seria detectando o vírus precocemente nos rebanhos (ALMEIDA et al., 2003), pois não existem vacinas disponíveis e método terapêutico eficaz. O controle seria a realização da sorologia a fim de identificar animais positivos, levando sempre em consideração fatores como soroconversão tardia, latência viral e latência sorológica (PINHEIRO et al., 2010). Caprinos podem ser considerados livres da doença quando apresentarem pelo menos dois resultados consecutivos de sorologia negativa com intervalo mínimo de seis meses (SANTA ROSA, 1996).

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).

O IDGA é recomendado pela OIE (Oficce International dês Epizooties), por ser de fácil aplicabilidade e não exigir equipamentos nem instalações sofisticadas, além de ser a forma de diagnóstico mais utilizado em todo mundo, principalmente em programas de controle da doença que já são empregados em vários países (MOOJEN, 2001).

O Elisa-i é usado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soroepidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (MADRUGA et al., 2001). O WB baseia-se na formação de um complexo antígeno-anticorpo que é visualizado por meio da aplicação de um conjugado enzimático, ao qual se adiciona um substrato que reage com a

enzima, dando cor à reação (BJERRUM e HEEGAARD, 1988). Apresenta como vantagem menor ocorrência de reações inespecíficas, o que reduz o aparecimento de resultados falso-positivos (ZANONI et al., 1989).

A PCR tem sido utilizada em alguns laboratórios de forma mais restrita, pois é ainda um teste caro, porém possui alta sensibilidade e especificidade, sendo indicado para animais de valor e para aqueles nos quais o resultado de outros testes não tenham sido conclusivos (RIET-CORREIA et al., 2001).

2. Agente Etiológico

Os lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) são retrovírus não oncogênicos, caracterizados por possuir longo período de latência no organismo animal sem que haja qualquer sinal clínico por meses ou anos (STRAUB, 2004), ocasionando enfermidades de curso progressivo como artrite encefalite caprina (CAE) em caprinos e Maedi-Visna (MV) em ovinos (ADAMS & CRAWFORD, 1980; PASICK, 1998). Também apresenta similaridade com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (QUINN et al., 2005)

O CAEV pertence ao gênero *Lentivirus*, da família Retroviridae, com tamanho entre 80-100 nm de diâmetro. Possui capsídeo cilíndrico e não icosaédrico diferenciando-o dos outros retrovírus. Seu material genético é composto de duas fitas simples de ácido ribonucléico (RNA) envolvido por um envelope derivado da membrana da célula hospedeira (LEROUX et al., 2010). O envelope viral é composto por uma dupla camada de lipídeos, nas quais são inseridas diversas glicoproteínas codificadas pelo vírus, além de uma grande quantidade de ácidos siálicos em sua superfície (HUSO et al., 1988). É essa quantidade de ácido que dificulta a ação dos anticorpos neutralizantes, o que ocasiona falha do sistema de defesa do hospedeiro, e esse mesmo fato, indiretamente, potencializa a infecção persistente (ADAMS et al., 1980).

A infecção pelo vírus ocorre principalmente pelas células do sistema monócito-fagocitário, sendo os macrófagos preferencialmente infectados, o que possibilita sua disseminação pelo organismo animal (LARA et al., 2005). Quando o vírus penetra nas células a partir do RNA viral ocorre a transcriptase reversa que gera o DNA de dupla fita (provírus) na qual irá integrar-se ao DNA cromossômico da célula hospedeira (DAWSON, 1987). Na primeira fase a replicação fica restrita, sem que haja a produção de proteínas e partículas virais, propiciando ao vírus período de latência nos monócitos dos hospedeiros sem ser detectado pelo sistema imune (PUGH, 2004; PAULA et al., 2008). Desta forma, monócitos

infectados que não expressaram o vírus são transportados até o cérebro, pulmões, articulações e outros órgãos, onde irão maturar para macrófagos ativando a expressão do gene viral, ocasionando a produção do vírus nestes órgãos (CLEMENTES et al., 1994).

3. Resposta imune e diagnóstico da CAE

Apesar de ocorrerem respostas imunológicas celulares e humorais específicas desenvolvidas pelos animais infectados frente ao vírus, não é possível prevenir a infecção persistente e muito menos a capacidade de transmissão do vírus através do animal durante toda a vida (DAWNSON, 1989), uma vez que a produção de anticorpos e sua concentração no sangue de um animal infectado são influenciadas por situações de estresse, condição alimentar, idade e presença de outras doenças (FRANKE, 1998). Além disso, observa-se que alguns animais infectados apresentam tardiamente anticorpos detectáveis por testes sorológicos (RIMSTAD et al., 1993).

A partir do momento que um animal é contaminado por um lentivírus, até que ocorra a soroconversão, existe um intervalo de tempo que pode variar de animal para animal, ocorrendo durante semanas, meses ou até anos, havendo ainda a possibilidade da sororeversão (HANSON et al., 1996). No entanto, na maioria dos casos, a partir da terceira semana pós infecção é possível detectar algum tipo de resposta imune relacionada contra a proteína do capsídeo (p25 ou p28) (HOUWERS e NAUTA, 1989) e produção de anticorpos de outros tipos de proteínas em torno da quinta semana (DE LA CONCHA-BERMEJILLO et al., 1995). Geralmente as imunoglobulinas da classe G (IgG) do tipo 1 e 2 são as comumente produzidas pelo organismo do animal infectado (OLIVEIRA, 2007).

O primeiro teste para usado para diagnóstico da CAE foi o Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA), o qual foi disponível por várias décadas, no entanto, os resultados não se mostraram acurados, sendo, portanto, adotados testes adicionais para detectar anticorpos para o CAEV, dentre eles os testes ELISA, WB e radioimunoensaio (RIA). Apesar da PCR identificar animais portadores de lentivírus caprinos antes da soroconversão, relatos mostram que após esta, o teste apresenta-se menos sensível quando comparada aos testes sorológicos, de forma que se recomende a associação de outros testes em um programa de monitoramento e controle da enfermidade (DE ANDRÉS et al., 2005; ANDRIOLI et al., 2006).

Novos estudos mostram que a proteômica pode vir a ser uma ferramenta que auxilia os testes já conhecidos, afim de possibilitar maior acurácia. Esse fato, pode ser observado no experimento realizado por Bezerra Jr. et al (2015), utilizando a zimografia em amostras de

soro sanguíneo de caprinos infectados cronicamente pelo CAEV, na qual foi possível observar elevada atividade de metaloproteinases do tipo 2 nas suas formas latentes e ativas sugerindo que a presença dessas enzimas no processo inflamatório em animais com e sem sintomatologia articular, pode ser utilizada como biomarcadores no monitoramento da infecção, e que a análise densitométrica dos zimogramas mostra ser uma ferramenta complementar na avaliação clínica do grupo estudado.

4. Proteômica

A proteômica visa caracterizar o conjunto de proteínas expressas em células, tecidos, e fluidos corporais em dado momento, sendo o equivalente proteico do genoma (WILKINS et al., 1996). Estudos já vêm sendo realizados desde o final da década de 1970, quando pesquisadores iniciaram a formação de bancos de dados de proteínas utilizando a técnica de eletroforese de gel bidimensional (O' FARREL, 1975). Esse estudo resultou na catalogação extensiva de manchas nos géis bidimensionais chamadas de “*spots*” para criar bancos de dados das proteínas expressas. Essa técnica é importante, pois permite estudar as proteínas, moléculas que controlam a maioria dos processos celulares que ocorrem em grande diversidade, podendo agir como enzimas, anticorpos, hormônios, componentes estruturais e receptores celulares (AEBERSOLD e MANN, 2003). Além disso, a técnica pode ajudar em testes de diagnósticos de algumas doenças, e já está avançada no diagnóstico de viroses, diabetes e câncer na espécie humana, embora nos animais os estudos ainda são incipientes.

Como a proteômica proporciona o estudo das proteínas expressas, dentre elas encontram-se as enzimas ou proteases, no caso em particular as Metaloproteinases (MMPs) que situam-se na matriz extracelular e estão envolvidas em processos fisiológicos e patológicos visando a remodelação das células. Portanto, a caracterização da resposta imune através da análise da atividade enzimática poderá contribuir para melhor conhecimento da ação do patógeno e da reação do hospedeiro frente ao agente infeccioso (PEREIRA, 2014).

5. Proteases

Os mediadores da resposta inflamatória são variados e dentre eles encontram-se as enzimas proteolíticas ou proteases, que em geral pode ser definida como uma enzima que hidrolisa ligações peptídicas. Elas, junto aos seus inibidores, desempenham papel-chave nos processos fisiológicos, como migração e sinalização celular, remodelação da superfície de

células e tecidos e também nas condições patológicas, como: cardiovascular e doenças neurodegenerativas, doenças artríticas, infecção e câncer, sendo assim de grande importância como potenciais alvos terapêuticos (PEREIRA, 2014).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) estas enzimas estão distribuídas em seis diferentes famílias, classificadas de acordo com a massa molecular, suas propriedades elétricas e sua especificidade ao substrato, destacando-se as metaloproteases, que envolvem as gelatinases (FREDERIKS e MOOK, 2004). As gelatinases atuam no processo de degradação e de síntese da matriz extracelular (MEC), estruturas que ocupam os espaços entre as células de um tecido, vindo a organizá-las, sendo, portanto, fundamentais nos processos de migração celular como locomoção das células dentro dos tecidos ou para outros tecidos. A MEC também se faz presente em processos fisiológicos e patológicos como ovulação, implantação do óvulo fertilizado, reparação de feridas, remodelação óssea, formação de cicatriz, e invasão de tumores e metástases (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993).

6. Metaloproteínas da Matriz (MMPs)

As Metaloproteínas da Matriz (MMPs) são um grupo de enzimas, endopeptidases, responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais. São secretadas por pro-enzimas, e liberadas por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos, podendo ser secretadas pelas células tumorais em resposta a uma variedade de estímulos (WOESSNER, 1991). Sua descoberta provavelmente aconteceu durante um experimento no ano de 1962, quando Gross e Lapière (1962) encontraram uma enzima ativa na cultura de fragmentos da pele de ratos, a qual degradou a tripla hélice do colágeno tipo I maduro.

A família das MMPs é composta de 24 proteínas divididas em colagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelinas (MMP- 3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) entre outras MMPs, representadas na figura 1 (VISSE et al., 2003). São classificadas pela especificidade ao substrato e de acordo com sua estrutura. Todas as MMPs contêm íons zinco (Zn^{++}) no sítio de ação catalítica e requerem íons cálcio (Ca^{++}) para sua estabilidade e atividade, sendo, por isso, denominadas enzimas metalodependentes (SOUZA e LINE 2002).

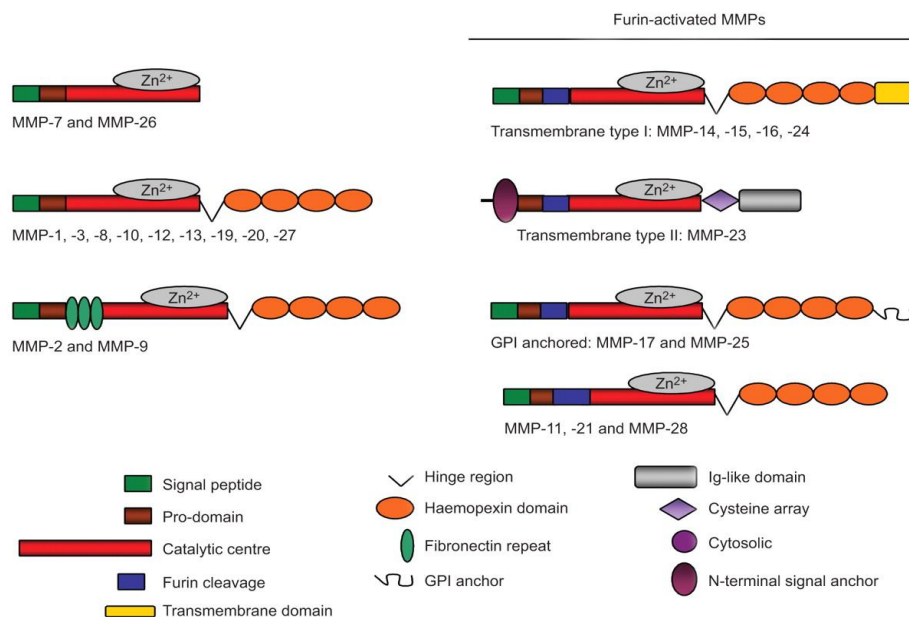


Figura 1: Classificação das MMPs de acordo com os sítios de ligação. Fonte: S. Loffek et al., (2011).

Em particular, as MMPs estão envolvidas na degradação da matriz extracelular (MEC) e atuam no controle regulatório em vários níveis, incluindo a transcrição, estabilidade do RNAm, a tradução, secreção, ativação de pró-enzimas, degradação e inibição, via endógena, pelos inibidores específicos conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinasas ou TIMPs (STETLER-STEVENSON et al., 2008). Atuam também em processos como a morfogênese, desenvolvimento tecidual, reparo tecidual e angiogênese (KÄHÄRI e SAARIALHO-KERE, 1997).

As gelatinases A (MMP- 2) e B (MMP-9) são dois membros intimamente relacionados da família MMP que degradam colágeno desnaturado ou gelatinas (VISSE et al., 2003). A MMP-2 e MMP-9 apresentam, respectivamente, peso molecular de 72 kDa na forma latente e 66 kDa na forma ativa e 92 kDa na forma latente e 83 kDa na forma ativa. A MMP-2 é capaz de degradar a gelatina, os colágenos dos tipos I, IV e V, a elastina e a vibronectina, sendo amplamente expressa nas células do tecido conjuntivo (STAMENKOVIC, 2000). Atua na migração celular, sendo responsável pela degradação direta da membrana basal (KLEIN et al, 2000). Já a MMP-9 é expressa quando ocorrem situações que necessitam da remodelação de tecidos, como no desenvolvimento, na cicatrização de feridas e na invasão tumoral (STAMENKOVIC, 2000; KLEIN et al., 2000).

Acredita-se que as MMPs atuam no desenvolvimento embrionário, na artrite, na angiogênese, na morfogênese, na reprodução, na reabsorção e na remodelação do tecido, no crescimento de tumores, na invasão progressiva, na metástase, através da quebra da MEC, nas

proteínas de superfície celular, nos fatores de crescimento de transformação, nas citocinas, e nas quimiocinas (WOESSNER, 1991). Essa participação em diversos eventos biológicos deve-se ao fato de que elas podem influenciar potencialmente o comportamento celular através de algumas ações, como clivagem de proteínas que fazem a adesão célula – célula, liberação de moléculas bioativas na superfície celular ou por clivagem de moléculas presentes na superfície celular, as quais transmitem sinais no ambiente extracelular (ARAÚJO et al., 2011).

Estas enzimas são controladas por meio dos inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). As TIMPs são proteínas pequenas e multifuncionais que regulam ambas as funções das MMPs. O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular, sendo possível a instalação de um processo patológico da matriz extracelular quando houver excesso de atividade das MMPs nos tecidos (OLLIVIER et al, 2007).

Existem quatro tipos de TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, com o tamanho aproximado de 23 kDa (SCHULZ, 2007). Estes se ligam às MMPs através da proporção molar estequiométrica 1:1 e, portanto, formam um sistema importante para o controle da atividade endógena das MMPs *in vivo*. Ao se ligarem às metaloproteinases, os TIMPs bloqueiam o sítio ativo, impedindo o acesso ao substrato específico (SPINALE et al., 2000).

A perda de controle da atividade das MMPs tem sido implicada no aparecimento de algumas doenças, tais como artrite reumatoide e osteoartrite (CAWSTON et al., 1996) e invasão tumoral (LIOTTA et al., 1991). Esses dados nos leva a acreditar que a presença das MMPs em processos inflamatórios em animais com e sem sintomatologia articular, pode ser utilizada como biomarcadores no monitoramento de infecções como as lentivirose.

7. MMPs no soro sanguíneo

A presença das MMPs no soro sanguíneo deve-se ao fato destas enzimas serem secretadas por componentes presentes do sistema circulatório e imunológico, tais como neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos, podendo também ser secretadas pelas células tumorais em resposta a uma variedade de estímulos (WOESSNER, 1991). Durante a fase de cicatrização, segundo Brown e Hook (1971), as proteases e colagenases são liberadas por células epiteliais, por fibroblastos e leucócitos e agem no sentido de remover células mortas e débeis.

Estudos têm comprovado a ação da MMP-9 como responsável pela liberação da forma biologicamente ativa do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual desempenha papel importante na angiogênese. Este processo, juntamente com a capacidade da enzima em realizar a degradação proteolítica da membrana basal, indica que a MMP-9 tem um papel importante na formação de novos vasos sanguíneos (KLEIN et al., 2011).

Bezerra Júnior et al. (2015) trabalhando com soro sanguíneo de reprodutores caprinos cronicamente infectados pela CAE na região Semiárida do Brasil, observaram atividade da pro-MMP-2 e MMP-2. Neste estudo, apenas um animal soropositivo apresentou artrite aparente, através da medição articular, mas com atividade das MMPs similares aos demais animais do grupo, o que sugere a existência de processo inflamatório em todos os animais estudados, evidenciado através da elevada atividade das MMPs no sangue.

8. Zimografia

Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliação das formas ativas e latentes de enzimas proteolíticas em amostras biológicas, entretanto, 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).

A zimografia é uma técnica eletroforética em gel desnaturante de poliacrilamida, copolimerizado com dodecil sulfato de sódio (SDS) e com o substrato preferencial da enzima em análise. A corrente elétrica usada possibilita a migração das MMPs no gel e sua separação pela diferença do tamanho molecular. Dependendo do substrato utilizado, diferentes MMPs podem ser especificamente detectadas (KUPAI et al., 2010).

Inicialmente a técnica foi desenvolvida usando gelatina como substrato para mensurar a atividade enzimática das gelatinases, as MMP-2 e MMP-9. Porém, protocolos que utilizam a caseína, por exemplo, podem detectar a presença da MMP-1, MMP-7, MMP-11, MMP-12 e MMP-13, e protocolos de colágeno detectam a MMP-1 e MMP-13, mas também das MMP-2 e MMP-9 (SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005; KUPAI et al., 2010).

A técnica zimográfica é composta por várias etapas, dentre elas pode-se destacar a desnaturação e inativação das MMPs no gel devido à presença do SDS durante a eletroforese. Após essa etapa, as enzimas são renaturadas através da lavagem do gel e retirada do SDS (FIETZ et al., 2008). A identificação das bandas ocorre pela diferença do peso molecular das

formas latentes e ativas através da coloração do gel. O resultado final corresponde à presença de bandas de atividade proteolíticas claras, que podem ser quantificadas, entre outras formas, por densidade dos *pixels* (LA ROCCA et al., 2004).

9. Referências Bibliográficas

- ADAMS, D.S.; CRAWFORD, T.B. CAE: viral arthritisencephalitis syndrome in goats. **International goat and sheep research**, v. 1(2), p. 168-172, 1980.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.
- ALMEIDA, N.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; FERREIRA, R.C.S. et al. Detecção de ovinos soropositivos para Maedi-Visna destinados ao abate na região metropolitana de Fortaleza. **Veterinária Notícias**, v. 9, p. 59-63, 2003.
- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R. Presença da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) no Estado do Maranhão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINARIA, 25.; CONGRESSO DE MEDICINA VETERINARIA DO CONE SUL, 2.; CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINARIA, 13., 1997, Gramado, RS. **A integração científica da medicina veterinária no Cone Sul: anais**. Porto Alegre: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 1997. p. 278. Resumo MVP 008.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; PINHEIRO, R.R. et al. Detecção do DNA pro-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 101-106, 1999.
- ANDRIOLI, A.; SOUZA, K.C.; PINHEIRO, R.R. et al. Protocolos para extração do DNA proviral e PCR do lentivírus caprino em sangue. **Comunicado Técnico Embrapa**, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/cot72.pdf>>. Acesso em: 16/11/2016.
- ARAÚJO, R.V.S et al. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.10, n.1, p.82-88, 2011.
- BEZERRA JÚNIOR, R.Q; ELOY, A.M.X; PERREIRA, E.P. et al. Avaliação das metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados. **Acta Scientiae Veterinariae**, 43:1258, 2015.
- BIRKEDAL-HANSEN, H; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.4, n.2, p.197-250, 1993.
- BJERRUM, O.J.; HEEGAARD, N.H.H. **Handbook of Immunoblotting of Proteins: technical descriptions**. Florida: CRC Press, 1988. 265p.
- BRITO, R. L. L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras**. 2009. 107 p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Vale do Acaraú, UVA, Sobral, Ceará.
- BROWN S.I., HOOK C.W., Treatment of corneal destruction with collagenase inhibitors. **Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology**, v. 75; p.1199-207, 1971.

- CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-Visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.21, p.87-97, 2001.
- CARNEIRO, F.F.D. **Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina**. 2011. 97 p. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Vale do Acaraú, UVA, Sobral, Ceará.
- CASTRO, R.S. **Lentivírus de Pequenos Ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas**. 1998. 132 p. Tese (Doutorado) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- CLEMENTES, J.E.; PAYNE, S.L. Molecular basis of the pathobiology of lentiviruses. **Virus Research**, v. 32, p. 97-109, 1994.
- CORK, L. C.; W. J. HADLOW; T. B. CRAWFORD; J. R. GORHAM; R. C. PIPER. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 129, n. 2, p. 134-41, 1974.
- CRAWFORD, T.B.; ADAMS, D.S.; CHEEVERS, W.P. et al. Chronic arthritis in goats caused by a retrovírus. **Science**, v. 207, n. 29, p. 713-719, 1980.
- CAWSTON, T.E. Metalloproteinase Inhibitors and the Prevention of Connective Tissue Breakdown. **Pharmacological Therapy**, v. 70(3), p. 163-182, 1996.
- DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. **The Veterinary Record**, v. 120, p. 451- 454, 1987.
- DE ANDRES, D.; KLEIN, D.; WATT, N. J. et al. Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 107(1-2), p. 49-62, 2005.
- DE LA CONCHA-BERMEJILLO, A.; BRODIE, S.J.; MAGNUS-CORRAL, S. et al. Pathologic and serological responses of isogeneic twin lambs to phenotypically distinct lentiviruses. **Journal of Acquired Immune Deficient Syndrome and Human Retrovirology**, v. 8, p. 116-123, 1995.
- FIETZ, S. et al. Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 3, p. 266-271, 2008.
- FRANKE, C.R. **Controle Sanitário da Artrite-Encefalite Caprina**. Salvador, Ed. EDUFBA 1998. 71p.
- FREDERIKS, W.M.; MOOK, O.R.F. Metabolic mapping of proteinase activity with emphasis on in situ zymography of gelatinases: Review and protocols. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 52, p. 711-722, 2004.

- GROSS, J.; LAPIÈRE, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 46, p. 1014-1022. 1962.
- HARE, W.C.D. Enfermedades transmissibles por el semen y las tecnicas de transferencia de embriones. Paris: **Office International des Epizooties**, 1985.
- HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSON, K. Along term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 37, p. 31-39, 1996.
- HOUWERS, D.J.; NAUTA, I.M. Immunoblot analysis of the antibody response to ovine lentivirus infections. **Veterinary Microbiology**, v. 19, p. 127-139, 1989.
- HUSO, L.D.; NARAYAN, O.; HART, W.G. Sialic acids on the surface of caprine arthritis-encephalitis virus define the biological properties of the virus. **Journal Virology**, v. 62, p. 1974-1980, 1988.
- KÄHÄRI, V.M.; SAARIALHO-KERE, V. Matrix metalloproteinases in skin. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 199-213, 1997.
- KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino Acids**, v. 41(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.
- 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.
- LARA, M.C.C.S.H.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; BIRGEL, E.H. Possibility of vertical transmission of Caprine Arthritis-Encephalitis Virus in neonate kids. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 4, p. 553 - 555, 2005.
- LA ROCCA, G. et al. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 7, p. 1414-1421, 2004.
- LEROUX, C.; CRUZ, J.C.M.; MORNEX, J.F. SRLVs: A genetic continuum of lentiviral species in sheep and goats with cumulative evidence of cross species transmission. **Current HIV Research**, v. 98, p. 94-100, 2010.
- LIOTTA, L.A.; STEEG, P.S.; STELLER-STEVENSON, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327-36, 1991.
- LOFSTEDT, J. **Overview of Caprine Arthritis and Encephalitis**. The Merck Manual Veterinary, 2014. Disponível em:<
http://www.boergoats4richardsandy.com/CAE_www.merckmanuals.com_caprine_.pdf>.
 Acesso em: 03/12/2016.

- MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- MARTINEZ, P.M.; COSTA, J.N.; SOUZA, T.S. et al. Sistemas de criação de ovinos e ocorrência de anticorpos contra o vírus da Maedi-Visna na Microrregião de Juazeiro - Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, p. 342-353, 2010.
- MELO, A.C.M.; FRANKE, C.R. Soroprevalência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina (CAEV) no rebanho de caprinos leiteiros da região da grande Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 113-117, 1997.
- MELO, C. P.; CASTRO, R. S.; OLIVEIRA, A. A.; FONTES, L. B.; CALLADO, A. K.; NASCIMENTO, S. A.; MELO, L. E. H.; SILVA, J. S. Estudo preliminar sobre a infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em ovinos e caprinos em Sergipe. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE BUIATRIA. **Sanidade, base da economia pecuária: programa final: livro de resumos**. Salvador: Associação Brasileira de Buiatria, 2003. p. 47.
- MOOJEN, V.; SOARES, H.C.; RAVAZOLLO, A.P. et al. Evidência de infecção pelo lentivírus (Maedi-Visna/artrite-encefalite caprina) em caprinos no Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**. UFRGS, v. 14, p. 77-78, 1986.
- MOOJEN, V. Maedi-visna dos ovinos, In: RietCorrea F., Schild A.L., Mendez M.D.C. & Lemos R.A.A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. 2 ed. Varela, São Paulo, p.138-144, 2001.
- O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.
- OLLIVIER, F.J.; GILGER, B.C, BARRIE, K.P. et al. Proteinases of the cornea and precocular tear film. **Vetinary Ophthalmol**, v. 10, p. 199-206, 2007.
- OLIVEIRA, M.M.M. **Diagnóstico e controle de lentivírus de pequenos ruminantes (LVPR) em caprinos**. 2007, 114 p. Tese (Pós-Graduação em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural do Pernambuco, UFRPE, Pernambuco.
- PASICK, J. Maedi-Visna Virus and Caprine Arthritis-Encephalitis Virus: Distinct species or quasispecies and its implications for laboratory diagnosis. Canadian. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 241-244, 1998.
- PAULA, N.R.O. **Parâmetros Clínicos, Hematológicos, Sorológicos e Reprodutivos em Reprodutores Natural e Experimentalmente Infectados com CAEV**. 2008. 193 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza.
- PEREIRA, P. E. **Caracterização das metaloproteinases (MMPs) no plasma seminal de caprinos sadios e infectados pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAE)**. 2014. 61f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Área de Reprodução Animal) - Universidade Vale do Acaraú, Sobral - CE.

- PERETZ, G.; ASSO, J.; DEVILLECHAISE, P.L.E. C.A.E.V: Revue des connaissances actuelles et conséquences pratiques. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 144(2), p. 93-98, 1993.
- PINHEIRO, R.R.; EGITO A.S.; SANTA ROSA J.; PINHEIRO A.A. Artrite-Encefalite Caprina Viral (CAEV). Embrapa-CNPC, Sobral, Ceará, 5p, (Comunicado técnico nº 19), 1989.
- PINHEIRO R.R.; GOUVEIA A.M.G.; ALVES F.S.F. Prevalência da infecção pelo vírus da Artrite-Encefalite Caprina no Estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, p. 449-454, 2001.
- PINHEIRO, R.R.; ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A.M.G.; ARAGÃO, M.A.C. et al. Avaliação de antígenos para o diagnóstico de lentivírus em rebanho caprino sob programa de controle. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 133-137, 2010.
- PREZIUSO, S.; SANNA, E.; SANNA, M.P. et al. Association of *Maedi visna* virus with *Brucella ovis* infection in rams. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, p. 151-157, 2003.
- PUGH, D.C. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 513 p.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. et al. Retroviridae. Grupo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes. In: **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 346-357 p.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1770 p.
- RIMSTAD, E.; EAST, N.E.; TORTEN, M. et al. Delayed seroconversion following naturally acquired caprine arthritis-encephalitis virus infection in goats. **Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1858-1862, 1993.
- SANTA ROSA, J. **Enfermidades em caprinos: diagnóstico, patogenia, terapêutica e controle**. Sobral: Brasília, 1996. 220p.
- SARDI, S.I.; SENA, G.S.R.; CAMPOS, G.S.; et al. Ocorrência de lentivírus de pequenos ruminantes no semiárido baiano e perfil da caprino/ovinocultura na região. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 13, n. 4, p. 494-503, 2012.
- SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: Rationale and therapeutic approaches. **Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 211-242, 2007.
- SILVA, J. B. A.; FAGUNDES NETO, C.; DANTAS, M. I. C.; BARRETO JÚNIOR, R. A.; SOUZA, C. H.; DIAS, R. V. C.; TEIXEIRA, M. F. S. Presença da artrite encefalite caprina em rebanhos caprinos da microrregião de Angicos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 15, n. 1, p. 53-56, 2005.

- SMITH, M.C.; SHERMAN, D.M. Caprine arthritis encephalitis. **Goat medicine**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.73-79, 1994.
- SNOEK-VAN BEURDEN, P.A.M.; VON DEN HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005.
- SOUZA, T.S.; COSTA, J.N.; MARTINEZ, P.M. et al. Anticorpos contra o vírus da língua azul em rebanhos ovinos da Microrregião de Juazeiro, Bahia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 419-427, 2010.
- De SOUZA, A.P.; LINE, S.R.P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v.10, n.1, p.1-6, jan./mar. 2002.
- SPINALE, F.G.; COKER, M.L.; BOND, B.R. et al. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. **Cardiovascular Research**, v. 46, n. 2, p. 225-238, 2000.
- STAMENKOVIC, I. Matriz metalloproteinases in tumor invasión and metastases. **Cancer Biology**, v. 10, p. 415-433, 2000.
- STETLER-STEVENSON, W.G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase independent biological activities. **Sci Signal**, v. 1, re6, 2008.
- STRAUB O.C. Maedi-Visna virus infection in sheep. History and present knowledge. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 1-5, 2004.
- STÜNZI H., BÜCH H.F., LE ROY H.L. & LEEMANN W. 1964. Endemische arthritis chronica bei Ziege. **Schweizer Archiv Fürur T-ierärkunden** 106:778-788.
- THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 233-251, 2000.
- TRAVASSOS, C.E.; BENOT, C.; VALAS, S. et al. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant**. v. 32, p. 101-106, 1999.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.
- WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; WILLIAMS, K.L. et al. Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, p. 830-838, 1996.
- WOESSNER J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The Faseb Journal**, v. 5, p. 2145-2154, 1991.
- ZANONI, R.; KREIG, A.; PETERHANS, E. Detection of antibodies to Caprine ArthritisEncephalitis Virus by protein G enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 580-582, 1989.

CAPÍTULO II

ANÁLISE ZIMOGRÁFICA DAS METALOPROTEINASES NO SORO SANGUÍNEO DE CAPRINOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS PELA CAE

RESUMO

A artrite-encefalite caprina (CAE) é uma enfermidade que acomete caprinos de qualquer raça, sexo e idade, possui extenso período de incubação e se enquadra no grupo dos Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR), causando prejuízos a caprinocultura, necessitando de vigilância epidemiológica constante devido à sua dispersão mundial. Algumas enzimas como as metaloproteinases têm sido estudadas na remodelação da matriz celular nos processos fisiológicos e patológicos, estando envolvidas em processos infecciosos virais e tumorais. Nesse contexto, estão sendo investigadas como possíveis biomarcadores. Objetiva-se nesse trabalho avaliar o comportamento das metaloproteinases e sua atividade no soro sanguíneo de caprinos experimentalmente infectados pelo vírus da CAE. Foram utilizados 5 reprodutores caprinos de raças leiteiras com idade variando de três a quatro anos, sendo a soronegatividade obtida após três testes consecutivos de Western Blotting (WB) e de Nested-PCR (PCRn) no sangue, com intervalo de 30 dias. Os animais foram infectados pela cepa viral CAEV-Cork, título $10^{5.6}$ TCID₅₀/mL por via intravenosa. O sangue foi coletado através de punção da veia jugular e o soro sanguíneo obtido por centrifugação. As amostras foram coletadas antes da infecção (F1) e, a cada semana pós-infecção. O PCR foi utilizado para comprovar se os animais eram livres da CAE e o WB para monitoramento da soroconversão através da detecção de anticorpos. Levando em consideração o tipo de enzima encontrado para cada fase (F1, F2 e F3) estudada, pode-se observar que na F1, antes da infecção, os cinco animais apresentaram as enzimas proMMP-9 e a MMP-2. Na fase da soroconversão (F2) as proteases encontradas foram as MMPs 2 e 9 e a proMMP-13 para todos os animais, sendo esta última presente apenas nos animais que soroconverteram pela primeira vez. No grupo da pós-soroconversão (F3), observa-se a presença das MMPs 2 e 9 e suas respectivas formas latentes. Sugere-se que a atividade enzimática no soro sanguíneo mostrou um comportamento padrão que poderá ser utilizado como referência em animais recentemente infectados, além de ressaltar a presença da proMMP-13. Conclui-se, portanto, que a atividade enzimática das MMPs poderá vir a ser uma ferramenta complementar no diagnóstico da CAE em infecções recentes.

Palavras-chaves: lentivírus, MMPs, pequenos ruminantes, proteômica, zimografia

ABSTRACT

Caprine arthritis encephalitis (CAE) is a disease that affects goats of any breed, sex and age, having an extensive incubation period. It's classified in the Small Ruminant Lentivirus (LVPR) group, causing losses to goat breeding, requiring epidemiological constant surveillance due to its worldwide dispersion. Some enzymes such as metalloproteinases (MMPs) have been studied in the remodeling of the cellular matrix involved in the physiological and pathological processes, being activated in viral and tumor infectious processes. The objective of this study was to evaluate the behavior of metalloproteinases and their activity in blood serum of goats experimentally infected by CAE virus. Five goats from dairy herds aging three to four years old were used, and the seronegativity to CAEV was obtained after three consecutive Western Blotting (WB) and Nested-PCR (PCRn) tests in the blood, at 30-day interval. The animals were infected by CAEV-Cork virus strain, titer $10^{5.6}$ TCID₅₀ / ml intravenously. Blood was collected by puncturing the jugular vein and the blood serum obtained by centrifugation. Samples were collected before infection (F1) and every week post-infection. PCR was used to identify whether the animals were free from CAE and WB for monitoring seroconversion through antibody detection. In the phase 1, before infection, the animals presented the enzymes proMMP-9 and MMP-2; in the seroconversion phase (F2) it were found the proteases MMPs 2 and 9 and proMMP-13 for all animals, being the last one only present in the animals that seroconverted for the first time. In the post-seroconversion phase (F3), it were observed the presence of MMPs 2 and 9 and their respective latent forms. It is suggested that enzymatic activity in blood serum showed a standard behavior that could be used as reference in infected animals, and in addition to highlighting the presence of proMMP-13. It is concluded, therefore, that MMPs activity may be used as a tool to complement the diagnosis of CAE in recent infections.

Keywords:, lentivirus, MMPs, proteomics, small ruminants, zymography,

1. INTRODUÇÃO

A Artrite Encefalite Caprina (CAE) é uma doença causada por lentivírus de pequenos ruminantes (“Small Ruminant Lentiviruses” - SRLV) e tem sido responsável pela perda de reprodutores e matrizes de alto valor genético. Para caprinocultores a presença de animais assintomáticos está diretamente ligada à baixa produtividade, representando uma séria ameaça à sanidade dos rebanhos. Por outro lado, o sacrifício dos animais é inviável, levando-se em consideração os prejuízos econômicos pela perda de produção e genética (PINHEIRO et al., 2004).

Para tentar evitar esse prejuízo e como alternativa de diagnóstico e controle da CAE, a proteômica surge como uma ferramenta avançada, estudando moléculas envolvidas na reação do sistema imune inato frente às infecções causadas por bactérias e vírus, estudos esses já avançados na espécie humana. Também possibilita caracterizar conjuntos de proteínas e proteases expressas em um dado momento, além de complementar os estudos sobre a biologia molecular das células (WILKINS et al., 1996). As metaloproteinases são enzimas zinco dependentes ligadas a processos fisiológicos e patológicos no organismo animal. Elas se encontram expressas naturalmente em processos como embriogênese, ovulação, angiogênese, espermatogênese, etc, como também em patologias como câncer e metástases, diabetes, HIV, periodontites, sendo portanto, muito explorada na medicina humana. As metaloproteinases estão sendo alvo de estudos pela comunidade científica desde 1990. Daí em diante, de acordo com Zitka et al. (2010), houve uma ascensão dos estudos, em especial na espécie humana, vindo a serem publicados até 2010, em torno de 4500 artigos.

Dentre as proteases expressas, destacam-se as Metaloproteinases da Matriz (MMPs) que participam como mediador do processo inflamatório, viabilizando, desta forma, o monitoramento e o prognóstico de doenças, podendo vir a ser potenciais biomarcadores para complemento do diagnóstico de infecções, assim como ser o elo para descobrir possíveis antivirais. Portanto, o objetivo deste trabalho foi conhecer o comportamento das MMPs no soro sanguíneo de caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da CAE.

2. MATERIAL e MÉTODOS

2.1 Período e Local

O estudo foi conduzido na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no Município de Sobral, na região Norte do Estado do Ceará. A Região está situada a 111 metros de altitude, 3°45'0,5" de latitude sul e 40°20'45,8" de longitude Oeste. O experimento foi realizado nos meses de setembro de 2015 a agosto de 2016.

2.2 Animais experimentais

Foram utilizados 5 reprodutores caprinos de raças Saanen e Anglo Nubiano com idade variando de três a quatro anos, sendo a soronegatividade obtida após três testes consecutivos de Western Blotting (WB) e de Nested-PCR (PCRn) no sangue, com intervalo de 30 dias. Todos os animais apresentavam bom estado de saúde, de acordo com exame clínico geral realizado segundo Diffay et al., (2005). Os mesmos foram mantidos durante todo o período experimental (270 dias) em regime intensivo de produção, alojados em baias coletivas de um aprisco parcialmente coberto localizado com orientação leste/oeste, e recebendo concentrado (300 g/animal) e volumoso a base de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) picado fornecidos no cocho, além de água e sal mineral *ad libitum*.

O experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, sendo submetido e aprovado no dia 17 de dezembro de 2014 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA UVA, recebendo o número de protocolo 001.04.013.UVA.505.01.

2.3 Inoculação Viral

Os reprodutores selecionados e livres do CAEV foram inoculados com um mililitro de Meio Essencial Mínimo (MEM) contendo a cepa viral CAEV-Cork, título $10^{5,6}$ TCID₅₀/mL, por via intravenosa, havendo daí em diante, acompanhamento semanal através do WB até a soroconversão. O preparo do inóculo viral foi realizado no Laboratório de Virologia, segundo Guedes (1999), utilizando-se amostra viral padrão (CAEV-Cork), replicadas em células de membrana sinovial caprina (MSC), e obtidas por explantação. Os sobrenadantes desses cultivos celulares inoculados foram titulados em microplacas, por diluições decimais em MEM com 2% de soro fetal bovino (SFB), usando-se oito repetições (poços) por diluição. Em cada poço distribuiu-se 50µL da diluição viral e, após uma hora de incubação a 37°C em 5% de atmosfera de CO₂, foram adicionados 50µL da suspensão de células de MSC. Aos quatorze dias pós-inoculação,

obteve-se o título segundo a técnica de Reed & Muench (1938) e calculada a dose infectante com a titulação viral de $10^{5,6}$ TCID₅₀/mL.

2.4 Coleta de Sangue

As coletas de sangue foram feitas por punção da veia jugular utilizando-se sistema vacutainer®, em tubos de 10 mL sem anticoagulante, e em seguida, centrifugado por 10 minutos à 3000x g, a fim de separar o soro, que foi devidamente armazenado em tubos eppendorf® de 2,5 mL e estocado em freezer a -20 °C para serem usados nos testes.

2.5 Experimento

Antes da inoculação viral foram realizadas duas coletas e após a inoculação 27 coletas semanais, as quais foram utilizadas no experimento. Foram realizados nove géis utilizando a técnica de zimografia, de acordo com o resultado do WB. Após os resultados obtidos distribuiu-se as amostras em três etapas ou fases:

- **Pré-infecção (F1):** amostras coletadas uma semana antes da inoculação viral;
- **Soroconversão (F2):** terceira semana após inoculação viral, correspondendo à primeira soroconversão para todos os animais.
- **Pós-soroconversão (F3):** vigésima terceira semana após inoculação viral, independente de soroconversão.

2.6 Testes laboratoriais

2.6.1 Quantificação das proteínas totais do soro sanguíneo

A concentração proteica foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G250* às proteínas, com formação de coloração azul. A presença de proteínas foi observada através de espectrofotômetro FP-901 (*Chemistry Analyser Labsystems*) pelo método de absorvância, utilizando-se o comprimento de onda de 595 nanômetros (nm), em triplicata, usando a albumina sérica bovina (BSA) para criar uma curva padrão. Esta curva também chamada de curva analítica de calibração, foi construída a partir de solução padrão, com concentrações conhecidas (0, 3,5,8,10,13,18,15,20 mg) de BSA. Portanto, a quantificação da concentração de proteínas totais do soro sanguíneo foi obtida com o cruzamento dos dados obtidos no espectrofotômetro com os da curva.

2.6.2 Zimografia

Para realização da zimografia as amostras do soro sanguíneo foram solubilizadas em tampão de amostra de forma que a concentração final fosse $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$, utilizando assim alíquotas de $10\mu\text{L}$ em cada poço do gel. Utilizou-se gel de poliacrilamida a 12,5%, polimerizados com gelatina, (2 mg/mL), segundo protocolo descrito por Kupai et al. (2010) e, submetidas à eletroforese (170V; 1A; 300W) por um tempo que varia de 50 minutos a 1 hora e 10 minutos (adaptado de LAEMMELI, 1970).

Após a corrida eletroforética, os géis foram lavados por 40 minutos em solução de Triton X-100 2,5% e, posteriormente, incubados por 20 horas a 37°C em solução de tampão contendo 50 mM Tris HCl, 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl_2 . Após esse período, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue-G a 0,25% por 2 horas e, posteriormente, descorados com solução contendo etanol a 30%, ácido acético a 7,5% em água Milli-Q por 30 minutos. Como resultado desse processo tem-se um gel corado onde é possível observar bandas claras, indicativas da atividade gelatinolítica das proteases presentes no soro sanguíneo de caprinos.

Os géis tiveram suas imagens escaneadas e foram avaliados através do Doc-IT® LS Image Analysis Software 6.0. Como padrão, utilizou-se o *LMW-SDS* marker kit (*GE Healthcare* - 94: fosfolipase b; albumina sérica bovina: 67; ovalbumina: 43; anidrase carbônica: 30; inibidor de tripsina de soja: 20,1; lactoalbumina: 14,4) para calibração da eletroforese. Através desse *software*, foram analisados os pesos moleculares. Para avaliação dos picos densitométricos e volume médio (*pixels*) utilizou-se o *software* Gel Analyzer versão 2010.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se a análise estatística descritiva, analisando-se a presença e ausência de bandas enzimáticas nos géis. O valor do volume médio e a intensidade (*pixels*) para cada enzima foi obtida através do *software* Gel Analyzer versão 2010.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do WB foi possível observar no soro dos animais experimentalmente infectados a primeira soroconversão na terceira semana pós-inoculação viral (Tabela 1). Na pós-soroconversão, mais precisamente na 23ª semana de coleta, observou-se que apenas um animal apresentou resultado negativo para a CAE, enquanto os outros continuaram soropositivos.

Hanson et al. (1996) observaram que a partir da infecção natural pelo lentivírus até a ocorrência da soroconversão, existe um intervalo de tempo que pode variar de animal para animal, ocorrendo durante semanas, meses ou até anos, havendo ainda a possibilidade da sororeversão. Segundo Morpeth et al., (2006), a maioria dos casos de indivíduos infectados pelo HIV tendem a soroconverter dentro de três semanas, embora casos muito raros sejam relatados de que a soroconversão não ocorra por até um ano. Essa variação quanto à soropositividade ocorre pelo fato de que o vírus da CAE apresenta tropismo por monócitos e macrófagos, que funcionam na replicação viral e como meio de distribuição. A “replicação restrita” permite que o vírus permaneça em latência nos monócitos do hospedeiro e não seja detectável pelo sistema imune (PUGH, 2004).

Tabela 1. Resultados do WB nas diferentes fases experimentais no soro sanguíneo de reprodutores caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV).

Fases	Animal				
	1	2	3	4	5
PRÉ-INFECÇÃO	-	-	-	-	-
SOROCONVERSÃO	+	+	+	+	+
PÓS-SOROCONVERSÃO	+	-	+	+	+

O presente estudo identificou nos caprinos experimentalmente infectados pelo vírus da CAE, a presença das formas ativas MMP-2 (64-66 kDa) e MMP-9 (80-84 kDa), assim como suas respectivas formas latentes proMMP-2 (72-75 kDa) e proMMP-9 (92 kDa), além da proMMP-13 (48 kDa). Estas enzimas podem ser visualizadas nas áreas claras do gel indicando seu processo proteolítico (Figura 2; A, B e C). Em humanos esses achados foram vistos por BAUMAN et al., (2002); SEABRA, 2006, TENTES et al., (2007), em ratos (DALMOLIN et al., 2007; BELHONICE et al., 2010) e em cães (SAENGSOI et al., 2011). Apesar das formas de MMPs citadas, encontrou-se também enzimas de maior peso molecular que não foram estudadas em virtude da escassez de dados. Esse trabalho, portanto, dedicou-se

ao estudo das MMPs já conhecidas. Também Bezerra e colaboradores (2015) encontraram enzimas de alto peso molecular em caprinos cronicamente infectados pela CAE.

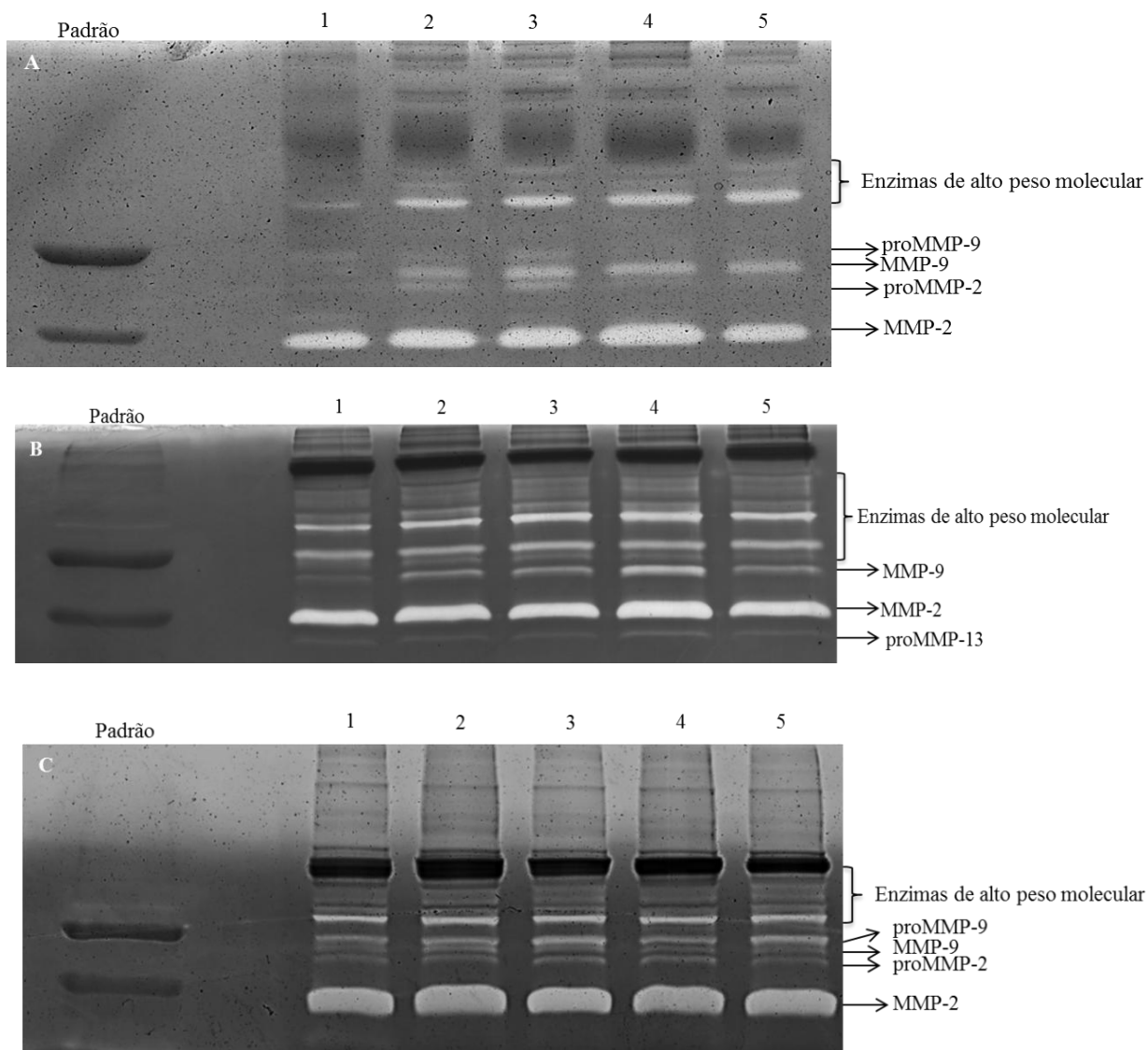


Figura 2. Atividade enzimática das metaloproteínas no soro sanguíneo de caprinos experimentalmente infectados pela CAE. (A) Pré-infecção (F1); (B) Soroconversão (F2), (C) Pós-soroconversão (F3); (1-5) corresponde aos animais experimentais. Como padrão, utilizou-se o LMW-SDS marker kit (GE Healthcare - 94: fosfolipase b; albumina sérica bovina: 67; ovalbumina: 43; anidrase carbônica: 30; inibidor de tripsina de soja: 20,1; lactoalbumina: 14,4) para calibração da eletroforese.

Levando em consideração o tipo de enzima encontrado para cada etapa experimental, pode-se observar que na F1, controle, os cinco animais apresentaram as enzimas proMMP-9 e a MMP-2. Já a enzima MMP9 esteve presente em três animais e a proMMP-2 apenas em um animal (Tabela 2), sugerindo que as MMPs 2 e 9 e suas respectivas formas latentes participam de processos fisiológicos em caprinos saudáveis.

Tabela 2. MMPs observadas no grupo controle através da zimografia em amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprinos (CAEV).

FASE PRÉ-INFECCÃO (F1)					
ANIMAL	1	2	3	4	5
MMPs	ProMMP-9	proMMP-9	ProMMP-9	ProMMP-9	ProMMP-9
	MMP-9	MMP-9	MMP-9	-	-
	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2
	-	-	ProMMP-2	-	-

A atividade das diferentes formas de MMPs na F1 pode ser explicada pelo fato de que essas enzimas proteolíticas são controladas por mecanismos distintos, e sua forma ativa ou latente poderá ser desencadeada por fatores que envolvem a membrana celular de células normais ou células tumorais (BUTLER et al, 1997; UENO et al, 1997). Como exemplo desse mecanismo, Edwards et al, (1996) observaram que a proMMP-9 é controlada principalmente ao nível da expressão do gene, sendo a sua transcrição ativada por mediadores inflamatórios.

Ao contrário da fase pré-infecção, na F2, soroconversão, as proteases encontradas foram as MMPs 2 e 9 e a proMMP-13 para todos os animais (Tabela 3). Esses resultados levam a supor que a ausência das latentes proMMP-2 e 9 sejam indícios de que houve transformação destas em formas ativas MMP-2 e 9 devido ao processo infeccioso causado pelo vírus na fase inicial de produção de anticorpos pelo hospedeiro. Elkington et al, (2005), afirmam que embora não provado *in vivo*, é provável que a migração de todas as células inflamatórias exija a atividade das MMPs. Além deste importante achado, observou-se a presença da proMMP-13 em todos os animais, pro-enzima esta vinculada a ativação da maioria das MMPs entre elas, as gelatinases.

Tabela 3. MMPs observadas na primeira soroconversão através da zimografia em amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV).

FASE SOROCONVERSÃO (F2)					
ANIMAL	1	2	3	4	5
MMPs	MMP-9	MMP-9	MMP-9	MMP-9	MMP-9
	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2
	ProMMP-13	ProMMP-13	ProMMP-13	ProMMP-13	ProMMP-13

A prevalência das MMPs 2 e 9 na soroconversão ocorre porque essas proteases são moléculas que têm papel-chave no processo inflamatório e estão envolvidas na remodelação

fisiopatológica da parede vascular (HU et al., 2007; KUZUYA et al.,2002). Estudos têm comprovado a ação da MMP-9 como responsável pela liberação da forma biologicamente ativa do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual tem um papel essencial na angiogênese. Este processo, juntamente com a capacidade da enzima em realizar a degradação proteolítica da membrana basal, indica que a MMP-9 tem um papel importante na formação de novos vasos sanguíneos (KLEIN et al., 2011). Ela também é expressa quando ocorrem situações que necessitam da remodelação de tecidos, como na cicatrização de feridas e na invasão tumoral (STAMENKOVIC, 2000; KLEIN et al., 2011). A MMP-2, por sua vez, é capaz de degradar a gelatina, os colágenos dos tipos I, IV e V, a elastina e a fibronectina e é amplamente expressa nas células do tecido conjuntivo (STAMENKOVIC, 2000). Atua na migração celular, sendo responsável pela degradação direta da membrana basal (KLEIN et al, 2011).

Quanto a presença da proMMP-13 em todos os animais na primeira soroconversão, sugere que pelo fato desta derivar de células ósseas ou epiteliais, e poder atuar como mediadora na ativação das outras MMPs a partir do momento em que ela é produzida (THOMPSON e LOFTUS, 2002). Essa colagenase é capaz de modificar uma grande quantidade de proteínas extracelulares e gerar degradação e remodelação de tecidos lesados, atuando principalmente nas camadas de revestimento sinovial, e nas células de cartilagem em tecidos sinoviais (IWAMOTO et.al, 2011). Além disso, mostram-se envolvidas com o aumento à susceptibilidade ao câncer (GAO et. al., 2014), em doenças como a artrite reumatoide (YE, 2007), doença arterial coronariana (VASKU et. al., 2012), doença da aorta abdominal (SARACINI et. al., 2012) e cárie dental (TANNURE et. al., 2012).

Em relação a fase pós-soroconversão (F3), observa-se a presença das MMPs 2 e 9 e suas respectivas formas latentes (Tabela 4). Portanto, sugere-se que após a primeira soroconversão as MMPs tendem a diminuir a intensidade da transcrição da latente para ativa, mostrando-se naturalmente como elas se apresentam em animais saudáveis. A tabela também mostra ausência da proMMP-13, levando a supor que após a primeira soroconversão, quando ocorre o decréscimo da produção de anticorpos, não haveria mais necessidade da proMMP-13 recrutar mais enzimas em suas formas ativadas.

Tabela 4. MMPs observadas na fase pós-soroconversão através da zimografia em amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos infectados experimentalmente pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV).

FASE PÓS-SOROCONVERSÃO (F3)					
ANIMAL	1	2	3	4	5
MMPs	ProMMP-9	ProMMP-9	ProMMP-9	ProMMP-9	ProMMP-9
	MMP-9	MMP-9	MMP-9	MMP-9	MMP-9
	ProMMP-2	ProMMP-2	ProMMP-2	ProMMP-2	ProMMP-2
	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2	MMP-2

Apesar do animal 2 ser diagnosticado como negativo no WB (vide tabela 1), ele apresenta as mesmas MMPs dos animais soropositivos. Esses achados sugerem que a soronegatividade ao teste WB não interfere na atividade do sistema imune inato que continua sua atividade enzimática independente da produção de anticorpos pelo organismo.

A não detecção de anticorpos nesse animal através do WB, aliado ao fato da literatura reportar intermitência de resultados negativos e positivos em amostras de soro sanguíneo de um mesmo animal (PINHEIRO et al., 2006; PETERSON et al., 2008), pode ser justificada pela ocorrência de “replicação restrita” permitindo ao vírus sua permanência em latência nos monócitos do hospedeiro, não sendo detectável pelo sistema imune (PUGH, 2004), provavelmente produzindo pouco ou não produzindo anticorpos. Nesse caso a técnica de zimografia poderia servir como complemento aos testes sorológicos de diagnóstico da CAE, vindo a contribuir para maior acurácia no controle da doença.

De um modo geral, observa-se nas fases estudadas variações quanto ao comportamento das MMPs. Esse mecanismo ocorre porque os tipos e quantidades expressas dessas enzimas variam de acordo com os tipos e estágio das doenças, neoplasias e inflamações, e dos tipos celulares, já que todo tecido possui matriz extracelular que necessita das MMPs para catalizar os fenômenos fisiológicos e também os processos patológicos que precisam de remodelação tecidual (PARKS et. al, 1998). Além disso, o fato de se encontrar formas latentes e ativas, diz respeito ao seu mecanismo de ação, pois para cada forma ativada é preciso a presença de uma forma latente. Desta forma, a proMMP-13 poderá ter sido responsável pela ativação das outras enzimas. Portanto, sugere-se que a presença da forma latente poderá ser usada como um biomarcador no monitoramento da CAE.

A análise densitométrica representada na figura 3 A, B, C e D mostra o comportamento das enzimas nos três grupos, em forma de picos densitométricos (*pixels*),

observando-se que houve maior intensidade da MMP-2, e que esta se manteve ativada e expressiva quando comparada as outras enzimas encontradas. Tendo em vista a função dessa enzima, estudos mostram que a gelatinase A e outros grupos de metaloproteinases como a estromelisina e a colagenase estão presentes normalmente no estroma corneal de humanos e aumentam gradualmente por vários meses, demonstrando o envolvimento na remodelação tecidual (SIVAK et al,2002). Este achado pode justificar a alta atividade dessa protease nas amostras de soro sanguíneo para todos os animais em todas as fases demonstrando sua atividade contínua.

Comparando as três fases, a pré-infecção (F1) apresentou baixa intensidade enzimática, indicando que as MMPs estão presentes nos animais sadios e desempenham funções fisiológicas inerentes ao desenvolvimento do organismo. Na fase da soroconversão (F2), pode-se observar comportamento enzimático diferente das MMPs quando comparado a F1, já que na primeira soroconversão tem-se maior intensidade enzimática. Na pós-soroconversão (F3) o perfil densitométrico do gel mostrou menor intensidade enzimática em relação à fase de soroconversão e semelhante a fase controle, levando-se a crer que após a 23^a semana pós-infecção, as enzimas tendem a retornar seu ritmo de atividade normal.

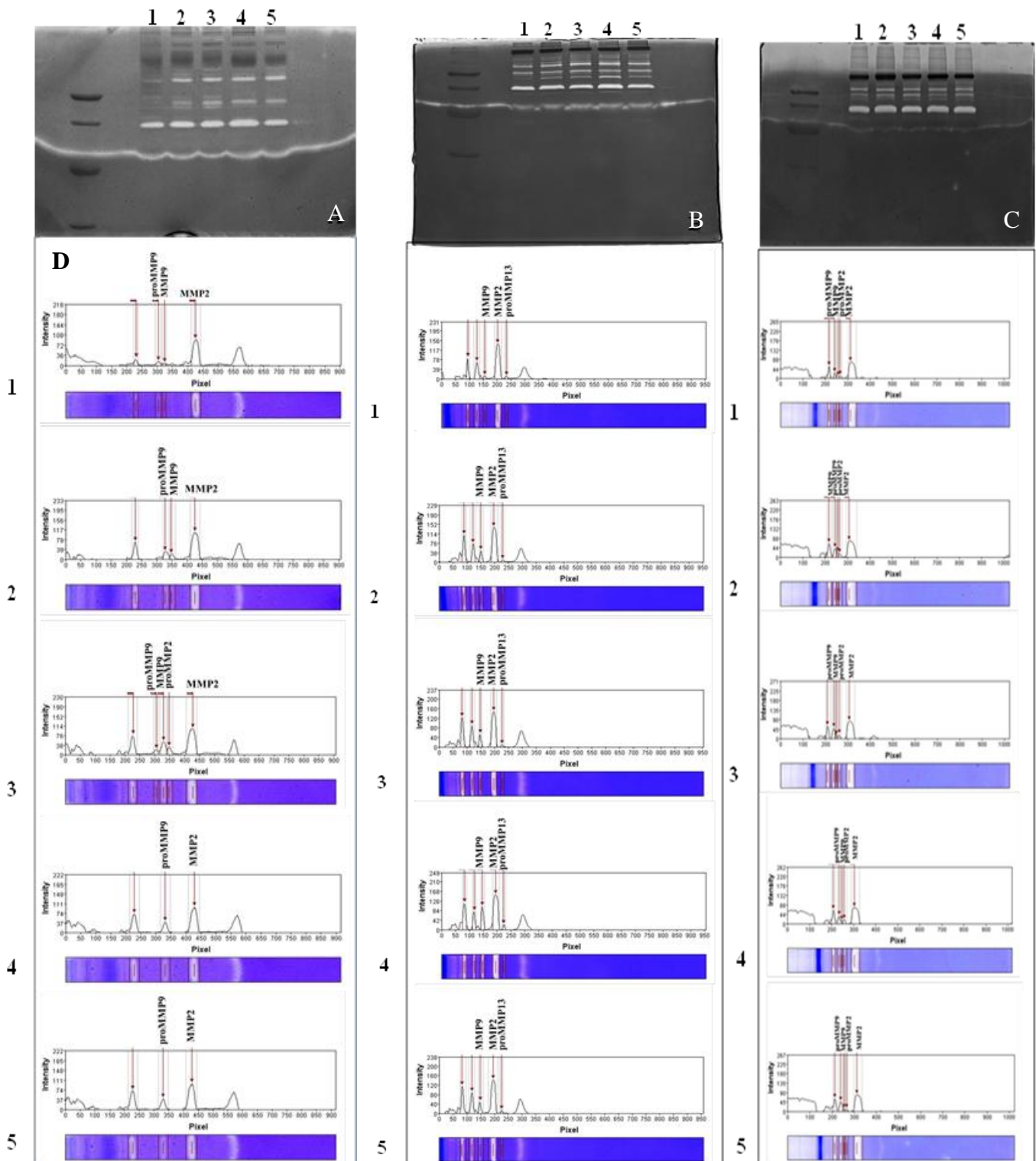


Figura 3. Análise densitométrica das proteases presentes no soro sanguíneo de caprinos nas fases pré-infecção (F1), soroconversão (F2) e pós-infecção (F3) experimentalmente infectados pela CAE. Na figura A estão as bandas digeridas pelas gelatinases em gel de poliacrilamida 12,5% mostrando a atividade das MMPs (bandas claras); n fase pré-infecção (B) a atividade das MMPs no grupo de soroconversão e C a atividade das MMPs no grupo pós-soroconversão. Em D, representação esquemática do perfil densitométrico das proteases. Os números de 1 a 5 referem-se às amostras de soro sanguíneo de diferentes animais. Padrão utilizado com pesos (97, 66, 45 e 30kDa).

Analisando o volume médio das enzimas detectadas nos géis de zimografia, tem-se um painel da distribuição das MMPs e proMMPs ao longo da infecção. É notório que a enzima de maior volume é a MMP-2 e de menor volume a MMP-9. Levando em consideração suas funções, elas são responsáveis pela retirada das camadas celulares e remodelação ou limpeza das células localizadas, respectivamente, sugerindo que estejam em equilíbrio uma vez que trabalham como parceiras. Klein et al, (2000) afirmam que a MMP-2 atua na migração celular, sendo responsável pela degradação direta da membrana basal. Já a MMP-9 é expressa quando ocorrem situações que necessitam da remodelação de tecidos, como na cicatrização de feridas e na invasão tumoral (STAMENKOVIC, 2000; KLEIN et al., 2000). Para as formas latentes, nota-se que a proMMP-2 e a proMMP-9 foram produzidas apenas nas fases controle e pós-soroconversão, possivelmente por elas estarem se transformando nas formas ativas MMP-2 e MMP-9 que estão em alta nestas fases. Quanto a presença da proMMP-13 em todos os animais na F2, mas com volume médio baixo, poderá ser um indicador da infecção pelo vírus devido ao seu comportamento na ativação do sistema imunoinato na soroconversão.

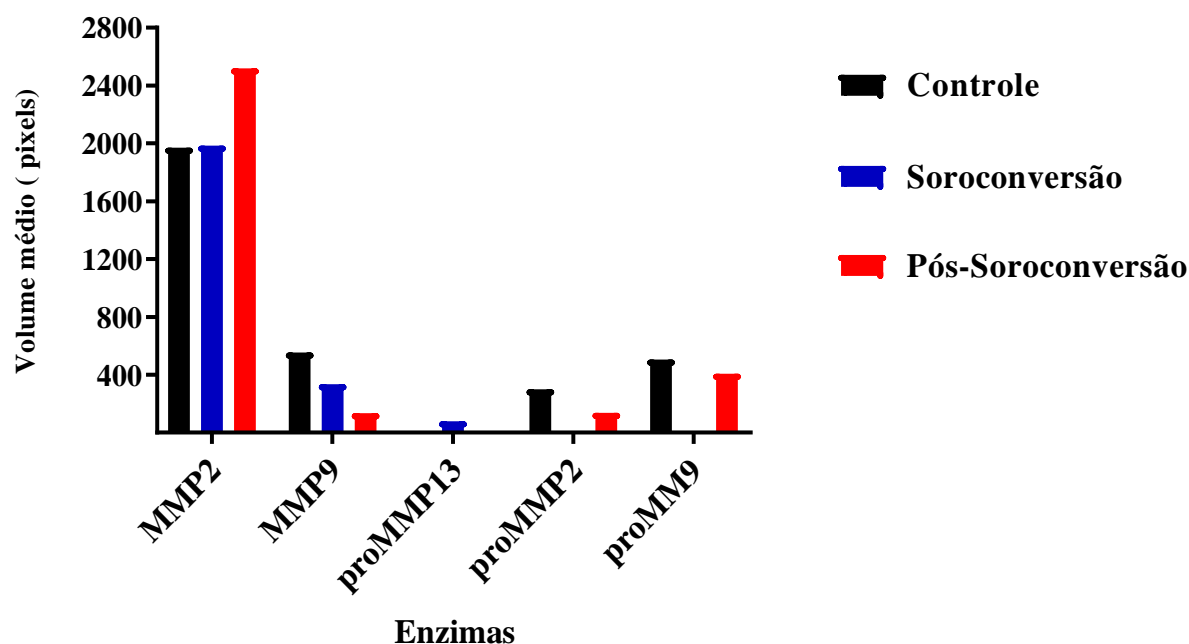


Figura 4. Volume médio em *pixels* das MMPs encontradas nas amostras de soro sanguíneo de caprinos experimentalmente infectados pela CAE.

5. CONCLUSÃO

A atividade enzimática das MMPs no soro sanguíneo de caprinos sadios e infectados pela CAE mostrou comportamento típico inerente às suas funções fisiológicas e patológicas;

A presença da proMMP-13 na primeira soroconversão poderá ser usada como um indicativo da presença do vírus em caprinos infectados recentemente pela doença;

Os achados deste estudo poderão servir de suporte para maiores investigações sobre a ação do sistema imune inato em caprinos infectados pela CAE, visando sua possível utilização como complemento no diagnóstico desta lentivirose.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUMAN, A. E.; SALLIS, J. F.; DZEWALTOWSKI, D. A.; OWEN, N. Towards a better understanding of the influences on physical activity: the role of determinantes, correlates, causal variables, mediators, moderators and confounders. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 23 (Supl. 2), p. 5-14, 2002.
- BELHOCINE, M.; GERNIGON-SPYCHALOWICZ, T.; JACOB, M. P. et al. Immunoexpression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) in the seminal vesicles and ventral prostate of Libyanjird (*Merioneslibycus*) during the seasonal cycle of reproduction. **Histology Histopathology**, v. 25, n. 5, p. 619-36, 2010.
- BEZERRA JÚNIOR, R. Q.; ELOY, A. M. X.; PERREIRA, E. P. et al. Avaliação das metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com Artrite Encefalite Caprina na Região Semiárida do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, p. 1-7, 2015.
- BRADFORD, M. M. A. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUTLER, G. S.; WILL, H.; ATKINSON, S. J.; MURPHY, G. Membrane-type-2 matrix metalloproteinase can initiate the processing of progelatinase A and is regulated by the tissue inhibitors of metalloproteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 244, p. 653–657, 1997.
- DALMOLIN, R. J.; ZANOTTO-FILHO, A.; DE OLIVEIRA, R. B. et al. Retinol and retinoic acid in crease MMP-2 activity by different path ways in cultured Sertoli cells. **Free Radical Research**, v. 41, p.1338-1347, 2007.
- DIFFAY, B. C.; MCKENZIE, D.; WOLF, C. et al. Abordagem e exame de ovinos e caprinos. In: **Clínica de ovinos e caprinos**. PUGH, D. G. São Paulo: Roca, 2005. Cap. 1, p. 1-19.
- EDWARDS, D. R.; BEAUDRY, P. P.; LAING, T. D.; KOWAL, V.; LECO, K. J.; LIM, M. S. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. **International Journal of Obesity**, v. 20, p. 9-15, 1996.
- ELKINGTON, H.; WHITE, P.; ADDINGTON-HALL, J. et al. The healthcare needs of chronic obstructive pulmonary disease patients in the last year of life. **Palliative Medicine**, v. 19, p. 485-491, 2005.
- GAO, P.; YANG, J. L.; ZHAO, H.; YOU, J. H.; HU, Y. Common polymorphism in the MMP-13 gene may contribute to the risk of human cancers: a meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 35(10), p. 10137-10148, 2014.
- GUEDES, M. I. M. C. **Infecção Experimental pelo vírus da artrite encefalite caprina em cabritos de nove a vinte e sete dias de idade**. 1999. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - Área de Patologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- HANSON, J.; HYDBRING, E.; OLSSON, K. A long term study of goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis vírus. **Acta Veterinary Scandinavian**, v. 37, p. 31-39, 1996.
- HU, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; SANG, Q-X. A.; OPDENAKKER, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature reviews**, v. 6(6), p. 480-498, 2007.
- IWAMOTO, N.; KAWAKAMI, A.; ARIMA, K.; TAMAI, M.; NAKAMURA, H.; KAWASHIRI, SY.; KITA, J.; OKADA, A.; KOGA, T. et al. Contribution of an adenine to guanine single nucleotide polymorphism of the matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) -77 promoter region to the production of anticyclic citrullinated peptide antibodies in patients with HLA-DRB1*shared epitope-negative rheumatoid arthritis. **Journal Modern Rheumatology**, v. 21, p. 240-243, 2011.
- KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino Acids**, v. 41(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.
- KUZUYA, M.; IGUCHI, A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 10(5), p. 275-282, 2002.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227(5259), p. 680-685, 1970.
- MORPETH, S. C. et al. Time to HIV-1 seroconversion similar among patients with acute HIV-1 infection; but there are exceptions... **Thirteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**, Denver, poster 389, 2006.
- PARKS, W. C.; MECHAM, R. P. **Matrix metalloproteinases**. San Diego: Academic Press; 1998.
- PETERSON, K.; BRINKHOF, J.; HOUWERS, D. J. et al. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. **Theriogenology**, v. 69, p. 433-442, 2008.
- PINHEIRO, R. R. et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, v. 101, p. 51-56, 2006.
- PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; TORRES, A. M. C. et al. Custo dos antígenos a dos testes de diagnóstico de lentivírus de pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 28, p. 110-113, 2006.
- PUGH, D. C. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. 513 p.

- SAENGSOI, W.; SHIA, W. Y.; W. SHYU, C. L. et al. Detection of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in canine seminal plasma. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 114– 119, 2011.
- SARACINI, C.; BOLLI, P.; STICCHI, E.; PRATESI, G.; PULLI, R.; SOFI, F.; PRATESI, C.; GENSINI, G. F.; ABBATE, R.; GIUSTI, B. Polymorphisms of genes involved in extracellular matrix remodeling and abdominal aortic aneurysm. **Journal of Vascular Surgery**, v. 55(1), p. 171-179, 2012.
- SEABRA, F. R. G. **Análise imuno-histoquímica das metaloproteínas da matriz (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) na doença periodontal**. 2006. 104 p. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte.
- SIVAK, J. M.; FINI, M. E. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, p. 1-14, 2002.
- STAMENKOVIC, I. Matriz metalloproteinases in tumor invasión and metastases. **Cancer Biology**, v. 10, p. 415-433, 2000.
- TANNURE, P. N, KÜCHLER, E. C.; FALAGAN-LOTSCH, P.; AMORIM, L. M.; RAGGIO LUIZ, R.; COSTA, M. C.; VIEIRA, A. R.; GRANJEIRO, J. M. MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. **Caries Research**, v. 46(4), p. 401-407, 2012.
- TENTES, I.; ASIMAKOPOULOS, B.; MOURVATI, E. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in seminal plasma. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**. v. 24, p. 278–281, 2007.
- LOFTUS, I. M.; THOMPSON, M. M. The role Of Matrix Metalloproteinases in Vascular Disease. **Vascular Medicine**, v. 7(11), p. 117-133, 2002.
- UENO, H.; NAKAMURA, H.; INOUE, M.; IMAI, K.; NOGUCHI, M.; SATO, H.; SEIKI, M.; OKADA, Y. Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. **Cancer Research**, v. 57, p. 2055–2060, 1997.
- VAŠKŮ, A.; MELUZÍN, J.; BLAHÁK, J.; KINCL, V.; GOLDBERGOVÁ, M. P.; SITAR, J.; ZLÁMAL, F.; BIENERTOVÁ-VAŠKŮ, J.; VÍTOVEC, J. Matrix metalloproteinase 13 genotype in rs640198 polymorphism is associated with severe coronary artery disease. **Disease Markers**, v. 33(1), p. 43-49, 2012.
- WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; JAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, E.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 61-65, 1996.
- YE, S.; PATODI, N.; WALKER-BONE, K.; READING, I.; COOPER, C.; DENNISON, E. Variation in the matrix metalloproteinase-3, -7, -12 and -13 genes is associated with

functional status in rheumatoid arthritis. **International Journal of Immunogenetics**, v. 34 (2), p. 81–85, 2007.

ZITKA, O.; KUKACKA, J.; KRIZKOVA, S.; HUSKA, D. et al. Matrix Metalloproteinases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3751-3768, 2010.