

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO DAS METALOPROTEINASES (MMPs) NO PLASMA
SEMINAL DE CAPRINOS SADIOS E INFECTADOS PELO VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE)**

ELIZÂNGELA PINHEIRO PEREIRA

SOBRAL - CE
SETEMBRO – 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**CARACTERIZAÇÃO DAS METALOPROTEINASES (MMPs) NO PLASMA
SEMINAL DE CAPRINOS SADIOS E INFECTADOS PELO VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE)**

ELIZÂNGELA PINHEIRO PEREIRA

SOBRAL - CE
SETEMBRO - 2014

ELIZÂNGELA PINHEIRO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS METALOPROTEINASES (MMPs) NO PLASMA
SEMINAL DE CAPRINOS SADIOS E INFECTADOS PELO VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE)**

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: Produção Animal

ORIENTADOR:

Prof^a. Dr^a. ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY

CO-ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. FÁTIMA RÉVIA GRANJA LIMA

SOBRAL - CE

SETEMBRO - 2014

Responsável: Neto Ramos CRB 3/1374

P489c

Pereira, Elizângela Pinheiro

Caracterização das metaloproteinases (MMPs) no plasma seminal de caprinos saudáveis e infectados pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAE)/ Elizângela Pinheiro Pereira. -- 2014.

63 p.: il.

Orientador: Prof^a Dr^a Ângela Maria Xavier Eloy

Co-orientador: Prof^a Dr^a Fátima Révia Granja Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Vale do Acaraú /

Centro de Ciências Agrárias e Biológicas / Mestrado em Zootecnia, 2014.

1. Metaloproteinases. 2. Plasma seminal. 3. Caprinos. I. Eloy, Ângela Maria Xavier. II. Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Mestrado em Zootecnia. III. Título.

CDD 636.3089

ELIZÂNGELA PINHEIRO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS METALOPROTEINASES (MMPs) NO PLASMA
SEMINAL DE CAPRINOS SADIOS E INFECTADOS PELO VÍRUS DA
ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA (CAE)**

Dissertação defendida e aprovada em: 12 de setembro de 2014 pela Comissão

Examinadora:

PROFA. DRA. ÂNGELA MARIA XAVIER ELOY
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS
(PRESIDENTE)

PROFA. DRA. FÁTIMA RÉVIA GRANJA LIMA
UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
(CO-ORIENTADORA)

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

PROFA. DRA. ALICE ANDRIOLI PINHEIRO
EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS
(EXAMINADORA)

SOBRAL - CE
SETEMBRO - 2014

A Deus por essa oportunidade;

A toda minha família: Creudes, Elias, Adalto,
Elvis e Jhonny;

A todos os que torceram por mim durante a
execução deste trabalho, dedico.

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”**

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida, capacidade, forças e a oportunidades de viver tantos momentos desafiadores, por ter enfeitado a minha vida com pessoas lindas que se tornaram importantes e pontos de apoio nessa caminhada, por nunca ter me abandonado e por demonstrar seu amor por minha vida, sempre.

A minha família, que sempre me apoiou incondicionalmente em todas as minhas decisões e sempre me deu força e ânimo em situações difíceis. Creudes, Elias, Adalto, Elvis, Jhonny, Claudia e a pequena Emilly, são esses os nomes que carrego no peito, nos quais sempre penso e são a força motriz da minha motivação.

A Dra. Ângela Eloy, que com toda sua dedicação e incentivo foi bem mais que uma orientadora, foi também amiga e mãe. Sou muito grata por sua orientação. A forma como você lida com situações adversas não foi importante apenas para a realização desse trabalho, mas produziu conhecimentos que serão úteis por toda minha vida.

A Universidade Estadual do Vale do Acaraú, pela oportunidade de realização deste curso de Pós-graduação.

A EMBRAPA Caprinos pelo apoio técnico e estrutural e ainda, aos seus funcionários pelo auxílio e amizade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Fundação pelo apoio financeiro em forma de bolsa.

A doutores Rizaldo Pinheiro, Fátima Lima e Alice Andrioli por se mantem sempre dispostos a contribuir com informações quando procurados.

Aos meus amigos de mestrado pelos momentos de alegria e companheirismo, em especial aos minha turma Van, Max, Tati, Clebio, Cleverton, e Awdrea.

Aos amigos “embrapianos”: Dr. Diônes Oliveira, Dr. Luís Vieira, Osmarilda, Helena, José Nóbrega, por todos os momentos, felizes e tristes, disponibilidade e receptividade na execução dos trabalhos de campo, laboratório sem os quais seria muito difícil a sua conclusão. Agradeço em especial ao Jhon (João Ricardo) por sua grande amizade, apoio, contribuições fundamentais para a execução do trabalho.

Aos amigos, em especial Rosinha Sales e Quésia de Carvalho, por ter dividido os momentos de alegrias e tristezas, pela amizade, incentivos e por estarem tão presentes em minha vida durante este período.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
RESUMO GERAL.....	xv
GENERAL ABSTRACT.....	xvi
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
OBJETIVOS	
Geral.....	20
Específicos.....	20
CAPÍTULO 1- REFERENCIAL TEÓRICO	
Caracterização da caprinocultura.....	22
Avanços da proteômica na caracterização das doenças.....	23
Proteases.....	23
Metaloproteinases da Matriz (MMPs).....	24
MMPs no plasma seminal.....	26
Zimografia.....	27
Artrite Encefalite Caprina (CAE).....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE ZIMOGRÁFICA DAS METALOPROTEINASES (MMPS) E CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA NO PLASMA SEMINAL CAPRINO	
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
Local e período experimental.....	41
Comitê de ética.....	41
Animais experimentais.....	41

Coleta e avaliação de sêmen.....	42
Testes Laboratoriais	
Quantificação das proteínas totais.....	43
Zimografia.....	43
Padronização da zimografia.....	44
Análise estatística.....	45
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIEV** - Vírus da Anemia Infecciosa Equina
- ANOVA** - Análise de Variância
- BIV** - Vírus da Imunodeficiência Bovina
- BSA** - Albumina Sérica Bovina
- CAE** – Artrite Encefalite Caprina
- CAEV** - Vírus da Artrite Encefalite Caprina
- CBRA** - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
- CEUA** - Comissão de Ética para o Uso de Animais
- DB** - Dot Blotting
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico
- ELISA** – Ensaio Enzimático de Imunoabsorção
- ECP** - Cipionato de Estradiol
- EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- FAO** - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- FIV** - Vírus da Imunodeficiência Felina
- HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IBGE** - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IDGA** - Imunodifusão em Gel de Agarose
- kDa** - kilodaltons
- LVPR** - *Lentivirose de Pequenos Ruminantes*
- INMET** – Instituto Nacional de Meteorologia
- MEC** - Matriz Extracelular
- MMPs** - Metaloproteinases da Matriz
- OIE** - Organização Mundial da Saúde Animal
- PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase
- RNA** - Ácido ribonucléico
- SDS** - Dodecil-sulfato de sódio
- SDS-PAGE** – Dodecil-sulfato de sódio de Polyacrilamide gel electrophoreses
- SIV** - Vírus da Imunodeficiência Símia
- TIMPs** - Inibidores de metaloproteinases nos tecidos
- UVA** - Universidade Estadual Vale do Acaraú
- WB** - Western Blotting

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Volume médio (pixels) das MMPs de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE.....	52
Tabela 2 -	Média dos parâmetros seminais de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE.....	53
Tabela 3 -	Correlação entre os parâmetros espermáticos de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE.....	53
Tabela 4 -	Correlações do volume da MMP com os parâmetros seminais, segundo a enzima e por grupo.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Presença (A) e volume médio (pixel) (B) das MMPs no plasma seminal de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE. 48
- Gráfico 2 - Distribuição da ocorrência do aspecto seminal segundo os grupos de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE 54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Padronização do teste de zimografia para plasma seminal de caprinos soronegativos e soropositivos para CAE, utilizando-se concentrações crescentes de proteínas e elegendo-se a de 20µg como ideal para o teste..... 42
- Figura 2 - Atividade enzimática das metaloproteinases do plasma seminal de caprinos. (A) gel de animais soronegativo e (B) de animais soropositivos; (A1-A12) corresponde aos 12 animais experimentais..... 46
- Figura 3 - Análise densitométrica das proteases e proteínas de amostras de plasma seminal caprino soronegativos para CAE. Em A as bandas digeridas de gelatinases em gel de poliacrilamida 10% mostrando a atividade das MMPs (bandas claras) e, em B, proteínas visíveis após contínua descoloração dos géis de zimografia. Em C, representação esquemática do perfil densitométrico proteases e proteínas do plasma seminal caprino. Os números de 1 a 5 referem-se às amostras de plasma seminal de diferentes animais. PAD – é o padrão utilizado com pesos (97, 66, 45 e 31kDa)..... 50
- Figura 4 - Análise densitométrica das proteases e proteínas de amostras de plasma seminal caprino soropositivos para CAE. Em A as bandas digeridas de gelatinases em gel de poliacrilamida 10% mostrando a atividade das MMPs (bandas claras) e, em B, proteínas visíveis após contínua descoloração dos géis de zimografia. Em C, representação esquemática do perfil densitométrico proteases e proteínas do plasma seminal caprino. Os números de 1 a 5 referem-se às amostras de plasma seminal de diferentes animais. PAD – é o padrão utilizado com pesos (97, 66, 45 e 31kDa)..... 51

RESUMO GERAL

As metaloproteinases estão sendo foco de recentes estudos, que visam buscar biomarcadores para doenças inflamatórias, de tumores e de resistência de animais e humanos às determinadas doenças. Na medicina humana as pesquisas já estão avançadas, enquanto que na medicina veterinária estas ainda são incipientes, principalmente na espécie caprina. Dentre os problemas sanitários de caprinos destaca-se a Artrite Encefalite Caprina (CAE) que acomete animais em várias regiões do país, em especial os rebanhos de caprinos leiteiros. Apesar de haver vários tipos de testes de diagnóstico eles não conseguem detectar todos os animais positivos levando a sérios problemas no controle da enfermidade. O estudo das MMPs abre possibilidades de incrementar este diagnóstico. Portanto, o conhecimento das proteases será de valia pois poderá colaborar para o diagnóstico, prognóstico e na identificação de anti-virais, além de identificar animais mais resistentes, mesmo estando infectados pelo vírus. Este trabalho teve como objetivo investigar a presença e atividade das metaloproteinases (MMPs) em caprinos sadios e acometidos pela CAE. Foram utilizados 12 reprodutores com idade média de 4 anos. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, um composto por animais soropositivos naturalmente para CAE e outro soronegativo, previamente testado através do IDGA e Western Blot. As coletas de sêmen foram realizadas com intervalos de uma semana para os grupos de animais soropositivos e soronegativos, e o plasma, obtido por centrifugação foi avaliado através da Zimografia. As formas latentes e ativas das proMMP-9, MMP-9 e a forma ativa da MMP-2 estão presentes no plasma seminal de caprinos dos dois grupos. Observou-se nos animais soropositivos correlação negativa e significativa entre a proMMP-9 e o vigor (-0,59) ($P < 0,05$), e entre a MMP-2 e o volume do ejaculado (-0,67) ($P < 0,05$), apresentando o grupo dos soropositivos maior concentração espermática do que os negativos, além de que a MMP-1 apresentou maior concentração nos negativos, necessitando de mais pesquisas. Com base nos resultados sugere-se que o vírus da CAE interfere na função das células germinativas e que a atividade das MMPs não foi alterada pela infecção, havendo, no entanto, maior atividade da MMP-1 nos animais negativos, fato esse digno de mais pesquisas. O perfil densitométrico revela que os animais do grupo positivo apresentam maior resposta do organismo ao vírus da CAE, sugerindo seu uso na avaliação de animais com infecções.

Palavras-chave: metaloproteinases, plasma seminal, caprino.

GENERAL ABSTRACT

Metalloproteinases are the focus of recent studies which seek biomarkers for human diseases to certain inflammatory diseases, tumors, and resistance of animals. In human medicine studies are already advanced, however, research in veterinary medicine is still poor, especially if we focus on the goats. This study aimed to investigate the presence and activity of matrix metalloproteinases (MMPs) in healthy and infected goats by caprine arthritis encephalitis (CAE). This virus affects goats in various countries, especially in dairy goats. Although there are several types of diagnosis, IDGA, which is a faster technique and does not requires sophisticated equipment, it would be best if its specificity was high and not present false negative results. Therefore, knowledge of proteases, especially MMPs may be of value as contribution to the diagnosis, prognosis and identifying anti-viral medicine, and also identify more resistant animals to CAE. It were used 12 animals with an average age of 4 years. The animals were divided into two experimental groups, one composed of naturally seropositive animals for CAE and other seronegative, previously tested by AGID and Western Blot. The semen collections were made at one week intervals for seropositive and seronegative animals, and the plasma obtained by centrifugation was assessed by zimography. The latent and active forms of proMMP-9, MMP-9 and active forms of MMP-2 are present in seminal plasma of both groups. It was observed in seropositive animals negative correlation between the proMMP-9 and the vigor (-0.59) ($P < 0.05$), and between the MMP-2 and ejaculate volume (-0.67) ($P < 0.05$) and in seropositive group it was identified higher sperm concentration than in negative. The MMP-1 showed a higher concentration in the negative group, result that needs to be investigated. Based on the results it is suggested that the CAE virus interferes on the germ cells function, and the MMPs activity were not altered by infection, exception to MMP-1. The densitometry profile reveals that positive group showed greater response of the body to the CAE virus in chronically infected animals, suggesting it to be used as evaluation of infected animals.

Keywords: metalloproteinases, seminal plasma, goats.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Animais submetidos a desafios internos e externos respondem vigorosamente ativando tanto a imunidade inata quanto a adquirida. O sistema imune inato cobre aspectos de defesa do hospedeiro e não depende da resposta específica, como produção de anticorpos, não só estimulando a atividade leucocitária, mas também muitos aspectos do processo metabólico do hospedeiro. A variedade de reações do hospedeiro a infecções, inflamações ou traumas abrange um grande leque de respostas patofisiológicas tais como a pirexia, leucocitose, alteração hormonal e redução das proteínas musculares combinados para minimizar a destruição do tecido enquanto o processo de reparação se completa. A inflamação crônica, como a artrite, pode ser percebida ou compreendida como uma consecutiva série de estímulos inflamatórios separados. Nestas condições, observa-se aumento generalizado das proteínas de fase aguda (PFAs). Contudo, o aumento é menor do que durante os episódios inflamatórios e infecciosos agudos. Também há indicações de que a resposta à inflamação crônica e aguda varia entre diferentes proteínas. Através da proteômica, potenciais biomarcadores para diagnóstico da tuberculose humana foram identificados, que podem vir a ser usados no desenvolvimento de testes diagnósticos. Dentre as moléculas estudadas pela proteômica, destaca-se as proteases e, dentre elas, as Metaloproteinases (MMPs).

As MMPs são enzimas que digerem as proteínas da *matriz* extracelular (MEC) e que apresentam funções importantes em diversos processos biológicos como morfogênese, e em todos os estágios da cicatrização: reparação tecidual e remodelação em resposta à injúria. Entretanto, quando não devidamente controladas, ou seja, quando não são inibidas, estão envolvidas na progressão de algumas doenças como aterosclerose, artrite, câncer e esclerose múltipla, mostrando serem envolvidas em diferentes quadros patológicos. Nesse sentido, pode-se perceber que é necessário haver um equilíbrio entre MMPs e seus inibidores. Na medicina em geral, tanto nas pesquisas clínicas como nas experimentais, a investigação da atividade e/ou expressão das MMPs de interesse estão sendo estudadas em processos fisiopatológicos.

Na medicina veterinária o uso das proteínas para diagnóstico e monitoramento das doenças está sendo aos poucos realizado, tais como para a mastite bovina, doença respiratória bovina, doenças hematológicas e neoplasias em cães e broncopneumonia em bezerros, entre outras. Estudos preliminares estão sendo desenvolvidos na Embrapa

Caprinos e Ovinos e já mostram uma diferença entre o perfil protéico do plasma seminal entre caprinos Moxotó infectados e não infectados pelo CAEV.

A proteômica, técnica na qual permite a análise do complemento de um genoma, poderá ser utilizada para elucidar a biologia de microrganismos e detectar marcadores de diagnóstico e prognóstico envolvidos na patogenia de infecções.

A CAE é uma doença que afeta tanto o sistema produtivo como o reprodutivo e os testes, como IDGA, apresentam resultado falso negativos e soroconversão, dificultando a eliminação da doença no rebanho. Nesse contexto, a utilização da proteômica pode nos ajudar na identificação de biomarcadores capazes de identificar animais infectados e resistentes a CAE.

A Artrite-Encefalite Caprina (CAE) é uma doença cosmopolita de alta prevalência nos rebanhos caprinos leiteiros. Sua forma de disseminação é favorecida em rebanhos cujo sistema de criação é intensivo, devido à proximidade dos animais. É uma enfermidade de evolução lenta, podendo manifestar sinais clínicos nas mais variadas formas, como a artrite, problemas neurológicos, pneumonias e alterações na glândula mamária. É causada pelo vírus Artrite Encefalite Caprina (CAEV), que apresenta semelhança molecular e biológica com o vírus *maedi-visna*. Devido ao fato de ambos os vírus já terem sido isolados tanto de caprinos quanto de ovinos, tem-se adotado, genericamente, a terminologia Lentivírus de Pequenos Ruminantes (LVPR). O vírus pode estar presente em todos os líquidos biológicos do corpo e a transmissão do mesmo entre os caprinos ocorre, com maior frequência, através da ingestão de colostro e leite de animais infectados. O contato direto entre os animais, bem como toda a forma de contato indireto com os líquidos corporais, também são importantes meios de transmissão do vírus.

O controle da CAE baseia-se no teste sorológico dos animais, seguido de isolamento ou sacrifício dos soropositivos, associado a medidas de manejo que visam a separação precoce das crias. Estas são alimentadas artificialmente com colostro e leite tratados termicamente (56°C por 60 minutos), ou com sucedâneos do colostro e leite.

O tema abordado será exposto e discutido ao longo de dois capítulos, nos quais serão estudados a presença e atividade das MMPs no plasma seminal de caprinos sadios e a relação destas enzimas com a qualidade do sêmen. No capítulo I teremos uma

revisão sobre a caprinocultura, a CAE, zimografia, e os avanços da técnica, sobretudo na área da reprodução. No capítulo II faremos uma exposição dos resultados e definição do perfil zimográfico do plasma seminal de caprinos através da densitometria, visando avaliar e caracterizar o perfil das MMPs e suas relações com os parâmetros seminais. Esses resultados serão cruzados com os de animais soropositivos para CAE visando avaliar também se a presença da enfermidade influencia no perfil das enzimas.

OBJETIVOS

Geral

Caracterizar, através da zimografia do plasma seminal, o perfil das metaloproteinases em caprinos no semiárido do Nordeste.

Específicos

- 1) Padronizar a expressão das MMPs no plasma seminal de animais soronegativos para CAE e sua relação com os parâmetros seminais;
- 2) Definir o perfil densitométrico das MMPs no plasma seminal de caprinos soronegativos e sua relação com os parâmetros seminais;
- 3) Comparar essas informações com as de animais soropositivos para CAE

CAPÍTULO I

REFERENCIAL TEÓRICO

Caracterização da caprinocultura

A criação de caprinos vem apresentando nos últimos anos um significativo crescimento, especialmente em regiões sem grande tradição na atividade ou sem rebanho expressivo. Tal desenvolvimento deve-se especialmente ao “boom” da caprinocultura nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, desde meados da década de 90, de tal forma que a exploração de caprinos, outrora considerada uma atividade marginal nas propriedades, ganhou o *status* de criação principal em muitas fazendas que tradicionalmente não se dedicavam a estes animais (SILVA et al., 2005).

A espécie caprina, primeira a ser domesticada com fins produtivos, tem-se difundido amplamente no mundo. Está entre os ruminantes domésticos que desempenham relevante papel no suprimento alimentar de origem animal destinado ao consumo humano, despertando assim, interesse dos produtores e dos órgãos governamentais para incremento da atividade sustentável do país.

No Brasil, em especial na região Nordeste, o rebanho caprino representa 92,59% do rebanho nacional, composto de 9,3 milhões de cabeças (IBGE, 2010), sendo o Ceará o quarto na lista de Estados da região com maior rebanho (11%) (IBGE, 2010). A exploração desses animais nesta região apresenta papel relevante como fonte de proteína e fator sócio-econômico importante para os pequenos e médios produtores, através da utilização dos seus subprodutos (RODRIGUES, 1998; LIMA, 2000).

Nessa região são encontradas raças de caprinos consideradas naturalizadas, como por exemplo, a raça Moxotó, que foi introduzida no Brasil pelos colonizadores e durante o processo de adaptação às condições adversas dessa região, causou uma redução no seu desempenho reprodutivo e produtivo, levando os mesmos a apresentar níveis de produção proporcional ao ambiente que lhes foi oferecido (SILVA et al., 2001). Visando melhorar a baixa produtividade dos caprinos nativos, houve importações de animais de raças exóticas consideradas mais produtivas, como por exemplo, a raça Saanen que é apontada como a raça caprina que mais produz leite. Esta raça é originária do Vale de Saanen, na Suíça e é a raça leiteira mais difundida no mundo (RIBEIRO, 1997).

Apesar deste efetivo expressivo, a produção de caprinos nesta região, é limitada por inúmeras falhas no manejo alimentar, reprodutivo e sanitário, além da falta de

escrituração zootécnica e diagnóstico tardio de diversas doenças, que em sua maioria não são controladas de maneira apropriada.

A demora no diagnóstico das LVPRs geralmente induz ao comprometimento do desempenho produtivo do rebanho, além de acarretar perdas econômicas significativas para os caprinocultores (PINHEIRO et al., 2006). Dentre essas enfermidades, destaca-se a Artrite Encefalite Caprina (do inglês CAE - *Caprine Arthritis-Encephalitis*), uma infecção viral multissistêmica, incurável, de caráter crônico-debilitante e específica de caprinos.

Avanços da proteômica na caracterização das doenças

Tanto na medicina humana quanto na veterinária, a utilização da proteômica tem permitido grandes avanços da ciência em direção à detecção de marcadores de diagnóstico e prognósticos envolvidos em alguns processos patológicos. A expressão proteica no plasma seminal está sendo muito explorada quanto aos aspectos reprodutivos, com fertilidade, infertilidade, congelamento do sêmen, entre outros. No entanto, estudos das enzimas presentes nesse material com a finalidade de estudar seu comportamento frente ao estado de infecção, é escasso.

Tendo em vista os impactos da CAE no sistema produtivo, aliado à ocorrência frequente da soroconversão, que dificulta a eliminação completa do vírus do rebanho, a caracterização da resposta imune através da análise da atividade enzimática poderá contribuir para melhor conhecimento da ação do patógeno no hospedeiro e sua reação frente ao agente infeccioso. Este estudo poderá levar à identificação de possíveis biomarcadores envolvidos no processo de infecção, bem como contribuir para o prognóstico das doenças, na identificação de antivirais e na seleção de animais mais resistentes.

Proteases

Os mediadores da resposta inflamatória são variados e dentre eles encontram-se as enzimas proteolíticas. As proteases e seus inibidores desempenham papel-chave nos processos fisiológicos, como migração, sinalização celular, remodelação da superfície

de células e tecidos. Estas enzimas podem pertencer a cinco diferentes famílias, entre elas as da 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 no processo de migração celular – locomoção das células dentro dos tecidos ou para outros tecidos. A degradação da MEC é uma característica essencial do reparo e da remodelação durante a cicatrização de lesões cutâneas. As metaloproteinases (MMPs) pertencem a família das endopeptidases, zinco dependentes, que coletivamente são capazes de degradar todos os componentes da matriz extracelular (GEARING et al., 1994). Essas enzimas podem ser produzidas pelas células da pele, como fibroblastos, células endoteliais, mastócitos e polimorfonucleares, tendo uma importante função na remodelação proteolítica da MEC em várias situações fisiológicas, incluindo a morfogênese, desenvolvimento tecidual, reparo tecidual e angiogênese (KÄHÄRI e SAARIALHO-KERE, 1997). O processo cicatricial envolve uma complexa sequência de eventos celulares e bioquímicos com o objetivo de restaurar a integridade tecidual após o trauma. Esse processo caracteriza-se pela inflamação, formação do tecido de granulação e remodelação da MEC (PARK e BABUL, 2004). De acordo com Heegaard et al. (2000) a inflamação crônica como artrite, pode ser compreendida como uma consecutiva série de estímulos inflamatórios separados.

Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

As metaloproteinases de matriz são um grupo importante de enzimas que contém zinco responsável pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC). Acredita-se que participam 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 invasão, na metástase através da quebra da MEC, nas proteínas de superfície celular, nos fatores de crescimento de transformação, nas citocinas, e nas quimiocinas (WOESSNER JR, 1991).

As MMPs têm atraído a atenção por causa de seu papel em diversas doenças, em especial na medicina humana. Elas e seus inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) trabalham em conjunto para remodelar a MEC (SEKHON, 2010). De acordo

com Maretti-Mira (2011) trabalhando com leishmaniose, os pacientes que produziam naturalmente maior quantidade de citocinas nas áreas lesionadas, possuíam maiores dificuldades de debelar a doença. Ainda, foi observado que a mudança no equilíbrio entre a expressão das gelatinases e seus respectivos inibidores pode estar sendo refletida na atividade exacerbada verificada nas grandes lesões de pacientes que responderam mal ao tratamento. Dessa forma, foi constatada uma correlação positiva entre a quantidade de células produzindo citocinas e a atividade das gelatinases.

Segundo Skiles et al. (2004), pelo menos 24 metaloproteinases (MMPs) em mamíferos foram identificadas, e podem ser agrupadas em cinco classes: colagenases, gelatinases, estromelinas, MMPs do tipo membrana (MT-MMPs) e outras enzimas. Estas enzimas têm superposição considerável na especificidade para o substrato e tem uma grande semelhança na sua estrutura de domínio. O segundo grupo das MMPs é composto pelas gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9), respectivamente. São secretadas pelos osteoblastos e têm a capacidade de degradar elastina, colágeno IV, V, VII, X e XI, assim como os componentes menores da matriz extracelular (MATRISIAN, 1990).

A expressão pontual das MMPs é um indicativo de sua participação em diversos processos biológicos normais, tais como o desenvolvimento embrionário, a cicatrização de feridas, angiogênese, ovulação, e crescimento de nervos. No entanto, a ativação estimulada ou crônica das MMPs pode resultar em um desequilíbrio entre a atividade destas enzimas proteolíticas e os TIMPs. Também podem ocorrer em condições patológicas, devido a uma degradação excessiva de componentes da matriz extracelular ou afins pelas MMPs (SKILES et al., 2004).

As TIMPs são pequenas glicoproteínas cujo papel na regulação da degradação da matriz pode ser exercido não só pela eliminação clássica da proteinase, mas também por um efeito ainda mais potente, ou seja, o bloqueio e interceptação da ativação da MMP (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular. É conhecido que um processo patológico da matriz extracelular pode se instalar quando houver excesso de atividade das MMPs nos tecidos. Por essa razão, há um grande interesse em desenvolver inibidores sintéticos das MMPs que possam ser usados em terapias médicas (NAVARRO et al., 2006).

As MMPs vêm sendo reconhecidas como importantes enzimas reguladoras, tanto com atividade pró como antagonistas nas vias inflamatórias, devido ao fato de poderem resultar em condições benéficas na regulação da defesa do hospedeiro e na

doença inflamatória (CONCHA, 2010). Na medicina humana o estudo das MMPs já está em estágio adiantado, sendo utilizadas tanto para diagnóstico de doenças como nas avaliações da eficácia de tratamentos e prognósticos.

Pesquisas correlacionando a presença e atividade das gelatinases em animais com lentivirose, em especial em caprinos, não existem, havendo a necessidade de estudos visando conhecer o perfil dessas enzimas na CAE e sua relação com os parâmetros seminais.

MMPs no plasma seminal

Embora não se compreenda todos os detalhes sobre os mecanismos que envolvem a maturação da célula espermática, sabe-se que esta sofre uma série de modificações envolvendo macromoléculas em sua superfície durante todo o seu trajeto pelas vias seminais. Tais eventos acontecem de forma sequencial e coordenada entre os produtos de secreção das glândulas acessórias e os gametas masculinos em trânsito e são de fundamental importância no processo de capacitação (SULLIVAN et al., 2005).

O plasma seminal é uma mistura de secreções do epidídimo e de várias glândulas acessórias incluindo a próstata, vesículas seminais e glândula de Cowper. A próstata é uma das principais contribuintes para o plasma seminal, sendo uma fonte muito rica em proteínas (DAVALIEVA et al., 2012).

O papel desempenhado pelas metaloproteinases no processo reprodutivo tem sido alvo de constantes investigações. Muitas informações já foram descritas para o sistema reprodutivo de fêmeas (RUSSEL et al., 1995; SALAMONSEN e WOOLEY, 1996; HULBOY et al., 1997, XU et al., 2000). No entanto, pesquisas referentes à expressão e papel dessas MMPs no sistema reprodutivo dos machos ainda é pouco explorada, sobretudo na espécie caprina.

A produção de MMPs no sistema reprodutivo tem sido estudada *in vitro* e *in vivo* (HULBOY et al. de 1997; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, (2008). Os membros da família da matriz de metaloproteinase, especialmente das MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa) são expressas em muitos órgãos do sistema reprodutivo e no processo celular (Hulboy et al., 1997), e têm apresentado um perfil diferente das MMPs entre amostras de sêmen normal e amostras de sêmen anormais de humanos.

Metayer et al. (2002) relataram a presença das MMP-2, MMP-3 e MMP-9 no testículo e nos fluidos do epidídimo de carneiros, suínos javali e equinos. As formas latente e ativa da MMP-9 foram elevadas no sêmen de cães com características de qualidade insatisfatória e proMMP-2 foi inversamente correlacionada com a qualidade do sêmen, enquanto a MMP-2 foi positivamente correlacionada com as características de qualidade do sêmen. Estes resultados sugerem que a ativação da proMMP-9 e MMP-9 contribui para a variação na qualidade do sêmen, enquanto a ativação da MMP-2 melhora a funcionalidade do esperma (SAENGSOI et al., 2011), sugerindo que a maior ativação das proMMP-9 e MMP-9 podem ser obtidas a partir de um processo de espermatogênese anormal sendo a presença de MMP-2 benéfica para a viabilidade dos espermatozoides. Conclui-se, portanto, que a caracterização do perfil das MMPs pode vir a ser uma importante ferramenta indicativa de funcionalidade espermática. Também Buchman-Shaked et al., (2002) mostraram que as MMP-2, e proMMP-2 e proMMP-9 aumentam ativamente a seu nível máximo após 2 h de capacitação espermática, acreditando-se que seja responsável por acionar a hiperativação do esperma .

Em caninos foi encontrada a MMP-2 e MMP-9 no plasma seminal, sendo que as formas latente e ativa estavam elevadas no sêmen de baixa qualidade, enquanto que a proMMP-2 foi inversamente correlacionada com a qualidade do sêmen.

Também Tentes et al. (2007) encontraram no plasma seminal de humanos as MMP-2 e MMP-9, tanto nas formas latente como ativas e não observaram correlação com os parâmetros seminais, enquanto os níveis de ProMMP-9 foram mais elevados em amostras de sêmen com baixa concentração.

Em humanos, as MMP-2 e MMP-9 foram encontradas no sêmen e as amostras com baixa concentração espermática apresentaram um aumento da MMP-2 e diminuição da MMP-9. Du et al. (2012) também encontraram relação entre as MMP-2 e MMP-9 com os parâmetros seminais em humanos.

Zimografia

A zimografia é uma técnica proteômica eletroforética que permite a visualização do número e tamanho aproximado de enzimas em amostras biológicas, com base na degradação de um substrato copolimerizado juntamente com os géis de eletroforese. No caso das proteases, utilizam-se como substrato a gelatina, caseína, fibronectina e

colágeno, dentre outros (LEBER e BALKWILL, 1997; ITOH et al., 1998; TROEBERG E NAGASE, 2003; SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005). Esta técnica é muito útil na análise da composição de proteases de amostras biológicas complexas, pois a visualização dessas enzimas depende diretamente da atividade proteolítica (KJELDSEN et al., 1993; FEITOSA et al., 1998; KIMURA et al., 2001; SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005).

A zimografia com substrato de gelatina é uma técnica amplamente usada no estudo de metaloproteases, especialmente as metaloproteases de matriz, sendo compatível com o sistema de tampão Laemmli, comumente utilizado em eletroforese SDS-PAGE (HUMMEL e PENHEITER et al., 1996), o que a torna interessante por ser de simples aplicação, sem grandes modificações em uma técnica já estabelecida. Outras vantagens desta técnica incluem a sensibilidade na faixa de picogramas e o uso de reagentes baratos e acessíveis (KLEINER e STETLERSTEVENSON, 1994; TAKESHITA, TOKUTOMI et al., 2001). Esta técnica consiste em co-polimerizar o substrato de gelatina em um gel comum de SDS-PAGE. Como o substrato está preso nos poros do gel, ele não migra quando é aplicada a corrente elétrica durante a eletroforese. A amostra biológica é desnaturada por SDS, porém não reduzida, e então aplicada no gel para separação. O tampão de solubilização da amostra não deve conter mercaptoetanol, para evitar a quebra das pontes de dissulfeto das MMPs, o qual evitaria a renaturação das mesmas. Após a corrida eletroforética, as proteases separadas são renaturadas dentro do gel, por lavagens repetidas com um detergente não-iônico, como o Triton X-100, que substitui o SDS do gel (HEUSSEN e DOWDLE, 1980). O gel é então incubado em um tampão adequado, permitindo que as proteases renaturadas realizem a digestão do substrato em uma zona ao redor de sua posição de eletroforese. Estas zonas são visualizadas ao corar o gel com Coomassie Blue, onde o gel inteiro fica azul e as áreas de digestão aparecem como zonas transparentes (TROEBERG e NAGASE, 2003). As proteases são então identificadas comparando as áreas digeridas com os padrões de peso molecular e/ou fazendo testes de inibição com inibidores específicos a certas classes de proteases. Não há análise por espectrometria de massa neste caso.

Artrite Encefalite Caprina (CAE)

A CAE, doença inicialmente descrita na Islândia, foi posteriormente relatada na França, África do Sul, Índia, Estados Unidos, Chile, Holanda e Alemanha. No Brasil encontra-se disseminada no Rio Grande do Sul, Bahia, Ceará, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Pernambuco, Maranhão, Pará, Piauí, Paraná e na Paraíba. Sobrinho et al. (2010) relataram que a prevalência no Estado de Tocantins é de 2,7%, e Pinheiro et al. (2001) observaram prevalência de 4,6% (37/810) em rebanhos leiteiros no Estado do Ceará. Estes dados confirmam que a doença está disseminada em todo o território brasileiro, daí a necessidade de testes mais seguros para implantação de programas de controle da doença nos rebanhos.

É uma doença cuja importância econômica recai nas perdas decorrentes da diminuição da produtividade, no aumento da mortalidade e também como fator limitante para o comércio internacional por tratar-se de uma doença controlada pela barreira sanitária. Não é zoonose e, portanto, não apresenta risco e importância para a saúde pública. Nos países onde as prevalências são mais elevadas e a ovino e caprinocultura são mais tecnificadas (OIE/FAO, 1997), as perdas econômicas são decorrentes da diminuição da vida produtiva e da produção leiteira, predisposição da glândula mamária às infecções bacterianas, retardo no crescimento das crias, desvalorização comercial dos produtos e despesas com programas de controle (CHEEVERS et al. 1993; GONZÁLEZ et al. 1987).

Os animais infectados podem apresentar quatro formas clássicas de sinais, sendo elas: nervosa, artrítica, respiratória e mamária (NARAYAN e CORK, 1985). É ocasionada pelo Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), o qual é um RNA vírus, não oncogênico, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Lentivirus*. No gênero *Lentivirus*, além do CAEV e Maedi Visna, estão inclusos o vírus da imunodeficiência bovina (BIV), humana (HIV-1, HIV-2), felina (FIV) e símia (SIV), além do vírus da anemia infecciosa equina (AIEV) e do *Lentivirus puma* (ICTV, 2012). Muitos animais infectados não apresentam sintomatologia clínica, porém permanecem soropositivos durante toda a sua existência (CUTLIP et al., 1992).

É difícil a avaliação das perdas ocasionadas pela CAE, pois se trata de doença de evolução geralmente crônica, resultante da complexa interação de vários fatores produtivos. 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. De acordo com Castro (1998), as perdas causadas pela CAE

estão relacionadas com a prevalência da infecção, distribuição do efetivo caprino e sua organização produtiva.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- 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.
- BRITO, R.L.L. **Implicações da artrite-encefalite caprina na reprodução, produção e na qualidade do leite de cabras**. 2009. 107f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2009.
- BUCHMAN-SHAKED, O.; KRAIEM, Z.; GONEN, Y. et al. Presence of matrixmetalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in human sperm. **Journal of Andrology**. v.23, p.702–708, 2002.
- CARNEIRO, F.F.D. **Perdas econômicas decorrentes da Artrite-Encefalite Caprina**. 2011. 97f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, 2011.
- CASTRO, R.S. **Lentivírus de Pequenos Ruminantes: ensaios imunoenzimáticos, perfil sorológico e inferências filogenéticas**. 1998. 132f. Tese (Doutorado em) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.
- CHEEVERS, W.; MCGUIRE, T.C.; NORTON, L.K. et al. Failure of neutralizing to regulate CAE lentivirus expression in vivo. **Virology**, v.196, p.835-839, 1993.
- CONCHA, H.A.R. **Papel das metaloproteinases de matriz nas alterações da barreira hematoencefálica em ratos submetidos à sepse severa**. 2010. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade do Extremo Sul, Criciúma.
- CUTLIP, R.C.; LEHMKUHL, H.D.; SACKS, J.M. et al. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.200, n.6, p.802-805, 1992.
- DAVALIEVA, K.; [KIPRIJANOVSKA, S.](#); [NOVESKI, P.](#) et al. Proteomic analysis of seminal plasma in men with different spermatogenic impairment. **Andrologia**, v. 44, p.256–264, 2012.
- DU, J.; [XU, K.](#); [FANG, L.](#) et al.. Detection and analysis of MMP-2 and MMP-9 in seminal plasma. **Journal of Men’s Health**, v. 9, n. 4, p. 216–219, 2012.
- FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Detection and characterization of metaloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrogenolytic activities in brownspider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v.36, p.1039-1051, 1998.
- 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.
- GEARING, A.J.H.; BECKETT, P.; CHRISTODOULOU, M. et al. Processing of tumour necrosis factor alpha precursor by metalloproteinases. **Nature**, v. 370, p. 555–557, 1994.

- GONZALEZ, L.; GELABERT, J.L.; MARCO, J.C. et al. Caprine arthritis encephalitis in the Basque country, Spain. **Veterinary Record**, v. 120, p.102-109, 1987.
- HEEGAARD, P.M.; GODSON, D.L.; TOUSSAINT M.J. et al. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 77, p. 9-15, 2000.
- HULBOY, D.L.; RUDOLPH, L.A.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 1, p. 27-45, 1997.
- HUMMEL, K.M.; PENHEITER, A.R.; GATHMAN A.C. et al. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. **Analytical Biochemistry**, v.233, n.1, p. 140-142, 1996.
- HEUSSEN, C.E.E.; DOWDLE, E.B. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl-Sulfate and Copolymerized Substrates. **Analytical Biochemistry**, v.102, n.1, p.196-202, 1980.
- INTERNATIONAL COMITEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV. Disponível em: <http://www.ictvonline.org/>. Acesso em: 06 agosto 2014.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Efetivo dos rebanhospor tipo de rebanho**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 13 ago. 2014.
- ITOH, Y.; ITO, A.; IWATA, K. et al. . Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 24360-24367, 1998.
- KÄHÄRI, V.M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in skin, review article. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 199-213, 1997.
- KIMURA, A.; SHINOHARA, M.; OHKURA, R. et al. Expression and localization of transcripts of MT5-MMP and its related MMP in the ovary of the medaka fish *Oryzias latipes*. **Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression**, v. 1518, p. 115–12, 2001.
- KJELDSEN, L.; JHONSEN, A.H.; SENGELOV, H. et al. Isolation and primary structure of Ngal, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 268, p. 10425–10432, 1993.
- KLEINER D. E.; STETLER-STEVENSON W. G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 325–329, 1994.
- LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Analytical Biochemistry**, v. 249, n. 1, p. 24-28, 1997.

- LE MAGUERESSE-BATTISTONI, B. Proteases and their cognate inhibitor softserine and metalloprotease subclasses, in testicular physiology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 636, p. 133–153, 2008.
- LIMA, L. A de A. Ovinocaprinocultura na Agricultura familiar. **Informativo do Centro Nacional de Caprinos CNPC/EMBRAPA**, Sobral, n.11, jun-jul., 2000.
- MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998 OIE/FAO. 1997. *Animal Health Yearbook*, 36 FAO.
- MARETTI-MIRA, A.C.; RODRIGUES, K.M.P.; OLIVEIRA-NETO, M.P. et al. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 119, 160–164, 2011.
- MATRISIAN, LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. **Trends in Genetics**, v. 6, p. 121–125, 1990.
- METAYER, S.; DACHEUX, F. DACHEUX J.L. et al. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1219–1229, 2002.
- NARAYAN O.; CORK L.C. Lentiviral diseases of sheep and goats: Chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 7, p. 89-98, 1985.
- NAVARRO, V.P.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L.A.B. et al. Participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia**, v. 35, n. 4, p. 233-38, 2006.
- PARK, J.E.P.; BARBUL, A.B. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery**, v.187, p.115-165, 2004.
- 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, n. 3, p. 449-454, 2001.
- PINHEIRO, R.R.; OLORTEGUI, C.D.C.; GOUVEIA, A.M.G. et al. Desenvolvimento de dot-blot para detecção de anticorpos para o vírus da Artrite Encefalite Caprina em caprinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 101, p. 51-56, 2006.
- RIBEIRO, A.C. **Estudo dos efeitos genéticos e de meio ambiente sobre as características de importância econômica em caprinos da raça Saanen**. 1997. 124 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista Jaboticabal, São Paulo, 1997.
- RODRIGUES, A. **Características de produção, crescimento, mortalidade e produção de leite em caprinos Parda Alemã, Anglo Nubiana e Sem Raça Definida (SRD), nos Cariris paraibanos**. 1998. 150 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal da Paraíba, Areia, 1998.
- RUSSEL, D.L., SALAMONSEN, L.A., FINDLAY, J.K. Immunization against the N-terminal peptide of the inhibin alpha 43-subunit (alpha N) disrupts tissue modeling

- and their crease in matrix metalloproteinase-2 during ovulation. **Endocrinology**, v.136, p. 3657-3664, 1995.
- SAENGSOI, W.; SHIA, W.Y.; 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.
- SALAMONSEN, L.A., WOOLLEY, D.E., Matrix metalloproteinases in normal menstruation. **Human Reproduction**, v. 11, n. 2, p. 124-133, 1996.
- SEKHON, B. S. Matrix metalloproteinases – an overview. **Research and Reports in Biology**. v. 1, p. 1-20, 2010.
- SILVA, S. L. **Influência dos fatores regionais, raciais, etários e de sexo em alguns constituintes bioquímicos do soro sanguíneo de caprinos sadios criados nos Estados de São Paulo e Paraíba**. 2001. 84 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.
- SILVA, J.B.A.; NETO, C.F.; DANTAS, M.I.C. et al. Presença da artrite encefalite caprina em rebanhos caprinos da microrregião de Angicos no Estado Do Rio Grande Do Norte. **Ciência Animal**, v. 15, n. 1, p. 53-56, 2005.
- SKILES, J.W.; GONELLA, N.C.; JENG, A.Y. The design, structures and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2911–2977, 2004.
- SOBRINHO, P.A.M.; RAMOS, T.R.R.; FERNANDES, C.H.C. et al. Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no Estado do Tocantins. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 11, p. 117-124, 2010.
- 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, p. 73–83, 2005.
- SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J. et al. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells Molecules and Diseases**, v. 35, n. 1, p.1-10, 2005
- TENTES, I.; ASIMOKOPOULOS, B.; MOURVATI, E. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in seminal plasma. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, p. 278–81, 2007.
- TAKESHITA, S.; TOKUTOMI, T.; KAWASE, H. et al. Elevated serum levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in Kawasaki disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 125, n. 2, p. 340-344, aug. 2001.
- TROEBERG, L.; NAGASE, H. Measurement of matrix metalloproteinase activities in the medium of culture of synovial cells using zymography. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 77-87, 2003.
- WOESSNER, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v. 5, p. 2145-2154, 1991.

XU, P.; WANG, Y.L.; PIAO, Y.S. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2, -9, and -14, tissue inhibitors of metalloproteinase-1, and matrix proteins in human placenta during the first trimester. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 240-246 , 2000.

CAPÍTULO II

**ANÁLISE ZIMOGRÁFICA DAS METALOPROTEINASES (MMPS) E
CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA NO PLASMA SEMINAL
CAPRINO**

RESUMO

A artrite encefalite caprina é uma doença que está disseminada no território brasileiro, causando prejuízo à produção e também ocasionando perda genética pelo sacrifício de animais de alto valor zootécnico. As metaloproteinasas são proteases envolvidas na remodelação da matriz celular sob determinadas circunstâncias, entre elas, infecções, artrites, apoptose celular, embriogênese, entre outros. No sistema reprodutivo de machos mamíferos já foram identificadas, sendo na espécie humana mais investigada. No entanto, referindo-se aos animais, este é o primeiro trabalho sobre identificação e caracterização das metaloproteinasas na espécie caprina em condições normais e em animais acometidos pelo vírus da Artrite encefalite Caprina (CAE). Utilizou-se 12 reprodutores sendo 06 soropositivos e 06 soronegativos para a CAE. As coletas de sêmen ocorreram entre junho e novembro de 2013, perfazendo 20 coletas por animal. Identificou-se no plasma seminal de caprinos sadios as metaloproteinasas MMP-2 (64-66 kDa), proMMP-9(89-91 kDa), MMP-9(80-84 Da) e MMP-1 (39-41kDa). O volume médio das mesmas, que refletem suas atividades, foram 64,89 para proMMP-9; 19,47 para MMP-9; 407,61 para MMP-2 e 120,18 para MMP-1, em animais sadios. Quanto aos animais soropositivos para CAE, observou-se essas mesmas MMPs, porém com expressão mais elevada. (46,60 para proMMP-9; 23,50 para MMP-9; 412,44 para MMP-2) com exceção da MMP-1, que apresentou maior atividade nos negativos. Quanto aos parâmetros espermáticos, os animais sadios e soropositivos para CAE apresentaram valores normais dentro do estabelecido para a espécie, embora a concentração espermática dos soropositivos tenha sido superior e significativa ($p < 0,05$) (Negativo 3,66; Positivo 4,22). Também observou-se nos animais infectados pela CAE correlação negativa e significativa entre as MMP-2 e proMMP-9 com o volume e vigor espermático, respectivamente. Possivelmente esses achados possam sugerir interferência do CAEV na qualidade do sêmen, sem no entanto, afetar sua qualidade, sugerindo-se mais estudos sobre as MMPs na espécie caprina.

Palavras-chave: caprino, plasma seminal, artrite encefalite caprina, metaloproteinasas

ABSTRACT

The caprine arthritis encephalitis is a disease that is widespread in Brazil, causing economic losses to the production and also causing genetic loss by the sacrifice of animals of high genetic value. Metalloproteinases are proteases involved in remodeling of extracellular matrix under certain circumstances including, infections, arthritis, cell apoptosis, embryogenesis, among others. The MMPs are identified in the reproductive system of male mammals, especially in human. However, this is the first work on identification and characterization of metalloproteinases in normal and infected goats by caprine arthritis encephalitis virus (CAE). It was used 12 breeding of Anglo-Nubian and Saanen divided into two groups, being six seropositive and six seronegative for CAE. The semen collections occurred between June and November 2013, totaling 20 samples per animal. It was identified in seminal plasma of healthy goats MMP-2 (64-66 kDa), proMMP-9 (89-91 kDa), MMP-9 (80-84 Da) and MMP-1 (39-41kDa). The average volume of the same, reflecting their activities, were 64.89 for proMMP-9; 19,47 for MMP-9; 407.61 for MMP-2 and 120.18 for MMP-1 in healthy animals. Concerning the seropositive animals for CAE, it were observed these same MMPs, although with higher expression: (46.60 for proMMP-9; 23.50 for MMP-9 and 412.44 for MMP-2) with the exception of MMP-1, which showed greater activity in the negative group. With respect to sperm parameters, the healthy and seropositive animals for CAE showed normal values within the established for the species, but the sperm concentration was higher and significant ($p < 0.05$) (negative 3.66; positive 4.22) in seropositive group. Also it was observed in animals infected a negative and significant correlation between MMP-2 and proMMP-9 with volume and spermatic vigor, respectively. Possibly these findings may suggest interference of CAEV in semen quality, without affecting the quality, suggesting more studies on MMPs in goats.

Key words: goat, seminal plasma, caprine arthritis encephalitis, metalloproteinases

INTRODUÇÃO

A artrite encefalite caprina (CAE) tem acarretado perdas econômicas nos rebanhos caprinos e afeta indivíduos de diferentes raças, idade e de ambos os sexos, podendo apresentar sintomatologia nervosa, bem como evidenciar poliartrite, pneumonia e mastite, dentre outras (NORMAN e SMITH, 1983).

Travassos et al. (1998, 1999) relataram a presença do DNA proviral do vírus da CAE (Lentivírus de pequenos ruminantes - LVPR) no sêmen de caprinos natural e experimentalmente infectados, indicando a possibilidade de ser esta mais uma via de infecção. Souza et al. (2013) confirmou a via sexual como mais uma forma de transmissão do vírus por ser mais uma porta de entrada com 100% de potencial de infecção.

A manifestação da CAE em reprodutores e matrizes de alto valor genético tem acarretado problemas para os caprinocultores, uma vez que aqueles que não têm sua produtividade alterada acabam representando uma séria ameaça à sanidade do rebanho. Porém, o sacrifício é, muitas vezes, inviável, levando-se em consideração os prejuízos econômicos (PINHEIRO et al., 2005).

Diante deste contexto, têm-se buscado alternativas para um melhor aproveitamento dos animais acometidos pela CAE, seja na forma de conservação de germoplasma ou na adoção de tecnologia que permita a manutenção desses animais no rebanho, sem aumentar, contudo, a prevalência da enfermidade. Todavia, dados sobre os parâmetros reprodutivos de animais infectados pelo vírus da CAE são escassos na literatura, o que dificulta a avaliação da viabilidade reprodutiva para a manutenção destes animais.

A proteômica estuda moléculas que estão envolvidas na reação do sistema imune inato às infecções causadas por bactérias e vírus, e, portanto, seu estudo poderá esclarecer a patogenia das lentiviroses, no caso da CAE, podendo vir a ser potenciais biomarcadores para diagnóstico da infecção, assim como ser o elo para descobrir possíveis anti-virais. Entre as proteases, as MMPs participam como mediador do processo inflamatório, viabilizando, desta forma, o monitoramento e o prognóstico de doenças. As MMPs e seus inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), suas inibidoras, trabalham em conjunto para remodelar a matriz extracelular (MEC), e de acordo com Sekhon (2010), inibem seletivamente certas MMPs.

Na medicina veterinária, o uso da proteômica para diagnóstico e prognóstico das doenças ainda é pouco utilizado, sobressaindo-se o da mastite bovina, da doença respiratória bovina e da broncopneumonia em bezerros, dentre outros. Já em humanos, os trabalhos estão mais avançados, em especial com o HIV, pertencente a mesma família do CAEV, vindo a ser identificadas proteínas que bloqueiam a replicação do vírus.

Embora pouco se saiba sobre a expressão das MMPs e sua função no sistema reprodutivo masculino, acredita-se estar envolvida na regulação da função dos espermatozoides. O plasma seminal contém muitas proteinases originárias das células testiculares, da próstata e de outras glândulas sexuais acessórias. Estudos têm identificado as MMPs como uma das proteínas expressas no plasma seminal humano (BAUMGART et al., 2002; BUCHMAN-SHAKED et al., 2002; SHIMOKAWA et al., 2002; TENTES et al., 2007). Contudo, a identidade e função das MMPs no sistema reprodutivo do macho é na maioria das vezes desconhecida (HULBOY et al., 1997; BAUMGART et al., 2002; LE MAGUERESSE-BATTISTONI, 2008).

De acordo com Hulboy et al., (1997), os membros da família das metaloproteinases, em especial as MMP-2 (72 kDa) e MMP-9 (92 kDa) são expressas em diversos órgãos do sistema reprodutivo e nos processos celulares, indicando existir uma diferença entre o perfil das MMPs entre amostras de sêmen normal e anormal de humanos. As MMP-2, MMP-3, MMP-9 e gelatinases estão presentes nos fluidos dos testículos e epidídimos de carneiro, javali e garanhão (METAYER et al., 2002), mas não existe ainda estudos no plasma seminal de caprinos, sendo esta a primeira abordagem sobre o assunto na espécie.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e identificar as MMPs no plasma seminal de caprinos sadios e comparar com animais soropositivos para CAE, relacionando as mesmas com a qualidade do sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e período experimental

O estudo foi realizado Fazenda Experimental – Santa Rita, pertencente à Embrapa Caprinos e Ovinos, no município de Sobral, Ceará, situada a 3°41'32" de latitude Sul e 40°20'53" de longitude Oeste, com 75m de altitude no município de Sobral, na região Norte do Ceará, no semiárido. O clima da região, pela classificação de Köppen, é Aw de Savana (MILLER, 1971), caracterizado por um período chuvoso (inverno) de janeiro a junho e um período seco (verão) de julho a dezembro, com temperaturas elevadas ao longo do ano, com temperaturas médias máximas de 32°C e mínimas de 22°C e pluviosidade média de 759 mm/ano e umidade relativa do ar de 69%. Os solos são do tipo bruno não-cálcico e latólico, cobertos por uma vegetação de caatinga sucessional, hiperxerófila, com árvores de pequeno porte a médio (FUNCEME, 2009).

O período experimental correspondeu aos meses de junho a novembro e, segundo a estação meteorológica da instituição, foi marcado pelos valores médios de pressão (hPa): 1000,8; Temperatura (°C): 27,7; Total de precipitação (mm): 282; Temperatura máxima: 35,4; Temperatura mínima: 21,9; Insolação total (h): 273; Umidade (%): 59. Os valores de precipitação e temperatura foram semelhantes às condições experimentais de Ávila (2013) semelhantes às dela na mesma região (INMET, 2013).

Comitê de ética

O trabalho experimental foi submetido ao Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), sendo registrado sob o número 007.12 e aprovado para a realização.

Animais experimentais

Os animais experimentais foram constituído por 12 reprodutores, com idade média de 4 anos. Eles foram divididos em dois grupos experimentais, um constituído por animais naturalmente infetados para CAE e outro soronegativo. A comprovação da infecção pelo CAEV foi feita através do teste de Western Blotting, realizados antes do início das atividades experimentais. Esses animais eram considerados livres do CAEV após comprovação, de no mínimo, três testes de IDGA e de Western Blotting com resultado negativo. Foi realizado ainda, em ambos os grupos, um exame andrológico segundo preconizado pela CBRA (2013).

Visando reduzir ao máximo o efeito ambiente sobre as variáveis, os animais foram abrigados em condições de manejo semelhante, em baias coletivas sob regime semi-intensivo onde recebiam capim elefante picado (*Pennisetum purpureum schum*), e eram suplementados com 300g de concentrado, no cocho, contendo 70% de milho, 28% de farelo soja e 2% de calcário, além de receberem sal mineral e água *ad libitum*.

Ao exame andrológico, todos os reprodutores apresentaram o testículo livre sem aderência à bolsa escrotal, ausência de sensibilidade dolorosa e de consistência tenso-elástica. O pênis apresentava-se normal à inspeção visual. Alguns machos apresentaram escroto bipartido, sendo estes achados dentro da normalidade para a espécie, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (2013). Todos os reprodutores utilizados neste trabalho foram capazes de responder satisfatoriamente à colheita de sêmen durante o experimento.

Coleta e avaliação de sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas com intervalos de uma semana, perfazendo um total de vinte amostras por animal, entre junho e novembro de 2013. Para tanto, utilizou-se o método de vagina artificial, modelo curto (MIES FILHO, 1962), tendo, como manequim, uma fêmea em estro induzido pela aplicação de 1,0 mL de Cipionato de estradiol, via intramuscular. Os dados referentes ao exame andrológico de cada animal eram registrados e o plasma seminal separado através da centrifugação.

Imediatamente após a coleta, o sêmen era mantido à temperatura de 37°C e encaminhado ao laboratório onde foram avaliadas segundo as seguintes variáveis: aspecto (Aquoso; Leitoso; Leitoso espesso; Cremoso; Cremoso espesso), volume do ejaculado (mL), motilidade progressiva individual (%), vigor (0-5) e concentração

espermática ($\times 10^9/\text{mL}$), seguindo recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Todas as avaliações espermáticas foram feitas por uma única pessoa, para minimizar erros de análises.

Uma vez coletado e avaliado, o sêmen foi acondicionado em tubos com fundo cônico identificados para cada amostra, e submetido à centrifugação em duas etapas, sendo a primeira à 1.500 rcf para separar os espermatozoides do plasma seminal, e a segunda à 10.000 rcf, para separar as demais células não espermáticas do plasma, ambas a 8°C por 30min cada. O plasma obtido foi armazenado em freezer a -80°C até a análise.

Testes Laboratoriais

Quantificação das proteínas totais

A concentração protéica 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 duplicata, 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, 5, 10, 15, 20 mg) de BSA. Portanto, a quantificação da concentração de proteínas totais do plasma seminal foi obtida com o cruzamento dos dados obtidos no espectrofotômetro com os da curva.

Zimografia

Para realização da zimografia as amostras de plasma foram solubilizadas em tampão de amostra de forma que a concentração final era 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Desse total, utilizou-se alíquotas de 10 μL , cujas concentrações de proteínas variavam de 4 a 20 μg por poço. 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 variou 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 à 37°C em solução de tampão contendo 50 mM Tris HCl, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂. 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 plasma seminal de caprinos.

Os géis e as bandas digeridas evidentes tiveram sua imagem registrada por meio do *scanner* 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 picos por densitometria das bandas.

Padronização da zimografia

Para definir qual seria a concentração protéica ideal para análise do plasma seminal através da técnica de zimografia foram realizados ensaios onde se utilizou concentrações crescentes que variavam de 4 a 32µg/µL de proteína. As amostras utilizadas eram oriundas de um representante de cada grupo. Após a análise dos géis foi possível constatar que, para ambos os grupos, a concentração de 20 µg/µL permitia a formação de bandas mais nítidas e com contornos bem definidos. Sendo esta, então, a concentração definida como adequada para aplicação da zimografia utilizando o plasma seminal (Figura 1).

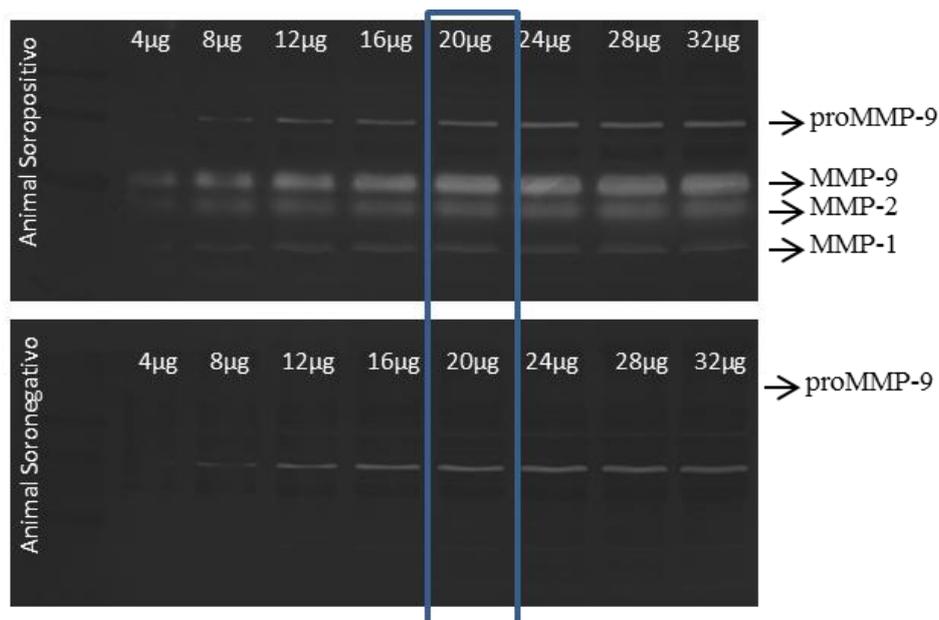


Figura 1. Padronização do teste de zimografia para plasma seminal de caprinos soronegativos e soropositivos para CAE, utilizando-se concentrações crescentes de proteínas e elegendo-se a de 20µg como ideal para o teste.

Análise estatística

Os dados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, a fim de serem verificados os pressupostos de normalidade e homogeneidade, respectivamente. Os valores de volume foram transformados para o logaritmo de base 10, a fim de atenderem ao pré-requisito de normalidade, bem como os valores de concentração foram transformados pela potência de segunda ordem. Aplicou-se então a Análise de Variância (ANOVA) para estes dados. Já os dados de motilidade e vigor foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney, enquanto os dados de aspecto foram analisados somente por meio de frequências simples e percentuais. Verificou-se também a correlação entre o Volume da MMP com os parâmetros seminais através do Coeficiente de Correlação de Pearson. Levou-se sempre em consideração o nível de 5% de significância. O *software* estatístico utilizado para as análises foi o SAS 9.2 (2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo identificou no plasma seminal de caprinos sadios e com CAE a presença da forma latente proMMP-9 (89-91 kDa) e das formas ativas MMP-2 (64-66 kDa) e MMP-9 (80-84 Da), onde as áreas claras do gel indicam o processo proteolítico das enzimas (Figura 2A e B). Estes achados concordam com os já descritos para humanos (BAUMAN et al., 2002; TENTES et al., 2007; SHIMOKAWA et al. 2002; BAUMAN et al. 2002; SEABRA, 2006), ratos (BROWN et al., 1990; DALMOLIN et al., 2007; LOKESHAWAR et al., 1993; BELHONICE et al., 2010) e cães (SAENGSOI et al., 2011). Foi detectada ainda, a presença da MMP-1(39-41kDa), não descrita no plasma seminal de outras espécies. Essas quatro MMPs se repetem em todos os animais, porém com frequências e intensidades diferentes (Gráfico 2A e B). Não foi possível identificar uma faixa de peso molecular que sugerisse a presença da forma latente proMMP-2. Estes achados são pioneiros para caprinos. Acredita-se que a MMP-2 também é produzida na sua forma inativa, embora não tenha sido possível identificá-la. Em animais soropositivos foram observadas as mesmas MMPs, no entanto, com maior atividade enzimática demonstrada através da maior intensidade nas bandas (Figura 2B). Como não foram encontrados dados sobre as MMPs em plasma seminal de caprinos com CAE não foi possível comparar e discutir estas informações.

Segundo a literatura, as metaloproteinases descritas mais comumente no plasma seminal são as formas ativas e latentes MMP-2 e MMP-9, proMMP-2 e proMMP-9, respectivamente. Embora não sabendo ao certo qual a origem e função dessas MMPs, sua presença tem sido descrita no plasma seminal de humanos sadios e com azoospermia (BAUMGART et al., 2002; TENTES et al., 2007; DU et al., 2012).

Baumgart et al. (2002) também encontraram a forma latente e ativa da MMP-2 em amostras de sêmen humano, mas não relatam a presença da MMP-9. Tentes et al (2007) identificaram ambas as formas latente e ativa da MMP-2 e MMP-9 em amostras de plasma seminal de humanos sadios. Para Tentes et al. (2007), as formas latentes de ambas as MMPs são predominantes sobre as formas ativas, sendo entre estas a MMP-2 a mais elevada.

Shimokawa et al. (2002) identificaram as bandas MMP-2 e MMP-9 em suas formas ativa e latente. Ainda segundo esses autores, as pro-MMP-9 (92 kDa), pro-MMP-2 (72 kDa) e MMP-2 (67 kDa) apresentam-se em ordem decrescente de concentração no plasma seminal humano, sendo estas bandas e mais duas adicionais de

52 e 45 kDa detectadas por zimografia de gelatina em amostras parcialmente purificadas por cromatografia. Os autores sugerem que estas bandas menores sejam produtos de degradação da MMP-2 e da MMP-9.

Baumgart et al. (2002) detectaram a presença de MMP-2 e -9, e TIMP-1 e 2 no plasma seminal humano e correlacionaram a presença destes componentes em pacientes normospérmicos e azoospérmicos, demonstrando que a concentração de MMP-2 era significativamente menor em indivíduos azoospérmicos, enquanto as MMP-9, TIMP-1 e -2 não mostraram-se significativamente diferentes nos dois grupos de pacientes estudados.

Trabalhando com células de Sertoli de ratos, tanto Brown et al, (1990) quanto Dalmolin et al. (2007) detectaram a presença da MMP-2 supondo serem essas células potenciais locais de secreção desta MMP. Posteriormente, pesquisas demonstraram a presença das formas latente e ativa da MMP-2 em outras glândulas do trato reprodutivo do macho, próstata e vesículas seminais, indicando a capacidade secretora dessas metaloproteinases nesses órgãos (LOKESHAWAR et al, 1993; BELHOCINE et al., 2010). Shimokawa et al. (2002) e Riccioli et al. (2005) atribuem às MMPs dentre outras funções, a de contribuir na liquefação do sêmen após a ejaculação. Van Den Steen et al. (2002) afirmam que a MMP-9 é ativada principalmente por outras MMPs, embora Baumgart et al. (2002) afirmem que sua origem e função potencial permanecem por ser elucidadas.

Trabalhando com tumores humanos, Stamenkovic (2000) e Westermarck e Kähäri (1999) encontraram a MMP-2, ou gelatinase A, com 75 kDa na forma inativa e 65 kDa na forma ativa e a MMP-9, ou gelatinase B com 92 kDa na forma inativa e 84 kDa quando ativada. Saengsoi et al. (2011) identificaram estas mesmas proteases estudando o plasma seminal de caninos saudáveis. De acordo com Hulbooy et al. (1997) estas proteases estão presentes nos vários órgãos reprodutivos e no processo celular. No entanto, não houve nesses trabalhos nenhuma citação à existência da MMP-1 no plasma seminal.

Estes resultados corroboram com os achados de Bauman et al. (2002) quando avaliaram a presença das MMPs em suas formas latentes e ativas no plasma seminal humano. Apenas a concentração de MMP-2 foi significativamente diminuída em homens azoospérmicos em comparação com os pacientes normozoospérmicos, havendo uma correlação significativa com o número de espermatozoides ($r = 0,54$, $p < 0,0001$).

Afirmam ainda que a MMP-2 no plasma seminal foi fortemente correlacionada com a contagem de espermatozóides.

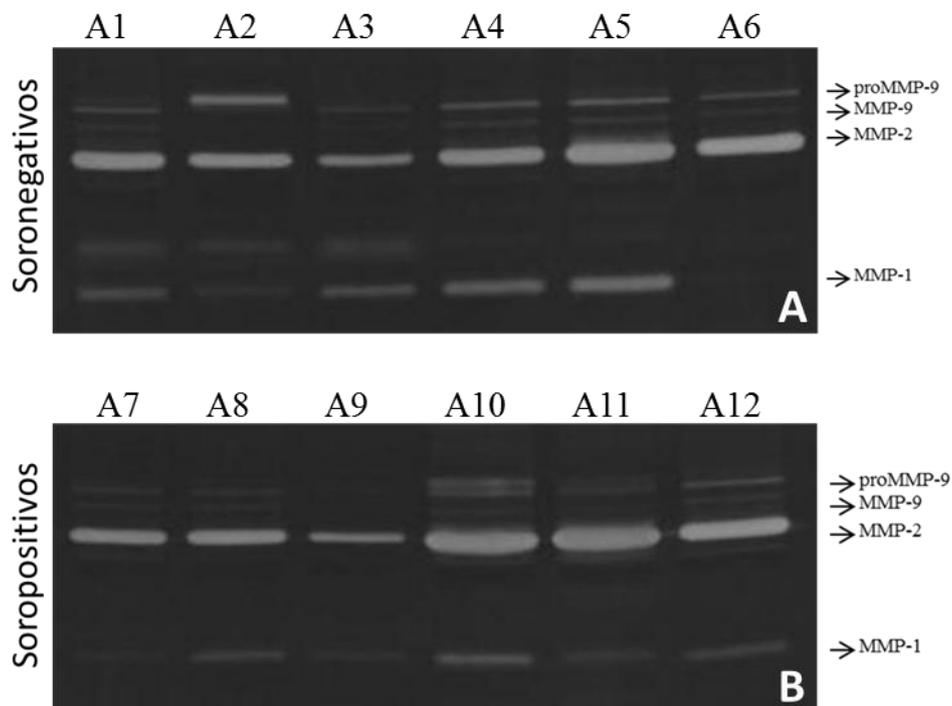


Figura 2: Atividade enzimática das metaloproteinases do plasma seminal de caprinos. (A) gel de animais soronegativo e (B) de animais soropositivos; (A1-A12) corresponde aos 12 animais experimentais.

Observou-se que a MMP-1 (39-41kDa) apresenta diferença significativa ($p < 0,05$) referente a sua frequência e volume entre os grupos, sendo maior nos soronegativos. É possível que nos animais soropositivos esteja ocorrendo uma destruição maciça de macrófago devido à presença da infecção ou, como as MMPs possivelmente sejam produzidas nas células de Sertoli, glândulas vesiculares e próstata, provavelmente esses órgãos não estejam sendo desafiados pela infecção e, portanto, não secretando as MMPs nesses locais. Como houve elevação significativa da MMP-1 nos negativos e, sendo ainda desconhecida a função desta MMP, fica uma incógnita a razão pela qual os animais soronegativos apresentaram alta concentração desta protease. Supõe-se que a MMP-1 seja inerente ao plasma seminal caprino porém, sua expressão ou ativação parecem ser comprometidas no estado de infecção pelo CAEV. Pode ser que, devido a sua presença ter sido relatada em áreas de rápida remodelação tecidual (SEABRA, 2006), sua presença tenha algo a ver com a dinâmica tecidual dos testículos na formação das células espermáticas.

De acordo com Seabra (2006), trabalhando com periodontites em humanos, observou que a MMP-1, ou colagenase 1, é uma enzima com 52 kDa na forma inativa e 41 kDa na forma ativa que é expressa *in vivo* em áreas de rápida remodelação tecidual fisiológica ou patológica. Lynch e Matrisian (2002) relataram que a MMP-1 degrada, dentre outros substratos, a gelatina. Nabeshima et al. (2002) e Westermarck e Kähäri (1999) relatam a expressão desta enzima nos fibroblastos, ceratinócitos, condrócitos, monócitos, macrófagos, hepatócitos e uma variedade de células tumorais em humanos.

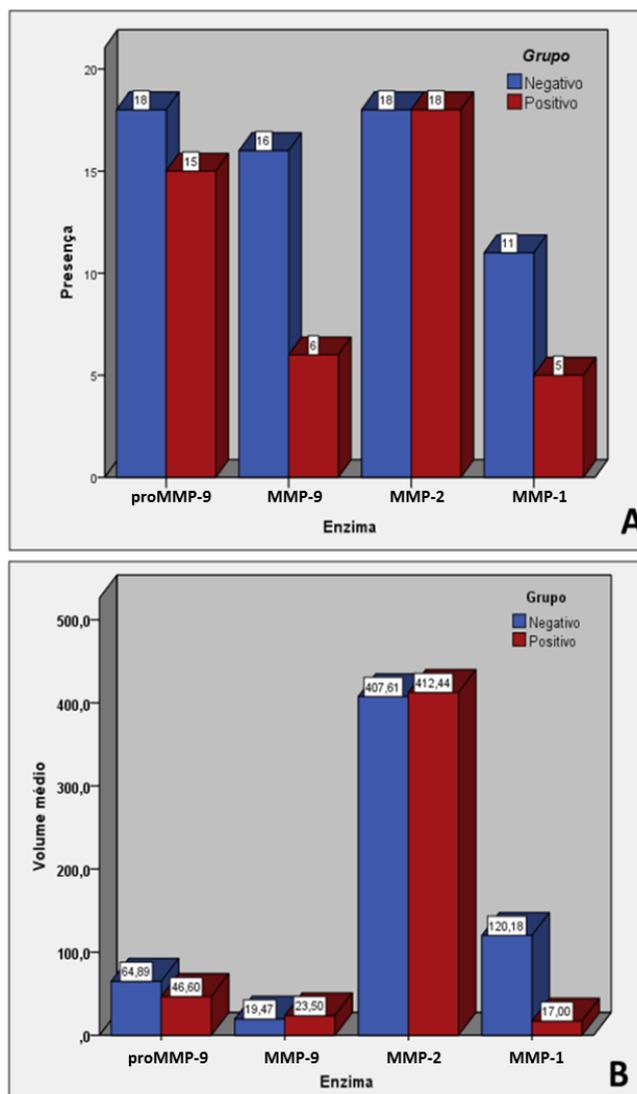
Sugere-se estudos mais profundos sobre a função da MMP-1 no sistema reprodutivo do macho caprino. Não foi encontrado na literatura dados que pudessem servir de referência para a discussão destes achados.

A MMP-2 é derivada principalmente a partir de fibroblastos, células endoteliais e tumorais. A ativação da pro-MMP-2 ocorre principalmente na superfície da célula através da interação com a membrana (ZHANG et al., 2009).

A MMP-9 é uma enzima de alto peso molecular que pode ser secretada por vários tipos celulares, dentre eles neutrófilos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, fibroblastos, várias células musculares vasculares lisas e células do miocárdio, entre outros tecidos (RAM et al., 2006). Sua expressão e secreção estão sob controle regular e restrito de genes de transcrição, síntese, secreção, ativação e inibição. Dentre os estímulos para sua produção está a presença de vírus em quadros de infecções. Tal estímulo provoca uma mudança estrutural e exposição da região de ativação Zn^{2+} dependente da forma latente (pro-MMP-9) (KOTYZA et al., 2005).

A ocorrência das formas latente e ativa da MMP-9 foi maior nos animais soronegativos, havendo, no entanto, diferença significativa ($p < 0,05$) apenas na forma ativa (Gráfico 1A), embora, os valores de volume médio, indicador de atividade, apresentem-se mais elevados nos animais soropositivos.

Gráfico 1 (2). Presença (A) e volume médio (pixel) (B) das MMPs no plasma seminal de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE.



Analisando os animais individualmente, quanto à presença e ausência dessas enzimas, pode-se observar que a MMP-2 estava presente em todos os animais soropositivos e soronegativos, e em todas as observações, enquanto a MMP-9 esteve presente em todos os animais do grupo soronegativo, mas não em todos os soropositivos ao longo das coletas.

A análise densitométrica dos zimogramas das amostras de plasma seminal de reprodutores soropositivos e soronegativos para CAE estão apresentadas nas Figuras 3 e 4. Em ambas as figuras é possível avaliar o comportamento proteolítico em quatro partes: em A, atividade enzimática das MMPs presentes nas amostras através da visualização de bandas claras que demonstram a digestão de proteínas em locais específicos. A área B, é obtida a partir das descoloração excessiva da A o que torna

possível observar que, as áreas correspondentes à degradação enzimática apresentam poucas proteínas. Esses comportamentos, tanto das MMPs quanto da proteínas restante são demonstrados em forma de picos densitométricos nas áreas C e D de cada figura.

O perfil densitométrico dos dois grupos mostrou uma maior atividade (concentração) da MMP-9 nos animais soropositivos quando comparados aos soronegativos, porém sem diferença estatística ($p > 0,05$). Quanto a MMP-2, os animais soropositivos e soronegativos não apresentaram variação na intensidade nos dois grupos, porém apresentaram maior volume médio em relação às demais MMPs encontradas neste trabalho.

Analisando os perfis densitométricos individuais dos animais soronegativos, observou-se picos com bases mais estreitas provavelmente em virtude da ausência do processo infeccioso. No caso dos soropositivos, pode-se observar um perfil dos picos com bases mais largas, ampliando-se para aproximadamente 180 pixels. Este perfil mais expressivo dos animais soropositivos poderá ser devido à presença do vírus já que este fato atua como fator promotor da produção das MMPs. Outra possibilidade para a maior expressão do grupo dos soropositivos é o fato de as MMPs terem também o poder de ativação de formas inativas de outras MMPs. Uma vez que os animais soropositivos apresentam uma maior quantidade de MMPs estimuladas pela presença do vírus, essa maior quantidade promoverá, também, a ativação de uma maior quantidade de formas inativas.

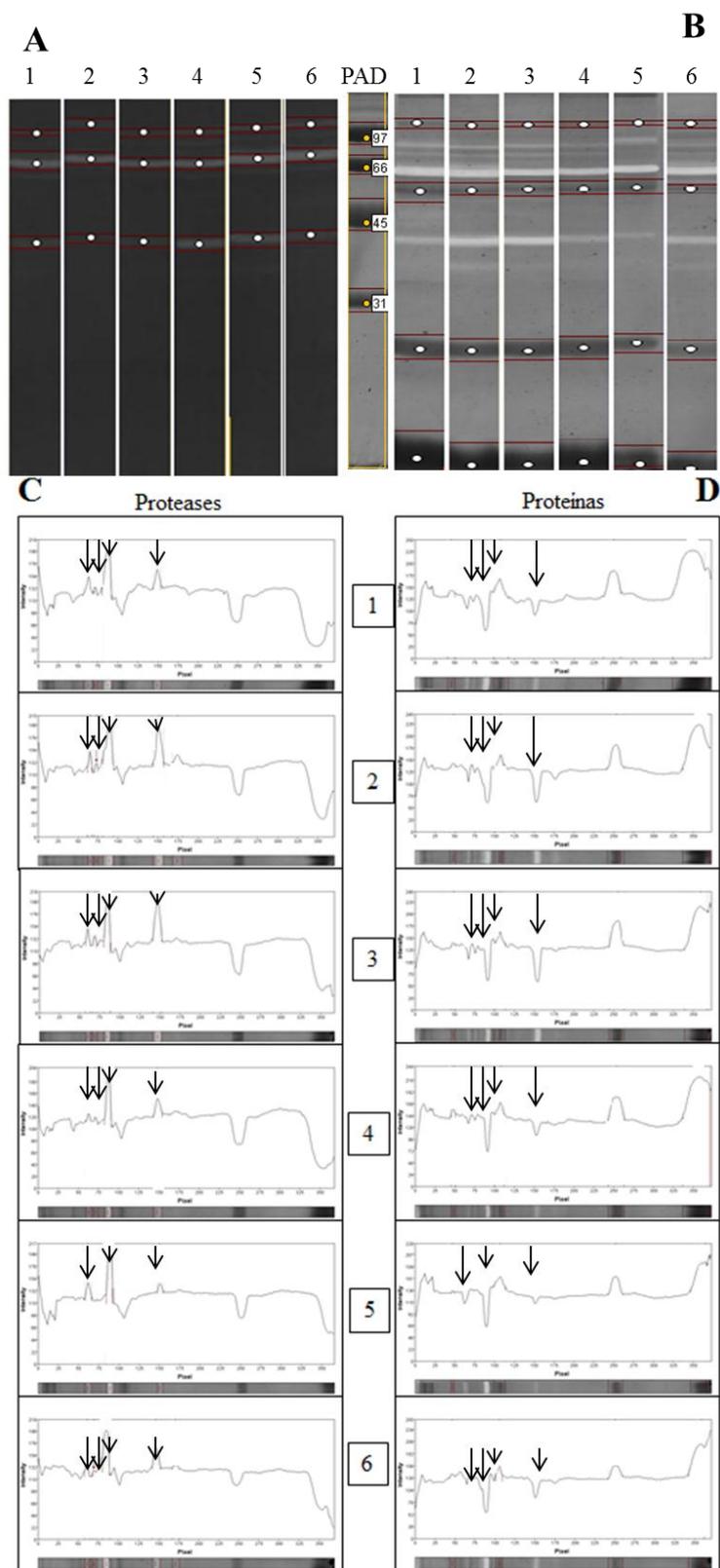


Figura 3. Análise densitométrica das proteases e proteínas de amostras de plasma seminal caprino soronegativos para CAE. Em **A** as bandas digeridas de gelatinases em gel de poliacrilamida 10% mostrando a atividade das MMPs (bandas claras) e, em **B**, proteínas visíveis após contínua descoloração dos géis de zimografia. Em **C**, representação esquemática do perfil densitométrico proteases e proteínas do plasma seminal caprino. Os números de 1 a 5 referem-se às amostras de plasma seminal de diferentes animais. PAD – é o padrão utilizado com pesos (97, 66, 45 e 31kDa).

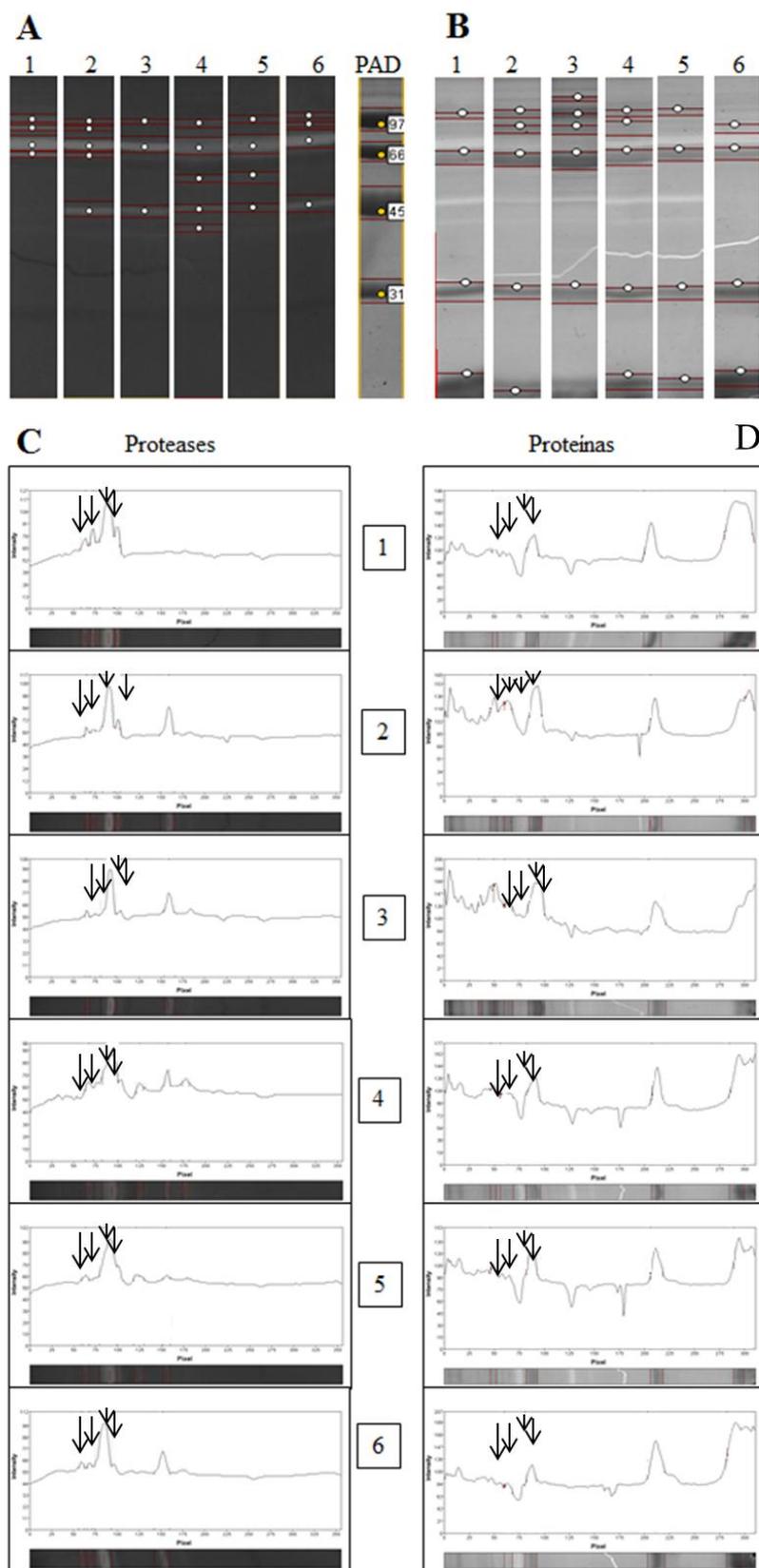


Figura 4. Análise densitométrica das proteases e proteínas de amostras de plasma seminal caprino soropositivos para CAE. Em **A** as bandas digeridas de gelatinases em gel de poliacrilamida 10% mostrando a atividade das MMPs (bandas claras) e, em **B**, proteínas visíveis após contínua descoloração dos géis de zimografia. Em **C**, representação esquemática do perfil densitométrico proteases e proteínas do plasma seminal caprino. Os números de 1 a 5 referem-se às amostras de plasma seminal de diferentes animais. PAD – é o padrão utilizado com pesos (97, 66, 45 e 31kDa).

Cogni et al. (2013), estudando patologias cardíacas, atribuíram um papel protetor à MMP-9. Acredita-se que a infecção deprime a capacidade protetora, visto que nos animais soropositivos a MMP-9 apresentaram menor atividade, fato esse observado através do perfil densitométrico (Figura 4). Este achado talvez possa indicar que a infecção pelo vírus da CAE inibiu a produção ou a transformação da forma latente para ativa da MMP-9. No entanto, sugere-se que outras pesquisas sejam realizadas a fim de que se confirmem estes achados.

Os dados do volume médio referentes à expressão e atividade das proteases revelam um alto volume quanto a MMP-2 e baixo volume médio da MMP-9 dentro do mesmo grupo e em ambos os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Volume médio (pixels) das MMPs de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE.

Grupo	proMMP-9	MMP-9	MMP-2	MMP-1
Negativo	64,89 ^A ± 71,50	19,47 ^A ± 12,44	407,61 ^A ± 244,30	120,18 ^A ± 141,25
Positivo	46,60 ^A ± 45,12	23,50 ^A ± 22,40	412,44 ^A ± 201,08	17,00 ^B ± 8,92

^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente a 5% ($p > 0,05$) pela ANOVA.

Sharma et al., (2013) identificaram proteínas que apresentam alta e baixa expressão no plasma seminal de homens com baixa qualidade espermática. A presença distinta de algumas delas pode servir como potenciais marcadores e fornecer informações sobre o papel desempenhado pelo mecanismo destas na infertilidade masculina. Acredita-se que esta mesma observação possa ser feita com relação às MMPs e qualidade do sêmen buscando associar a presença ou ausência de determinada enzima com a viabilidade espermática, no entanto, mais estudos nesse sentido devem ser realizados a fim de avaliar essa relação.

Na análise dos parâmetros espermáticos obteve-se concentração média de 4,22 ($\times 10^9$ /mL) para os animais soropositivos e 3,66 ($\times 10^9$ /mL) para os soronegativos, apresentando, portanto, diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$) (Tabela 2). Os outros parâmetros (volume, motilidade e vigor) apresentaram-se mais elevados nos animais pertencentes ao grupo soronegativo porém não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) (Tabela 2). Segundo o CBRA (2013) o volume seminal, motilidade, vigor e concentração espermáticos são considerados normais com valores a partir de 0,8ml, 70%, 3 e 2 $\times 10^9$ /mL, respectivamente. Sendo assim, é possível afirmar que todos os

animais de ambos os grupos são considerados como dentro dos padrões andrológicos estabelecidos para a espécie e corroboram, ainda, com os achados de Rodríguez *et al.* (2005), quando demonstraram que a qualidade seminal de reprodutores caprinos acometidos pela CAE não foi afetada. Os valores de motilidade, vigor e volume para os animais soronegativos e, os de concentração e volume nos soropositivos foram superiores aos encontrados por Ávila (2013) que também afirmaram que animais portadores da CAEV apresentaram boa qualidade seminal. Estes resultados foram superiores também aos descritos para Santos e Simplício (2000) em animais da raça Moxotó ou mestiços de Moxotó x Pardo Alpina avaliados na mesma região.

Tabela 2. Média dos parâmetros seminais de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE

Grupo	Volume (ml) $\bar{x} \pm dp$	Concentração ($\times 10^9$ /mL) $\bar{x} \pm dp$	Motilidade (%) $\bar{x} \pm dp$	Vigor (0-5) $\bar{x} \pm dp$
Negativo	1,33 ^A \pm 0,58	3,66 ^A \pm 0,72	87,50 ^a \pm 6,22	4,25 ^a \pm 0,45
Positivo	0,97 ^A \pm 0,61	4,22 ^B \pm 0,71	84,17 ^a \pm 7,52	3,89 ^a \pm 0,58

^{A,B} letras maiúsculas sobrescritas iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente a 5% ($p > 0,05$) pela ANOVA.

^{a,b} letras minúsculas sobrescritas iguais, na mesma coluna, não diferem estatisticamente a 5% ($p > 0,05$) pelo teste de Mann-Whitney.

Entre as variáveis seminais pode-se observar que houve correlação positiva e significativa ($r=0,69$) entre motilidade e vigor nos animais soropositivos (Tabela 3). As correlações entre as demais variáveis não foram significativas mesmo tendo sido maiores nos animais positivos.

Tabela 3. Correlação entre os parâmetros espermáticos de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE

Grupo	Volume x Concentração	Motilidade x Vigor
Negativo	0,12 ^{NS}	0,26 ^{NS}
Positivo	0,15 ^{NS}	0,69 ^{***}

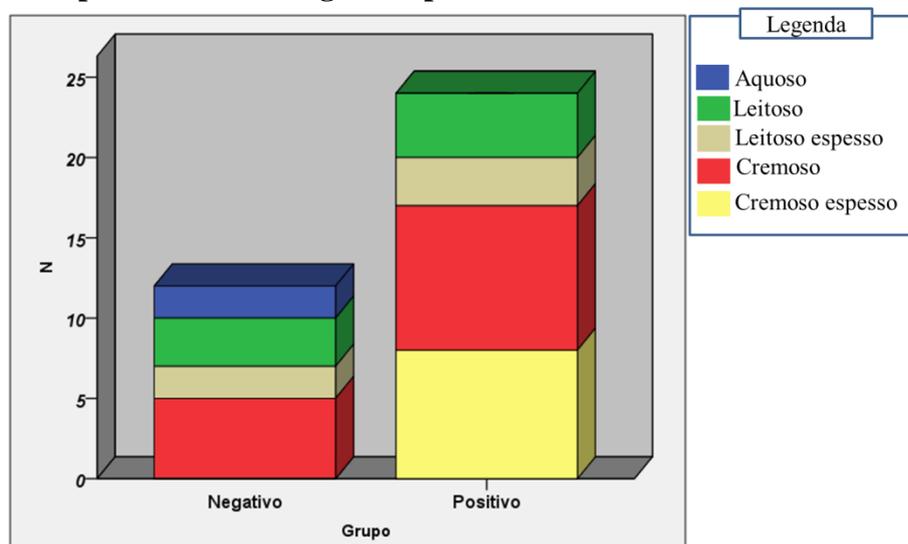
^{NS} Não significativo ($p > 0,05$) para o coeficiente de correlação de Pearson.

^{ns} Não significativo ($p > 0,05$) e ^{***} altamente significativo ($p < 0,001$) para o coeficiente de correlação de Spearman.

No Gráfico 2 encontra-se a descrição das ocorrências referentes aos diferentes tipos de aspecto do sêmen entre os animais soropositivos e soronegativos, observando-

se maior quantidade de aspectos cremoso e cremoso espesso nos animais soropositivos em relação aos soronegativos, indicativo de maior concentração nos primeiros.

Gráfico 2. Distribuição da ocorrência do aspecto seminal segundo os grupos de caprinos soropositivos e soronegativos para CAE



As observações dos parâmetros seminais de ambos os grupos nos permitem afirmar também que os animais soropositivos para CAE apresentaram boa qualidade seminal. A partir desta observação é possível considerar que o sêmen desses reprodutores seja compatível com o aproveitamento em biotécnicas reprodutivas. Nakhuda e Sauer (2007) estudando a utilização do sêmen de homens soropositivos para HIV, um lentivírus que acomete humanos, afirma ser possível sua utilização para a inseminação e fertilização *in vitro* em mulheres não infectadas após tratamento do ejaculado removendo o vírus. Porém, Ávila (2013) trabalhando com sêmen caprino, associou as técnicas de *swin-up*, *PCRn* com *RT-PCR-nested* e concluiu que o procedimento de lavagem não foi suficiente para promover a eliminação completa do vírus das amostras.

Portanto, serão necessários mais estudos a fim de que se desenvolva um protocolo de remoção do CAEV, assim como se verifica para o HIV, tornando possível para reprodutores caprinos infectados a utilização de seu material genético de forma segura com auxílio de biotécnicas de reprodução assistida. Esta possibilidade permite, pelo menos em parte, evitar maior perda econômica e/ou genética para a caprinocultura. Sugere-se, no entanto, que o uso desse material seja associado a medidas preventivas de

disseminação do vírus e, também, que possibilitem o monitoramento periódico dos rebanhos.

Acerca da influência das MMPs sobre os parâmetros seminais, neste trabalho observou-se correlação não significativa entre as MMPs com os parâmetros seminais exceto as correlações negativas entre proMMP-9 e vigor e entre os níveis de MMP-2 e volume seminal. Fazendo a mesma análise, Tentes et al. (2012) encontraram no plasma seminal de humanos relação positiva e significativa dos níveis de proMMP-9 com a concentração espermática, o contrário acontecendo com sua forma ativa.

A análise das correlações dos volumes das MMPs com os parâmetros seminais revelam que houve significância ($p < 0,05$) entre o vigor e o volume da forma latente proMMP-9 no grupo positivo e também entre volume de ejaculado com o volume da forma ativa MMP-2 ($p < 0,01$), também no grupo positivo. Sendo estes valores inversamente proporcionais. Os demais parâmetros, em ambos os grupos, não apresentaram correlação significativa.

Du et al (2012) trabalhando com plasma seminal humano observaram correlação negativa entre proMMP-2 e o volume do ejaculado, e correlação positiva entre a MMP-2 e esse mesmo parâmetro. A proMMP-9 apresentou correlação positiva com o volume do ejaculado enquanto a MMP-9 apresentou correlação negativa com est mesmo parâmetro. A correlação entre a expressão da MMP-2 e o volume do ejaculado é negativa e significante a 1% (Tabela 4). Estes autores também mostraram que a expressão das MMPs foram estatisticamente significativas independente da concentração seminal. Este fato discorda dos achados deste trabalho no qual as correlações observadas para o mesmo parâmetro em ambos os grupos, soropositivos e soronegativos, não mostraram significância ($P < 0,05$), embora tenha havido diferença estatística a 5% quanto a média da concentração entre os grupos (Tabela 4).

De acordo com os mesmos autores, a expressão da proMMP-2 e da MMP-2 diminui com o aumento da concentração seminal em humanos, enquanto a expressão da proMMP-9 e MMP-9 aumenta proporcionalmente quando a concentração seminal está elevada.

Tabela 4. Correlações do volume da MMP com os parâmetros seminais, segundo a enzima e por grupo.

Enzima	Grupo	Volume	Concentração	Motilidade	Vigor
proMMP-9	Negativo	-0,09 ^{NS}	-0,34 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	-0,05 ^{NS}
	Positivo	0,09 ^{NS}	-0,30 ^{NS}	-0,46 ^{NS}	-0,59 [*]
MMP-9	Negativo	0,46 ^{NS}	-0,41 ^{NS}	-0,03 ^{NS}	0,35 ^{NS}
	Positivo	-0,16 ^{NS}	-0,10 ^{NS}	-0,26 ^{NS}	0,10 ^{NS}
MMP-2	Negativo	-0,07 ^{NS}	-0,32 ^{NS}	-0,29 ^{NS}	0,47 ^{NS}
	Positivo	-0,67 ^{**}	-0,20 ^{NS}	0,22 ^{NS}	0,11 ^{NS}
MMP-1	Negativo	0,43 ^{NS}	0,04 ^{NS}	-0,15 ^{NS}	0,58 ^{NS}
	Positivo	0,50 ^{NS}	0,31 ^{NS}	0,59 ^{NS}	0,30 ^{NS}

^{NS} Não significativo ($p > 0,05$); *, ** significativos a 5% e 1%, respectivamente, pelo coeficiente de correlação de Pearson.

CONCLUSÃO

É a primeira vez que as MMPs foram identificadas e caracterizadas no plasma seminal de caprinos sadios e soropositivos para CAE no Nordeste do Brasil, sendo elas as MMP-2, proMMP-9, MMP-9 e MMP-1;

Sugere-se que a MMP-1 seja característica do plasma seminal de caprinos;

A pro-MMP-9 e a MMP-2 tiveram influência negativa sobre o vigor e o volume do ejaculado em animais positivos para CAE;

O perfil densitométrico das MMPs do plasma seminal poderá ser uma ferramenta para avaliação da reação do sistema imune inato dos caprinos frente ao estado de infecção, representando um possível indicador de monitoramento da infecção;

Animais soropositivos para CAE não apresentaram alteração na qualidade seminal, sugerindo-se seu uso através de biotécnicas de reprodução assistida, como forma de conservação do patrimônio genético. Entretanto, sanitariamente, não devem ser utilizados para a reprodução à campo, até que seja padronizada uma técnica confiável para eliminação/inativação do vírus no germoplasma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁVILA, A.A. **Uso de técnica do *swin-up* para remoção o vírus da artrite encefalite caprina e obtenção de espermatozoides viáveis.** 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
- SOUZA, K.C. **Artrite-encefalite caprina: infecção experimental via inseminação artificial e acompanhamento clínico e sorológico.** 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral.
- BAUMGART, E.; LENK, S.V.; LOENING, S.A. et al. Quantitative differences in matrix metalloproteinase (MMP)-2, but not in MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 or TIMP-2, in seminal plasma of normozoospermic and azoospermic patients. **Human Reproductive**, v.17, n.11, p.2919-23, 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.
- BROWN, P.D.; LEVY, A.T.; MARGULIES, I.M et al. Independent expression. And cellular processing of Mr 72,000 type IV collagenase and interstitial collagenase in human tumor igenic cell lines. **Cancer Research**, v.50, p.6184–91, 1990.
- BUCHMAN-SHAKED, O.; KRAIEM, Z.; GONEN, Y. et al.. Presence of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in human sperm. **Journal Andrology**. v.23, p.702–708, 2002
- BRADFORD, M.M.A. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254, 1976.
- COGNI, A.L.; FARAH, E.; MINICUCCI, M.F. et al. Metaloproteinases 2 e 9 são Preditoras de Remodelação Ventricular Esquerda após o Infarto do Miocárdio. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v.100, n.4, p.315-321, 2013.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed, 2013
- 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.1338–47, 2007.
- DU, J.W.; XU, K.Y.; FANG, L.Y. et al.. Detection and analysis of MMP-2 and MMP-9 in seminal plasma. **Journal Medical Humanities**, v.9, n.4, p. 216–219, 2012.
- FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEROROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS - FUNCEME. **Monitoramento**. Disponível em:<http://www.funceme.br> Acesso em: 27/11/2009.
- HULBOY, D.L.; RUDOLPH, L.A.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. **Molecular Human Reproduction**. v.3, p.27-45. 1997.

- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. **Climatologia mapas**. [online]. Disponível em <<http://www.inmet.gov.br/clima/mapclima.html>>. Acesso em: 16/01/14.
- KOTYZA J, PESEK M, BEDNÁROVÁ V, TERI M, WERLE B. Pleural fluids associated with metastatic lung tumors are rich in progelatinase B/proMMP-9. **Neoplasma**. v.52, p.388–92, 2005.
- LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature, London**, v.277, p.680-685, 1970. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v277/n5259/abs/227680a0.html>> Doi: 10.1038/227680a0.
- LE MAGUERESSE-BATTISTONI, B. Proteases and their cognate inhibitors of these rine and metalloprotease subclasses, in testicular physiology. *Advances in Experimental Medicine Biology*. v.636, p.133–153, 2008.
- LOKESHAWAR BL, SELZER MG, BLOCK NL, GUNJA-SMITH Z. Secretion of matrix metalloproteinases and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinases) by human prostate in explantcultures: reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissue. **Cancer Research**. v.53, p.4493–8, 1993.
- LYNCH, C.C.; MATRISIAN, L.M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. **Differentiation**, v.70, p.561-573, 2002.
- PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; ANDRIOLI, A. Medidas carpo-metacarpianas como índice articular clínico em caprinos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.27, p.170-173, 2005.
- METAYER, S.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. et al. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals. Matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1219–1229, 2002.
- MIES FILHO, A. Novo modelo de vagina artificial para ovinos. **Revista da Faculdade de Agronomia do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v.5, p.187-193, 1962.
- MILLER, A. **Meteorology**. 2ª ed, Columbia, Ohio: Charles E. Merrill Publishing Company, 1971. 154p.
- NABESHIMA, K.; INOUE, T.; SHIMAO, Y.; SAMESHIMA, T. Matrix metalloproteinase in tumor invasion: role for cell migration. **Pathology International**, v. 52, p.255-264, 2002.
- NAKHUDA, G.S.; SAUER, M.V. Assisted Reproductive Technology for HIV-1 Serodiscordant Couples: A Review of Current Controversies. **Journal of Reproduction e Contraception**, v.18, n.1, p.41-48, 2007.
- NORMAN, S.; SMITH, M.C. Caprine arthritis encephalitis review of the neurologic form in 30 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.182, n.12, p.1342-1345, 1983.

- 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, 2008.
- RAM, M.; SHERER, Y.; SHOENFELD, Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. **Journal Clinical Immunology**. v.26, p.299–307, 2006.
- RICCIOLI, A.; DAL SECCO, V.; DE CESARIS, P. et al. Presence of membrane and soluble forms of Faslig and and of matrilysin (MMP-7) activity in normal and abnormal human semen. **Human Reproduction**.v.20, p.2814–20, 2005.
- RODRIGUEZ, H.A.M.; ÁLVAREZ, H.R.; PÉREZ, J.T. et al. Efecto del virus de artritis encefalitis caprina en el aparato reproductor de machos caprinos. **Veterinaria México**, v.36, n.2, p.159-176, 2005.
- 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.
- SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p.1835-1841, 2000.
- SEABRA, F.R.G. **Análise imuno-histoquímica das metaloproteínas da matriz (MMP-1, MMP-2 E MMP-9) na doença periodontal**. Tese (Doutorado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2006.
- SEKHON, B.S. Matrix metalloproteinases – an overview. **Research and Reports in Biology**. v.1, p.1-20, 2010. DOI: 10.2147/RRB.S12043.
- SHARMA, R.; AGARWAL, A.; MOHANTY, G. et al. Functional proteomic analysis of seminal plasma proteins in men with various semen parameters. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, p.38, 2013.
- SHIMOKAWA, K.; KATAYAMA, M.; MATSUDA, Y. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. **Molecular Human Reproduction**. v. 8, p.32–6, 2002.
- SOUZA, K. C; PINHEIRO, R. R. ; SANTOS, D. O. et al. Transmission of the caprine arthritis–encephalitis virus through artificial insemination. **Small Ruminant Research** v.109, p.193– 198, 2013.
- STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasi. **Cancer Biology**. v.10, p. 415-433, 2000
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS - SAS Institute Inc. 2009.SAS On line Doc. 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- 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.278–81, 2007.

- TRAVASSOS, C.; BENOIT, C.; VALAS, S. et al. Caprine arthritis encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v.32, n.2, p.101-106, 1999.
- TRAVASSOS, C.; BENOÎT, C.; VALAS, S.; SILVA, A.; PERRIN, G. Détection du virus de l'arthrite encéphalite caprine dans le sperme de boucs infectés expérimentalement. **Veterinary Research**, v.29, n.6, p.579-584, 1998.
- VAN DEN STEEN, P.E.; PROOST, P.; GRILLET, B. et al. Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis. **FASEB Journal**. v.16, n.3, p.379–389, 2002.
- WESTERMARCK, J.; KÄHÄRI, V.M. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. **FASEB Journal**. v.13, p. 781–792, 1999.
- ZHANG J, YANG L, TANG Z, XUE R, WANG Y, LUO Z, HUANG W, SUNG KL. Expression of MMPs and TIMPs family in human ACL and MCL fibroblasts. **Connect Tissue Research**. v.50, p.7–13, 2009