



UNIVERSIDADE ESTADUAL
VALE DO ACARAÚ

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**PERFIL DAS METALOPROTEINASES EM CAPRINOS INFECTADOS PELA
Mycoplasma agalactiae NA PRINCIPAL BACIA LEITEIRA DO NORDESTE,
BRASIL**

ANDRESSA MARIA NUNES PINHEIRO

SOBRAL-CE
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL VALE DO ACARAÚ
PROGRAMA DE MESTRADO EM ZOOTECNIA

**PERFIL DAS METALOPROTEINASES EM CAPRINOS INFECTADOS PELA
Mycoplasma agalactiae NA PRINCIPAL BACIA LEITEIRA DO NORDESTE,
BRASIL**

ANDRESSA MARIA NUNES PINHEIRO

SOBRAL-CE
2022

Andressa Maria Nunes Pinheiro

**PERFIL DAS METALOPROTEINASES EM CAPRINOS INFECTADOS PELA
Mycoplasma agalactiae NA PRINCIPAL BACIA LEITEIRA DO NORDESTE,
BRASIL**

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: Reprodução e Sanidade Animal

Orientadora: Profª. Dra. Ângela Maria Xavier Eloy

Coorientador: Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro.

SOBRAL-CE
2022
Andressa Maria Nunes Pinheiro

**PERFIL DAS METALOPROTEINASES EM CAPRINOS INFECTADOS PELA
Mycoplasma agalactiae NA PRINCIPAL BACIA LEITEIRA DO NORDESTE,
BRASIL**

Esta Dissertação foi julgada adequada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual Vale do Acaraú.

Sobral, ____ de _____, 2022.

Profª. Dra. Cláudia Goulart de Abreu,
Coordenadora da Pós-Graduação em Zootecnia

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Ângela Maria Xavier Eloy
Orientadora, Universidade Estadual Vale do Acaraú/EMBRAPA Caprinos e Ovinos

Prof. Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro
Coorientador, Universidade Estadual Vale do Acaraú/EMBRAPA Caprinos e Ovinos

Dra. Ana Milena César Lima
Pesquisadora Visitante EMBRAPA Caprinos e Ovinos

Dr. Francisco Selmo Fernandes Alves
Pesquisador da EMBRAPA Caprinos e Ovinos

*A Deus por essa oportunidade;
Aos meus pais e meus irmãos que
sempre me apoiam;
A todos que torceram por mim durante a
realização deste trabalho, dedico.*

*“Deus nunca deixou trabalho sem
recompensa nem lágrimas sem
consolação”.*

Pe. Cícero Romão Batista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me iluminar e permitir chegar até aqui. Agradeço também aos meus familiares, especialmente aos meus pais, Matias Alves Pinheiro e Maria Lucidalva Nunes Pinheiro, e aos meus irmãos, Alex Ramon Nunes Pinheiro e Anne Israeliny Nunes Pinheiro, que estiveram sempre comigo, me apoiando e me fortalecendo em todos os momentos, apesar da distância em vários momentos. Vocês são tudo para mim! A vocês, minha eterna gratidão!

Agradeço imensamente aos que estiveram comigo na rotina dessa pesquisa, Nathália Maria de Andrade Magalhães, Lidiane Ximenes, João Ricardo Furtado, Zenaide Sousa Olímpio, Maria Fernanda Lima Vasconcelos, em especial, Dra. Ana Milena César Lima, obrigada por toda ajuda e companheirismo.

Um agradecimento especial a minha orientadora Professora Dra. Ângela Maria Xavier Eloy, pela orientação e paciência comigo durante esse período. Agradeço ao meu coorientador Dr. Raymundo Rizaldo Pinheiro que foi fundamental para realização desse trabalho. Agradeço ao Dr. Francisco Selmo Fernandes Alves, pela oportunidade de participar dessa equipe e por toda ajuda.

Quero agradecer também a Maria Vilmara Monteiro da Silva por ter esse coração gigante e me receber tão bem na sua residência.

Agradeço imensamente ao meu querido amigo Francisco Wilson Laurentino Filho por toda dedicação e companheirismo durante todo esse processo, que seja apenas o início dessa parceria, muito obrigada amigo Kardeon.

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

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

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

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científica e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro na bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	VIII
RESUMO GERAL.....	IX
GENERAL ABSTRACT.....	X
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
CAPÍTULO 1	
REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1. Introdução.....	17
2. Agalaxia Contagiosa.....	18
1.1. Etiologia.....	19
1.2. Epidemiologia.....	20
1.3. Transmissibilidade.....	22
1.4. Sinais Clínicos.....	22
1.5. Diagnóstico.....	23
1.6. Controle e Tratamento.....	25
3. Proteômica.....	26
2.1. Metaloproteinases de Matriz (MMPs).....	27
2.2. MMPs no Soro Sanguíneo.....	27
2.3. Zimografia.....	30
3. Referências Bibliográficas.....	33
CAPÍTULO 2	
Perfil das Metaloproteinases em caprinos infectados pela <i>Mycoplasma agalactiae</i> na principal bacia leiteira do Nordeste, Brasil.....	40
RESUMO.....	41
ABSTRACT.....	42
INTRODUÇÃO.....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
ANEXOS.....	59

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Estudos experimentais e relatos da Agalaxia Contagiosa (Micoplasmose) em caprinos no Brasil.....	21
---	----

CAPÍTULO 2

Perfil das Metaloproteinases em caprinos infectados pela *Mycoplasma agalactiae* na principal bacia leiteira do Nordeste, Brasil.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais conforme os resultados do teste de ELISA para Agalaxia Contagiosa em fêmeas caprinas nos estados da Paraíba e Pernambuco.....	45
--	----

Tabela 2. Frequência das MMPs encontradas nos géis, de acordo com os grupos amostrais: Soropositivos (Grupo 1) e Soronegativos (Grupo 2).....	50
--	----

Tabela 3: Média de volume da MMP (ProMMP-13), em <i>pixels</i> , entre os grupos estudados.....	53
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

Página

Figura 1: Classificação das MMPs de acordo com os sítios de ligação..... 28

CAPÍTULO 2

Perfil das Metaloproteinases em caprinos infectados pela *Mycoplasma agalactiae* na principal bacia leiteira do Nordeste, Brasil.

Figura 1: Atividade enzimática das metaloproteinases no soro sanguíneo de caprinos. (A) gel de fêmeas soropositivas (1-13) corresponde aos animais experimentais; (AB) gel de fêmeas soropositivas (14-15) e (1N-4N) fêmeas soronegativas; (B) gel de fêmeas soronegativas (5N-10N) corresponde aos animais experimentais; PM: Peso Molecular..... 49

Figura 2: Análise densitométrica das proteases presentes no soro sanguíneo de caprinos soropositivos e soronegativos para AC. Em **A, B, C, D** as bandas digeridas de gelatinases em gel de poliacrilamida 10% mostrando a atividade das MMPs (bandas claras), em seguida a representação esquemática do perfil densitométrico das proteases..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor que
=	Igual
P<0,05	Probabilidade menor que 5%
µm	Micrometro
°C	Graus Celsius
AC	Agalaxia Contagiosa
BSA	Albumina Sérica Bovina
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE	Corpo Elementar Infeccioso
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima, do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FC	Fixação de Complemento
g	Força centrífuga
h	Horas
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IDGA	Imunodifusão em Gel de Agarose
MEC	Matriz extracelular
Min	Minutos
Mm	Milímetros
mg/mL	Miligrama por mililitro
MMPs	Metalo proteinases da Matriz
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	nanômetro
kDa	Kilodalton
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal, do inglês <i>World Animal Health Information System</i>
PAD	Padrão utilizado com pesos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNAr	Ácido Ribonucléico Ribossômico
Spp	Espécie
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TIMPs	Inibidores teciduais de Metaloproteinases
VEGF	Fator de crescimento vascular endothelial
V	Volts
W	Watt
SRD	Sem raça definida/Sem padrão racial definido
UFPI	Universidade Federal do Piauí
µg/µL	Micrograma por microlitro

RESUMO GERAL

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs) estão sendo foco de estudos, devido ser investigadas como possíveis biomarcadores. Elas são responsáveis pela degradação dos componentes das membranas basais e da matriz extracelular. As MMPs são secretadas através de pro-enzimas, sua liberação ocorre pelos neutrófilos, macrófagos, monócitos, fibroblastos, membrana celular e podem também serem ativadas por substâncias como as quimiocinas e citocinas em resposta a vários estímulos, sendo envolvidas em processos patológicos, por exemplo, HIV, periodontites, câncer e metástases, doenças oftalmológicas, artrite, dentre outros. O estudo das MMPs abre possibilidades de diagnóstico, portanto, através do conhecimento das proteases será de grande importância para colaborar no diagnóstico e prognóstico da enfermidade. Devido aos estudos incipientes na medicina veterinária, especialmente na espécie caprina, objetivou-se com esse trabalho analisar o perfil das MMPs em caprinos infectados naturalmente pela *Mycoplasma agalactiae* oriundos de rebanhos distribuídos em municípios pertencentes a principal bacia leiteira do Nordeste. Foram utilizadas 25 fêmeas caprinas, sendo dividido em dois grupos experimentais, um composto por animais soropositivos naturalmente para Agalaxia Contagiosa (AC) e outro soronegativo. O sangue foi coletado através de punção da veia jugular e o soro sanguíneo obtido por centrifugação, posteriormente testados através do ELISA Indireto, por meio do *kit* comercial anti-*Mycoplasma agalactiae* test kit (IDEXX®, Australia). Os géis foram analisados através do software Gel Analyzer no qual foi possível identificar a presença e ausência de bandas enzimáticas, picos densitométricos e o volume médio (*pixels*) das bandas proteolíticas, e posteriormente foram realizadas as análises estatísticas. As formas ativas das MMP-9, MMP-2 e a forma latente da proMMP-13 estão presentes no soro sanguíneo de caprinos infectados pela *Mycoplasma agalactiae*. Já as formas latentes da proMMP-9 estão presentes nos animais do grupo soronegativo. Com base nesse resultado sugere-se que a presença da MMP-9 e MMP-2 em todos os animais positivos poderá ser usada como monitoramento da infecção, fato esse digno de mais pesquisas. A presença da proMMP-13 em todas as amostras experimentais pode ser justificada devido ao seu comportamento de estimular a secreção de várias MMPs em caso de necessidade de defesa do organismo.

Palavras-chave: Micoplasmose, proteases, soro sanguíneo, caprinocultura.

GENERAL ABSTRACT

Matrix Metalloproteinases (MMPs) are being the focus of studies, due to be investigated as possible biomarkers. They are responsible for the degradation of basement membrane and extracellular matrix components. MMPs are secreted through proenzymes, their release occurs by neutrophils, macrophages, monocytes, fibroblasts, cell membranes and can also be activated by substances such as chemokines and cytokines in response to various stimuli, being involved in pathological processes, for example., HIV, periodontitis, cancer and metastases, eye diseases, arthritis, among others. The study of MMPs opens diagnostic possibilities, therefore, through the knowledge of proteases it will be of great importance to collaborate in the diagnosis and prognosis of the disease. Due to the incipient studies in veterinary medicine, especially in the goat species, the objective of this work was to analyze the behavior of MMPs in goats naturally infected by *Mycoplasma agalactiae* from herds distributed in municipalities belonging to the main dairy basin in the Northeast. Twenty-five female goats were used, divided into two experimental groups, one composed of animals naturally seropositive for Contagious Agalactia (AC) and the other seronegative. Blood was collected by jugular vein puncture and blood serum was obtained by centrifugation, later tested by Indirect ELISA, using the commercial anti-*Mycoplasma agalactiae* test kit (IDEXX®, Australia). The gels were analyzed using the Gel Analyzer software, in which it was possible to identify the presence and absence of enzymatic bands, densitometric peaks and the average volume (pixels) of the proteolytic bands. The active forms of MMP-9, MMP-2 and the latent form of proMMP-13 are present in the blood serum of goats infected with *Mycoplasma agalactiae*. The latent forms of proMMP-9 are present in the animals of the seronegative group. Based on this result, it is suggested that the presence of MMP-9 and MMP-2 in all positive animals can be used to monitor the infection, a fact worthy of further research. The presence of proMMP-13 in all experimental samples can be justified due to its behavior of stimulating the secretion of several MMPs in case the organism needs to defend itself.

Keywords: Mycoplasmosis, proteases, blood serum, goat culture.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Diante do crescimento da caprinocultura na região Nordeste, esse segmento ganha destaque como importante atividade pecuária. Principalmente pela representatividade socioeconômica na produção de leite e derivados, associada à comercialização de produtos como importante geração de emprego e renda.

Alguns territórios nordestinos possuem maior destaque no cenário nacional, como nos estados da Paraíba e Pernambuco. Juntos, os dois estados, compreendem uma relevante bacia leiteira caprina do Nordeste, Brasil. O seu crescimento está associado principalmente a incentivos públicos e locais, no que concerne à produção e comercialização de produtos oriundos da caprinocultura.

Contudo, alguns entraves têm dificultado o fortalecimento da cadeia produtiva, para que possa permanecer presente e competitiva no mercado nacional. Nesse caso, as incidências de enfermidades nos rebanhos geram problemas sanitários com consequentes perdas produtivas.

A Agalaxia Contagiosa (AC) é uma doença grave em caprinos leiteiro e responsável por impacto econômico nas pequenas e grandes indústrias produtoras de leite de cabra. Os rebanhos podem apresentar surtos de AC, mas a presença de portadores assintomáticos é um alerta as condições sanitárias, já que podem ser detectados em rebanhos cronicamente infectados.

O diagnóstico é baseado especificamente no teste de ELISA, PCR e isolamento da *M. agalactiae*. Contudo, ainda são práticas onerosas e comercializadas exclusivamente para laboratórios especializados, onde se realizam pesquisas científicas. Todavia, é relevante o conhecimento das principais enfermidades que acometem os caprinos leiteiros e desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas, para assim evitar maiores problemas.

Nisso, a análise proteômica surge como uma ferramenta potencial para identificar biomarcadores das enfermidades. Sendo necessária também, a busca por medidas para o fortalecimento de programas de controle das enfermidades, incluindo a Agalaxia Contagiosa. Novas técnicas de diagnóstico, por exemplo, o estudo das MMPs, poderá auxiliar e ganhar destaque como uma ferramenta a mais para estudos sobre AC.

As MMPs consistem em um grupo de várias enzimas classificadas de acordo com a especificidade ao substrato e, principalmente, pela sua estrutura. As MMPs estudadas nessa pesquisa foram às formas ativas (MMP-9 e MMP-2) e suas respectivas formas latentes (proMMP-9 e proMMP-2). Estas possuem funções diretamente ligadas à remodelação da matriz extracelular, a formação de novos vasos sanguíneos, em processos de cicatrização e na formação de tecidos, e foram recentemente encontradas em amostras de plasma seminal e no soro sanguíneo de caprinos infectados pela CAE.

O reconhecimento dessas proteases pode servir de subsídio para pesquisas posteriores, e precedentes para busca de antibacterianos, refletindo positivamente na produção de caprinos. Diante disso, o objetivo desse estudo é analisar o perfil das MMPs em caprinos infectados naturalmente pela *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos pertencentes a principal bacia leiteira do Nordeste.

CAPÍTULO 1
REFERENCIAL TEÓRICO

Introdução

A caprinocultura é uma importante atividade pecuária, e seu crescimento, especialmente na região Nordeste, está vinculado a sua relevância socioeconômica, com representatividade na produção de leite e derivados, associada também a comercialização de produtos como geração de renda (SILVA e ARAÚJO, 2000).

O rebanho caprino concentrado no território nordestino corresponde a 92,98% do rebanho nacional. Ainda neste aspecto, os estados da Paraíba e de Pernambuco, se destacam como importante bacia leiteira caprina do Nordeste/Brasil, compreendendo cerca de 692 mil caprinos (IBGE, 2021).

No entanto, a carência de práticas sanitárias e a ocorrência de enfermidades ainda são fatores limitantes ao crescimento e geração de renda para os caprinocultores. Visto que a saúde dos caprinos pode ser afetada pela ação de agentes infecciosos, com atuação direta ou indiretamente na produtividade dos animais e nos aumentos das taxas de mortalidade (PINHEIRO et al., 2003).

Dentre as enfermidades que afetam a caprinocultura leiteira, destaca-se a Agalaxia Contagiosa (AC) que se enquadra no complexo de doença denominada por Micoplasmose e que possui a bactéria *Mycoplasma agalactiae* como agente causador. Este patógeno é responsável por causar infecções nas vias mamária, respiratória e digestiva, e sua transmissão pode ocorrer por contato direto entre animais infectados e sadios, e até mesmo pela ingestão de água e alimentos contaminados (SANTOS et al., 2015).

A presença de animais assintomáticos vem sendo considerada como uma ameaça à sanidade do rebanho, devido à transmissibilidade do agente e o envolvimento deste na baixa produtividade do criatório. Contudo, o sacrifício de animais infectados não é uma prática recomendada para combater a enfermidade. Visto que, não solucionará o problema e causará maiores prejuízos por conta da perda de produção e genética dos animais, afetando assim, a economia da atividade (BANDEIRA et al., 2008). Portanto, são crescentes as buscas por técnicas de diagnóstico para detecção de animais infectados. Assim como no desenvolvimento de estudos a fim de encontrar marcadores diagnosticamente relevantes (AKBARZADEH-NIAKI et al., 2020; BARBOSA et al., 2020; CACCIOTTO et al., 2021).

Na busca por alternativas de medidas para conhecimento e diagnóstico da AC, diminuindo os impactos negativos, a proteômica surge como uma técnica inovadora, que consiste no estudo de moléculas envolvidas na reação do sistema imune inato

frente às infecções ocasionadas por microrganismos (GALIZA et al., 2020). Essa ferramenta caracteriza grupos de proteínas e proteases presentes em algum momento da história natural das enfermidades, sendo possível, também, acompanhar os estudos da biologia celular (WILKINS et al., 1996).

Através da proteômica, é possível avaliar as metaloproteinases, que são enzimas proteolíticas, ativadas durante alguns processos fisiológicos e patológicos no organismo, sendo responsáveis pela degradação das membranas basais e da matriz extracelular (PEREIRA et al., 2014).

Essas enzimas são observadas, normalmente, em eventos como ovulação, espermatogênese, embriogênese, angiogênese, e em patologias como HIV, câncer, diabetes e periodontites (RANGASAMY et al., 2019; MANNELLO e MEDDA, 2012). Dessa forma, são bastante estudadas na medicina humana. De acordo com Zitka (2010), desde a década de 90, muitas pesquisas científicas vêm sendo realizadas com as metaloproteinases, e diversos artigos foram publicados sobre o assunto nos seres humanos. Devido ao déficit de estudos no âmbito veterinário e ao grande reflexo socioeconômico da AC nos animais, tornam-se necessárias novas pesquisas acerca dessa temática.

A alta incidência nos rebanhos e a necessidade por novas metodologias diagnósticas para a AC fazem da análise proteômica uma ferramenta em potencial na busca por biomarcadores da patologia. Nesse contexto, é preciso buscar o aperfeiçoamento dos programas de controle desse microrganismo e novas técnicas de diagnóstico, por exemplo, o estudo das MMPs.

O reconhecimento dessas proteases, certamente será um progresso científico de caráter inovador, e poderá servir de subsídio para estudos posteriores, e precedentes para busca de antibacterianos, o que refletirá positivamente na produção de caprinos. Diante disso, o objetivo desse estudo é analisar o comportamento das MMPs em caprinos infectados naturalmente pela *Mycoplasma agalactiae* oriundos de rebanhos distribuídos em municípios pertencentes a principal bacia leiteira do Nordeste, visto que esse patógeno apresenta grande impacto na caprinocultura leiteira.

Agalaxia Contagiosa

Agalaxia Contagiosa é uma enfermidade causada por bactérias do gênero *Mycoplasma*, com distribuição cosmopolita, afetando vários animais domésticos como caprinos, ovinos, bovinos, suínos e equinos. Animais acometidos por essa doença

podem apresentar: mastite, agalaxia, artrite, pleuropneumonia, problemas reprodutivos, ceratoconjuntivite e septicemia (SANTOS et al., 2015). A enfermidade é responsável por perdas econômicas consideráveis devido à alta mortalidade de crias e na redução ou até mesmo parada da produção de leite (OIE, 2018).

Assim, a adoção de práticas sanitárias, associada ao diagnóstico precoce de animais infectados, são ferramentas importantes para o conhecimento, o controle e até mesmo ao combate de enfermidades. Já que, comumente, são diagnosticadas de forma tardia, quando os animais estão debilitados. Consequentemente, resulta em baixo desempenho produtivo e com perdas econômicas significativas (PINHEIRO et al., 2003).

A ocorrência da enfermidade em rebanhos caprinos tem um impacto importante na economia local, especialmente, em situações onde a venda de leite de cabra e derivados são tidas como a única renda dos produtores. Neste âmbito, os pequenos criadores podem sofrer mais ainda com os danos pela disseminação desta doença, pois detêm de poucos recursos financeiros para substituir o rebanho ou adoção de programas de controle (AZEVEDO et al., 2006; BANDEIRA et al., 2008).

Nestas regiões, a disseminação de doenças pode ser agravada pelo uso reduzido de práticas sanitárias, associada às diversas formas de aquisição de animais, intenso trânsito animal e poucas informações quanto às enfermidades que acometem os rebanhos caprinos (BANDEIRA et al., 2008).

Os primeiros relatos sobre micoplasmas em animais foi em 1898 por Nocard e Roux (WAITES et al., 2005), porém Zagali descreveu que a forma clínica da doença ocorreu primeiramente em 1816 na Itália relatada por Metaxo (DA MASSA et al., 1992). Mundialmente, a Agalaxia Contagiosa é considerada uma enfermidade endêmica na maioria dos países do Mediterrâneo, da África, dos Estados Unidos e da Ásia Ocidental (CAMPOS et al., 2009).

No Brasil, em 1942, foi relatado o primeiro caso da enfermidade em caprinos no estado de São Paulo, a partir de um surto de pneumonia em cabritos e de mastite nas cabras (PENHA e D'APICE, 1942). Posteriormente no Nordeste, o agente foi isolado e identificado no ano de 2001 em caprinos do estado da Paraíba (NASCIMENTO et al., 2002).

Etiologia

As bactérias pertencentes à espécie *Mycoplasma* são consideradas de tamanho pequeno (124 e 50 nm) e de genoma reduzido (877 kb). São parasitas obrigatórios que podem ser encontrados em uma ampla gama de espécies hospedeiras, incluindo a maioria dos animais de produção. Geralmente, estão associados a uma série de doenças inflamatórias agudas e crônicas que são problemáticas na medicina veterinária.

O principal agente etológico da Agalaxia Contagiosa é a bactéria *Mycoplasma agalactiae*, porém outras espécies de *Mycoplasma* podem estar envolvidas nessa enfermidade, como *M. mycoides subsp. mycoides* (colônia grande), *M. capricolum subsp. capricolum*, *M. mycoidessubspcaprie* *M. Putrefaciens*, no entanto, essas são pouco conhecidas (NASCIMENTO, 2003).

Essas bactérias pertencem à classe *Mollicutes* e são considerados os menores microrganismos autorreplicantes. Encontram-se em colônias em forma de “ovo frito” em meio sólido, sendo diferente das outras bactérias típicas, uma vez que não possuem parede celular e apresentam proteínas e colesterol na membrana celular (WALKER, 2003).

Epidemiologia

A presença da enfermidade se dá através de atividades e até mesmo por práticas que possam facilitar a entrada e disseminação do agente entre animais infectados e sadios. Já que animais contaminados pelo *M. agalactiae* pode apresentar ou não sinais clínicos evidentes. Além da possibilidade de ingestão de água, alimentos e leite contaminados.

Conforme estudo realizado por Azevedo et al. (2006) na Paraíba, mediante surtos de Agalaxia Contagiosa, os animais afetados apresentaram mastite, agalaxia e poliartrite (cabras), além de casos de poliartrite e ceratoconjuntivite em cabritos e cordeiros. Destaca-se que ainda segundo o estudo, *M. agalactiae* foi isolado a partir de leite, líquido articular, swab nasal e lavado do conduto auditivo externo.

No estado do Rio de Janeiro, casos de Agalaxia Contagiosa também foram relatados. Contudo, foi verificada a ocorrência de *Mycoplasma* spp. em todas as amostras do conduto auditivo externo dos caprinos avaliadas, e destas, 80% (16/20) foram positivos para *Mycoplasma mycoides* (BARBOSA et al., 2020).

Outros estados do Nordeste também descreveram sobre a presença da Agalaxia Contagiosa nos rebanhos, como: Paraíba (BANDEIRA et al., 2008), Pernambuco (ALVES, 2013), Sergipe (SANTOS et al., 2015), Ceará (PEIXOTO et al., 2018) e Rio Grande do Norte (DAMASCENO et al., 2020) (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos experimentais e relatos da Agalaxia Contagiosa (Micoplasmose) em caprinos no Brasil.

ESTADO	PREVALÊNCIA	AMOSTRA	TESTE	AUTOR(ANO)
Paraíba	100%(11/11)	LEITE	PCR	AZEVEDO et al. (2006)
Paraíba	83,28%(264/317)	SORO	ELISA	CAMPOS et al. (2009)
Paraíba	7,5%(9/120)	LEITE	PCR	BANDEIRA et al. (2008)
Sergipe	10,3% (20/194)	SORO	ELISA	SANTOS et al. (2015)
Rio Grande do Norte	7,8%(42/538)	SORO	ELISA	DAMASCENO et al. (2020)
Pernambuco	17,9%(7/39)	SÊMEN	PCR	ALVES et al. (2013)
	3,7%(3/81)	LEITE	PCR	
Ceará	0,62%(3/486)	SORO	ELISA	PEIXOTO et al. (2018)

Adaptado de LIMA et al., 2021.

A presença da *Mycoplasma agalactiae* nos rebanhos caprinos pode ser considerada um risco a atividade leiteira, com possibilidades de danos a sanidade dos rebanhos e de surtos de Agalaxia Contagiosa na região Nordeste do Brasil (ALVES et al., 2013). Diante disto, queda de 90% na produção de leite foi relatada em rebanhos caprinos afetados pela doença (AZEVEDO et al., 2006).

No estado de Sergipe, amostras sorológicas de caprinos e ovinos foram testadas por ELISA, onde 10,3% (20/194) dos animais apresentaram anticorpos circulantes, enquanto não foi detectado nas amostras de leite. Indicando que os animais tiveram contato com o agente causador da Agalaxia Contagiosa, de modo a atuarem como fonte de infecção (SANTOS et al., 2015).

A presença da *M. agalactiae* em rebanhos caprinos coloca os animais em risco de distúrbios reprodutivos e surtos de agalaxia contagiosa na região Nordeste do Brasil, já que o agente foi detectado em 17,9% (7/39) das amostras de sêmen e 3,7% (3/81) das amostras de leite (ALVES et al., 2013).

Segundo Damasceno et al. (2020), a soroprevalência de *M. agalactiae* em rebanhos caprinos do Rio Grande do Norte foi de 7,8% (42/538), com 10,1% (39/387)

para fêmeas, 4,3% (14/326) matrizes e 25,9% (14/54) das propriedades com pelo menos um animal soropositivo.

Devido ao pouco conhecimento dos produtores sobre a enfermidade, associado à ausência de planos de controle da Agalaxia Contagiosa, principalmente em caprinos no Nordeste do país, a ocorrência e danos à cadeia produtiva gera preocupação e prejuízo no setor.

Transmissibilidade

A principal via de infecção é a oral, seguida da via respiratória e mamária. Logo assim, a transmissão acontece através do contato direto ou indireto. Esse microrganismo fica presente no leite, fezes, urina, exsudatos oculares e nasais por vários meses, havendo, então, disseminação do mesmo para animais sadios, caracterizando a principal forma de transmissão da enfermidade (BERGONIER et al., 1997).

A bactéria também pode permanecer no solo, materiais cirúrgicos, ordenhadeira mecânica, cama, bebedouros, comedouros e dentre outros elementos que podem facilitar a contaminação dos animais, estes que por sua vez, também são considerados como fontes de contaminação. Geralmente, a disseminação também pode ocorrer devido a aquisição de animais em eventos agropecuários com elevada aglomeração de animais, ausência de informações sanitárias dos animais, que na maioria das vezes, não possuem atestado sanitário adequado comprovando a higidez dos animais presentes (BERGONIER et al., 1997; MADANAT et al., 2001; AZEVEDO, 2007).

A transmissão por via transplacentária também parece ser possível, já que a infecção de cabritos por *M. agalactiae* durante a gestação, resultou no nascimento de animais com sinais clínicos de Agalaxia Contagiosa (SILVA et al., 2014).

Sinais Clínicos

Os principais sinais clínicos incluem a infecção das glândulas mamárias, ocasionando diminuição ou parada total na produção de leite e mudança na sua coloração (variando de aquoso, marrom com grumos até aspecto purulento). Os animais afetados ainda podem apresentar perda de apetite, artrite (com aumento de

volume nas regiões do tarso e do carpo) e dificuldade de locomoção, levando à perda de peso acentuada e, conseqüentemente, à morte do animal por prostração (AZEVEDO, 2015).

Alguns autores relatam alterações oculares nos animais infectados pela Agalaxia Contagiosa como opacidade de córnea, conjuntivite, ceratite, lacrimejamento, congestão da mucosa conjuntival, fotofobia, diminuição da vascularização da superfície da córnea, resultando em perda da visão uni ou bilateral (CORRALES et al., 2007). Ademais, em cabras, pode haver distúrbios reprodutivos como hiperemia das mucosas, secreções seromucosas e vulvovaginite (AZEVEDO et al., 2006).

De acordo com o estado imunológico, manejo e alimentação dos animais, a taxa de mortalidade pode variar de 10 a 80% dos casos, com morbidade de até 100% (AZEVEDO et al., 2006). O período de incubação pode ser de uma a oito semanas, dependendo da quantidade de bactérias invasoras, da resistência do hospedeiro e da virulência (NICHOLAS, 2002).

Segundo estudo realizado em caprinos e ovinos na Paraíba, a morbidade atingiu valores de 26,1% a 100% em cabras, 36,5 a 100% em cabritos e 49% em cordeiros. Sendo que, devido ao surto, 14,3% das cabras em lactação e 6,4% dos cabritos morreram ou foram eutanasiados (AZEVEDO et al., 2006).

Diagnóstico

A enfermidade permanece endêmica em vários países, e o desenvolvimento de ferramentas profiláticas e diagnósticas eficazes ainda representa um desafio. Logo, a detecção da *M. agalactiae* com testes de alto desempenho e custos acessíveis também é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de controle eficaz (CACCIOTTO et al., 2021).

Mediante a similaridade dos sintomas clínicos da Agalaxia Contagiosa, com outras enfermidades, por exemplo: Artrite Encefalite Caprina, que também atingem caprinos e ovinos, o diagnóstico clínico na propriedade torna-se mais dificultoso. Desse modo, torna-se importante adotar técnicas de diagnóstico eficazes, associada a informações da enfermidade em rebanhos locais e da região.

O diagnóstico laboratorial da AC baseia-se no isolamento de *M. agalactiae* ou na detecção de seus antígenos. Neste caso, o isolamento bacteriano compreende uma

técnica mais onerosa, devido a necessidade de estrutura laboratorial específica, pessoal técnico especializado e alto investimento. Já que podem envolver técnicas moleculares e de cultivo bacteriano para a identificação do agente. Os testes sorológicos também podem ser realizados, como imunodifusão, imunofluorescência, soroaglutinação e imunoenzimáticos (ELISA) (CAMPOS et al., 2009).

Já em relação aos materiais biológicos, como sangue, leite, secreção nasal ou conjuntival e líquido articular, são amostras geralmente utilizados para identificação do agente causador (RIET-CORREA et al., 2006). Contudo, todos esses materiais necessitam de cuidados para que permaneçam inalterados em suas principais propriedades até a realização dos testes de diagnóstico.

Para o diagnóstico definitivo é recomendado o cultivo bacteriano, contudo essa técnica é demorada e laboriosa. Ao contrário do ELISA, o qual irá identificar animais que estão infectados ou tiveram contato com a bactéria, fornecendo resultado mais rápido. A detecção de fragmentos do DNA amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), também apresenta resultados relevantes, já que detecta pequenas quantidades dos agentes nas amostras, entretanto é uma técnica mais laboriosa e de custos elevados.

O teste de ELISA tem sido uma técnica de escolha entre os procedimentos sorológicos existentes, pois tem potencial para alta sensibilidade e especificidade, além de ser simples e permitir analisar um grande número de amostras em pouco tempo, favorecendo um alto rendimento (LAMBERT et al., 1998; AZEVEDO et al., 2006). O diagnóstico também pode ser feito pela utilização da técnica de Western Blotting (De la Fe et al., 2006).

Também o teste de fixação de complemento e o Western Blotting são técnicas de diagnóstico utilizados para AC. O teste de fixação do complemento, pode apresentar limitações devido a possibilidade de reações cruzadas e falsos positivos em comparação com outros métodos diagnósticos (OIE, 2018). Por esta razão, bem como pelos resultados consistentes, o teste ELISA tem se mostrado confiável como diagnóstico para essas infecções (CAMPOS et al., 2009; PÉPIN et al., 2003; KITTELLBERGER et al., 2006; LAMBERT et al., 1998; FUSCO et al., 2007).

A ocorrência de *M. agalactiae* reforça a necessidade de estudos quanto à presença do agente infeccioso em pequenos ruminantes, os impactos a atividade e adoção de técnicas de diagnósticos confiáveis. Além disso, direcionar ações, por meio das instituições de apoio técnico a produtores, capacitações abordando pontos

importantes quanto à sanidade do rebanho, mais especificamente, da Agalaxia Contagiosa e o impacto causado por esta enfermidade.

Controle e Tratamento

A Agalaxia Contagiosa surge como uma doença de alto potencial negativo em cabras leiteiras. Portanto, recomendam-se a implementação de medidas de controle para esta doença, já que a infecção ocorre principalmente, pela introdução de animais portadores no rebanho e essa prática tem importância dentro do estudo da doença.

Considerando a inexistência de vacinas contra AC no Brasil, a alta prevalência detectada sugere a presença de infecção intensiva entre rebanhos caprinos na microrregião (CAMPOS et al., 2009).

Manejo sanitário deve ser adotado para o controle da Agalaxia Contagiosa. Os animais infectados devem ser isolados e iniciar a administração de antibióticos específicos como, tilosina, lincomicina, danofloxacina, enrofloxacina para diminuir a carga bacteriana. É importante ressaltar que, mesmo com o desaparecimento ou redução dos sintomas em um período curto de tratamento, não há garantia da eliminação da bactéria, pois a mesma é bastante resistente (RIET-CORREA et., 2011). Assim, em alguns casos, o sacrifício dos animais é necessário, entretanto essa medida causa grande impacto na economia (MADANAT et al., 2001; CORRALES et al., 2007).

A quarentena deve ser adotada nas propriedades juntamente com a realização de exames de diagnóstico como requisitos ao adquirir novos animais. Outra medida é a separação das crias ao nascimento, evitando contato com mães infectadas, sendo necessário o aquecimento do colostro na temperatura de 56°C durante 30 minutos, ou substituir o colostro por sucedâneo. Além disso, deve-se realizar a higienização das instalações, materiais cirúrgicos e insumos utilizados nos animais enfermos (NASCIMENTO et al., 2002).

Em alguns países da Europa, a vacinação é uma medida profilática. No entanto, o uso de vacinas com agentes vivos atenuadas contra *Mycoplasma agalactiae* produz títulos de anticorpos altos e duradouros, podendo o agente ser secretado no leite durante vários meses, por esse motivo diversos países não realizam a vacinação (MADANAT et al., 2001). Já vacinas vivas inativadas produzem títulos mais baixos e

menos persistentes, mas têm como desvantagem a necessidade de reaplicações em intervalos curtos, especialmente antes e após os partos, para obter uma prevenção mais segura contra a Agalaxia Contagiosa (LEON et al., 1995).

Campos et al. (2013) desenvolveram estudos de vacinas inativadas a partir de amostra do agente isolado no Brasil e afirmaram a eficiência da vacinação em ovinos e caprinos, porém se observou que a imunidade desses animais foi relativamente limitada, sendo necessária revacinação em curto período. No Brasil a vacina ainda não está disponível.

Proteômica

O termo proteômica significa o estudo do conjunto de proteínas expressas em fluidos corporais, tecidos e células em um dado momento, que são responsáveis de forma direta ou indireta pelo controle de quase todos os processos biológicos (WILKINS et al., 1996). Na década de 70 ocorreu o início dos estudos sobre essa técnica, em que pesquisadores começaram a formação de bancos de dados das proteínas por meio da eletroforese de gel bidimensional (O'FARREL, 1975). Através dessas pesquisas, ocorreu a catalogação extensiva de manchas nos géis bidimensionais conhecidos como “spots” ou bandas, resultando nos bancos de dados das proteínas presentes.

A proteômica é de suma importância uma vez que analisa as proteínas/moléculas que participam dos diversos processos celulares, agindo como enzimas, hormônios, receptores celulares, componentes estruturais e anticorpos (AEBERSOLD e MANN, 2003). Essa técnica também pode ajudar nos testes de diagnósticos de algumas enfermidades como o câncer, diabetes e viroses nos seres humanos.

Por meio da proteômica, encontram-se diversas enzimas ou proteases, especialmente as Metaloproteinases (MMPs), que estão presentes na matriz extracelular, envolvidas tanto em processos fisiológicos como patológicos, desenvolvendo o remodelamento das células. Assim, a análise da atividade enzimática permite melhor conhecimento do patógeno e a resposta do hospedeiro frente ao agente infeccioso (PEREIRA, 2014).

Proteases

Vários são os mediadores da resposta inflamatória, podendo ser enzimas chamadas de proteases ou proteolíticas, que são responsáveis pela hidrólise das ligações peptídicas. Essas enzimas, junto com seus mediadores, desenvolvem um papel chave tanto nos processos fisiológicos, tais como remodelação da superfície celular e dos tecidos, migração e sinalização das células, como também em processos patológicos, por exemplo, doenças articulares, cardiovasculares, câncer, infecção e doenças neurodegenerativas, sendo, então, consideradas potenciais alvos terapêuticos (PEREIRA, 2014).

De acordo com a massa molecular, propriedades elétricas e especificidade ao substrato, essas enzimas são classificadas em seis diferentes famílias, destacando-se as metaloproteases, que envolvem as gelatinases, segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) (FREDERIKS e MOOK, 2004). As gelatinases são responsáveis pela degradação e sínteses da matriz extracelular (MEC) e ocupam os espaços entre as células do tecido, sendo fundamentais na locomoção das células e no processo de migração celular. Além disso, a MEC está presente em processos patológicos e fisiológicos como reparação de feridas, metástases, formação de cicatriz, ovulação e implantação do óvulo fertilizado (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993).

Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

Metaloproteinases da Matriz (MMPs) são enzimas, endopeptidases, encarregadas pela degradação dos componentes da matriz extracelular e das membranas basais. Esse grupo de enzimas é secretado através de pro-enzimas com liberação por neutrófilos, macrófagos, monócitos, fibroblastos e células tumorais (WOESSNER, 1991). Em meados de 1962, Gross e Lapiérre (1962) descobriram uma enzima ativa na cultura de fragmentos de pele de ratos, foi quando provavelmente aconteceu a descoberta das MMPs.

As MMPs são compostas de 24 proteínas, divididas em gelatinases (MMP-2 e 9), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24), estromelisinas (MMP-3, 7 e 10), collagenases (MMP-1, 8 e 13) e outras MMPs pouco

conhecidas (VISSE et al., 2003). De acordo com a especificidade ao substrato e a estrutura essas enzimas são classificadas. Contêm íons de zinco no sítio de ação catalítica e requerem íons de cálcio para estabilidade e atividade, logo são conhecidas como enzimas metalodependentes (SOUZA e LINA 2002).

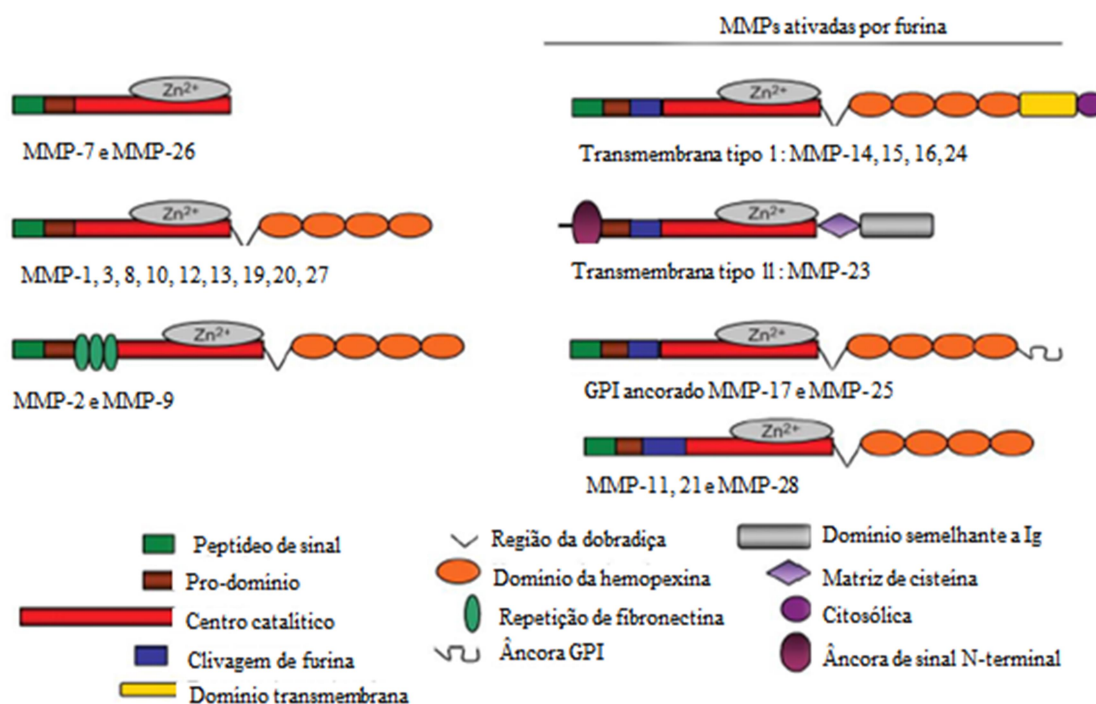


Figura 1: Classificação das MMPs de acordo com os sítios de ligação. Fonte: Adaptado Galiza et al., (2016).

Esse grupo de enzimas atua no controle regulatório, na transcrição, estabilidade do RNAm, ativa pró-enzimas, degradação da matriz extracelular e nos inibidores teciduais de metaloproteinases ou TIMPs específicos. Agem também em processos como desenvolvimento e reparação de tecidos, angiogêneses e morfogênese (STETLER-STEVENSON et al., 2008).

A MMP-2 e MMP-9 são responsáveis pela degradação do colágeno desnaturado ou gelatinas. Apresentam peso molecular na forma latente e na ativa, respectivamente, de 72 kDa e 66 kDa (MMP-2) e 92 kDa e 83 kDa (MMP-9). A MMP-2 é capaz de degradar colágenos do tipo I, IV e V, fibronectina, elastina e gelatina, enquanto que a MMP-9 é expressa em situações de remodelamento tecidual, ou seja, na cicatriz de ferimentos e invasão tumoral (STAMENKOVIC, 2000; VISSE et al., 2003).

Na medicina humana, são crescentes os estudos envolvendo MMPs e enfermidades. Assim, dentre as várias MMPs que se acredita estarem envolvidas no câncer, a atenção concentrou-se nas gelatinases, devido a uma variedade de tumores malignos e sua expressão e atividade estão frequentemente associados à agressividade do tumor e a um prognóstico ruim (BAUVOIS et al., 2012).

Níveis elevados de MMP-2 e/ou MMP-9 são encontrados na mama, cérebro, câncer de ovário, pâncreas, próstata, pulmão e melanoma (ROY et al., 2009; KLEIN et al., 2011; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2005). A expressão desregulada de MMP também é observada em casos de linfoblástica aguda leucemia, leucemia de células T do adulto, leucemia linfocítica B crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia mieloide crônica (KLEIN et al., 2004).

Estudo realizado sobre a atividade sérica de MMPs na apneia obstrutiva do sono, a atividade da MMP-2 foi associada à gravidade da condição e ao nível de hipoxemia em pacientes com essa síndrome (FRANCZAK et al., 2020). As metaloproteinases de matriz (MMPs), especialmente MMP-2 e MMP-9, segundo Lotfi et al. (2015) em casos de carcinoma espinocelular orais (CEC), apresentaram aumentadas em malignidade e envolvimento de linfonodos afetados pela doença. Onde pacientes com CEC oral apresentaram níveis séricos significativamente maiores de MMP-2 ($p=0,01$) e MMP-9 ($p<0,001$) em comparação com indivíduos saudáveis. Segundo os autores desse estudo, os resultados dos estudos são indicativos do papel das MMPs na avaliação do estágio avançado ou inicial da enfermidade pode ser utilizado como preditor precoce de seu prognóstico (LOTFI et al., 2015). A expressão de metaloproteinase da matriz 2 e 9 também foi registrada com maior atividade em casos de carcinoma hipofaríngeo. Estando assim, envolvidas na ocorrência, desenvolvimento, invasão e metástase do carcinoma hipofaríngeo através de uma variedade de mecanismos (SONG et al., 2020).

As MMPs, especialmente a MMP-2, estão associadas tanto ao estresse oxidativo quanto às doenças cardiovasculares (SAWICKI, 2013). As MMPs mais frequentemente analisadas em relação à síndrome de insuficiência cardíaca são a MMP-2 e a MMP-9 (RADOSINSKA et al., 2017). O nível de MMP-9 foi significativamente associado a complicações pós-operatórias de pacientes com pericardite constrictiva e o alto nível de MMP-9 no pericárdio foi associado a maus resultados pós-operatórios (FANG et al., 2022).

Estudos recentes apontam para o possível papel das metaloproteinases de matriz (MMPs) na patogênese da endometriose. A expressão de MMP-2 e MMP-9 foram observadas, estatisticamente maiores, em amostras colhidas de pacientes com endometriose (BARBE et al., 2020). Os resultados dos estudos são indicativos do papel das MMPs na avaliação do estágio avançado ou inicial da enfermidade.

MMPs no soro sanguíneo

Essas enzimas são secretadas através dos componentes presentes nos sistemas circulatório e imunológico, ou seja, a presença das MMPs no soro sanguíneo é devido à secreção por neutrófilos, macrófagos, monócitos, fibroblastos e células tumorais em resposta a vários estímulos (WOESSNER, 1991). Além disso, segundo Brown e Hook (1971), no processo de cicatrização tecidual, as células epiteliais liberam as colagenases e proteases por meio dos leucócitos e fibroblastos agindo na remoção das células débeis ou mortas.

De acordo com Klein et al. (2011), a ação da MMP-9 libera a forma biologicamente ativa do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual é responsável por papel fundamental na angiogênese. Associando-se isso à capacidade da MMP-9 em realizar a degradação proteolítica da membrana basal, indica-se que essa enzima é importante na formação de novos vasos sanguíneos.

Em 2015, Bezerra Júnior et al. realizaram um trabalho com soro sanguíneo de reprodutores caprinos cronicamente infectados pela Artrite Encefalite Caprina (CAE) no semiárido do Brasil, em que foi possível observar a atividade da pro-MMP-2 e MMP-2. Constatou-se que apenas um dos animais soropositivos apresentava artrite aparente (medição articular), porém apresentou atividade das MMPs igual aos animais sem sintomatologia clínica, sugerindo, assim, a existência do processo inflamatório em todos os animais da pesquisa, comprovado pela elevada atividade das MMPs no sangue.

Estudo realizado em soro sanguíneo de caprinos infectados experimentalmente com CAEV, notaram que na fase de pré-infecção (soroconversão) as MMPs 2 e 9 estiveram presentes assim como a proMMP-13. Ainda segundo o estudo, esses resultados levam a supor que a ausência das latentes proMMP-2 e 9 sejam indicativos de uma transformação destas em formas ativas MMP-2 e 9 devido ao processo infeccioso causado

pelo vírus na fase inicial de produção de anticorpos pelo hospedeiro (GALIZA et al., 2020). Assim, notaram que MMP-2 e MMP9 apresentaram comportamentos opostos, dependendo do estágio da infecção, de modo que, a maior atividade da MMP-2 foi detectada no estágio pós-soroconversão. Contudo, a MMP-2 exibiu maior atividade do que MMP-9 em todas as fases experimentais (GALIZA et al., 2020).

Zimografia

Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para avaliação das formas latentes e ativas das enzimas proteolíticas nas amostras biológicas. O método da zimografia é o mais utilizado por ser mais completo, sendo eficaz na detecção das formas ativas e latentes das MMPs e capaz de quantificar a atividade enzimática. Outras vantagens dessa técnica são: elevada sensibilidade nas diferentes classes de MMPs e o baixo custo quando comparado a outros procedimentos (SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005).

Ela consiste em uma técnica eletroforética em gel desnaturado de poliacrilamida. É copolimerizado com dodecil sulfato de sódio (SDS) e com substrato preferencial da enzima que irá ser analisada. Através da corrente elétrica sobre o gel, ocorre à migração das MMPs e a separação por diferença de tamanho molecular, e, a depender do substrato usado, diferentes MMPs vão ser especificamente detectadas (KUPAI et al, 2010).

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

Esta técnica possui diversas etapas, destacando-se a de desnaturação e inativação das MMPs no gel através da presença do SDS durante a eletroforese. Depois dessa etapa, ocorre a renaturação das enzimas por meio da lavagem do gel e retirada do SDS (FIETZ et al., 2008). Para identificar as bandas, observa-se a diferença do peso molecular das formas ativas e latentes pela coloração do gel. Como

resultado final, identifica-se a presença das bandas de atividade proteolíticas claras, que são quantificadas, e observa-se a densidade dos *pixels* (LA ROCCA et al., 2004).

A zimografia, técnica utilizada para detectar enzimas proteolíticas capazes de degradar gelatina de várias fontes biológicas. É particularmente útil para a avaliação de dois membros-chave da família das metaloproteinases de matriz, MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B), devido à sua potente atividade de degradação da gelatina. Este método baseado em eletroforese em gel de poliacrilamida pode fornecer uma avaliação confiável do tipo de gelatinase, quantidade relativa e status de ativação (latente, comparado com formas enzimáticas ativas) em células cultivadas, tecidos e fluidos biológicos (TOTH et al., 2012).

Quantidades aumentadas de MMP-2 e MMP-9 ativas foram detectadas em líquido de lavagem traqueobrônquica (TBLF) de bezerros com doença do trato respiratório, em comparação com quantidades em animais normais. Ressalta-se que ainda neste mesmo estudo, a infecção concomitante por *Mycoplasma bovirhinis* em bezerros com pneumonia atribuível a *Pasteurella multocida* foi associada a maiores concentrações de MMP-9 (SIMONEN-JOKINEN et al., 2005). Destaca-se que a MMP-9 desempenha um papel crucial na degeneração da matriz extracelular, inflamação e remodelação tecidual.

Estudo realizado em cabras leiteiras analisou a relação entre a expressão de MMP-9 e contagem de células somáticas no leite. Assim, o contagem de células somáticas no leite de cabra foi positivamente correlacionado com a expressão de MMP-9 (LI et al., 2016). No caso de vacas com mastite, foi relatada também alta atividade da proteína MMP-9 (BARKEMA et al., 1998). A MMP-9 desempenha papéis importantes no recrutamento de neutrófilos e na indução de apoptose celular em células epiteliais mamárias bovinas com mastite (RAULO et al., 2002).

As metaloproteinases 2 (gelatinase A) e 9 (gelatinase B) são caracterizadas por renovação e remodelação de tecidos fisiológicos, mas também contribuem para uma série de eventos patológicos. Nesta condição, despertam interesse como potenciais biomarcadores não invasivos. Contudo, o estudo dessas estruturas (MMP-2 e MMP-9) em processos fisiopatológicos requer um método confiável para avaliação da atividade enzimática, e a zimografia é uma técnica vantajosa em biologia molecular para o estudo da atividade proteolítica de MMPs (RICCI ET AL, 2006).

8. Referências Bibliográficas

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, p. 198-207, 2003.
- AKBARZADEH-NIAKI, M.; DERA KHSHANDEH, A.; KAZEMIPOUR, N., ERAGHI, V., & HEMMATZADEH, F. A novel chimeric recombinant protein PDHB-P80 of *Mycoplasma agalactiae* as a potential diagnostic tool. **Molecular Biology Research Communications**, 9(3), p. 123-128, 2020.
- ALVES, B.H.L.S.; SILVA, J.G.; MOTA, A.R.; CAMPOS, A.C.; JÚNIOR, J.W.P.; SANTOS, S. B. *Mycoplasma agalactiae* in semen and milk of goat from Pernambuco State, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33(11):1309-1312, 2013.
- ARAÚJO, R.V.S et al. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.10, n.1, p.82-88, 2011.
- AZEVEDO, E.O. Agalaxia contagiosa. Um “novo” problema para caprinos e ovinos do Brasil, **Ciência Veterinária Trópicos**. v. 18, n. 2, 2015.
- AZEVEDO, E.O. **Micoplasmoses em ruminantes** In: Doenças de Ruminantes e Equinos. 3 ed. Santa Maria, Pallotti, v.1, p. 383-391, 2007.
- AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA, I.V.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; ARAÚJO, M.D’O.; RODRIGUES, A.R.O.; RIET-CORREA, F. & CASTRO, R.S.. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. **Braz. J. Microbiol.** 37, p. 576-581, 2006.
- AZEVEDO, E.O.; ALCÂNTARA, M.D.B.; NASCIMENTO, E.R.; TABOSA, I.V.; BARRETO, M.L.; ALMEIDA, J.F.; ARAÚJO, M.D’O. RODRIGUES A.R.O., RIET-CORREA F. & CASTRO R.S. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. **Braz. J. Microbiol.** 37: 576-581, 2006.
- BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R. S.; AZEVEDO, E. O.; NASCIMENTO, E. R.; MELO, L. S. S. & MELO, C. B. Infecção por *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos caprinos leiteiros nas microrregiões do Cariri na Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 60 (5), p. 1255-1258, 2008.
- BARBE, A.M.; BERBETS, A.M.; DAVYDENKO, I.S.; KOVAL, H.D.; YUZKO, V.O.; YUZKO, O.M. Expressão e Significado da Matriz Metaloproteinase-2 e Matriz Metaloproteínas-9 na Endometriose. **Journal of Medicine and Life**. v. 13, n. 3, p. 314-320. 2020.
- BARBOSA, M. S.; DOS SANTOS ALVES, R. P.; DE SOUZA REZENDE, I.; PEREIRA, S. S.; CAMPOS, G. B.; FREITAS, L. M. ... & TIMENETSKY, J.. Novel antigenic proteins of *Mycoplasma agalactiae* as potential vaccine and serodiagnostic candidates. **Veterinary Microbiology**, 251, 108866, 2020.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; LAM, T. J. G. M.; BEIBOER, M. L.; WILMINK, H.; BENEDICTUS, G., BRAND, A. Incidence of clinical mastitis in

- dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. **Journal of dairy science**. v. 81, n. 2, p. 411 – 419, 1998.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1825, p. 29–36, 2012.
- BERGONIER, D.; BERTHELOT, X.; POUMARAT, F. Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. **Revue Scientifique Technology**, v.16, p. 848-873, 1997.
- BEZERRA JÚNIOR, R. Q., ELOY, Â. M. X., FURTADO, J. R., PINHEIRO, R. R., ANDRIOLI, A., MORENO, F. B., ... & DA SILVA TEIXEIRA, M. F. A panel of protein candidates for comprehensive study of Caprine Arthritis Encephalitis (CAE) infection. *Tropical animal health and production*, v. 50, n.1, 43-48, 2018.
- BEZERRA JÚNIOR, R. Q., JR.; ELOY, A. M. X.; PERREIRA, E. P.; FURTADO, J. R.; SOUZA, K. C. S.; LIMA, A. R.,... TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação das metaloproteínas de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com artrite encefalite caprina na região Semiárida do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 43, n. 1258, p. 1-7, 2015.
- BIRKEDAL-HANSEN, H; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.4, n.2, p.197–250, 1993.
- BROWN S.I., HOOK C.W., Treatment of corneal destruction with collagenase inhibitors. **Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology**, v. 75; p.1199-207, 1971.
- CACCIOTTO, C.; ADDIS, M. F.; PAGNOZZI, D.; CORADDUZZA, E.; PITTAU, M.; & ALBERTI, A. Identification of conserved *Mycoplasma agalactiae* surface antigens by immunoproteomics. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 236, 110239, 2021.
- CAMPOS, A. C.; AZEVEDO, E. O.; ALCÂNTARA, M. D. B.; SILVA, R. B. S.; CORDEIRO, A. A.; MAMEDE, A. G.; MELO, M.A.; NASCIMENTO, E. R.; CASTRO, R. S. Efficiency of inactive vaccines against contagious agalactia in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1394-1402, 2013.
- CAMPOS, A.C.; TELES, J.A.A.; AZEVEDO, E.O.; NASCIMENTO, E.R.; OLIVEIRA, M.M.M.; NASCIMENTO, S.A. E CASTRO, R.S. ELISA protein G for the diagnosis of contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**. 84 (1-3), p. 70-75, 2009.
- CAWSTON, T.E. Metalloproteinase Inhibitors and the Prevention of Connective Tissue Breakdown. **Pharmacological Therapy**, v. 70(3), p. 163-182, 1996.
- CORRALES, J.C.; ESNAL, A.; DE LA FE, C.; SANCHEZ, A.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**., v. 68, p.154–166, 2007.
- DAMASCENO, E. M., PINHEIRO, R. R., ANDRIOLI, A., ALVES, F. S. F., LIMA, A. M. C., PEIXOTO, R. M., ... & BRANDÃO, I. S. Seroprevalence and associated risk factors of *Mycoplasma agalactiae* and investigation of coinfection with the caprine

- lentivirus in Rio Grande do Norte, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 4, 2111-2117, 2020.
- DA MASSA, A. J. et al.. Mycoplasma of goats and sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.4, p. 101-113, 1992.
- DE LA FE, C.; Castro-Alonso, A.; Herráez, P.; Poveda, J.B. Recovery of *Mycoplasma agalactiae* from the ears of goats experimentally infected by the intramammary route. **The Veterinary Journal**. v. 190, n. 1, p. 94-97, 2011.
- FANG, L.; YU, W.; YU, G.; YE, B.; CHEN, G. Predictive value of matrix metalloprotease 9 on surgical outcomes after pericardiectomy. **J Cardiothorac Surg**. v.17, 2022.
- FIETZ, S.; EINSPANIER, R.; HOPPER, S.; HERTSCH, B.; BONDZIO, A. Determination of MMP-2 and -9 activities in synovial fluid of horses with osteoarthritic and arthritic joint diseases using gelatin zymography and immunocapture activity assays. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, n. 3, p. 266-271, 2008.
- FRANCZAK, ALEKSANDRA; SKOMRO, ROBERT; SAWICKA, JOLANTA; BIL-LULA, IWONA; NOCON, ANDRHEA; FENTON, MARK; LAWSON, JOSHUA; SAWICKI, GRZEGORZ. Serum matrix metalloproteinase-2 as a predictor of level of hypoxemia and severity of obstructive sleep apnea. **Sleep and Breathing**, v.25, p. 877-886, 2021.
- 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.
- FUSCO, M. CORONA, L.; ONNI, T.; MARRAS, E.; LONGHEU, C.; IDINI, G., TOLA, S. Desenvolvimento de um ensaio imunoenzimático sensível e específico baseado em antígenos recombinantes para detecção rápida de anticorpos contra *Mycoplasma agalactiae* em ovinos. **Imunologia clínica e vacinal**, 14 (4), 420-425, 2007.
- GALIZA, Y. S., ELOY, A. M. X., PINHEIRO, R. R., PEIXOTO, R. M., LIMA, A. M. C., BARROSO, M. D. S., & FONSECA, L. M. (2020). Study of metalloproteinases in the blood of goats experimentally infected with caprine encephalitis arthritis virus. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 41, n. 6, suplemento 2, p. 3165-3176, 2020.
- GROSS, J.; LAPIÈRE, C.M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 46, p. 1014-1022. 1962.
- IBGE. **Efetivos de rebanho por tipo de rebanho**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#notas-tabela>> . Acesso em: 19 dez. 2021.
- KITTELBERGER, R.; O'KEEFE, J.S.; MEYNELL, R.; SEWELL, M.; ROSATI, S.; LAMBERT, M.; DUFOUR, P.; PÉPIN, M. Comparison of four diagnostic tests for the identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*. **N Z Vet J**. v. 54, n. 1, p. 10-15, 2006.
- KLEIN, G.; VELLENGA, E.; FRAAIJE, M.W.; KAMPS, W.A.; DE BONT, E.S. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. **Crit. Rev. Oncol. Hematol**. v. 50, p. 87-100, 2004.

- KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino Acids**, v. 41(2), p. 271-290, 2011.
- KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and toxicological methods**, v. 61, n. 2, p. 205-209, 2010.
- LA ROCCA, G.; PUCCI-MINAFRA, I.; MARRAZZO, A. N. T. O. N. I. O.; TAORMINA, P.; & MINAFRA, S. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **British Journal of Cancer**, v. 90, n. 7, p. 1414-1421, 2004.
- LAMBERT, M.; CALAMEL, M.; DUFOUR, P.; CABASSE, E.; VITU, C.; PÉPIN, M. Detection of false-positive sera in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 326–330, 1998.
- LEON, V. L.; GARRIDO A.F.; CUBERO P.M.J.; PERALES, A. Immunoprophylaxis of caprine contagious agalactia due to *Mycoplasma agalactiae* with an inactivated vaccine. **The Veterinary Record**. v. 137, n. 11, p. 266-269, 1995.
- LIMA, A.M.C. **Avaliação epidemiológica de agentes infecciosos da esfera reprodutiva em caprinos e ovinos dos estados de Alagoas, Ceará e Maranhão. 2021.** 129p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, 2021.
- LIOTTA, L.A.; STEEG, P.S.; STELLER-STEVENSON, W.G. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell**, v. 64, p. 327-36, 1991.
- LOTFI, A.; G, MOHAMMADI.; A, TAVASSOLI.; M, MOUSAVIAGDAS.; H, CHAVOSHI.; L, SANIEE. Serum levels of MMP9 and MMP2 in patients with oral squamous cell carcinoma. **Asian Pac J Cancer Prev**. v.16, n.4, p.1327-30, 2015.
- MADANAT, A.; ZENDULKOVÁ, D.; POSPÍŠIL, Z. Contagious agalactia of sheep and goats. **Acta Veterinaria Brno**. v.70, p.403-412, 2001.
- MANNELLO, F.; MEDDA, V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. **Prog Histochem Cytochem**, v. 47, p. 27-58, 2012.
- NASCIMENTO, E.R.; BARRETO, M.L.; PLATENIK, M.O. Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in goats in Brazil. Etiologic study. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR MYCOPLASMOLOGY, 14, 2002, Vienna. **Anais**. Vienna: IOM, p.45-46. (Resumo) 2002.
- NASCIMENTO, E.R.; Micoplasmose caprina e ovina In: Simposio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira = International Symposium on the Agribusiness of the Goat Milk Industry,1.; Simposio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte = International Symposium on Sheep And Goat Production,2.; Espaço Prisão Nordeste,1., 2003, João Pessoa. **Anais**. Proceedings João Pessoa: EMEPA, p.141-151, 2003.
- NICHOLAS, R.A.J. Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. **Small Ruminants Research**. v. 45, p. 145–149, 2002.
- O'FARRELL, P. H. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 10, p. 4007-4021, 1975.

- Manual OIE Terrestre, 2018. Capítulo 3.7.3. **Agalactia Contagiosa**. P.1430 – 1440. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.07.03_CONT_AGA_LACT.pdf
- OLLIVIER, F.J.; GILGER, B.C, BARRIE, K.P. et al. Proteinases of the cornea and precocular tear film. **Vetinary Ophthalmol**, v. 10, p. 199-206, 2007.
- PEIXOTO, R. M.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; DOS SANTOS, V. W. S.; DE SOUZA, M. M.; DE AZEVEDO, D. A. A.; DAMASCENO, E. M.; TEIXEIRA, M. F. DA S. *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat flocks bred in state of Ceará in association with Caprine Arthritis Encephalitis Virus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n.1, p.1533, 2018.
- PENHA, A.M.; D' APICE, M. Agalaxia contagiosa das cabras em São Paulo. **Arquivo Instituto Biológico**, v.13, p.299-301, 1942.
- PÉPIN, M.; DUFOUR, P.; LAMBERT, M.; AUBERT, M.; VALOGNES, A., ROTIS, T.; VAN DE WIELE, A.; BERGONIER, D. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays for serologic diagnosis of contagious agalactia in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. 15, n. p. 281-5, 2003.
- PEREIRA, P. E. **Caracterização das metaloproteinases (MMPs) no plasma seminal de caprinos sadios e infectados pelo vírus da artrite encefalite caprina (CAE)**. 2014. 61f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Área de Reprodução Animal) – Universidade Vale do Acaraú, Sobral – CE.
- PINHEIRO, R. R.; CHAGAS, A. C. S.; ANDRIOLI, A.; ALVES, F. S. F. Víroses de pequenos ruminantes. Sobral, CE: **Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2003. 30 p. (Série Documentos, 46).
- RADOSINSKA, J.; BARANCIK, M.; VRBJAR, N. Heart failure and role of circulating MMP-2 and MMP-9. *Panminerva Medica*. v. 59, n. 3, p. 241-253, 2017.
- RAM, M.; SHERER, Y.; SHOENFELD, Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. **Journal Clinical Immunology**. v.26, p.299–307, 2006.
- RANGASAMY, L.; GERONIMO, B. D.; ORTÍN, I.; CODERCH, C.; ZAPICO, J. M.; RAMOS, A.; PASCUAL-TERESA, B. Molecular Imaging Probes Based on Matrix Metalloproteinase Inhibitors (MMPIs). **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 2982, 2019.
- RAULO, S.M.; SORSA, T.; TERVAHARTIALA, T.; LATVANEN, T.; PIRILÄ, E.; HIRVONEN, J.; MAISIA, P. Increase in milk metalloproteinase activity and vascular permeability in bovine endotoxin-induced and naturally occurring *Escherichia coli* mastitis. **Veterinary immunology and immunopathology**. v. 85, n. 3, p. 137–45, 2002.
- RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; DANTAS, A. F. **Plantas Tóxicas da Paraíba**. SEBRAE, João Pessoa. 54p., 2006.
- RIET-CORREA, F; SIMÕES, S.V.D; AZEVEDO, E.O. Principais enfermidades de caprinos e ovinos no semiárido brasileiro. In: XV Congresso latino americano de buiatria e XXXIX jornada uruguayas de buiatria, 2011, Uruguay **Anais XV Congresso latino americano de buiatria e XXXIX jornada Uruguay de buiatria**, 2011.

- ROY, R.; YANG, J.; MOSES, M.A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. **Journal of Clinical Oncology**. v 27, p. 5287–5297, 2009.
- SANTOS, M.O.; CAMPOS A.C.; SANTOS J.P.; SANTOS P.O.M.; CALDAS E.L.C.; SANTOS A.D.F.; NASCIMENTO E.R.; CASTRO R.S. E AZEVEDO E.O. Agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos do Estado do Sergipe: dados preliminares. **Scientia Plena**. 11(4), 046124-1, p.1-5, 2015.
- SAWICKI, G. Intracellular regulation of matrix metalloproteinase-2 activity: new strategies in treatment and protection of heart subjected to oxidative stress. **Scientifica**, v. 2013, 2013.
- SILVA, F. L. R.; ARAÚJO, A. M. Desempenho produtivo em caprinos mestiços no semi-árido do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 1028 – 1035, 2000.
- SILVA, N. S.; AZEVEDO, E. O.; CAMPOS, A. C.; CORDEIRO, A. A.; MAMEDE, A. G.; SILVA, R. B. S., ... & MARINHO, M. L. Infecção congênita em cabritos por *Mycoplasma agalactiae*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 66, p. 631-634, 2014.
- SIMONEN-JOKINEN, T.L.; ESKELINEN, U.M.; HÄRTEL, H.M.; NIKUNEN, S.K.; SALONIEMI, H.S.; MAISI, P.S. Gelatinolytic matrix metalloproteinases-2 and -9 in tracheobronchial lavage fluid obtained from calves with concurrent infections of *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma bovirhinis*. **Am J Vet Res**. v. 66, n.12, p. 2101-2106, 2005.
- SNOEK-VAN BEURDEN, P.A.M.; VON DEN HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v. 38, n. 1, p. 73-83, 2005.
- SONG, Z.; WANG, J.; SU, Q.; LUAN, M.; CHEN, X.; XU, X. A função da MMP-2 e MMP-9 na metástase e no desenvolvimento de carcinoma hipofaríngeo. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. v. 87, p.521-528, 2021.
- SOUZA, A.P.; LINE, S.R.P. The biology of matrix metalloproteinases. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v.10, n.1, p.1-6, jan./mar. 2002.
- STAMENKOVIC, I. Matriz metalloproteinases in tumor invasión and metastases. **Cancer Biology**, v. 10, p. 415-433, 2000.
- STETLER-STEVENSON, W.G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase independent biological activities. **Sci Signal**, v. 1, re6, 2008.
- TOTH, M.; SOHAIL, A.; FRIDMAN, R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. In: Dwek, M., Brooks, S., Schumacher, U. (eds) *Metastasis Research Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 878. Humana Press, Totowa, NJ. 2012.
- TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. **Biochimie**. v. 87, p. 287-297, 2005.
- VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix Metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-839, 2003.

- WAITES, K.B.; KATZ, B.; SCHELONKA, R.L.; Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clinica Microbiologica Revista**. 18, p. 757-89, 2005.
- WALKER, R.L. *Mollicutes*. In: HIRSH, D.C., ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.155-162. 2003.
- WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; WILLIAMS, K.L. et al. Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, p. 830-838, 1996.
- WOESSNER J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The Faseb Journal**, v. 5, p. 2145-2154, 1991.
- ZITKA, O.; KUKACKA, J.; KRIZKOVA, S.; HUSKA, D. et al. Matrix Metalloproteinases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3751-3768, 2010.

CAPÍTULO 2
PERFIL DAS METALOPROTEINASES EM CAPRINOS INFECTADOS
PELA *Mycoplasma agalactiae* NA PRINCIPAL BACIA LEITEIRA DO
NORDESTE, BRASIL

RESUMO

A agalaxia contagiosa (AC) é uma enfermidade que pode acometer pequenos ruminantes de qualquer raça, idade e sexo, se enquadra no grupo das Micoplasmose, causando prejuízos a caprinocultura, havendo a necessidade de vigilância epidemiológica constante devido à sua dispersão. Varias enzimas, por exemplo, as metaloproteinases têm sido pesquisadas na remodelação da matriz celular tanto em processos fisiológicos quanto patológicos, envolvidas em processos infecciosos e tumorais. Dessa forma, estão sendo investigadas como possíveis biomarcadores. Pesquisas correlacionando a atividade das gelatinases em caprinos acometido por enfermidades são incipientes havendo a necessidade de maiores estudos visando compreender a dinâmica dessas enzimas. Objetivou-se nessa pesquisa analisar o comportamento das MMPs em caprinos infectados naturalmente pela *Mycoplasma agalactiae* oriundos de rebanhos distribuídos em municípios pertencentes a principal bacia leiteira do Nordeste, sendo esse o primeiro estudo sobre identificação das MMPs em caprinos com AC. Foram utilizadas 25 fêmeas caprinas, sendo dividido em dois grupos experimentais, um composto por 15 animais soropositivos naturalmente para Agalaxia Contagiosa (AC) e 10 soronegativo. A comprovação da infecção pela bactéria foi realizada através do ELISA Indireto, por meio do *kit* comercial anti-*Mycoplasma agalactiae test kit* (IDEXX®, Australia) e posteriormente as amostras de soro sanguíneo foram submetidas a zimografia usando a gelatina como substrato. Nos grupos experimentais foi possível observar a presença das enzimas na forma latente proMMP-13 (45-48 kDa) em todos os animais, já a forma ativa identificadas, MMP-2 (64-66 kDa) e MMP-9 (80-84 kDa), foram visualizadas em todos os animais do grupo soropositivo. Identificou-se também a presença das formas latentes proMMP-9 (92 kDa) nas amostras do grupo negativo. Conclui-se que a atividade enzimática no soro sanguíneo mostrou um perfil padrão que será aplicado como referência em caprinos infectados. Dessa forma, a atividade enzimática das MMPs poderá ser sugerida como uma ferramenta complementar no diagnóstico da AC.

Palavras-chave: Agalaxia contagiosa, proteômica, zimografia, gelatinase.

ABSTRACT

Contagious agalactia (CA) is a disease that can affect small ruminants of any breed, age and sex, it fits into the Mycoplasmosis group, causing damage to goat farming, requiring constant epidemiological surveillance due to its dispersion. Several enzymes, for example, metalloproteinases, have been investigated in the remodeling of the cellular matrix both in physiological and pathological processes, involved in infectious and tumor processes. Thus, they are being investigated as possible biomarkers. Research correlating the activity of gelatinases in goats affected by diseases is incipient and there is a need for further studies to understand the dynamics of these enzymes. The objective of this research was to analyze the behavior of MMPs in goats naturally infected by *Mycoplasma agalactiae* from herds distributed in municipalities belonging to the main dairy basin in the Northeast, which is the first study on the identification of MMPs in goats with CA. Twenty-five female goats were used, divided into two experimental groups, one composed of 15 animals naturally seropositive for Contagious Agalactia (AC) and 10 seronegative. Proof of the presence and absence of the bacteria was performed by means of Indirect ELISA, using the commercial anti-*Mycoplasma agalactiae* test kit (IDEXX®, Australia) and later the blood serum samples were submitted to zymography using gelatin as a substrate. In the experimental groups, it was possible to observe the presence of enzymes in the latent form proMMP-13 (45-48 kDa) in all animals, while the active form identified, MMP-2 (64-66 kDa) and MMP-9 (80-84 kDa), were seen only in the seropositive group. The presence of latent forms proMMP-9 (92 kDa) was also identified in the samples of the negative group. It is concluded that the enzymatic activity in the blood serum showed a standard behavior that will be applied as a reference in infected goats. Thus, the enzymatic activity of MMPs may be suggested as a complementary tool in the diagnosis of CA.

Keywords: Contagious agalactia, proteomics, zymography, gelatinase.

INTRODUÇÃO

O Nordeste se destaca na participação de rebanhos caprinos e ovinos do Brasil, apresentando cerca de 95,02% do rebanho nacional. Os estados da Paraíba e Pernambuco possuem importância no desenvolvimento socioeconômico da caprinocultura, já que corresponde a 33,87% do rebanho da região Nordeste e evidenciam-se como a maior bacia leiteira de caprinos do país, sendo produzido aproximadamente 9 milhões de litros de leite por ano (IBGE, 2020; GUIMARÃES et al., 2021). Para aprimorar a produção dos caprinos foi fundamental investir em melhoramento genético através da importação de raças especializadas, porém alguns aspectos não foram considerados, por exemplo, o controle de transmissão de enfermidades infectocontagiosas e a fiscalização (CÂMARA, 2012).

Algumas enfermidades são pouco conhecidas pelos produtores, sendo um fator crítico para pecuária, devido causar sérios prejuízos, como é o caso da Agalaxia Contagiosa (AC). Essa doença é causada pela *Mycoplasma agalactiae*, bactéria que tem característica de ausência da parede celular. Os animais se infectam através da via digestiva, respiratória e mamária, ocorrendo à transmissão pelo contato direto entre animais sadios e enfermos ou pela ingestão de água e alimentos contaminados (SANTOS et al., 2015). A AC tem sido considerada a principal micoplasmose nas criações leiteiras de pequenos ruminantes e caracteriza-se por mastite, queda na produção de leite ou agalaxia, alterações oculares, pneumonia e alterações das articulações (poliartrites) (CORRALES et al., 2007).

Diante deste contexto, faz-se necessário buscar alternativas para um melhor aproveitamento dos animais acometidos pela AC, evitando assim, maiores prejuízos e conhecendo novas possibilidades de controle e de diagnóstico dessa doença. Atualmente, a proteômica surge como uma ferramenta inovadora, porque através dessa técnica é possível o estudo das moléculas envolvidas na reação do sistema imune inato frente às infecções causadas por bactérias ou vírus. Além disso, proporciona a caracterização de conjuntos de proteases e proteínas expressas em algum momento, e também possibilitar os estudos da biologia molecular das células (WILKINS et al., 1996).

As Metaloproteinases são enzimas zinco dependentes ligadas a processos patológicos e fisiológicos no organismo. Naturalmente estão expressas em processos como ovulação, espermatogêneses, angiogênese, embriogênese, como também em doenças como diabetes, periodontite, HIV, câncer e metástases, tornando-se assim, muito estudadas na medicina humana. Desde 1990 as metaloproteinases são alvo de pesquisas pela comunidade científica, ocorrendo uma ascensão dos estudos na espécie humana, sendo publicados diversos artigos no meio acadêmico (ZITKA et al., 2010).

Entre as proteases expressas, ressaltam-se as Metaloproteinases de Matriz (MMPs), pois participam como mediador do processo inflamatório, permitindo assim, a monitorização e prognóstico de enfermidades, revelando-se como potenciais biomarcadores para complemento do diagnóstico de doenças, fazendo um elo para descobrir possíveis antibióticos. Em vista disso, o objetivo desse trabalho foi analisar o perfil das MMPs em caprinos infectados naturalmente pela *Mycoplasma agalactiae* oriundos de rebanhos distribuídos em municípios pertencentes a principal bacia leiteira do Nordeste, visto que ainda não existem estudos das MMPs em caprinos acometidos pela AC, sendo esta a primeira abordagem sobre o assunto.

MATERIAL E MÉTODOS

Período e Local

O estudo foi realizado de outubro de 2021 a maio de 2022. As amostras foram coletadas na região de Cariri Paraibano e Sertão Pernambucano, consideradas grandes produtoras de leite caprino no Brasil. A seleção dos municípios foi conduzida conforme a relevância da densidade animal e representatividade quanto à cadeia produtiva de leite caprino da região. Essa pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos – (CEUA/CNPC) sob protocolo número 006/2020.

A pesquisa foi realizada na Embrapa Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral, na região Norte do estado do Ceará.

Animais

Os animais experimentais foram selecionados a partir de uma coleta de soro sanguíneo de um total de 937 caprinos leiteiros em 51 propriedades nos estados da Paraíba e de Pernambuco. Essas amostras foram obtidas de um projeto maior intitulado “Inteligência epidemiológica das principais enfermidades infecciosas da

caprinocultura leiteira dos territórios Cariri Paraibano e Sertão Pernambucano e da ovinocultura e da caprinocultura de corte na Bacia do Jacuípe na Bahia”, sendo esse financiado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Coleta de Sangue

As coletas de sangue foram realizadas por punção venosa da jugular, utilizou-se agulhas individuais, descartáveis e tubos do tipo vacutainer® sem anticoagulante. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1500x g, por 10 minutos, a fim de separar o soro sanguíneo, que foi devidamente armazenado em microtubos identificados e mantidos na temperatura de 6°C. Em seguida, foram acondicionadas sob refrigeração (caixas térmicas) e transferidas a Embrapa Caprinos e Ovinos, no município de Sobral, Ceará, Brasil, as quais foram estocadas em freezer a -20°C para serem utilizadas nos testes.

Grupos experimentais

A formação dos grupos experimentais se deu a partir do diagnóstico sorológico pelo teste de ELISA Indireto *Mycoplasma agalactiae*. Conforme os resultados obtidos, as amostras foram distribuídas em dois grupos experimentais organizados em soropositivos e soronegativos, prosseguindo assim com as etapas de execução deste estudo (Tabela 1).

Logo, dos animais soropositivos (Grupo 1) foram selecionadas 15 amostras, sendo 10 matrizes e 5 fêmeas jovens. Quanto ao grupo dos soronegativos (Grupo 2), foram selecionadas 10 amostras, sendo 5 matrizes e 5 fêmeas jovens. Ressalta-se que os animais de ambos os grupos foram selecionados de propriedades distintas e que todos os animais apresentaram resultados negativos nos testes de ELISA para Toxoplasmose, Clamidiose, Paratuberculose, Brucelose e, também, negativo no IDGA para Artrite Encefalite Caprina (CAE).

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais conforme os resultados do teste de ELISA para Agalaxia Contagiosa em fêmeas caprinas nos estados da Paraíba e Pernambuco, Nordeste, Brasil.

Categoria	Resultados do ELISA	
	Grupo 1 (Positivos)	Grupo 2 (Negativos)
Matrizes	10	5
Fêmeas Jovens	5	5
Total	15	10

Testes laboratoriais

Diagnóstico para *Mycoplasma agalactiae*

Para comprovação da infecção de animais positivos para *Mycoplasma agalactiae* foi realizado o teste ELISA Indireto, por meio do *kit* comercial anti-*Mycoplasma agalactiae test kit* (IDEXX®, Australia), composto por placas de microtitulação pré-impregnadas com antígeno de *Mycoplasma agalactiae*. O resultado adquirido foi através da leitura da absorbância em espectrofotômetro *Thermo Scientific Fisher Multiskan FC*®. Foram seguidas as instruções do fabricante, com leitura realizada utilizando um comprimento de onda de 450nm, para comparar a densidade óptica das amostras testadas com os padrões de controle positivo e negativo, presentes no *kit*. A obtenção dos resultados das amostras testadas se deu através dos critérios de interpretação e validação, seguindo as recomendações do *kit*, o qual tinha metodologia de validade de controle positivo $\leq 2,000$, controle negativo $\leq 0,500$ e suspeitos $\geq 0,300$.

Quantificação das proteínas totais do soro sanguíneo

A concentração proteica foi realizada através do método descrito por Bradford (1976) que se baseia na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G250* às proteínas, formando a coloração azul. Os níveis de proteína foram obtidos pela leitura da absorvância, num comprimento de onda de 595 nanômetros (nm), em triplicata, no espectrofotômetro FP-901 (*Chemistry Analyser Labsystems*) utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). Esta curva, também chamada de curva analítica de calibração, foi construída a partir da solução padrão, com concentrações conhecidas (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mg) de BSA. Desse modo, a quantificação da concentração de proteínas totais do soro sanguíneo foi realizada pelo cruzamento dos dados obtidos no espectrofotômetro com os da curva.

Zimografia

Na zimografia as amostras sorológicas foram solubilizadas em tampão de amostra de forma que a concentração final era $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, sendo utilizada alíquotas de $40\mu\text{g}$ em cada poço dos géis. Foi utilizado gel de poliacrilamida a 10%, polimerizados com gelatina na concentração de 2 mg/mL, seguindo a recomendação do protocolo descrito por Kupai et al. (2010) e então os quatro géis pequenos foram submetidos a

eletroforese (120mA; 500V; 60W) por um tempo que variou de 50 minutos a 1 hora e 10 minutos (adaptado de LAEMMLI, 1970).

Posteriormente, os géis foram lavados com a solução Triton X-100 2,5% durante 30 minutos, em seguida incubados a 37°C por 48 horas em solução de tampão contendo 50 mM Tris HCl, 0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂, a cada 12 horas trocava-se a solução. Depois os géis foram corados em Coomassie Brilliant Blue-G a 0,25% por 2 horas, após esse período descorados com solução contendo etanol a 30%, ácido acético a 7,5% em água Milli-Q por 30 minutos. Ao final desse processo obteve-se os géis corados onde observou-se as bandas claras, indicativas da atividade gelatinolítica das proteases presentes no soro sanguíneo dos animais (GALIZA et al., 2020). Ressalta-se que foi realizada a duplicata da zimografia, apresentando-se resultados semelhantes.

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

Análise Estatística

A análise estatística para este estudo foi descritivo, verificando a presença ou ausência de bandas correspondentes às respectivas enzimas os géis.

A variável densitometria foi submetida aos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, a fim de serem verificados os pressupostos da normalidade e homogeneidade, respectivamente. Aplicou-se o teste F, através da Análise de Variância, seguido pelo teste de Tukey para a comparação dos pares de médias entre os grupos. Foi considerado um nível de significância de 5% para todos os testes.

O software estatístico utilizado para as análises foi o R Studio: R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Agalaxia Contagiosa causa redução ou interrupção completa da produção de leite. Nas fêmeas, a prevalência tende a apresentar maiores taxas, devido à maior permanência desses animais nos rebanhos leiteiros em relação aos machos, apesar de esses serem igualmente afetados pela doença (Alves et al., 2013).

As MMPs participam de diversos processos biológicos, pois elas influenciam no comportamento celular por meio de ações como adesão entre as células, clivagem de moléculas e de proteínas que se encontram na superfície celular e transmissão de sinais ao meio extracelular. Acredita-se que elas atuam no desenvolvimento embrionário, no crescimento de tumores, na artrite, nos fatores de crescimento, nas quimiocinas e nas citocinas (ARAÚJO et al., 2011).

Os inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) são pequenas proteínas multifuncionais responsáveis por regular as funções dessas enzimas. A homeostase da matriz extracelular é realizada através do equilíbrio entre a produção de MMPs e de TIMPs, e, quando há um excesso da atividade das MMPs nos tecidos, pode-se iniciar um possível processo patológico nessa matriz (OLLIVIER et al., 2007). Esse descontrole funcional pode implicar no aparecimento de algumas doenças, como osteoartrite reumatoide e invasão tumoral (CAWSTON et al., 1996; LIOTTA et al., 1991). Diante desses fatos, infere-se que a presença das MMPs em processos inflamatórios nos animais com e sem sintomatologia clínica, pode servir como monitoramento de infecções, inclusive para AC.

O presente estudo identificou, no soro sanguíneo de caprinos sadios (soronegativas) e com AC (soropositivas), a presença das formas latentes proMMP-13 (45-48 kDa) em todos os animais experimentais.

As formas ativas identificadas, MMP-2 (64-66 kDa) e MMP-9 (80-84 kDa), foram visualizadas no grupo de soropositivas (Grupo 1). Porém, a presença dessas MMPs não se apresentou no grupo de fêmeas soronegativas, mas houve a presença das formas latentes proMMP-9 (92 kDa) nas amostras desse grupo (Grupo 2). Estas enzimas podem ser visualizadas no gel, indicando o processo proteolítico (Figura 1).

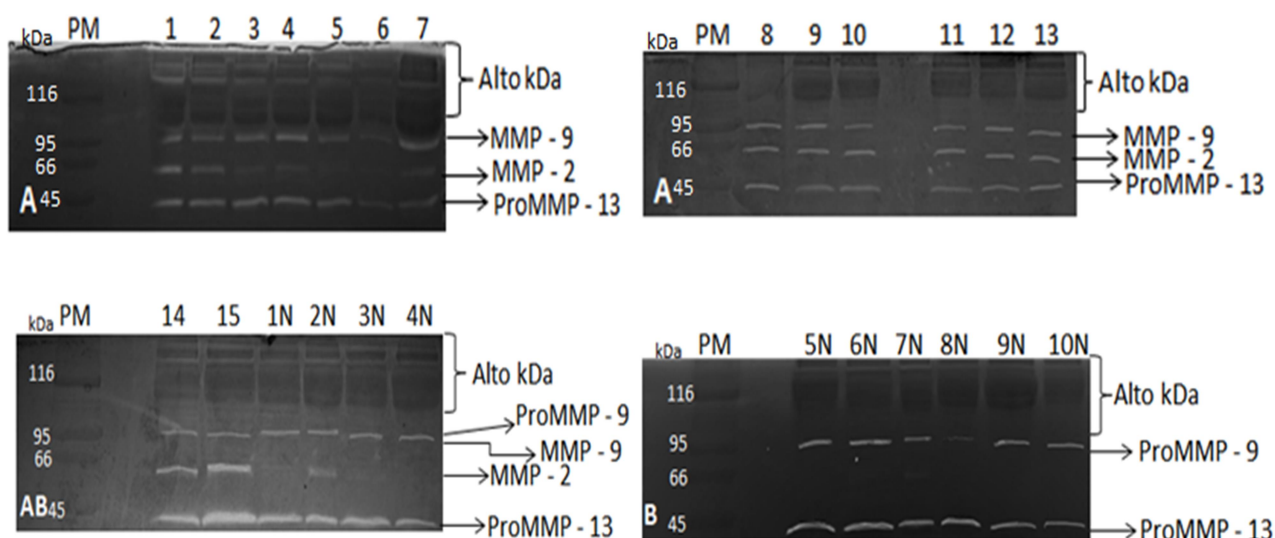


Figura 1: Géis zimográficos apresentando a atividade enzimática das metaloproteinases no soro sanguíneo de caprinos. (A) gel de fêmeas soropositivas (1-13) corresponde aos animais experimentais; (AB) gel de fêmeas soropositivas (14-15) e (1N-4N) fêmeas soronegativas; (B) gel de fêmeas soronegativas (5N-10N) corresponde aos animais experimentais; PM: Peso Molecular.

A presença dessas proteases, MMP-2 e MMP-9, podem ocorrer devido as suas ações em processos inflamatórios, estando envolvidas na remodelação fisiopatológica da parede vascular (HU et al., 2007; KUZUYA et al., 2002).

A MMP-9, por sua vez, também é expressa quando ocorrem situações que necessitam da remodelação de tecidos, como no caso de cicatrização de feridas e na invasão tumoral (STAMENKOVIC, 2000; KLEIN et al., 2011). Desse modo, pode-se apresentar ligação como a sua presença no grupo de animais soropositivos para Agalaxia Contagiosa, conforme resultados apresentados neste estudo (Tabela 2).

Ademais, a MMP-9 possui alto peso molecular, podendo ser secretada por vários tipos celulares: neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, fibroblastos, células musculares lisas e células do miocárdio, entre outros tecidos (RAM et al., 2006).

Acerca da presença da MMP-2, sua atuação está relacionada à capacidade em degradar gelatina, colágenos, elastina e a vitronectina, e é amplamente expressa nas células do tecido conjuntivo (STAMENKOVIC, 2000). Atua também na migração celular, sendo responsável pela degradação direta da membrana basal (KLEIN et al., 2011).

Esses achados corroboram com os vistos em humanos (BAUMAN et al., 2002; TENTES et al., 2007; SEABRA, 2006), em cães (SAENGSOI et al., 2011) e em ratos

(BELHONICE et al., 2010; DALMOLN et al., 2007). Além das MMPs citadas nesse estudo, também foram encontradas enzimas de alto peso molecular, contudo não foram estudadas devido à escassez de dados; portanto, esse trabalho dedicou-se às análises das MMPs conhecidas. Outros pesquisadores como Galiza et al. (2020) e Bezerra Júnior et al. (2015) também encontraram enzimas de maior peso molecular na espécie caprina, os mesmos também não mencionaram quais enzimas.

Tabela 2: Frequência das MMPs encontradas nos géis, de acordo com os grupos amostrais: Soropositivos (Grupo 1) e Soronegativos (Grupo 2)

MMPs	Grupo positivo		Grupo negativo	
	Fêmeas adultas	Fêmeas jovens	Fêmeas adultas	Fêmeas jovens
	n/N (%)	n/N (%)	n/N (%)	n/N (%)
ProMMP-9 (92 kDa)	0/10 (0%)	0/5(0%)	5/5 (100%)	4/5 (80%)
MMP-9 (80 – 84 kDa)	10/10 (100%)	5/5(100%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
MMP-2 (64 – 66 kDa)	10/10 (100%)	5/5(100%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)
ProMMP-13 (45 – 48 kDa)	10/10 (100%)	5/5(100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)

A ausência das formas latentes proMMP-2 e proMMP-9 pode ser indício de que houve transformação destas em formas ativas MMP-2 e MMP-9 devido ao processo infeccioso causado pela bactéria no hospedeiro. Segundo Elkington et al. (2005), embora não comprovado in vivo, é provável que a migração de todas as células inflamatórias exija a atividade das MMPs. Além desse achado, foi possível observar a presença da proMMP-13 em todos os animais. Essa pro-enzima está vinculada à ativação da maioria das MMPs, entre elas, as gelatinases.

A atividade de proMMP-2 e MMP-2, em caprinos infectados pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV), foi relatada por Bezerra Júnior et al. (2015), em que foi observada maior atuação dessas proteases em reprodutores naturalmente infectados com CAEV do que em animais negativo. Dessa maneira, percebe-se a ação dessas proteases nos processos inflamatórios crônicos de cabras.

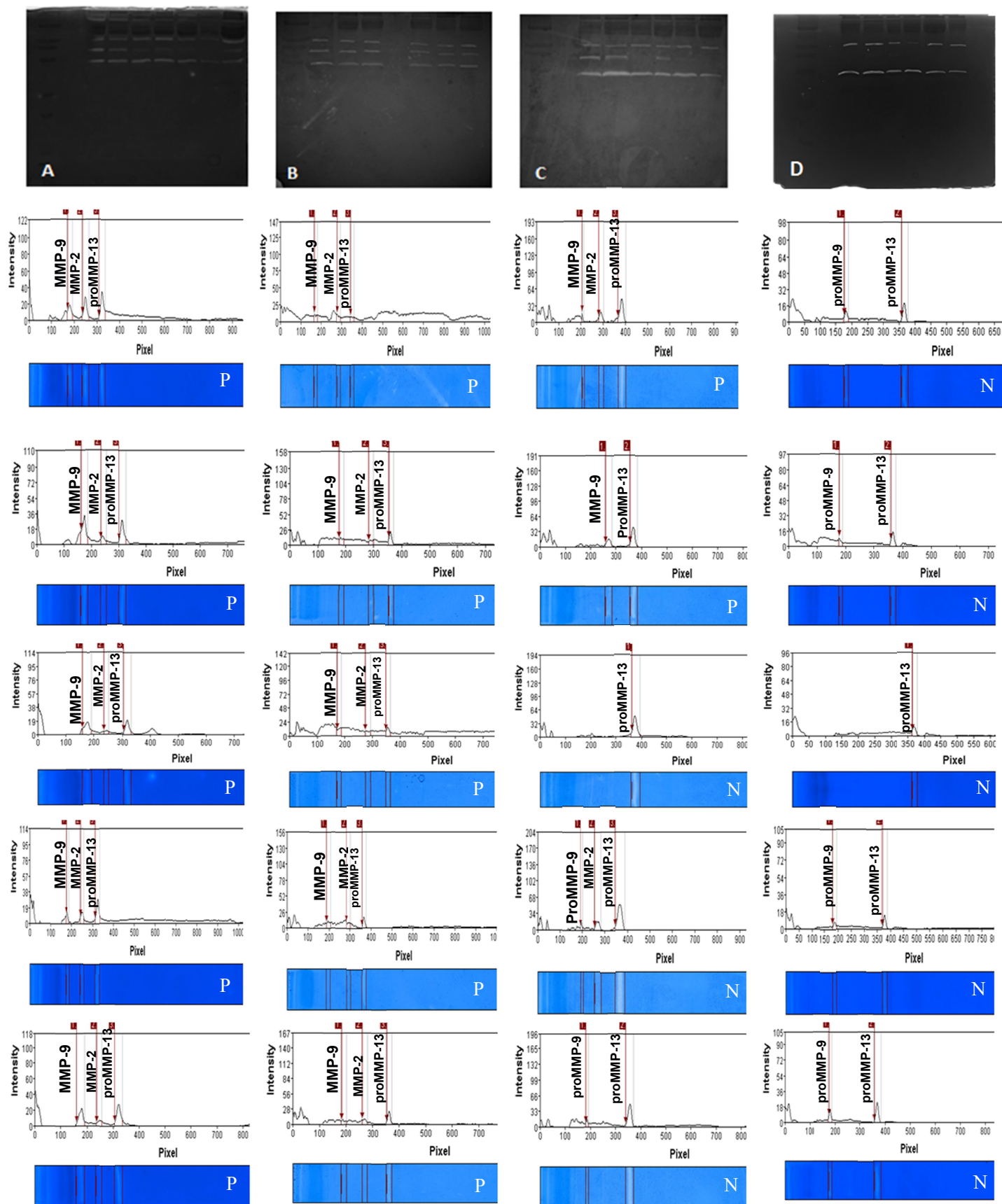
Segundo estudos realizados com a presença das MMPs, Galiza et al., (2020) utilizando caprinos infectados pelo CAEV, verificaram que, no grupo pós soroconversão (S3), as MMP-2 e MMP-9 se apresentaram juntamente com suas respectivas formas latentes. Entretanto, a maior atividade de MMP-2 foi observada em S3, sugerindo que a mesma pode ser usada no monitoramento de infecção.

Assim, infere-se que essas proteases ocorrem naturalmente em animais saudáveis, bem como em animais infectados. Contudo, sua expressão é aumentada nestes últimos, para facilitar o controle da doença (GALIZA et al., 2020).

A expressão dessas enzimas pode variar de acordo com o tipo e estágio da doença, presença de neoplasias, inflamações, além da participação em processos fisiológicos (PARKS e MECHAM, 1998). Isso ocorre porque a matriz extracelular, presente em todos os tecidos, necessita de MMPs para a remodelação tecidual, por exemplo (YO e WERB, 1998).

O fato de se encontrar formas latentes e ativas diz respeito ao mecanismo de ação das MMPs, já que para cada forma ativada é preciso a presença de uma forma latente. Desse modo, a MMP-9 e a MMP-2 presentes em todas as amostras soropositivas, poderão ser sugeridas como monitoramento da infecção.

A análise densitométrica dos zimogramas e das amostras de soro sanguíneo dos caprinos soropositivos e soronegativos para AC estão apresentadas na Figura 2. É possível avaliar, através das imagens (A, B, C, D), a ação proteolítica das MMPs presentes nas amostras: visualização de bandas claras, demonstrando a digestão de proteínas em locais específicos. Esses comportamentos são demonstrados em forma de picos densitométricos nas áreas da figura.



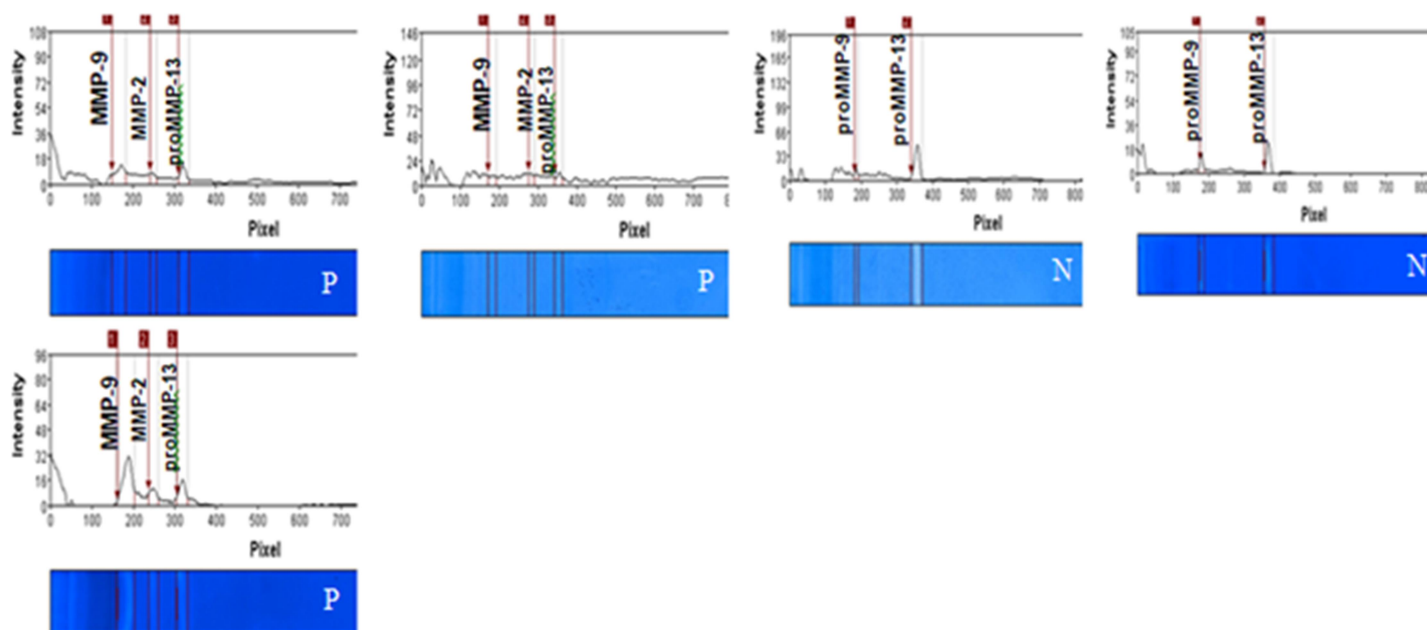


Figura 2: Análise densitométrica das proteases presentes no soro sanguíneo de caprinos soropositivos e soronegativos para AC. Em **A, B, C, D** as bandas digeridas de gelatinases em gel de poliacrilamida 10% mostram a atividade das MMPs (bandas claras), em seguida a representação esquemática do perfil densitométrico das proteases; P: Positiva; N: Negativa.

Quanto a presença da collagenase (proMMP-13) em todos os animais, isso pode ocorrer pelo fato desta derivar de células epiteliais e ósseas, além de ser mediadora da ativação de outras MMPs, inclusive as gelatinases. Ela é capaz de modificar várias proteínas extracelulares e gerar degradação e remodelação de tecidos, tendo ação principalmente em tecidos sinoviais (IWAMOTO et.al, 2011). Em humanos mostram-se envolvidas à susceptibilidade ao câncer (GAO et. al., 2014), doença coronariana (VASKU et. al., 2012), em tumores de mamários, condrócitos hipertróficos, fibroblastos da pele in vivo e cárie dental (TANNURE et. al., 2012).

A proMMP-13 apresenta maior volume médio referente à expressão e à atividade no grupo soronegativo, com diferença significativa do grupo soropositivo, logo, acredita-se não ser um indicador da infecção por AC, já que está presente em todas as amostras experimentais (Tabela 3).

Tabela 3: Média de volume da MMP (ProMMP-13), em *pixels*, entre os grupos estudados.

GRUPOS	ProMMP-13
Negativo	671.5 ^A
Positivo	368.9 ^B

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

Foi comprovado em humanos que a MMP-13, ou seja, a forma ativa da proMMP-13, participa da degradação de proteínas da matriz extracelular, incluindo colágeno fibrilas, colágeno tipo I, II, III, IV, XIV e X. Essa collagenase participa da cicatrização de feridas, degradação da cartilagem, desenvolvimento ósseo, mineralização óssea e ossificação, sendo necessária para o desenvolvimento normal do osso embrionário (AMELI, et. al., 2021).

Conclusão

Animais soropositivos para *M. agalactae* apresentaram alteração na presença das MMPs em relação aos animais soronegativos. Assim, sugere-se que a presença de MMPs pode favorecer o desenvolvimento de técnicas para detecção de animais infectados. Ainda são necessários estudos mais aprofundados sobre essas análises. Os resultados podem auxiliar pesquisas sobre doenças infecciosas na medicina veterinária, principalmente com a utilização de técnicas de análise proteômica aplicadas à identificação de proteínas relacionadas a infecções, colaborando para o diagnóstico de enfermidades.

Referências Bibliográficas

- ALVES B.H.L.S.; SILVA J.G.; MOTA A.R.; CAMPOS A.C.; JÚNIOR J.W.P.; SANTOS S. B. *Mycoplasma agalactiae* in semen and milk of goat from Pernambuco State, Brazil, **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 33(11), p. 1309-1312, 2013.
- AMELI, F.; NASSAB, F. G; MASIR, N.; KAHTIB, F. Tumor-Derived Matrix Metalloproteinase-13 (MMP-13) Expression in Benign and Malignant Breast Lesions. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 1;22(8), p. 2603-2609, 2021
- AZEVEDO, E.O. Agalaxia contagiosa. Um “novo” problema para caprinos e ovinos do Brasil, **Ciência Veterinária Trópicos**. v. 18, n. 2, 2015.
- BAUMAN, A. E.; SALLIS, J. F.; DZEWALTOWSKI, D. A.; OWEN, N. Towards a better understanding of the influences on physical activity: the role of determinantes, correlates, causal variables, mediators, moderators and confounders. *American Journal of Preventive Medicine*, v. 23 (Suppl. 2), p. 5-14, 2002.
- BEZERRA JÚNIOR, R. Q., JR.; ELOY, A. M. X.; PERREIRA, E. P.; FURTADO, J. R.; SOUZA, K. C. S.; LIMA, A. R.; TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação das metaloproteínas de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com artrite encefalite caprina na região Semiárida do Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 43, n. 1258,p. 1-7, 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72(1-2), 248-254, 1976.
- CORRALES, J.C.; ESNAL, A.; DE LA FE, C.; SANCHEZ, A.; ASSUNÇÃO, P.; POVEDA, J.B.; CONTRERAS, A. Contagious agalactia in small ruminants. **Small Ruminant Research**., v. 68, p.154–166, 2007.
- DAMASCENO, E. M., PINHEIRO, R. R., ANDRIOLI, A., ALVES, F. S. F., LIMA, A. M. C., PEIXOTO, R. M., ...e BRANDÃO, I. S. Seroprevalence and associated risk factors of *Mycoplasma agalactiae* and investigation of coinfection with the caprine lentivirus in Rio Grande do Norte, Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 4, 2111-2117, 2020.
- ELKINGTON, H.; WHITE, P.; ADDINGTON-HALL, J. et al. The healthcare needs of chronic obstructive pulmonary disease patients in the last year of life. **Palliative Medicine**, v. 19, p. 485-491, 2005.
- GALIZA, Y. S., ELOY, A. M. X., PINHEIRO, R. R., PEIXOTO, R. M., LIMA, A. M. C., BARROSO, M. D. S., FONSECA, L. M. (2020). Study of metaloproteínas in the blood of goats experimentally infected with caprine encephalitis arthritis virus. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 41, n. 6, suplemento 2, p. 3165-3176, 2020.
- GAO, P.; YANG, J. L.; ZHAO, H.; YOU, J. H.; HU, Y. Common polymorphism in the MMP-13 gene may contribute to the risk of human cancers: a meta-analysis. **Tumor Biology**, v. 35(10), p. 10137-10148, 2014.

- HU, J., STEEN, P. E. VAN DEN., SANG, Q. X. A., & OPDENAKKER, G. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 6, 480-498, 2007.
- IBGE. **Efetivos de rebanho por tipo de rebanho**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#notas-tabela>> . Acesso em: 19 dez. 2021.
- IWAMOTO, N.; KAWAKAMI, A.; ARIMA, K.; TAMAI, M.; NAKAMURA, H.; KAWASHIRI, SY.; KITA, J.; OKADA, A.; KOGA, T. et al. Contribution of an adenine to guanine single nucleotide polymorphism of the matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) -77 promoter region to the production of anticyclic citrullinated peptide antibodies in patients with HLA-DRB1*shared epitope-negative rheumatoid arthritis. **Journal Modern Rheumatology**, v. 21, p. 240-243, 2011.
- KLEIN, T.; BISCHOFF, R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. **Amino Acids**, v. 41(2), p. 271-290, 2011.
- KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and toxicological methods**, v. 61, n. 2, p. 205-209, 2010.
- KUZUYA, M., & IGUCHI, A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 10, n. 5, 275-282, 2003).
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- PARKS, W. C.; MECHAM, R. P. Matrix metalloproteinases. San Diego: Academic Press; 1998.
- PEIXOTO, R. M.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; ALVES, F. S. F.; DOS SANTOS, V. W. S.; DE SOUZA, M. M.; DE AZEVEDO, D. A. A.; DAMASCENO, E. M.; TEIXEIRA, M. F. DA S. *Mycoplasma agalactiae* in dairy goat flocks bred in state of Ceará in association with Caprine Arthritis Encephalitis Virus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n.1, p.1533, 2018.
- RAM, M.; SHERER, Y.; SHOENFELD, Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. **Journal Clinical Immunology**. v.26, p.299–307, 2006.
- 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, M.O.; CAMPOS A.C.; SANTOS J.P.; SANTOS P.O.M.; CALDAS E.L.C.; SANTOS A.D.F.; NASCIMENTO E.R.; CASTRO R.S. E AZEVEDO E.O. Agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos do Estado do Sergipe: dados preliminares. **Scientia Plena**. 11(4), 046124-1, p.1-5, 2015.
- SANTOS, M.O.; CAMPOS A.C.; SANTOS J.P.; SANTOS P.O.M.; CALDAS E.L.C.; SANTOS A.D.F.; NASCIMENTO E.R.; CASTRO R.S. E AZEVEDO E.O. Agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos do Estado do Sergipe: dados preliminares. **Scientia Plena**. 11(4), 046124-1, p.1-5, 2015.
- SEABRA, F. R. G. Análise imuno-histoquímica das metaloproteínas da matriz (MMP1, MMP-2 e MMP-9) na doença periodontal. 2006. 104 p. Tese (Doutorado

em Odontologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte.

STAMENKOVIC, I. Matriz metalloproteinases in tumor invasión and metastases. **Cancer Biology**, v. 10, p. 415-433, 2000.

TANNURE, P. N, KÜCHLER, E. C.; FALAGAN-LOTSCH, P.; AMORIM, L. M.; RAGGIO LUIZ, R.; COSTA, M. C.; VIEIRA, A. R.; GRANJEIRO, J. M. MMP13 polymorphism decreases risk for dental caries. **Caries Research**, v. 46(4), p. 401-407, 2012.

TENTES, I.; ASIMAKOPOULOS, B.; MOURVATI, E. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in seminal plasma. *Journal of Assisted Reproduction Genetics*. v. 24, p. 278–281, 2007.

VASKU, A.; MELUZÍN, J.; BLAHÁK, J.; KINCL, V.; GOLDBERGOVÁ, M. P.; SITAR, J.; ZLÁMAL, F.; BIENERTOVÁ-VAŠKŮ, J.; VÍTOVEC, J. Matrix metalloproteinase 13 genotype in rs640198 polymorphism is associated with severe coronary artery disease. **Disease Markers**, v. 33(1), p. 43-49, 2012.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; WILLIAMS, K.L. et al. Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. **Electrophoresis**, v. 17, p. 830-838, 1996.

YO, T. H., & WERB, Z. Gelatinase B: structure, regulation, and function. *Matrix metalloproteinases* (pp. 115-149). San Diego, CA: Academic Press, 1998.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na espécie caprina, embora os trabalhos sobre proteômica ainda estejam se iniciando, alguns achados importantes já podem ser logrados. Espera-se que mais pesquisas sejam realizadas com o objetivo de identificar marcadores de diagnóstico e prognóstico de enfermidades, entre outros mecanismos, de fundamental importância para formação e desenvolvimento de rebanhos produtivos.

A Agalaxia Contagiosa é uma doença que está presente na criação em caprinos e ovinos. Suas medidas de controle eficazes e seu diagnóstico precoce deverão ser adotados, visando diminuir impactos negativos na caprinocultura.

Evidencia-se que, ainda, há necessidade de mais estudos sobre as MMPs. E, é importante destacar que as pesquisas devem avançar com foco na sanidade e fisiologia animal, favorecendo, assim, o combate aos problemas sanitários.

ANEXO

Certificado de autorização da CEUA.



Caprinos e Ovinos

Comissão de Ética no Uso de Animais –
CEUA / CNPCCERTIFICADO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM
PESQUISA

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos – CEUA-CNPC – certifica que o projeto intitulado *“Inteligência epidemiológica das principais enfermidades infecciosas da caprinocultura leiteira dos territórios Cariri Paraibano e Sertão Pernambucano e da ovinocultura e da caprinocultura de corte na Bacia do Jacuípe na Bahia”*, protocolo nº 006/2020, sob a responsabilidade de Raymundo Rizaldo Pinheiro – que envolve a produção, manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos (CEUA/CNPC), em reunião realizada no dia 14 de outubro de 2020.

Espécie Animal	Raça / linhagem	Idade	Peso aprox.	Quantidade		
				MACHOS	FÊMEAS	SUBTOTAL
Caprino	Diferentes raças	A partir de um ano	Variável qto. A raça, sexo e idade			2000
Ovino	Diferentes raças	A partir de um ano	Variável qto. A raça, sexo e idade			1000
				TOTAL:		3000
Vigência do projeto		Início: 26/10/2020 Término: 31/12/2021				
Origem dos animais		- 50 propriedades caprinas leiteiras distribuídas no Cariri Paraibano (PB) e Sertão pernambucano (PE); - 50 propriedades de ovinos e 50 propriedades de caprinos de corte na Bacia do Jacuípe, Bahia.				

Sobral, CE 23 de outubro de 2020.

Dra. Alice Andrioli Pinheiro
Coordenadora da CEUA-CNPC

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos e Ovinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral-Groaíras, Km 4,
CEP 02010-970 Sobral – CE
Telefone (88) 3112.7400 Fax (88) 3112.7455
www.embrapa.br/caprinos-e-ovinos