

Técnica Zimográfica como método para monitoramento da Artrite Encefalite Caprina (CAE)

Angela Maria Xavier Eloy¹
Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior²
Raymundo Rizaldo Pinheiro³
Alice Andrioli⁴

Introdução

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases cálcio e zinco dependentes, que promovem a degradação de todo tipo de proteínas da matriz extracelular (MEC) (Figura 1), a qual determina a forma e as propriedades mecânicas de tecidos e órgãos, agindo nas proteínas da superfície das células, podendo também serem chamadas de matrixinas. As MMPs são produzidas, principalmente, pelos leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e pelas células mesenquimais, sendo secretadas como proenzimas (NAVARRO et al., 2006).

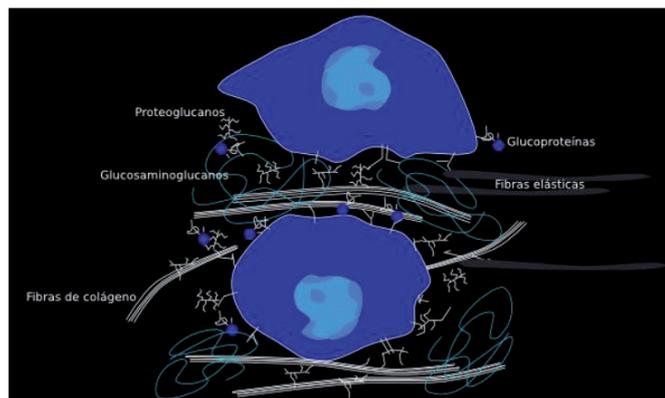


Figura 1. Esquema das principais moléculas que aparecem na matriz extracelular (MEC) do tecido conectivo.
Fonte: Adaptado de Atlas of Plant and Animal Histology (2015).

As MMPs participam de diversos processos biológicos, como determinação da arquitetura da MEC, desenvolvimento embrionário, implantação do blastocisto, morfogênese dos órgãos, desenvolvimento do sistema nervoso, ovulação, dilatação cervical, regressão uterina pós-parto, desenvolvimento e remodelação do tecido oral, cicatrização, angiogênese e apoptose (VERMA; HANSCH, 2007). No entanto, a ativação estimulada ou crônica das MMPs, seja por vírus, bactéria, seja por lesão traumática, pode resultar em um desequilíbrio entre a atividade dessas enzimas proteolíticas e dos inibidores dos tecidos das metaloproteinases (TIMPs), com a consequente ocorrência de alterações patológicas devido a uma degradação excessiva de componentes da matriz extracelular ou afins pelas MMPs (Figura 2). Segundo Skiles et al. (2004), já foram identificadas pelo menos 24 metaloproteinases (MMPs) em mamíferos, sendo agrupadas em cinco classes: collagenases, gelatinases, estromelisinases, MMPs do tipo membrana (MT-MMPs) e outras enzimas.

Entre algumas ferramentas desenvolvidas para avaliação das formas ativas e latentes das enzimas proteolíticas, a técnica eletroforética zimográfica é a que permite a visualização do número e

¹Médica-veterinária, PhD em Fisiologia Animal, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos.

²Médico-veterinário, doutor em Ciência Animal, aluno do doutorado da Universidade Estadual do Ceará/UECE.

³Médico-veterinário, doutor em Virologia, pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos.

⁴Médica-veterinária, doutora em Reprodução, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos.

massa molecular aproximada de enzimas em amostras biológicas, com base na degradação de um substrato copolimerizado, no caso a gelatina, juntamente com os géis de eletroforese.

De acordo com Leber e Balkwill (1997), Snoek-Van Beurden e Von Den Hoff (2005) e Kupai et al. (2010), a zimografia é o método mais usado por ser o mais completo, capaz de detectar formas ativas e latentes das MMPs e quantificar a atividade enzimática, apresentando também alta sensibilidade para diferentes classes de MMPs e baixo custo em comparação a outras técnicas.

Em caprinos, este é o primeiro trabalho no qual se investigou o comportamento das MMPs em animais cronicamente infectados pela artrite encefalite caprina (CAE), doença crônica que acomete rebanhos leiteiros, acarretando alto índice de morbidade e perdas econômicas consideráveis.

Experimento

Utilizaram-se dois grupos de cinco animais, todos pertencentes ao rebanho experimental da Embrapa. O primeiro foi composto de animais das raças Saanen (n = 2) e Anglo-Nubiana (n = 3), com idade variando entre 4-5 anos, naturalmente infectados pelo Artrite Encefalite Caprina a Vírus CAEV. O segundo grupo consistiu também de animais das raças Saanen (n = 2) e Anglo-Nubiana (n = 3), com idade entre 3-4 anos, soronegativos para a CAE. A comprovação da infecção ou não pelo vírus foi realizada por meio do *Western Blotting* (WB) (RODRIGUES et al., 2014), e confirmada pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (ANDRIOLI et al., 1999), ao longo dos dois primeiros anos. Os grupos foram mantidos em sistema semi-intensivo em uma área isolada por cercas duplas, recebendo concentrado balanceado, capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), sal mineral e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos a exame clínico geral para avaliação da condição corporal e manifestação ou não da doença.

Protocolo do teste Zimográfico

Esta técnica consiste em copolimerizar o substrato de gelatina a 0,2%, dependendo da MMP a ser analisada, em um gel de SDS-PAGE a 12,5%. Como o substrato está retido nos poros do gel, ele não migra quando é aplicado à corrente elétrica durante a eletroforese. Foi utilizado o seguinte padrão molecular: Phosphorylase b 97 kDa rf 0,16; Albumin 66 kDa rf 0,13; Ovalbumin 45 kDa rf 0,25; Carbonic anhydrase 30; Da rf 0,46; Trypsin inhibitor 20,1 rf 0,67; α -Lactalbumin 14,4 rf 0,89.

A amostra biológica, podendo ser soro sanguíneo, tecido, plasma seminal ou outros fluidos biológicos, é desnaturada por SDS, porém não reduzida, e então aplicada no gel (20 μ g) para separação da quantidade conhecida de proteína. Após a corrida eletroforética, as proteases separadas são renaturadas dentro do gel, através de lavagens repetidas com um detergente não-iônico, como o Triton X-100 2,5%, que substitui o SDS do gel (HEUSSEN; DOWDLE, 1980). O gel

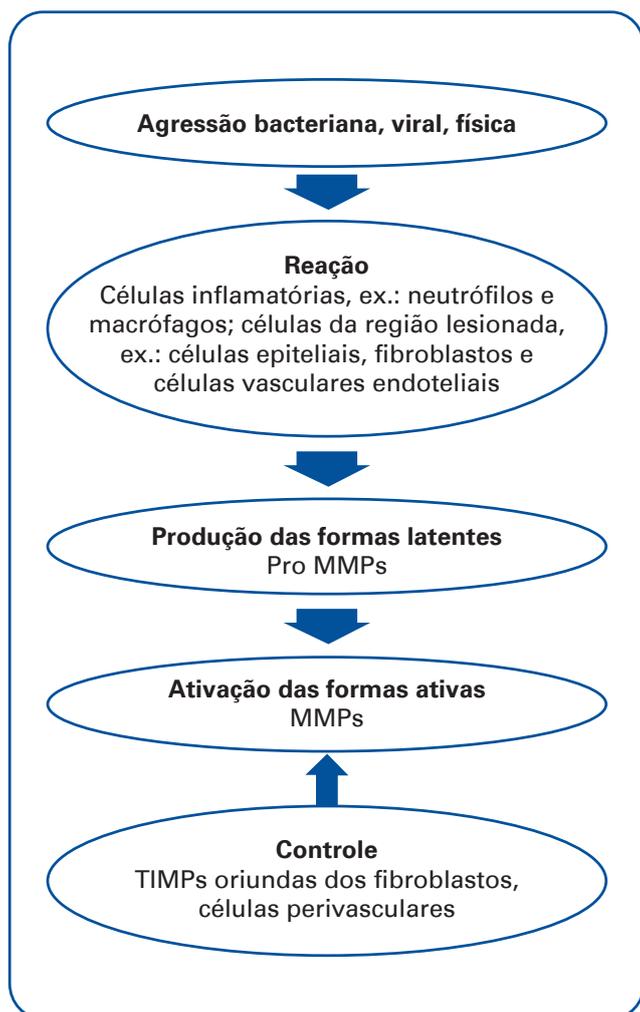


Figura 2. Esquema da produção, ativação e inibição das MMPs em casos patológicos.

Fonte: Adaptado de Cawston (1996) e Percival e Bowler (2004).

é então incubado *overnight* em um tampão (50 mM Tris, pH 7.8-8.0, 150 mM NaCl e 10 mM CaCl₂) à 37 °C em constante movimento, permitindo que as proteases presentes nas amostras sejam renaturadas e autoativadas, realizando a digestão do substrato em uma zona ao redor de sua posição no gel de eletroforese. Essas zonas são visualizadas ao corar o gel com Coomassie Brilliant Blue-G a 0,25% (TROEBERG; NAGASE, 2003) e, posteriormente, submetidos à solução descorante (etanol a 30% e ácido acético a 7,5% em água Milli-Q). A identificação das proteases é realizada comparando-se as áreas digeridas com os padrões de massa molecular.

Para padronização do ensaio zimográfico com gelatina em soro sanguíneo de caprinos saudáveis, foram testadas diferentes quantidades de proteínas, variando de 4 µg a 32 µg, e identificou-se como padrão 20 µg (Figura 3).

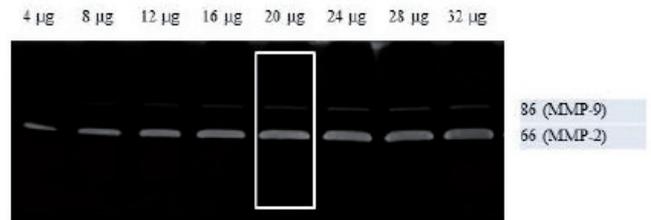


Figura 3. Padronização da quantidade mínima ótima de soro sanguíneo para análise zimográfica em caprinos. Fonte: Bezerra Júnior et al. (2015).

Na figura 4 encontra-se a imagem de um gel gelatinolítico de zimografia, obtido a partir de experimento utilizando soro sanguíneo de caprinos adultos saudáveis e soropositivos infectados naturalmente pela artrite encefalite caprina (CAE). Antes, porém, os animais foram testados por *Western blotting* e PCR. O gel foi digitalizado utilizando Visidoc-It™ *Imaging System* 6.4, UVP, Cambridge, UK e a quantificação das bandas foi realizada através do Doc-it® *Is image analysis software* 6.0.

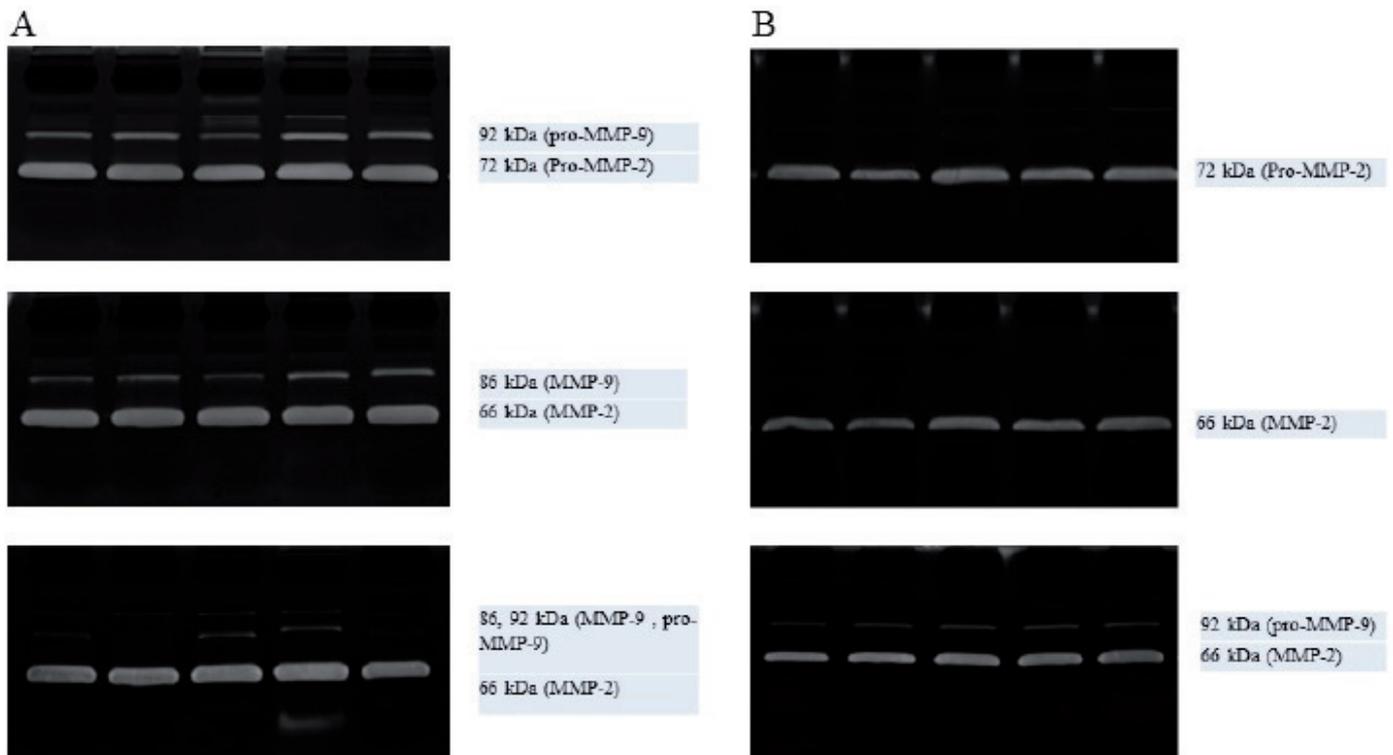


Figura 4. Zimograma representativo das amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos (A) soropositivos e (B) soronegativo para CAE, utilizando-se 20µg de amostra por poço. Fonte: Bezerra Junior et al. (2015).

Nos géis (Figura 4) dos grupos infectados e saudáveis encontraram-se massas moleculares de 72 kDa (proMMP-2), 66 kDa (MMP-2 ativa), 92 kDa (pro-MMP-9) e 86 kDa (MMP-9 ativa) (BEZERRA JÚNIOR et al., 2015), com diferentes frequências notando-

se claramente maior atividade gelatinolítica nas amostras dos animais soropositivos para CAE. Essas massas moleculares foram identificadas, levando em consideração o padrão molecular utilizado.

A análise densitométrica é de importância para avaliar o grau de atividade das MMPs. Na figura 5 a densitometria mostrou claramente maiores picos da Pro-MMP-9 (92 kDa) e da MMP-2 (66 kDa) nos animais do grupo soropositivo, enquanto no grupo soronegativo (Figura 6) observou-se incremento da atividade da MMP-2 (66 kDa). Sugere-se, portanto, que a Pro-MMP-9 (92 kDa)

seja um indicativo da infecção crônica pela CAE e que a MMP-2 (66 kDa) por sobressair-se nos animais soronegativos, faça parte natural dos processos fisiológicos naturais de remodelação da matriz extracelular (MEC). O perfil densitométrico permite visualizar a atividade e monitorar com segurança a reação das MMPs frente a inflamação crônica da CAE.

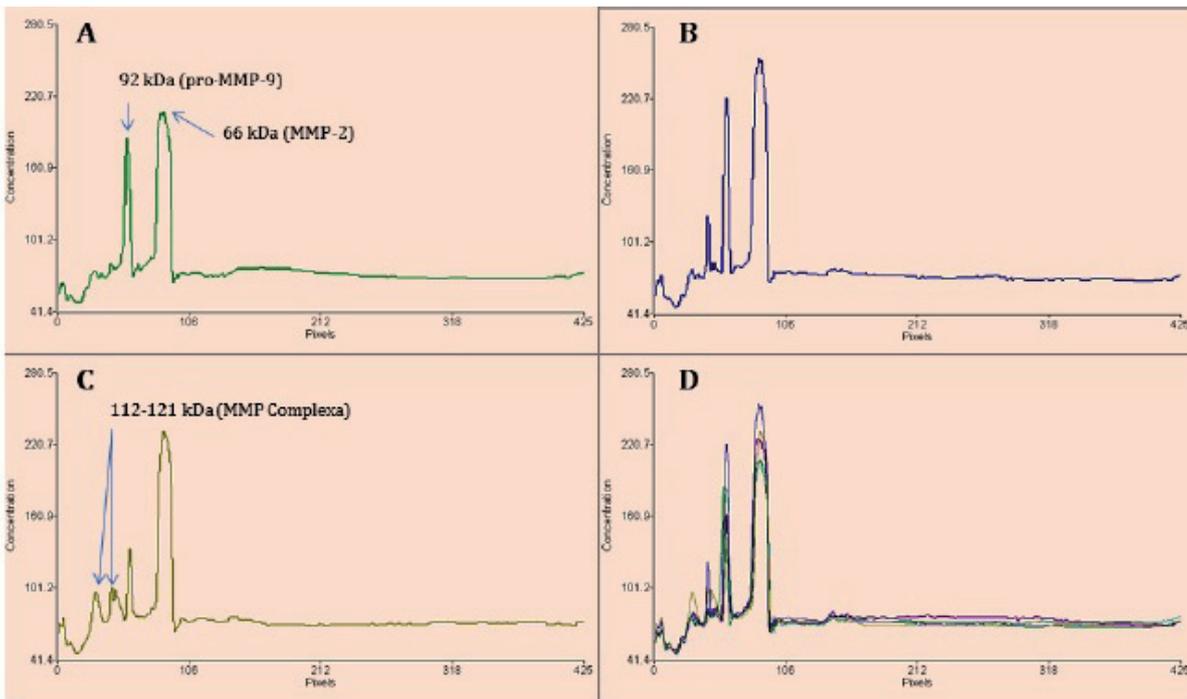


Figura 5. Análise densitométrica dos géis zimográficos das amostras de soro sanguíneo de reprodutores soropositivos para CAE, mostrando a atividade das MMPs (seta). Amostras individuais de soro sanguíneo (A, B, C) e amostras do grupo (D). Fonte: Bezerra Júnior et al. (2015).

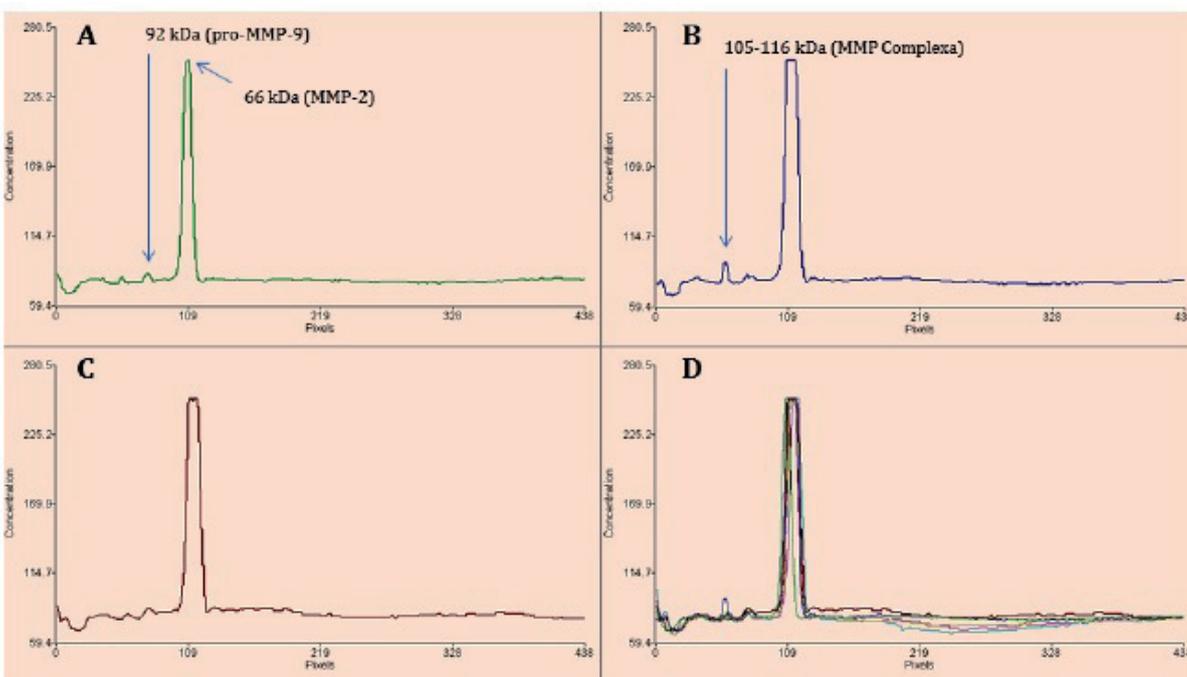


Figura 6. Análise densitométrica dos géis zimográficos das amostras de soro sanguíneo de reprodutores soronegativos para CAE, mostrando a atividade das MMPs (seta). Amostras individuais de soro sanguíneo (A, B, C) e amostras do grupo (D). Fonte: Bezerra Júnior et al. (2015).

Considerações Finais

A técnica zimográfica é uma ferramenta de fácil execução, de baixo custo e de acurácia comprovada na identificação das formas latentes e ativas das MMPs, mostrando-se eficaz na identificação do grau de atividade do sistema imune inato frente ao vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAE). Portanto, poderá vir a ser utilizada para monitorar rebanhos saudáveis, avaliar a resistência dos animais frente à infecção e colaborar com programas de controle da doença.

Referências

- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A. S.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 420-421, 1999. Edição dos resumos do 13o. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1999.
- ATLAS of PLANT and ANIMAL HISTOLOGY. **The cell. Extracellular Matrix**. Disponível em: <http://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/5-celulas/2-matriz_extracelular.php>. Acesso em: 14 jun. 2015.
- BEZERRA JUNIOR, R. Q.; ELOY, A. M. X.; PEREIRA, E. P.; FURTADO, J. R.; SOUZA, K. C. de; LIMA, A. R.; PINHEIRO, R. R.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M. F. da S. Avaliação das metaloproteinases de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com Artrite Encefalite Caprina na Região Semiárida do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, pub. 1258, p. 1-7, 2015. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/136223/1/cnpc-2015-Avaliacao-das-metaloproteinases.pdf>>.
- CAWSTON, T. E. Metalloproteinase Inhibitors and the Prevention of Connective Tissue Breakdown. **Pharmacological Therapy**, Oxford, v. 70, n. 3, p. 163-182, 1996.
- HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 102, n. 1, p. 196-202, Feb. 1980.
- KUPAI, K.; SZUCS, G.; CSEH, S.; HAJDU, I.; CSONKA, C.; CSONT, T.; FERDINANDY, P. Matrix metalloproteinase activity assays: importance of zymography. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 61, n. 1, p. 205-209, Mar. 2010.
- LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 249, n. 1, p. 24-28, Jun. 1997.
- NAVARRO, V. P.; NELSON FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; FREITAS, A. C. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 35, n. 4, p. 233-238, 2006.
- PERCIVAL, S.; BOWLER, P. Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on wound healing. **World Wide Wounds**, 2004. Disponível em: <<http://www.worldwidewounds.com/2004/july/Percival/Community-Interactions-Wounds.html>>. Acesso em: 12 out. 2015.
- RODRIGUES, A. S.; BRITO, R. L. L.; PINHEIRO, R. R.; DIAS, D. P.; ALVES, S. M.; SOUZA, T. S.; SOUZA, K. C.; AZEVEDO, D. A. A.; PINHEIRO, A. A.; MAGALHÃES, D. C. T.; TEIXEIRA, M. F. S. Padronização do Elisa indireto e Western Blot para diagnóstico da artrite-encefalite caprina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 66, n. 2, p. 417-424, 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/112082/1/ap-Padronizacao.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2015.
- SKILES, J. W.; GONNELLA, N. C.; JENG, A. Y. The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. **Current Medicine Chemistry**, Schiphol, v. 11, n. 22, p. 2911-2977, Nov. 2004.
- SNOEK-VAN BEUREDEN, P. A. M.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, London, v. 38, n. 1, p. 73-83, Jan. 2005.

TROEBERG, L.; NAGASE, H. Zymography of metalloproteinases. In: COLIGAN, J. E.; KRUISBEEK, A. M.; MARGULIES, D. H. SAEVACH, E. T.; STRUBER, W. (Ed.). **Current protocols in protein science**. New York: John Wiley & Sons, 2003. Chapter 21, Unit 21.15.1-21.15. DOI: 10.1002/0471140864.ps2115s33.

VERMA, L.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q) SARs. **Bioorganical Medicine Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 2223-2268, 2007.

Comunicado
Técnico, 155

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/
Groáiras, Km 4. Caixa Postal 145. CEP 62010-970.
Sobral - CE.

Fone: (88) 3112-7400

Fax: (88) 3112-7455

SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

On-line (2015)

CGPE 13040

Embrapa

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

Comitê de
Publicações

Presidente: Vinícius Pereira Guimarães

Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho

Membros: Carlos José Mendes Vasconcelos, Diônes
Oliveira Santos, Maíra Vergne Dias, Manoel Everardo
Pereira Mendes, Patrícia Yoshida Faccioli Martins,
Tânia Maria Chaves Campelo, Viviane de Souza.

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização: Tânia Maria Chaves Campelo

Editoração eletrônica: Maíra Vergne Dias