

# ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: ATUAÇÃO DA MMP-2 NA QUEBRA DA BARREIRA HEMATOLIQUÓRICA

## NEUROLOGICAL ALTERATIONS IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS: ROLE OF MMP-2 IN BLOOD-CEREBROSPINAL FLUID-BARRIER DISRUPTION

Guilherme Dias de Melo, Gisele Fabrino Machado, Milena Sato de Souza, Olívia Campos de Moraes, Natália Ribeiro Marangoni, Mary Marcondes

UNESP Campus de Araçatuba – Faculdade Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Medicina Veterinária – Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal – Contato: di.melo@uol.com.br – Apoio: FAPESP

**Palavras-chave:** metaloproteinases; sistema nervoso central; *Leishmania chagasi*

**Key-words:** metaloproteinases; central nervous system; *Leishmania chagasi*

### 1. INTRODUÇÃO

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são, atualmente, uma família de 26 endopeptidases  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ - dependentes que atuam na remodelação da matriz extracelular (MEC). As MMPs estão envolvidas em várias afecções no sistema nervoso central (SNC) que compartilham alterações patológicas comuns, como quebra das barreiras hematoencefálica (BHE) e hematoliquórica (BHL), estresse oxidativo e inflamação. As MMPs são também importantes moduladoras da homeostase da MEC, e atuam no equilíbrio entre morte neuronal e regeneração tecidual.

A leishmaniose visceral (LV) é uma antroponose causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi* (= *L. infantum*) e no cão, principal reservatório doméstico, é caracterizada por uma doença sistêmica crônica, podendo ser manifestada por três diferentes padrões: (1) forma assintomática, (2) forma oligossintomática, com sintomas inespecíficos como febre, diarreia e anemia, e (3) sintomática clássica, com quadros de alopecia, onicogribose, caquexia, linfadenopatia, hepatosplenomegalia e lesões cutâneas. Cães oligossintomáticos ou sintomáticos podem apresentar sinais de envolvimento neurológico, demonstrando episódios convulsivos, alterações locomotoras e de nervos cranianos, sendo meningite e coroidite as principais alterações histopatológicas do SNC, principalmente relacionadas com migração de linfócitos T.

Leucócitos geralmente produzem MMPs para facilitar sua entrada no SNC, resultando em ruptura da membrana basal que circunda os vasos sanguíneos e promovendo a quebra da BHE e da BHL. A MMP-2 (gelatinase A) está fisiologicamente presente no SNC em sua forma latente, e quando ativada, tem como maior substrato o colágeno tipo IV da membrana basal, estando, por essa razão, relacionada com a migração celular. Com o objetivo de compreender o envolvimento da MMP-2 na patogenia da manifestação neurológica da LV, avaliamos a atividade dessa enzima no líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* e que apresentavam sintomatologia nervosa.

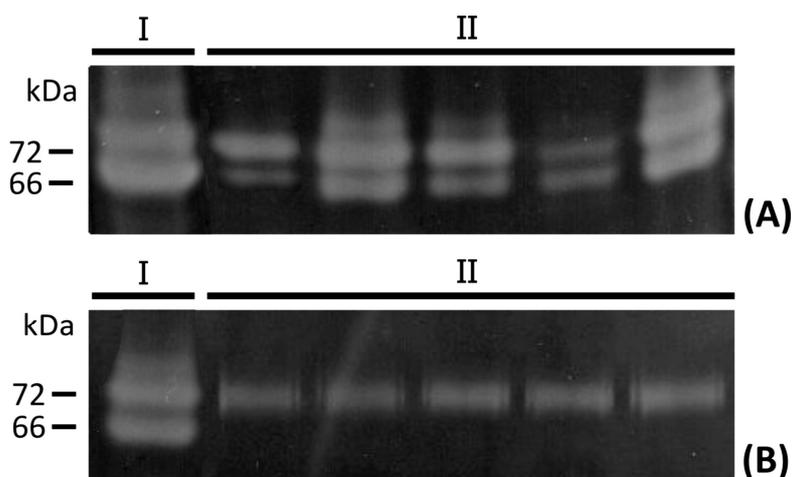
### 2. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de LCR de cães com diagnóstico positivo para leishmaniose visceral, apresentando sintomas neurológicos (n=16) e de cães com diagnóstico negativo (grupo controle, n=10) foram analisadas por meio de zimografia, realizada para detectar a presença da gelatinase A. As amostras de LCR foram colhidas e imediatamente centrifugadas a  $12.000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi submetido à eletroforese não desnaturante por 3 horas a 125 V e 40 mA em gel de poliacrilamida a 10,0% contendo gelatina como substrato. Após corrida, o gel foi lavado em solução

de 2,5% Triton X-100 por 30 minutos, permitindo a renaturação da gelatinase no gel, e incubado por 20 horas em tampão de ativação enzimática contendo 50 mM Tris base, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> e 0,2% Brij-35, pH 7,5 a 37°C, possibilitando a degradação da gelatina pela gelatinase. O gel foi corado com azul de Coomassie 0,5% por 30 minutos e descorado em solução descorante (45% metanol, 10% ácido acético glacial e 45% água) por 45 minutos. A presença das gelatinases é indicada por bandas gelatinolíticas claras em contraste com a coloração escura do “background”. A identidade da MMP-2 foi baseada no peso molecular comparando-se com bandas de MMP-2 recombinantes. As imagens dos géis foram digitalizadas e analisadas pelo *software* de domínio público ImageJ 1.40x for Windows (National Institutes of Health, Maryland, USA). Os dados, expressos como média ± desvio padrão, foram avaliados pelo teste *t* de Student com correção de Welch no nível de 5% de significância.

### 3. RESULTADOS

Nas amostras de LCR detectamos ambas as formas latente e ativa da MMP-2 (Figura 1). A PróMMP-2 foi detectada em todos os cães do estudo e não houve diferença significativa ( $p=0,2493$ ) quando comparados os cães neurológicos ( $56,51 \pm 41,53$ ) com os cães controle ( $43,12 \pm 13,90$ ). Ao contrário, a MMP-2 apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p<0,0001$ ) entre os grupos (Figura 2), sendo mais evidenciada no grupo dos cães neurológicos ( $40,22 \pm 28,24$ ) que nos cães controle ( $2,99 \pm 3,68$ ). Dos cães do grupo controle, a enzima ativa foi detectada somente em cinco animais (50,0%). Nos cães neurológicos, a atividade das formas ativa e latente da MMP-2 apresentou uma forte e positiva correlação linear ( $r=0,877$ ;  $p<0,0001$ ), e por meio da reta dos mínimos quadrados ( $y = 0,596x + 6,508$ ), 76,9% da variação da atividade da forma ativa da MMP-2 pode ser explicada pela variação da forma latente da enzima (Figura 3).

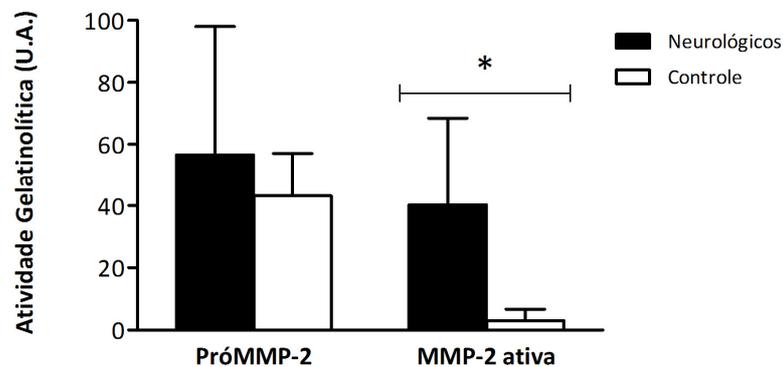


**Figura 1.** Zimogramas do líquido cefalorraquidiano de cães. Observar bandas gelatinolíticas equivalentes à PróMMP-2 (72 kDa) e à MMP-2 ativa (66 kDa). **A:** Cães portadores de leishmaniose visceral e com sintomas neurológicos. **B:** Cães do grupo controle. **I:** MMP-2 recombinante. **II:** Amostras representativas dos grupos experimentais.

### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

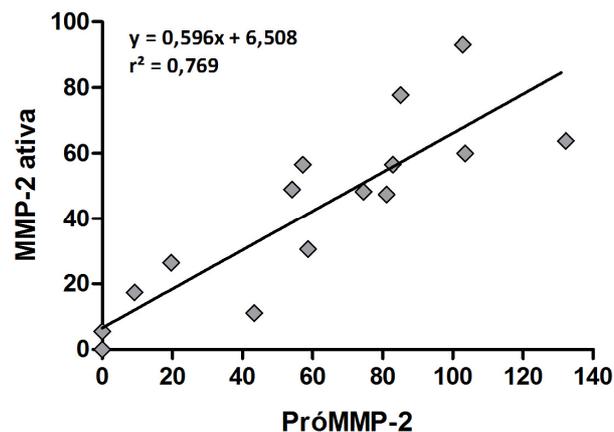
O LCR é produzido por filtração nos plexos coróides e tem como função a regulação do microambiente químico e o transporte de substâncias pelo SNC. Existem na literatura relatos que sugerem a quebra da barreira hematoliquórica em cães com LV espontânea, como presença de deposição de antígenos e células inflamatórias no plexo coróide, além de altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* no LCR. A MMP-2 está relacionada com a abertura inicial das barreiras cerebrais, e

os pés terminais astrocitários contíguos às células endoteliais modulam a permeabilidade da BHE pela secreção dessa enzima.



**Figura 2.** Atividade de MMP-2 no líquido cefalorraquidiano de cães. Colunas representam valores médios ( $\pm$  desvio padrão) das unidades de densidade óptica inversas das bandas gelatinolíticas. Valores, expressos em unidades arbitrárias (U.A.), apresentam diferença estatisticamente significativa (\* $p < 0,05$ ).

Nossos resultados concordam com os dados da literatura, os quais referem que a MMP-2, em sua forma latente, está constitutivamente presente no tecido nervoso e no LCR de cães. Isso proporciona rápida disponibilidade da enzima em casos iniciais de injúria tecidual. A elevada quantidade da enzima ativa presente no LCR dos cães com sintomatologia nervosa, inicialmente, demonstra a presença de estímulos pró-inflamatórios no ambiente nervoso. A correlação encontrada entre as formas ativa e inativa da MMP-2 no LCR dos cães neurológicos comprova a presença de sinais inflamatórios no SNC desses animais, já que além da ocorrência de ativação da MMP-2, o aumento da secreção da pró-forma ocasiona a elevação dos níveis da enzima ativa, conforme demonstrado pela equação de regressão linear.



**Figura 3.** Correlação entre a atividade das formas ativa e latente da MMP-2 no líquido cefalorraquidiano de cães infectados por LV e com sintomas neurológicos, com representação da reta estimada e do coeficiente de determinação ( $r^2$ ). Valores, expressos em unidades arbitrárias (U.A.), representam unidades de densidade integrada das bandas gelatinolíticas.

Notamos uma grande variabilidade individual na atividade das formas da MMP-2 nos cães neurológicos, conforme demonstrado pelos diferentes padrões de intensidade das bandas na Figura 1A e pelo amplo desvio padrão desse grupo (Figura 2). Essa variabilidade pode ser decorrente das diferentes fases da infecção em que cada cão se encontra, bem como da resposta inflamatória

individual efetuada contra a doença. Contudo, todos os cães com LV e sinais de envolvimento neurológico apresentaram intensa taxa de MMP-2 ativada. Essa informação nos permite postular que nesses animais a MMP-2 participe na alteração da permeabilidade da BHL tornando-a permeável à proteínas e células do sangue, confirmando o plexo coróide como importante porta de entrada e o LCR como via de transporte através do SNC.

## 5. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Bergman, R.L.; Inzana, K.D.; Inzana, T.J. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.63, n.10, p.1359-1362, 2002.
- Di Terlizzi, R.; Platt, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. **Vet. J.**, v.172, p.422–431, 2006.
- Garcia-Alonso, M.; Nieto, A.G.; Blanco, A.; Requena, J.M.; Alonso, C.; Navarrete, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunol.**, v.18, p.539-546, 1996.
- Ikeda, F.A.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.; Feitosa, M.M.; Machado, G.F.; Perry, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.44, p.5-11, 2007.
- Lima, V.M.F.; Gonçalves, M.E.; Ikeda, F.A.; Luvizotto, M.C.R.; Feitosa, M.M. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, p.485-489, 2003.
- Melo, G.D.; Marcondes, M.; Vasconcelos, R.O.; Machado, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v.162, n.3-4, p.248-256, 2009.
- Noli, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus.**, v.9, p.16-24, 1999.
- Reis, A.B.; Martins-Filho, O.A.; Teixeira-Carvalho, A.; Giunchetti, R.C.; Carneiro, C.M.; Mayrink, W.; Tafuri, W.L.; Corrêa-Oliveira, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.28, n.1-3, p.87-95, 2009.
- Rosemberg, G.A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia.**, v.39, p.279-291, 2002.
- Sulik, A.; Wojtkowska, M.; Oldak, E. Preanalytical factors affecting the stability of matrix metalloproteinase-2 concentrations in cerebrospinal fluid. **Clin. Chim. Acta.**, v.392, p.73-75, 2008.
- Yong, V.W.; Krekoski, C.A.; Forsyth, P.A.; Bell, R.; Edwards, D.R. Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. **Trends Neurosci.**, v.21, p.75-80, 1998.