

Avaliação das metaloproteínas de matriz -2 e -9 em gatos com desmineralização óssea secundária à tirotoxicose induzida

[*Evaluation of matrix metalloproteinases -2 and -9 in cats under bone demineralization secondary to induced thyrotoxicosis*]

F.S. Costa¹, M.J.L. Cardoso², L.M.R. Muniz³, L.C. Vulcano³, L.A. Justulin Júnior⁴
S.L. Felisbino⁵, S. Martins Filho¹

¹Departamento de Medicina Veterinária - CCA-UFES
Alto Universitário s/n
29500-000 – Alegre, ES

²FFALM-UNESPAR – Bandeirantes, PR

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, SP

⁴Instituto de Biologia – UNICAMP – Campinas, SP

⁵Instituto de Biociências - UNESP – Botucatu, SP

RESUMO

Observou-se significativo aumento de atividade das formas ativas das metaloproteínas -2 e -9 em gatos com tirotoxicose induzida e desmineralização óssea. As formas pró e intermediária da metaloproteína -2 elevaram-se com 14 dias de administração hormonal, porém, posteriormente, houve uma tendência de queda. Observou-se correlação negativa entre a forma ativa das metaloproteínas de matriz -2 e -9 e a densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio. Os resultados sugerem aumento da degradação da matriz colágena secundária com a elevação dos hormônios tireoidianos.

Palavras-chave: gato, hipertireoidismo, tirotoxicose, desmineralização óssea, metaloproteína de matriz

ABSTRACT

Significant increase of activity of active forms of matrix metalloproteinases -2 and -9 in cats under induced thyrotoxicosis and bone demineralization was observed. Pro and intermediated forms of matrix metalloproteinases -2 and -9 increased at 14 days of hormonal treatment, followed by decrease tendency. A negative correlation between active forms of matrix metalloproteinases -2 and -9 and bone mineral density of radius distal extremity was also observed. The results suggest an increase of collagen matrix degradation secondary to high levels of thyroid hormones.

Keywords: cat, hyperthyroidism, thyrotoxicosis, bone demineralization, matrix metalloproteinases

INTRODUÇÃO

O hipertireoidismo felino é uma alteração clínica multissistêmica resultante da excessiva concentração de hormônios tireoidianos, sendo atualmente considerado o distúrbio endócrino de maior incidência em felinos domésticos (Peterson et al., 1983; Thoday et al., 1992; Broussard et al., 1995). Alterações no metabolismo ósseo em gatos com tirotoxicose

podem ser caracterizadas, tais como desmineralização óssea, hipercalcemia, hiperfosfatemia (Peterson et al., 1983), diminuição do paratormônio circulante e aumento da fosfatase alcalina de origem óssea (Archer e Taylor, 1996; Foster e Thoday, 2000) e níveis de osteocalcina (Archer e Taylor, 1996).

Em humanos, as alterações sobre o metabolismo ósseo também são amplamente descritas nos

Recebido em 24 de outubro de 2007

Aceito em 2 de setembro de 2008

E-mail: fabianosellos@cca.ufes.br

Apoio: FAPESP

casos de tirotoxicose (Mosekilde et al., 1990). A caracterização e o tratamento precoce dos efeitos dos hormônios tiroidianos sobre o tecido ósseo assumem grande importância e previnem a ocorrência de fraturas patológicas (Jodar et al., 1997). A reposição hormonal em excesso em pacientes com hipotireoidismo, principalmente em mulheres após a menopausa, pode produzir um estado hipermetabólico idêntico ao observado na tirotoxicose endógena, também promovendo um remodelamento ósseo exagerado (Fallon et al., 1983; Jodar et al., 1997).

Estudos experimentais com indução a um estado de tirotoxicose foram desenvolvidos em humanos (Lukensmeyer et al., 1970), cães (Adams e Jowsey, 1966) e ratos (Kung e Ng, 1994; Pereira et al., 1999; Serakides et al., 2000), nos quais também foi possível demonstrar alterações no metabolismo ósseo, assim como ocorre no hipertireoidismo endógeno.

O processo de reabsorção óssea é mediado diretamente por osteoclastos, entretanto a degradação da matriz óssea é mediada pela secreção de proteases produzidas pelos osteoblastos. Esses dois processos estão intimamente relacionados e regulados, uma vez que os agentes que modificam a reabsorção do tecido ósseo frequentemente alteram a degradação do colágeno ósseo por mudanças na expressão das metaloproteinases de matriz (MMP) e seus inibidores (Pereira et al., 1999).

As metaloproteinases de matriz formam uma família de endopeptidases dependentes de metais e atuam no remodelamento da matriz extracelular. As MMPs -2 e -9, também denominadas como gelatinase A e B, respectivamente, são secretadas pelos osteoblastos e têm a capacidade de degradar elastina, colágeno IV, V, VII, X e XI, assim como componentes menores da matriz extracelular (Matrisian, 1990).

Agentes que sabidamente aumentam a reabsorção óssea promovem maior síntese das MMP -2 e -9 pelos osteoblastos (Lorenzo et al., 1992; Kusano et al., 1998; Guo et al., 2005). Em ratos, os hormônios tiroidianos em excesso proporcionaram aumento na expressão das MMP -2 e -9, sendo este fato possivelmente associado à degradação da matriz colágena e à ocorrência de osteopenia (Pereira et al., 1999).

As MMP -2 e -9 têm sido alvo freqüente de estudos por atuarem na degradação da membrana basal, favorecendo processos de invasão tumoral e metástases (Kugler, 1999; Mook et al., 2004). Além disso, essas enzimas estão envolvidas em processos de diferenciação celular, apoptose e angiogênese, estando diretamente envolvidas no prognóstico de diferentes processos neoplásicos (Mook et al., 2004). Nas espécies canina (Loukopoulos et al., 2003) e felina (Jankowski et al., 2002; Sorensen et al., 2004), foi comprovado aumento da atividade dessas metaloproteinases de matriz em processos neoplásicos de caráter maligno, entretanto informações sobre o papel dessas enzimas nos casos de excesso dos hormônios tiroidianos nessas espécies não foram descritas até o momento.

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade das MMP -2 e -9 em gatos domésticos induzidos à tirotoxicose experimental e com desmineralização óssea concomitante, bem como avaliar o papel dessas enzimas no processo de remodelamento da matriz colágena.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco gatos domésticos, adultos, sem distinção de sexo ou raça e sem alterações clínicas ou laboratoriais que pudessem interferir na realização da pesquisa. Animais em fase de crescimento, castrados e fêmeas gestantes foram excluídos do grupo experimental. Após a seleção, os animais foram alojados em um gatil com acesso ao sol, sendo administrada alimentação (ração seca) e água à vontade. Após a realização do experimento, os gatos passaram por um período de desintoxicação de 10 dias.

Para indução ao estado de tirotoxicose, administraram-se, por via oral, comprimidos com 150µg de levotiroxina sódica a cada 24 horas durante 42 dias. Semanalmente, os gatos eram pesados e as doses para cada animal eram reajustadas conforme a necessidade. Todos os dados experimentais foram colhidos imediatamente antes do início da administração do medicamento (M0), sendo realizadas posteriormente novas avaliações das variáveis a cada 14 dias, até o término do período experimental (M3).

A dosagem dos níveis séricos dos hormônios tiroidianos (T4 livre e T4 total) foi obtida em

todos os momentos, pela técnica de radioimunoensaio em fase sólida, utilizando-se conjunto de reagente comercial sem qualquer tipo de extração química ou processo de purificação, tendo como elemento radioativo traçador o Iodo¹²⁵.

A avaliação da densidade mineral óssea foi realizada pela técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas, conforme previamente

descrito na literatura (Vulcano et al., 1998; Rahal et al., 2001; Vulcano, 2001). A área avaliada foi a extremidade distal do rádio direito e, para melhor análise seqüencial dos valores densitométricos, padronizou-se a seleção da região da metáfise localizada 5mm acima da cicatriz epifisária em todos os animais e em todos os momentos experimentais, sendo posteriormente feito o cálculo da densidade mineral óssea (Fig. 1).

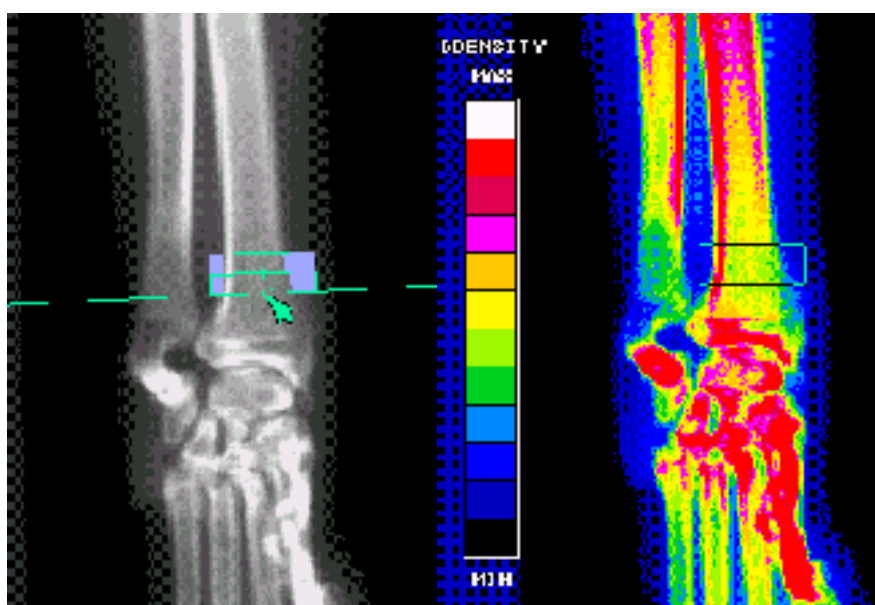


Figura 1. Seleção da região da extremidade distal do rádio de felino com tirotoxicose induzida (esquerda) e mensuração da densidade mineral óssea (direita).

Para a realização da zimografia de proteínas (Fig. 2), alíquotas com 1µl de soro foram submetidas à eletroforese sob condições não redutoras (100V a 4°C) em gel de poliacrilamida a 8%, contendo 0,1% de gelatina. Após a eletroforese, os géis foram lavados em Triton X-100 2,5%, duas vezes por 15 minutos. Posteriormente, os géis foram novamente lavados duas vezes com o tampão Tris-HCl 50Mm pH 8,4 por cinco minutos, sendo em seguida incubados por 14 horas a 37°C no mesmo tampão contendo 5Mm de cloreto de cálcio e 1µM de cloreto de zinco. Após a incubação, os géis foram corados com Comassie Brillant Blue 0,25%, possibilitando a visualização da atividade gelatinolítica das MMP -2 e -9.

As bandas de proteínas obtidas na zimografia foram digitalizadas, convertidas em bandas

escuras sobre um fundo claro e analisadas por densitometria. A atividade gelatinolítica das bandas das metaloproteinases -2 e -9 foi analisada obtendo-se a densidade óptica integrada (IOD), utilizando-se o programa computacional Image Master VDS versão 3.0 acoplado ao aparelho Image Master VDS¹.

Para a análise estatística das variáveis estudadas, utilizou-se o teste de regressão. A associação entre as variáveis nos diferentes momentos foi realizada por testes de correlação linear de Pearson, sendo considerados significativos os valores com probabilidade menor que 5%.

¹Pharmacia Biotech - Uppsala, Suécia.

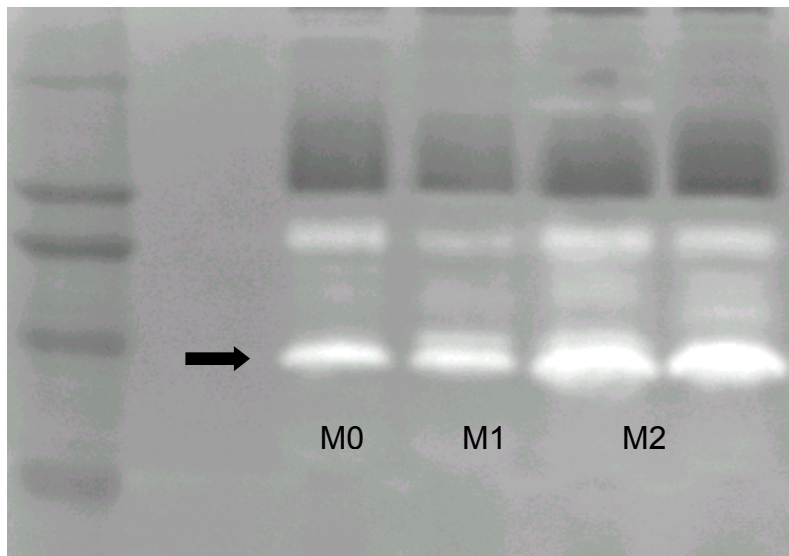


Figura 2. Aumento da atividade da forma ativa da MMP-2 (62kDa, seta) nos momentos 1, 2 e 3 comparado ao momento inicial (M0) em felinos com tirotoxicose induzida.

RESULTADOS

O protocolo utilizado para a indução ao hipertireoidismo foi eficaz, ocorrendo por elevação significativa dos níveis séricos de T4 livre e T4 total. Esse aumento, detectado já no primeiro momento avaliado após o início da administração exógena de levotiroxina sódica, manteve-se alto até o término do período experimental (Fig. 3 e 4). Houve queda dos valores séricos de T4 livre aos 42 dias de tratamento, porém continuaram acima dos valores observados no momento inicial (Fig. 3). Os níveis séricos de T3 total não apresentaram variação significativa durante o período experimental.

Associada à tirotoxicose promovida, observou-se queda da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio direito dos animais nos demais momentos após o início da administração hormonal de levotiroxina sódica (Fig. 5).

Testes para padronização da técnica de zimografia em gelatina foram realizados, sendo utilizados para avaliação uma alíquota de 1µl das amostras séricas e um período de incubação de 14 horas. Essa metodologia demonstrou ser eficaz para a demonstração das formas pró, intermediária e ativa da MMP-2 (75kDa, 66kDa

e 62kDa, respectivamente) e da forma ativa da MMP-9 (83kDa), sem provocar saturação de nenhuma banda.

A forma ativa da MMP -2 apresentou uma tendência de elevação após o início da administração hormonal, e este fato perdurou até o final do protocolo experimental (Fig. 6). As formas pró-enzima e intermediária da MMP-2 apresentaram-se elevadas com 14 dias de tratamento quando comparadas ao momento inicial, porém posteriormente houve tendência de queda (Tab. 1).

A forma ativa das MMP -2 e -9 apresentou uma expressiva correlação negativa com os valores da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio dos gatos no primeiro momento experimental ($P<0,05$), com 14 dias de administração hormonal (Tab. 2).

Anteriormente à administração hormonal, era presente uma fraca correlação negativa entre os níveis séricos da forma intermediária da MMP -2 e os resultados densitométricos. Posteriormente, nos demais momentos experimentais, passou a ser observada uma correlação positiva entre essas variáveis, sendo esta de significância estatística ($P<0,01$) aos 42 dias de experimento (Tab. 2).

Avaliação das metaloproteinases...

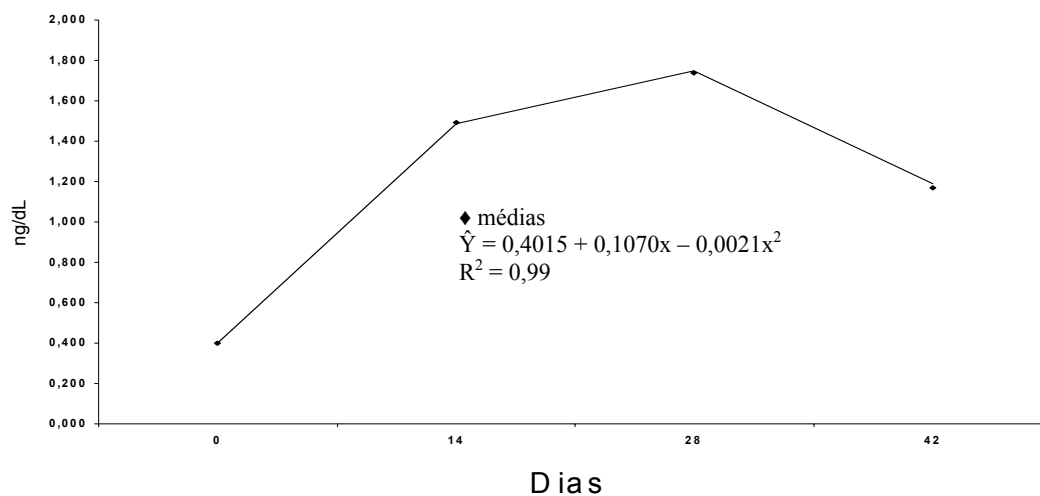


Figura 3. Regressão dos valores médios de T₄ livre em gatos com tirotoxicose experimental.

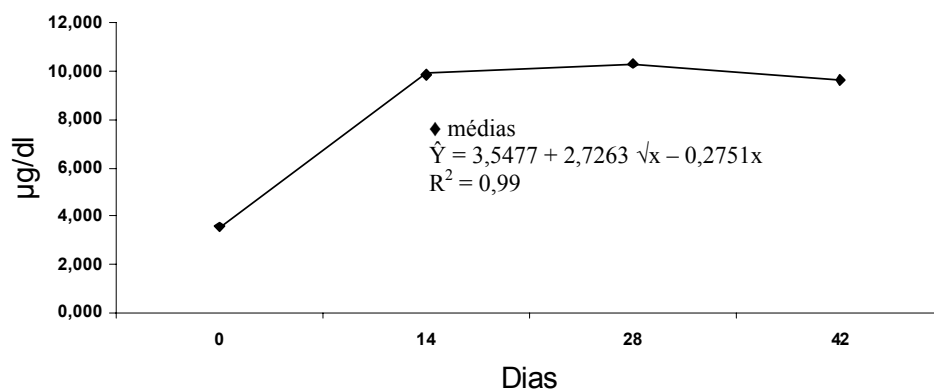


Figura 4. Regressão dos valores médios de T₄ total (µg/dl) em gatos com tirotoxicose experimental.

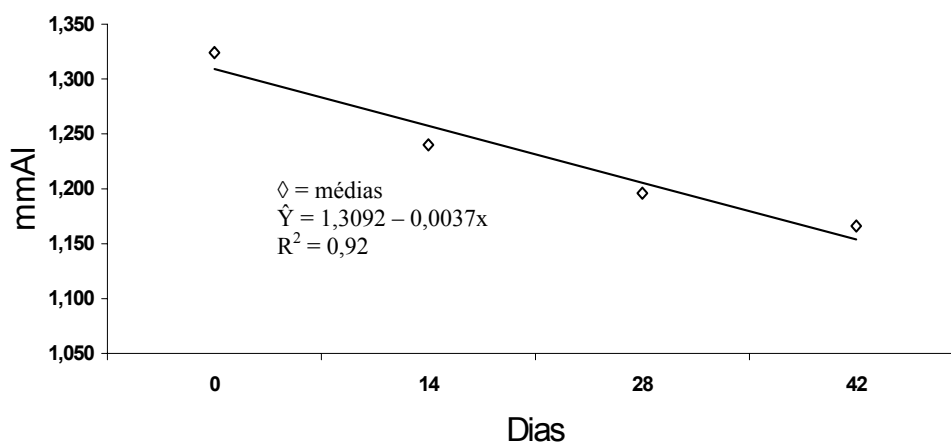


Figura 5. Regressão dos valores médios de densidade mineral óssea em gatos com tirotoxicose experimental.

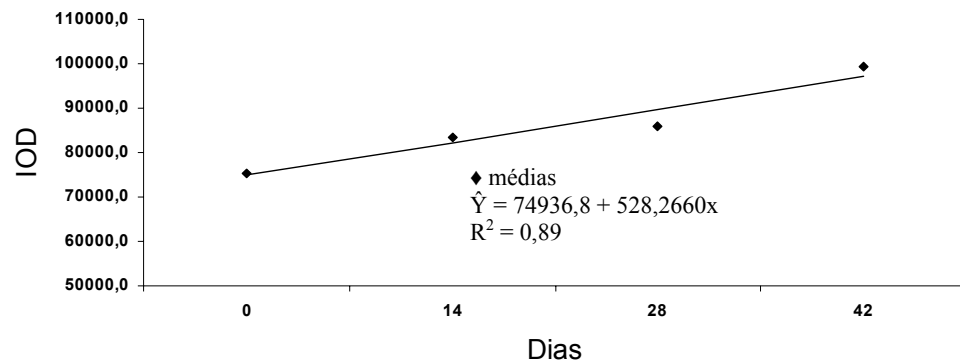


Figura 6. Regressão dos valores médios da forma ativa MMP-2 em gatos com tirotoxicose experimental.

Tabela 1. Valores médios da densidade óptica integrada e desvio-padrão das formas pró-enzima e intermediária da metaloproteinase de matriz -2 em gatos com tirotoxicose induzida segundo o período de avaliação

Variável	Início do tratamento	14 dias	28 dias	42 dias
MMP-2 75kDa	7471±3341	14432±9219	8214±9566	12075±8329
Forma pró-enzima				
MMP-2 66kDa	20655±9373	24974±11169	24467±8151	11386±10813
Forma intermediária				
MMP-9 83kDa	2818±1260	7159±3524	4951±2464	5118±3363
Forma ativa				

MMP: metaloproteinases de matriz.

Tabela 2. Valores da associação entre a densidade mineral óssea e as metaloproteinases de matriz em gatos com tirotoxicose induzida segundo o período de avaliação

Variável	Início do tratamento	14 dias	28 dias	42 dias
DMO x MMP-2 75kDa	-0,45	-0,42	-0,39	0,28
DMO x MMP-2 66kDa	-0,17	0,28	0,51	0,93 ¹
DMO x MMP-2 62kDa	-0,37	-0,98 ¹	-0,63	-0,06
DMO x MMP-9 83kDa	-0,19	-0,91 ²	-0,15	0,01

¹P<0,01; ²P<0,05. DMO: densidade mineral óssea; MMP: metaloproteinases de matriz.

DISCUSSÃO

Como nesta pesquisa, outros autores conseguiram promover indução experimental à tirotoxicose a partir da administração oral de levotiroxina sódica. São descritos trabalhos em ratos (Kung e Ng, 1994; Pereira et al., 1999;

Serakides et al., 2000) e cães (Adams e Jonsey, 1966), nos quais também foi possível a demonstração de alterações do metabolismo ósseo. Os maiores valores médios dos níveis séricos de T4 livre foram observados nos momentos de 14 e 28 dias após início da suplementação de levotiroxina sódica, havendo

um decréscimo no último momento avaliado. Uma inibição da produção endógena é observada após início da suplementação hormonal em humanos, fato este também caracterizado nos gatos utilizados neste experimento, uma vez que a dose administrada foi sempre constante. Os valores de T4 total permaneceram elevados e em patamares constantes durante todos os momentos avaliados posteriormente ao início do tratamento hormonal. A discreta alteração observada nos níveis séricos de T3 total também pode, segundo Thoday e Mooney (1992), estar presente com frequência no hipertiroidismo felino de origem endógena.

A técnica de densitometria óptica em imagens radiográficas demonstrou ser útil e de fácil realização, conforme já previamente relatado em cães (Vulcano et al., 1998), gatos (Rahal et al., 2001) e cavalos (Vulcano, 2001). Foi possível uma observação precisa do quadro de perda de massa óssea, assim como um acompanhamento periódico das alterações da densidade mineral óssea ao longo do experimento.

As semelhanças nas alterações no tecido ósseo na tirotoxicose de origem exógena e endógena em humanos, conforme descrito por Fallon et al. (1983), em mulheres submetidas a uma reposição hormonal excessiva, levam a considerar que fato semelhante ocorra nos gatos domésticos. Dessa forma, possivelmente a desmineralização óssea e a maior ativação das MMPs -2 e -9, observadas nos animais do presente estudo, também ocorrerão de forma semelhante no hipertiroidismo felino de origem endógena.

Os resultados observados, semelhantes aos já relatados por Pereira et al. (1999) após estudo em ratos, sugerem o envolvimento das metaloproteinases -2 e -9 no processo de desmineralização óssea também na espécie felina. Os gatos com tirotoxicose induzida apresentaram maior atividade das MMP -2 e -9, estando este achado possivelmente correlacionado à promoção de maior degradação da matriz colágena do tecido ósseo.

Alta correlação negativa foi verificada entre as formas ativas das MMP -2 e -9 e a densidade mineral óssea com 14 dias de administração hormonal, momento em que também se observou maior amplitude de desmineralização do tecido ósseo. Tal fato demonstra a rápida ação dessas

MMPs na ocorrência de tirotoxicose, sendo um fator agravante nos processos de osteoporose secundária em pacientes com hipertiroidismo, conforme já descrito em ratos (Pereira et al., 1999).

A forma intermediária da MMP -2, em um primeiro momento, apresentou-se elevada, entretanto, com 42 dias de indução ao estado de tirotoxicose, caracterizaram-se os menores valores médios desse precursor, observando-se também uma correlação positiva com os valores densitométricos. Tal fato justifica-se pela elevação significativa da forma ativa dessa enzima durante todo o período experimental, promovendo uma alta taxa de conversão da forma intermediária.

Pode-se concluir que a desmineralização óssea secundária à tirotoxicose promoveu aumento da atividade das MMP -2 e -9 em gatos. Além do importante papel dessas enzimas em diferentes processos neoplásicos, conforme previamente descrito na medicina veterinária (Jankowski et al., 2002; Loukopoulos et al., 2003; Sorensen et al., 2004), vale ressaltar a importância da avaliação do papel das metaloproteinases de matriz -2 e -9 em diferentes processos que promovam desmineralização óssea, entre estas o hipertiroidismo, para melhor esclarecimento dos aspectos fisiopatológicos dessa enfermidade na espécie felina.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P.; JOWSEY, J. Bone and mineral metabolism in hyperthyroidism: an experimental study. *Endocrinology*, v.81, p.735-740, 1966.
- ARCHER, F.J.; TAYLOR, S.M. Alkaline phosphatase bone isoenzyme and osteocalcin in the serum of hyperthyroid cats. *Can. Vet. J.*, v.37, p.735-739, 1986.
- BROUSSARD, J.D.; PETERSON, M.E.; FOX, P.R. Changes in clinical and laboratory findings in cats with hyperthyroidism from 1983 to 1993. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.206, p.302, 1995.
- FALLON, M.D.; PERRY, H.M.; BERGFELD, M. Exogenous hyperthyroidism with osteoporosis. *Arch. Intern. Med.*, v.143, p.442-444, 1983.
- FOSTER, D.J.; THODAY, K.L. Tissue sources of serum alkaline phosphatase in 34 hyperthyroid cats:

- a qualitative and quantitative study. *Res. Vet. Sci.*, v.68, p.89-94, 2000.
- GUO, L.G.; LUO, X.H.; WU, X.P. Relationships between circulating metalloproteinases -1 and -2 and metalloproteinase -1 levels and bone biochemical markers and bone mineral density in chinese postmenopausal women. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, v.85, p.734-737, 2005.
- JANKOWSKI, M.K.; OGILVE, G.K.; LANA, S.E. et al. Matrix metalloproteinase activity in tumor, stromal tissue, and serum from cats with malignancies. *J. Vet. Intern. Med.*, v.16, p.105-108, 2002.
- JODAR, E.; TORRES, M.M.; JIMENES, F.E. Bone loss in hyperthyroid patients and in former hyperthyroid patients controlled on medical therapy: influence of etiology and menopause. *Clin. Endocrinol.*, v.47, p.279-285, 1997.
- KUGLER, A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res.*, v.19, p.1589-1592, 1999.
- KUNG, A.W.; NG, F.A. rat model of thyroid hormone-induced bone loss: effect of antiresorptive agents on regional bone density and osteocalcin gene expression. *Thyroid*, v.4, p.93-98, 1994.
- KUSANO, K.; MIYAUURA, C.; INADA, M. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology*, v.139, p.1338-1345, 1998.
- LORENZO, J.A.; PILBEAN, C.C.; KALINOWSK, J.F. et al. Production of both 92 and 72kDa gelatinases by bone cells. *Matrix*, v.12, p.282-290, 1992.
- LOUKOPOULOS, R.; MUNGALL, R.C.; STRAW, R.C. et al. Matrix metalloproteinase -2 and -9 involvement in canine tumors. *Vet. Pathol.*, v.40, p.382-394, 2003.
- LUKENSMEYER, W.W.; HEGER, J.H.; THEIL, G.B. et al. Calcium and phosphorus metabolic studies in triiodothyronine-induced hypermetabolism. *Am. J. Med. Sci.*, v.259, p.282-291, 1970.
- MATRISIAN, L.M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trend Genet.*, v.6, p.121-125, 1990.
- MOOK, O.R.; FREDERIKS, W.M.; VAN NOORDEN, C.J. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*, v.1705, p.69-89, 2004.
- MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E.F.; CHARLES, P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.*, v.19, p.35-63, 1990.
- PEREIRA, R.C.; JORGETTI, V.; CANALIS, E. Triiodothyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expression in murine osteoblasts. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.*, v.277, p.E496-E504, 1999.
- PETERSON, M.E.; KINTZER, P.P.; CAVANAGH, P.G. et al. Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.183, p.103-110, 1983.
- RAHAL, S.C.; MORTARI, A.C.; CAPORALI, E.H.G. et al. Emprego da densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MEDICINA FELINA, 2001, Rio de Janeiro. *Anais*. Rio de Janeiro, 2001, p. 35.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F. et al. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.579-585, 2000.
- SORENSEN, K.C.; KITCHELL, B.E.; SCHAEFFER, D. et al. Expression of matrix metalloproteinases in feline vaccine site-associated sarcomas. *Am. J. Vet. Res.*, v.65, p.373-379, 2004.
- THODAY, K.L.; MOONEY, C.T. Historical, clinical and laboratory features of 126 hyperthyroid cats. *Vet. Rec.*, v.131, p.257-264, 1992.
- VULCANO, L.C.; LEAL, A.C.R.; LOUZADA, M.J.Q. et al. Determination of the normal values of density of the radius in Rottweilers, using radiographic optical densitometry (experimental study). In: CONGRESSO MUNDIAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DE PEQUENOS ANIMAIS, 1998, Buenos Aires, *Anais...* Buenos Aires, 1998.
- VULCANO, L.C. *Determinação e padronização dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) do carpo acessório de equinos em crescimento da raça Puro Sangue Inglês (PSI) por meio da densitometria óptica radiográfica*. 2001. 52f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

