

Citoquinas, Metaloproteinasas y Bisfosfonatos: claves para el control de la enfermedad articular degenerativa en el equino. (Citokines, Metalloproteinases and Bisphosphonates: control keys for degenerative joint disease in horses).

Caggiano, Nicolás: Cátedra de Fisiología Animal y Bioquímica Fisiológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires| **Rolando, Jesica:** Cátedra de Fisiología Animal y Bioquímica Fisiológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires| **Polli, Magali:** Cátedra de Fisiología Animal y Bioquímica Fisiológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires| **Perrone, Gustavo:** Cátedra de Producción de Equinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires| **Marino, Mario:** Cátedra de Fisiología Animal y Bioquímica Fisiológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires| **De Simone, Emilio:** Cátedra de Fisiología Animal y Bioquímica Fisiológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires| **Chiappe Barbará, Angelina:** Cátedra de Fisiología Animal y Bioquímica Fisiológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.

Resumen:

La Osteoartritis es una entidad patológica de gran incidencia en equinos deportivos que afecta de manera directa la performance de estos animales dentro de las disciplinas en las cuales compiten. El diagnóstico precoz de esta entidad es de suma importancia para la salud del atleta ya que cuanto antes podamos instaurar un tratamiento la agresividad y la duración del episodio de fase aguda será menor y el pronóstico será más favorable.

Además del diagnóstico clínico y radiográfico de rutina proponemos la utilización de marcadores bioquímicos que, con mayor certeza, pueden indicarnos el tipo, grado y etapa de la evolución de la enfermedad articular. Los marcadores utilizados son citoquinas (IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , RANK-L). Por otro lado se puede evaluar el nivel de enzimas encargadas de la degradación de la matriz extracelular del cartílago articular, las metaloproteinasas.

En lo que respecta al tratamiento abordaremos un grupo de drogas denominadas bisfosfonatos que tienen acción regulatoria sobre los niveles de citoquinas e inhiben la actividad de las metaloproteinasas, dichas características hacen que estas drogas sean una opción adecuada a la hora de instaurar un tratamiento efectivo por su acción sobre mediadores y efectores.

Palabras claves: Citoquinas (Citokines), Metaloproteinasas (Metalloproteinasas), Bisfosfonatos (Bisphosphonates), Osteoartritis (Osteoarthritis), Equinos (Equine).

Abstract:

Osteoarthritis is a disease entity of great impact on sport horses that directly affects the performance of these animals in the disciplines in which they compete. Early diagnosis of this entity is critical to the health of the athlete and the sooner we can begin a treatment, the aggressiveness and duration of acute episode will be lower and the prognosis will be more favorable. In addition to the routine clinical and radiographic diagnosis we suggest the use of biochemical markers, with greater certainty, may indicate the type, grade and stage of evolution of the joint disease. The markers used are cytokines (IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α , RANK-L). On the other hand one can evaluate the level of enzymes responsible for the degradation of the extracellular matrix of articular cartilage, metalloproteinasas.

Regarding the treatment we board a group of drugs called bisphosphonates which have regulatory actions on the levels of cytokines and inhibit the activity of MMPs, these features make these drugs a good choice when establishing treatment effective by its action on mediators and effectors.

Introducción a la Osteoartritis equina

La osteoartritis OA es una entidad patológica de gran incidencia en equinos deportivos, a consecuencia de los reiterados esfuerzos que estos animales realizan en sus distintas disciplinas para alcanzar una buena performance. En algunos casos esta situación también se ve acompañada por alteraciones en el normal desarrollo osteocondral a consecuencia de una alimentación deficiente en la primeras etapas del crecimiento. La enfermedad se caracteriza por una lenta y progresiva pérdida de cartílago articular, eburnificación del hueso subcondral e inflamación de la membrana sinovial y aumento del líquido sinovial en la mayoría de los casos. En los estadios más avanzados se observa erosión cartilaginosa y esclerosis del hueso subcondral, se generan osteofitos, fibrosis de la membrana sinovial y alteración macroscópica del líquido sinovial (Norrdin, 1998) (Schett, 2007).

Esta enfermedad insidiosa y degenerativa se asienta sobre distintas articulaciones de los équidos, variando su ubicación según su etiología. Para facilitar su estudio se las clasificó en agudas o crónicas y primarias o secundarias a otras patologías. La presentación que afecta en mayor medida a los atletas es la aguda con asiento principalmente sobre la articulación carpiana, metacarpofalangiana y tibiotarsal. En deportes en los cuales los equinos pueden alcanzar edades avanzadas y seguir practicando dicha disciplina, como en los animales *de salto* la osteoartritis se presenta como una entidad clínica de tipo insidiosa o crónica que afecta principalmente a las articulaciones de poca movilidad y que soportan mucho peso como la ínterfalangiana o la intertarsiana. Esta última forma se presenta con periodos de remisión intercalados con los de fase activa de reagudización (Stashak, 2004).

La gran problemática que acarrea esta enfermedad dentro de la industria hípica hace que los profesionales veterinarios deban llegar a un rápido diagnóstico de la patología para implementar tratamientos que permitan evitar que la enfermedad se instale, haciéndose crónica. Por otra parte, en algunos casos, la indicación de reposo deportivo no es respetada por los cuidadores o propietarios y ante una leve mejoría del cuadro clínico el animal vuelve a desarrollar sus actividades físicas rutinarias y de esta manera entra en círculos reiterados de reagudización cada vez con mayor compromiso osteoarticular.

El diagnóstico clásico de la enfermedad se lleva a cabo mediante un examen clínico y la evaluación de alteraciones radiográficas de las articulaciones comprometidas. En este artículo haremos una revisión sobre posibles marcadores bioquímicos que se usan como métodos complementarios para realizar un diagnóstico precoz de la disfunción articular. El objetivo es predecir la predisposición de un animal a padecer la enfermedad articular degenerativa antes que los cambios a nivel de la estructura anatómica afectada sean irreversibles o hagan que su desempeño deportivo se vea comprometido. Dentro de estos marcadores bioquímicos se encuentran las citoquinas y las metaloproteinasas y sus niveles se relacionan con la magnitud de la respuesta inmune. Y por otra parte por su intermedio se puede conocer si la persistencia de la enfermedad está relacionada con la respuesta inmune, que por algún tipo de desbalance regulatorio, está tomando un negativo protagonismo sumándose al proceso patológico primario.

En este artículo trataremos en temas relacionados al rol de distintas citoquinas en la patogenia de la OA, así como las enzimas efectoras que son las metaloproteinasas. En la parte final vamos a abordar la problemática que tiene esta enfermedad que en la instauración de un tratamiento efectivo y fundamentalmente vamos a hablar de los bisfosfonatos que es un grupo de drogas que se vienen usando hace ya varios años en humanos (Fleish, 1972 & 1996) y que se están usando ahora en el tratamiento de enfermedad articular de los equinos (Coudry, 2007). Desarrollaremos las modificaciones que pueden

causan estas drogas sobre el perfil de citoquinas y la actividad de las metaloproteinasas, lo cual va a traer aparejado cambios a nivel de la microestructura articular con modificaciones en el cuadro clínico del animal, una mejor performance deportiva y una mejor calidad de vida del individuo.

Rol de las citoquinas en la patogenia y en el diagnóstico de la OA.

Los estudios de tipo inmunológicos se centran en las citoquinas, IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , RANK-L moléculas de señalización celular fisiológica, que ante leves cambios en la homeostasis articular se verán alteradas. Es así que se han desarrollado distintos métodos diagnósticos para evaluar la variación en los niveles de estas citoquinas como signo precoz indicativo del desarrollo de la artritis (Anca Rosu, 2012) (Leibbrandt, 2008) (Martel-Pelletier, 2011). El estudio de las modificaciones en los niveles de ciertas citoquinas no sólo nos sirve de herramienta diagnóstica sino que pueden ser el blanco de nuevas estrategias terapéuticas (Bluml, 2012) (Jotanovic, 2012). Es por eso que a continuación daremos las generalidades sobre las citoquinas para comprender su estructura, sus funciones y así poder simplificar la tarea diagnóstica y de la comprensión de la patogenia de las enfermedades articulares a la hora de tomar decisiones sobre una estrategia terapéutica.

Por definición las citoquinas son polipéptidos sintetizados en respuesta a microorganismos y otros antígenos que median y regulan las reacciones inmunitarias e inflamatorias. Estructuralmente tienen diferencias entre ellas pero comparten distintas propiedades que pueden ser importantes para tener en cuenta a la hora de establecer un diagnóstico a partir de los niveles de estas moléculas o implementar una terapia para regular sus acciones. Dentro de las propiedades generales de las citoquinas estas tienen un período de secreción breve que se autolimita. Es decir son sintetizadas y liberadas en respuesta a un estímulo que aumenta la expresión de su ARNm para que pueda ser sintetizado el polipéptido, y es de destacar que no se almacenan. Otra propiedad compartida entre algunas citoquinas, la IL-1 y el TNF- α , es la de tener un mecanismo de regulación post-traducciona en el cual se produce la liberación de estos péptidos en su forma inactiva y luego mediante mecanismos proteolíticos son activados (Locksley, 2001). Algo importante de destacar es la acción pleiotrópica y redundante que tienen las citoquinas, esto permite que puedan actuar sobre diferentes tipos celulares lo que da una gran variedad de funciones biológicas. Es decir, el concepto de redundancia hace referencia a que más de una citoquina tiene la misma acción. Por otra parte las citoquinas influyen en la síntesis y las acciones de otras citoquinas como en el caso de la relación que se establece entre el TNF- α y la IL-1 (Locksley, 1987).

Además, tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, hay que tener en claro una propiedad de las citoquinas, estas pueden tener acciones locales y sistémicas, el TNF- α por ejemplo puede ser medido a nivel local y sistémico, ya

que es liberado en grandes concentraciones en el torrente sanguíneo aunque no permanece durante mucho tiempo (Robak, 1997). En cuanto al mecanismo de señalización de estas proteínas éste se lleva a cabo mediante receptores de membrana específicos de la célula diana, lo anteriormente dicho toma relevancia principalmente para la terapéutica. Otra propiedad que es importante destacar es que la expresión de receptores por parte de las células dianas, y por ende la reactividad de las mismas, se ve modificado por señales externas y esto determina el marco tisular dentro del cual puede ejercer su efecto una citoquina o no.

Las citoquinas pueden generar respuestas que en su mayoría tienen un origen génico con lo cual va a promover la expresión de nuevas funciones y en algunos casos la proliferación de células dianas.

El hecho que las funciones de las citoquinas sean ejercidas por un *origen génico* hace que dichas funciones sean tan variadas e importantes y sujetas a una estrecha regulación que incluye mecanismos inhibidores de retroalimentación para inactivar sus respuestas. Dentro de los mecanismos inhibitorios también podemos nombrar mecanismos que activan las citoquinas mediante la inducción de genes, codificando moléculas que inhiben la síntesis de receptores también existen receptores señuelo que bloquean la interacción de la citoquina con su receptor de membrana específico (Abbas, 2008).

Todas las particularidades mencionadas sobre las citoquinas son indicativas de la gran complejidad de su actividad fisiológica.

Las citoquinas que median los distintos procesos inflamatorios-degenerativos son varias pero algunas tienen mayor importancia tanto como por las acciones que llevan a cabo sobre los tejidos que constituyen a la articulación como por regular la actividad de otras citoquinas. A continuación hablaremos de las funciones globales y de ciertas características que tienen las interleuquinas que se están involucradas en los procesos osteoartrotríticos y cómo actúan a nivel de la fisiopatología de los procesos degenerativos.

El **TNF- α** es el principal mediador de la respuesta inflamatoria aguda, puede detectarse en suero porque se produce en gran cantidad. Esta citoquina posee dos receptores (TNF-RI y TNF-RII) los cuales al ser activados activan distintos factores de transcripción, pero fundamentalmente al NF- κ B, factor importante para la transcripción de numerosos genes dentro de las respuestas inmunitarias tanto innata como adquirida (Cabal-Hierro, 2012). El TNF- α actúa sobre los fagocitos mononucleares estimulando la secreción de IL-1 que actúa de manera similar al propio TNF- α , éste también contribuye a las reacciones inflamatorias locales que son perjudiciales para el huésped.

Por otro lado tiene acciones sistémicas que si no son reguladas estrictamente genera un cuadro desfavorable para el individuo. Un miembro del receptor de TNF- α es una proteína que se llama activador del receptor NF- κ B o RANK. Este receptor se identifica en osteoclastos y es estimulado por una sustancia llamada RANK ligando que se sintetiza en linfocitos T activados. Al estimularse estos receptores se promueve la resorción ósea lo que al agravarse trae el desarrollo de las patologías de las cuales hablamos. Dentro del desarrollo de un proceso inflamatorio el TNF- α es la primer citoquina en liberarse y es el encargado de llevar a cabo las primeras acciones y estimular la síntesis y liberación de otras citoquinas como la IL-1 y la IL-6 (Clark, 2005).

Lo anteriormente dicho es importante como estrategia de amplificación, ya que la activación de pocas molécula de TNF- α genera la activación de muchas moléculas de IL-1 que tiene mayor actividad sobre los procesos proteolíticos y de resorción ósea, unas diez veces más potente que la acción del TNF- α , que es la que nos va a generar un aumento en la degradación del cartílago articular. Entonces mediante la IL-1 se lleva a cabo la degradación de cartílago pero este proceso es TNF- α dependiente por ser el primer eslabón de la cascada inflamatoria (Westacott, 1996). Esta relación íntima entre TNF- α e IL-1 se vio confirmada mediante la administración de anticuerpos que neutralizaban al TNF- α en un cultivo de tejido sinovial, a los tres días de comenzado el tratamiento se procedió a medir los niveles de IL-1 y se observó una gran disminución en la bioactividad de dicha citoquina. Además la IL-6 también se vio disminuida al neutralizar el TNF- α .

También se habla de una regulación negativa por parte de la IL-1 sobre el TNF- α pero no se ha observado una disminución en los valores del TNF- α sino de la activación de otras citoquinas como la IL-6 (Feldmann, 1996).

En lo que refiere a la relación existente entre el TNF- α y las metaloproteinasas éstas se ven estimuladas por el TNF- α en su liberación por parte de condrocitos, células sinoviales y fibroblastos. En este punto también es importante mencionar la relación existente entre TNF- α e IL-1 ya que la liberación del TNF- α produce un aumento en la liberación de IL-1 y ésta tiene mayor capacidad de activación de los tipos celulares antes descriptos para la liberación de MMPs. A su vez algo a destacar es que para la reducción en la liberación de MMPs habría que inhibir a ambas citoquinas porque se habla de un *efecto redundante* en el cual ante la ausencia de una la otra llevaría a cabo las acciones, por lo tanto si se inhibe solamente una de las dos la actividad enzimática no se vería reducida (Jouglin, 2000).

La **IL-1** actúa junto con el TNF- α en la inmunidad innata y en la inflamación. El principal lugar de síntesis de la IL-1 son los fagocitos mononucleares, su producción se ve estimulada por el TNF- α . También puede ser sintetizada en otros tipos celulares como neutrófilos, células epiteliales y endoteliales. Hay dos

tipos de IL-1 llamadas IL-1 α e IL-1 β , que tienen el mismo receptor y llevan a cabo las mismas funciones biológicas. La IL-1 media sus efectos a través de un receptor de membrana denominado receptor de IL-1 de tipo I que activa factores de transcripción como el NF-kB y AP-1.

Los efectos biológicos de IL-1 van a variar según las cantidades producidas, si la cantidad es baja actúa como mediador local de la inflamación, en cambio si se produce en grandes cantidades tiene acciones endocrinas sistémicas como la producción de fiebre, la síntesis de proteínas de fase aguda de manera indirecta estimulando la síntesis de IL-6 o el aumento de neutrófilos circulante (Sahoo, 2011).

Esta citoquina a nivel del cartílago promueve también el aumento de la síntesis de IL-6 por parte de condrocitos y de fibroblastos, ésta IL-6 a nivel articular tiene un rol cooperativo a la hora de inhibir la síntesis de proteoglicanos por parte de la IL-1. A nivel de síntesis proteica la IL-1 tiene un fuerte rol inhibitorio, este efecto se ve principalmente cuando se libera IL-1 en grandes cantidades ya que a bajos niveles puede estimular la síntesis de proteínas por parte de los osteoblastos. En lo que refiere al proceso de resorción ósea la IL-1 estimula este proceso mediante el aceleramiento de los procesos de proliferación de los osteoclastos lo cual va a resultar en una mayor degradación de masa ósea. Muchas de las acciones de la IL-1 son en sinergia con el TNF- α y una de las que hay que volver a mencionar es la que llevan a cabo sobre la liberación y la activación de las MMP que van a actuar sobre los distintos componentes de la matriz extracelular (von Rechenberg, 1999).

La **IL-6** es otra citoquina que se la suele ubicar entre las citoquinas proinflamatorias y cumplen un rol catabólico pero las opiniones respecto a su verdadero rol son bastante contradictorias ya que podría tener acciones anabólicas y también tener un rol regulatorio sobre la respuesta inflamatoria que a su vez es el estímulo para su liberación. Un ejemplo que soporta lo dicho anteriormente es que las acciones catabólicas que lleva a cabo esta citoquina son en conjunto con la IL-1, pero por otro lado la IL-6 regula e inhibe ciertas acciones catabólicas de la IL-1 (Florent, 2007). Es así que prácticamente en todos los casos se encuentran niveles detectables de IL-6 en líquido sinovial.

Dentro de las características generales de la IL-6 podemos decir que es una citoquina que participa tanto de la inmunidad innata como adaptativa. Se sintetiza en fagocitos mononucleares, células endoteliales y fibroblastos. Durante una respuesta aguda aumenta la síntesis de proteínas de fase aguda por parte del hígado y aumenta la producción de neutrófilos. También la IL-6 favorece las relaciones inmunitarias celulares estimulando la síntesis de algunas citoquinas proinflamatorias, principalmente la IL-17 e inhibiendo la generación y las acciones de los linfocitos T reguladores (Abbas, 2008). En lo que respecta a los roles que cumple la IL-6 a nivel articular se observó que inhibe la formación de hueso y

promueve la resorción ósea mediante efectos estimulante sobre osteoclastos y es por este motivo que algunos trabajos científicos la han usado como marcador de catabólico (Le Goff, 2010). Por otra parte el utilizar a dicha citoquina como marcador catabólico no es algo errático ya que los valores de IL-6 a nivel de líquido sinovial se ven correlacionados positivamente con el desarrollo de distintas enfermedades degenerativas que afectan a las articulaciones (Kokebie, 2011).

Respecto a la **IL-4** esta es una citoquina que, a diferencia de las proinflamatorias, tiene un rol principalmente regulador limitante de los procesos inflamatorios y degenerativos. Respecto a las características generales de la IL-4 podemos decir que las células que liberan principalmente esta citoquina son los linfocitos T CD4+ Th2. La IL-4 es la única citoquina que activa al factor de transcripción STAT6 que genera una diferenciación de linfocitos hacia un perfil Th2, inhibiendo el desarrollo de la población Th1 y Th17 promoviendo respuestas humorales y regulatorias. Los efectos de la IL-4 sobre los macrófagos incluye la activación de la arginasa que da lugar a la síntesis de colágeno de ahí una de sus funciones anabólicas (Ohmura, 2005). Los niveles que se producen de IL-4 son principalmente bajos, no suelen ser detectados a nivel sérico y esta baja producción hace que su rol sea principalmente parácrino, esto fue demostrado en nuestros estudios en los cuales no pudimos detectar la presencia de IL-4 en plasma (Park, 2012) (Polli 2012) (Verghese, 2011). Sus acciones regulatorias incluyen la inhibición tanto de la IL-1 como de la IL-6 y el TNF- α mediante la inhibición en la liberación de estas citoquinas por parte de monocitos (Vannier, 1992). Ciertas acciones de la IL-4 son llevadas a cabo de manera sinérgica junto con la IL-10, una de ellas es la de disminuir el infiltrado de células mononucleares dentro de áreas inflamatorias y disminuir la destrucción del cartílago articular (Jorgensen, 1998).

Los métodos utilizados para la determinación de las citoquinas son: ELISA, Western Blotting, RT-PCR para la detección de su ARNm. También se pueden utilizar métodos sobre tejidos como inmuno-histoquímica o fluorescencia in-situ. El ELISA con kits comerciales es el más utilizado por su sencillez. Algo importante a tener en cuenta es la relación entre la citoquina que se quiere medir y la muestra que debe ser utilizada, ya que por ejemplo si queremos encontrar niveles de IL-4 en suero va a resultar difícil y probablemente no vamos a tener éxito ya que la misma se sintetiza en pequeñas cantidades debido a su acción parácrina mencionada previamente.

Metaloproteinasas (MMP).

Las metaloproteinasas, MMP2, MMP9, MMP13 y otras proteasas llamadas *agrecanasas* ADAM-TS4 ADAM-TS5 son enzimas encargadas de la remodelación normal del cartílago articular y son los efectores de las acciones que promueven las citoquinas. A través de la evaluación del aumento o descenso de mediadores de la inflamación y la evaluación de los elementos encargados en la destrucción del cartílago articular que conducen a modificaciones del hueso subcondral_g

y por ende la afección del resto de las estructuras que componen la articulación (Galasso, 2012) (Takaishi, 2008) (Malfait, 2002).

Para comenzar a hablar de las MMPs y su rol en los procesos degenerativos articulares antes daremos algunas pautas generales sobre estas enzimas que nos permita comprender mejor su papel dentro de la patogenia de las enfermedades articulares. Las MMPs son una familia de endopeptidasas dependientes de zinc (Zn^{2+}) encargadas del normal remodelado de la matriz extracelular (Reynolds JJ., 1996). Esta familia de proteinasas a su vez se dividen en cinco subfamilias según la sustancia que degraden: colagenasa, gelatinasa, estromalisina, metaloproteinasas de membrana y la quinta subfamilia es un grupo diverso de enzimas que no han podido ser nombradas en alguno de los grupos anteriores (Burrage, 2006).

La estructura de estas proteínas está compuesta por dominios homólogos: péptido señal que direcciona a la MMP hacia la membrana secretoria o a la membrana donde se va a insertar, un prodominio que le confiere latencia ya que ocupa el sitio activo donde se sitúa el zinc, esto hace que la enzima catalítica no pueda acceder a los sustratos y el dominio catalítico de Zn^{2+} . También hay un dominio de gran importancia dentro de la molécula que es el dominio de hemopexina que media en las interacciones con los sustratos y le confiere especificidad a la enzima. Y por último una región bisagra que une el dominio catalítico con el dominio de hemopexina (Vargová, 2012). En el dominio catalítico se encuentra un sitio activo para el que se encuentra unido a residuos de cisteína (Cys). Cuando la unión Cys- Zn^{2+} está intacta la MMP se encuentra inactiva.

La activación de las MMPs requiere la disrupción de la unión Cys- Zn^{2+} . A su vez para la activación se produce el clivaje del pro-dominio de la molécula por clivaje autocatalítico o por otras proteasas (Figura N°1). La reducción en la masa molecular es de 8-10 kDa aproximadamente (Snoek-van Beurden, 2005).

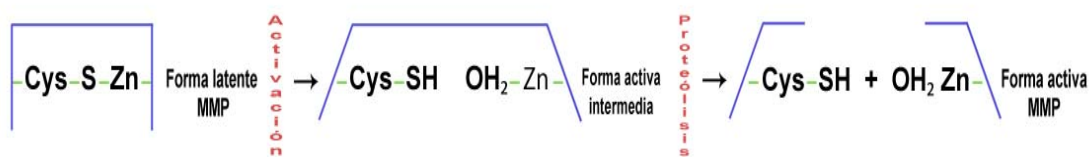


Figura N° 1. Activación de las MMPs.

Las MMPs sobre las cuales vamos a tratar en este artículo son las gelatinasas que son una de las subfamilias más estudiadas dentro de los trastornos osteoartrotríticos del equino. Esta subfamilia está representada por las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) que antiguamente se llamaban gelatinasa A y gelatinasa B respectivamente. Estas dos enzimas poseen una actividad catalítica similar,

pero son dos productos génicos de origen distinto y diferente peso molecular, la MMP-2 tiene un peso de 70kDA mientras que la MMP-9 pesa 92 kDA.

Las sustancias que pueden ser degradadas por estas enzimas incluye colágeno tipo IV, V, VII, X y XI, agreganos y otras proteínas que se encuentran formando parte de la matriz extracelular (ECM) o entramado tisular cartilaginosa (Nyman, 2010).

Algo que es importante resaltar es la acción conjunta de las distintas subfamilias de metaloproteinasas ya que las gelatinasas utilizan como principal sustrato el colágeno ya degradado por las colagenasas, es decir las colagenasas degradan la triple hélice de colágeno y esta molécula clivada es tomada como sustrato por las gelatinasas (Thompson, 2001).

La presencia de estas enzimas no es igual en todos los tejidos, ni en todo tipo de situación fisiopatológica. Las gelatinasas 2 y 9 son producidas por una variedad de tipos celulares en los equinos, estas enzimas fueron encontradas en altos niveles en líquido sinovial de equinos con enfermedades articulares. Con referencia a los componentes articulares la MMP-2 es secretada por los dos tipos de fibroblastos sinoviales y condrocitos, mientras que la MMP-9 es secretada por condrocitos, monocitos sanguíneos y polimorfonucleares (Fotopoulos, 2012).

La MMP-2 se encuentra de manera constitutiva en los tejidos manteniendo valores estables lo cual sugiere una acción homeostática ya que removería el colágeno anormal sintetizado de novo en la matriz extracelular. Los cambios que se pueden encontrar en el dosaje de MMP-2 pueden ser debidos a la edad o procesos patológicos, estos últimos no tienen comparación con el grado de aumento que tiene la MMP-9 en procesos patológicos (Trumble, 2001).

En cambio sucede lo opuesto con la MMP-9, es una enzima que en condiciones normales se encuentra en niveles basales o no se puede detectar, mientras que en procesos patológicos aumenta su nivel de manera manifiesta. La MMP-9 aumenta en muchas patologías articulares como la osteoartritis crónica, la artritis reumatoide, la artritis séptica de resolución lenta (Kim, 2012) (Blain, 2001) (Clegg, 1997). Entonces a partir de las variaciones en los niveles de estas enzimas uno puede tener un panorama sobre el proceso en el que se encuentra el cartílago articular, si está bajo una remodelación normal mediada por la MMP-2 o si los altos valores de MMP-9 son indicativos de una intensa degradación de la matriz cartilaginosa. Otra posibilidad diagnóstica sería tratar de medir los productos de degradación de estas enzimas, pero este es un método menos utilizado.

Otro grupo de enzimas de gran importancia en la fisiopatología de procesos nocivos articulares son las agreganasas, estas enzimas clivan las moléculas de agreganos, importante proteoglicano del cartílago, a nivel del dominio interglobular. A nivel del cartílago articular podemos encontrar dos

agrecanasas la ADAMTS-4 y la ADAMTS-5, estas enzimas actúan independientemente de los valores de MMPs a nivel articular lo que denota la importancia de estas enzimas catalíticas en los procesos degradativos articulares (Malfait, 2002). Diversos tipos celulares dentro de las articulaciones son capaces de sintetizar estas enzimas, podemos citar a los condrocitos y fibroblastos sinoviales que ante distintos estímulos aumentan la producción de agrecanasas. Las citoquinas como la IL-1 y el TNF- α son disparadores en el aumento en la expresión de agrecanasas por parte de condrocitos y fibroblastos, con lo cual va a aumentar la degradación de los agrecanos articulares. Por otro lado la inhibición de las agrecanasas es similar a la que se lleva a cabo sobre las MMPs, principalmente está dada por el inhibidor tisular de MMPs (TIMP-3) y un desbalance entre activadores e inhibidores originan procesos patológicos (Fosang, 2008). El importante rol de las agrecanasas en los procesos patológicos hace que estas enzimas sean el blanco de distintas estrategias terapéuticas, tratando de inhibir una mayor producción de las mismas por medio de la modulación de su transcripción o actuando a nivel de las citoquinas que aumentan su expresión (Huang, 2008).

Entonces sabiendo que la actividad de las MMPs puede ser indicativa del estado de la articulación afectada analizaremos las pautas y técnicas para realizar las determinaciones de las mismas. Para detectar la actividad de la MMP-2 y la MMP-9 la evaluación es a nivel articular tomando una muestra de líquido sinovial. También se puede determinar MMP-2 y MMP-9 en plasma pero los niveles no serán solo indicativos del daño articular, por esto se recomienda evaluar el líquido sinovial. En el equino la artrocentesis no es una maniobra difícil pero debe realizarse tomando ciertos recaudos para no provocar una sinovitis séptica iatrogénica.

Exámen de líquido sinovial y detección de MMPs.

El *examen macroscópico* del líquido sinovial puede indicar la presencia de algún proceso patológico, tanto por los cambios en la coloración como en la viscosidad. Una vez tomada la muestra se aconseja enviar lo antes posible la muestra al laboratorio, ya que si bien la actividad de estas enzimas se mantiene por largo tiempo no ocurre lo mismo con las citoquinas que deben ser evaluadas dentro de las 48 hs. de tomada la muestra de líquido sinovial. Además de la determinación de las MMPs en la evaluación del líquido sinovial se realiza como rutina el conteo de células blancas y proteinograma y en los casos que se requiera más información se realiza el test de Proteína C Reactiva, óxido nítrico y el dosaje de citoquinas de las cuales vamos a hablar más adelante.

Asimismo el profesional que remite las muestras debe enviar los datos clínicos del paciente al momento de la extracción del líquido sinovial, para lo que se remite un score clínico de cinco puntos. Esta evaluación es importante para saber si estamos

tratando con una patología netamente local y de origen primario o estamos ante una lesión articular secundaria generada por una patología de base.

La determinación de las MMP se realiza con el método zimográfico, muy sensible, ya que llega a detectar hasta 10 pg de MMP-2 y también se puede determinar otras MMP como la MMP-1, la MMP-8 y la MMP-13, pero con menor sensibilidad (Simard, 2006). Técnicamente el método zimográfico es una corrida electroforética en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), pero el gel sobre el cual se corren las muestras tiene una base de gelatina que es el sustrato de las enzimas que estamos midiendo. Después de la corrida se realizan lavados con distintos detergentes para renaturalizar las enzimas (Woessner JF Jr., 1995). Además de por el método zimográfico, las MMPs pueden ser también determinadas por ELISA, citometría de flujo y mediante la determinación del ARNm que codifique para la síntesis de las enzimas en estudio (Fraser, 2001). Otra posibilidad es recurrir a estudios genómicos, esto se ve facilitado por el hecho que el extremo N-terminal de las gelatinasas del equino es similar al extremo N-terminal de las gelatinasas humanas y caninas, esto facilita la identificación de las gelatinasas en distintas muestras por medio de la secuenciación y la comparación con las gelatinasas humanas y caninas, ya que entre el humano y el equino hay un 66% de homología en las secuencias de estas enzimas (Freemont, 2012) (Flannelly, 2002).

Por último es importante referirnos a los distintos niveles de la regulación de estas enzimas, punto a tener en cuenta a la hora de instaurar un plan terapéutico. La actividad de las MMP es regulada en distintos niveles: transcripción, secreción, activación e inhibición. Probablemente para la mayoría de las MMP, excluyendo la MMP-2, el paso regulatorio de mayor importancia sea la transcripción. La vía de señalización de Nf-kB es la más importante en la regulación en la expresión génica de las MMP, cuando una célula es estimulada por IL-1 o TNF- α se activa la transcripción de los genes que codifican para la síntesis de MMP, este proceso necesita de la intervención de Nf-kB para que se transcriban los genes (Burrage, 2005). Ahora hablando de otro punto regulatorio como es la activación en el caso de la MMP-2 está regulada por: hipoxia, reoxigenación, trombina, IL-1, TGF- β . Por el lado de la MMP-9 ésta se ve activada por: LDL oxidada, TNF- α , TGF- β y CD-40L (Vargová, 2012). A su vez otra estrategia que tiene el organismo para controlar la actividad de estas enzimas es producirlas en forma de proenzimas y que sean clivadas en el sitio de acción (Hollander, 1997).

Un mecanismo de regulación importante está mediado por inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs). En un estado de homeostasis la producción de MMP y TIMP está equilibrada, pero en situaciones patológicas como una osteoartritis se produce un desequilibrio en esta relación ya que hay un aumento de las MMP por sobre los TIMP (Huang, 2008). Otros inhibidores de las MMP son las α 2-microglobulinas, las tetraciclinas, dexametasona, sólo inhibe la MMP-2 y a altas dosis, y los bisfosfonatos. La acción de los antiinflamatorios no esteroideos es

controversial, ya que en estudios en humanos se vio que los niveles de MMP-2 y MM-9 disminuían, pero en estudios realizados en equinos no tuvieron resultados concluyentes (Yang, 2008).

Bisfosfonatos y su función en el perfil inflamatorio articular.

Los bisfosfonatos (BPs) representan uno de los mayores avances en el tratamiento de las osteopatías médicas en distintas especies, posicionándolos como una de las alternativas más usadas a la hora de instaurar un tratamiento terapéutico en la enfermedad osteoarticular (Hayami, 2004). El uso de los BPs es ya de larga data en medicina humana en el tratamiento de la osteoporosis y otras enfermedades con compromiso osteoarticular (Pasternak, 2009) y actualmente cada vez se difunde más su uso en el tratamiento de afecciones óseas en los equinos.

Los BPs son análogos de los pirofosfatos inorgánicos en los cuales se sustituyó un átomo de oxígeno por un átomo de carbono, ésta estructura molecular le da a estos compuestos mucha afinidad por los cristales de hidroxapatita. Según las cadenas que se ubiquen a los lados del átomo de carbono central va a ser el tipo de bisfosfonato y la potencia que tenga el integrante de dicha familia para inhibir la resorción ósea y para permanecer en el tejido óseo (Fleisch, 1996)

Los bisfosfonatos que contienen átomos de nitrógeno en sus cadenas laterales son más potentes que aquellos integrantes de la familia que no contienen este elemento y cuanto más alejados del átomo de carbono estén esos átomos de nitrógenos mayor va a ser la potencia. El alendronato y el pamidronato son bisfosfonatos que contienen nitrógeno en sus cadenas laterales, mientras que el tiludronato es un bisfosfonato que carece de nitrógeno en su estructura. Lo anteriormente dicho es algo importante ya que la estructura molecular del bisfosfonato que utilicemos nos va a indicar su potencia así como su mecanismo de acción. Si bien el mecanismo de acción entre bisfosfonatos difiere, su farmacocinética es similar y se caracteriza por la baja absorción intestinal, corta vida media en plasma y gran selectividad y adherencia en tejido óseo (Chiappe Barbará 2001).

La utilidad del uso de los BPs en la OA radica por un lado en su efecto terapéutico primario sobre el tejido óseo que es inhibir la resorción ósea por su actividad proapoptotica sobre los osteoclastos (Ebetino, 2011) y por otro en su efecto secundaria retrasando la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (Plotkin, 2006). Además los BPs presentan efectos positivos sobre la respuesta inmune local que genera el individuo (Maksymowych, 2002).

Con respecto a la inhibición de la resorción ósea ésta se verá disminuida como respuesta a una fuerte inhibición osteoclástica, la forma de inhibición de los osteoclastos es llevada a cabo por dos vías diferentes según el BP. Los BP de primera generación, tiludronato o etidronato, inducen la apoptosis de los osteoclastos mediante la inhibición de enzimas ATP dependientes. En

cambio los aminoBP, alendronato y pamidronato, desencadenan este efecto por la inhibición de la enzima farnesil pirofosfato sintetasa que actúa a nivel de la vía del mevalonato. Al inhibir esta enzima se ven alteradas pequeñas proteínas ligadoras de GTP que van a alterar la estructura del citoesqueleto de estas células obteniendo como resultado osteoclastos anormales y afuncionales aumentando su índice de apoptosis (Coxon, 2003).

En lo que respecta al control de la respuesta inmune los bisfosfonatos tienen acciones sobre distintas citoquinas que median las respuestas pro-inflamatorias como la IL-1. En una experiencia con altas dosis de etidronato se pudo observar como los niveles de IL-1 descendían (Suzuki, 2007), lo mismo se vio que ocurría con niveles de TNF- α pero con otros compuestos como el pamidronato pero los resultados no fueron tan concluyentes (Maksymowych, 2002) (Carbone, 2006). Por su lado la IL-6 tiene una cinética distinta según la dosis de BP que se administró, ya que a altas dosis los niveles de IL-6 disminuyen pero con bajas dosis los niveles de esta citoquina aumentan (Giuliani, 1998).

Además de la dosis a la cuales se suministran estas drogas otro factor importante es el régimen, diario, semanal, mensual, anual, y la duración del tratamiento. Es importante destacar que la mayoría de los bisfosfonatos en los primeros 3 a 4 días de administración producen un aumento en la respuesta inflamatoria con aumento de los niveles de TNF- α , IL-1 e IL-6, pero en protocolos en los cuales los bisfosfonatos fueron administrados por más de tres días los valores de las citoquinas antes mencionadas decayeron. Las acciones de los bisfosfonatos también se centran en la inhibición directa de las metaloproteinasas como es el caso de la inhibición en la expresión de MMP-9 producidas por macrófagos, este efecto inhibitorio se pudo observar en tratamientos con zoledronato y pamidronato (Melani, 2007).

Una hipótesis sobre la acción inhibitoria de los bisfosfonatos sobre la actividad de las MMPs sería que los mismos son quelantes del calcio, importante cofactor de las reacciones enzimáticas. Pero estos datos no son concluyentes y algunos estudios mencionan que altas dosis de alendronato fueron asociadas con activación de la MMP-9 (Clegg, 1998). Las acciones directas de los bisfosfonatos sobre las MMPs no son claras pero al inhibir, en tratamientos prolongados, la liberación de citoquinas pro-inflamatorias dichas enzimas proteolíticas no podrían llevar a cabo sus funciones catabólicas.

Como se ha mencionado los efectos que tiene los bisfosfonatos son complejos, variados y dependientes de muchos factores, por lo tanto su uso debe ser racional y aplicarse solo en casos clínicos con diagnóstico preciso para aplicar el tratamiento adecuadamente, según la edad del animal, su etapa productiva y reproductiva y la fase de la enfermedad osteoarticular, ya que por ejemplo no están indicados en las fases de remisión clínica de la OA. Para culminar, recientemente se está evaluando la posibilidad de la utilización de bisfosfonatos en

protocolos preventivos en las fases de actividad iniciales de los procesos osteoartríticos, lo cual podría ser algo positivo pero teniendo en cuenta que los casos a tratar deben tener altas probabilidades de padecer una enfermedad articular degenerativa.

Conclusión.

Los factores predisponentes de la enfermedad articular degenerativa son variados, pero los profesionales debemos anticiparnos al desarrollo de la misma mediante un seguimiento cercano de los pacientes, tanto desde el punto clínico como de la información que nos pueden proveer los estudios complementarios. Ante una leve sospecha se debe, en lo posible, poner todo nuestro esfuerzo en el rápido diagnóstico de la enfermedad y a su vez poder llegar a delimitar la fase fisiopatológica en que se encuentra nuestro paciente para establecer un procedimiento terapéutico adecuado al momento del diagnóstico. La utilización de marcadores bioquímicos en el diagnóstico de las enfermedades articulares suele ser variable y muchas veces los resultados obtenidos no pueden ser incluidos en un patrón para pronosticar la futura evolución de la enfermedad articular. Sin embargo, si pueden orientarnos en la evaluación del grado de intensidad de la respuesta autoinmune en un momento dado así como orientarnos respecto al grado de éxito de un tratamiento aplicado. En lo que respecta al control de citoquinas proinflamatorias y MMPs con el tratamiento con BPs, estos surgen como una buena alternativa si bien es necesario aún realizar más investigaciones sobre el rol preventivo o curativo que tienen estas drogas en las enfermedades articulares degenerativas del equino.

Agradecimientos:

a la Licenciada Bárbara Caggiano por la confección de la ilustración en el apartado de Metaloproteinasas.

Bibliografía:

- Abbas AK., Lichtman AH.; Pillai S. (2008) Inmunología Celular y Molecular. 6º ed. Elsevier.
- Blain EJ, Gilbert SJ, Wardale RJ, Capper SJ, Mason DJ, and Duance VC (2001) Up-regulation of matrix metalloproteinase expression and activation following cyclical compressive loading of articular cartilage in vitro. Archives of Biochemistry and Biophysics 396: 49–55,
- Blom AB., van Lent PL, Libregts S, Holthuysen AE., van der Kraan PM., van Rooijen N, van den Berg WB. (2007), Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism 56:147–157.

- Bluml Stephan, Scheinecker Clemens, Smolen Josef S. and Redlich Kurt. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. *Int Immunol.* 2012 May;24(5):275-81. Epub 2012 Mar 28.
- Bondeson J (1997) The mechanisms of action of disease-modifying antirheumatic drugs: a review with emphasis on macrophage signal transduction and the induction of proinflammatory cytokines. *Gen Pharmacol* 29:127-50.
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci.* 11:529-43.
- Carbone LD, Warrington KJ, Barrow KD, Pugazhenti M, Watsky MA, Somes G, Ingels J, Postlethwaite AE. (2006) Pamidronate infusion in patients with systemic sclerosis results in changes in blood mononuclear cell cytokine profiles. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology* 146: 371–380.
- Catterall JB, Cawston TE. Drugs in development: bisphosphonates and metalloproteinase inhibitors. *Arthritis Res Ther.* (2003) 5:12-24.
- Chiappe Barbará MA. (2001), Efectos del alendronato sobre las propiedades densitométricas, tomográficas, histomorfométricas y mecánicas del hueso de rata ovariectomizada. Tesis de Doctorado director Ferretti J.L., Universidad de Buenos Aires..
- Clark J, Vagenas P, Panesar M, Cope A P. What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term? *Ann Rheum Dis* 2005;64:iv70–iv76.
- Clegg PD, Coughlan AR, Riggs CM, Carter SD. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids. *Equine Vet J.* 1997 Sep;29(5):343-8.
- Clegg PD, Burke RM, Coughlan AR, Riggs CM, Carter SD. Characterisation of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints. *Equine Vet J.* 1997 Sep;29(5):335-42.
- Clegg PD, Jones MD, Carter SD. The effect of drugs commonly used in the treatment of equine articular disorders on the activity of equine matrix metalloproteinase-2 and 9. *J Vet Pharmacol Ther.* 1998 Oct;21(5):406-13.
- Coudry V, Thibaud D, Riccio B, Audigié F, Didierlaurent D, Denoix JM. Efficacy of tiludronate in the treatment of horses with signs of pain associated with osteoarthritic lesions of the thoracolumbar vertebral column. *Am J Vet Res.* 2007 Mar;68(3):329-37.
- Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int.* 2003 Jan;72(1):80-4. Epub 2002 Oct 10.
- Ebetino FH, Hogan AM, Sun S, Tsoumpra MK, Duan X, Triffitt JT, Kwaasi AA, Dunford JE, Barnett BL, Oppermann U, Lundy MW, Boyde A, Kashemirov BA, McKenna CE, Russell RG. The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. *Bone.* 2011 Jul;49(1):20-33. Epub 2011 Apr 9.

- Feldmann Marc, Brennan Fionula M., and Maini Ravinder N.. Role of cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Annu. Rev. Immunol.* 1996. 14:397–440.
- Flannelly J., Chambers M. G., Dudhia J., Hembry R. M., Murphy G., Mason R. M. and
- Bayliss M. T. Metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase expression
- in the murine STR/ort model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* (2002) 10, 722–733.
- Fleisch H. Bisfosfonatos en patología ósea. Del laboratorio al paciente. 2nd ed. Madrid Jarpyo Ed; 1996.
- Fleish, H., Russell, R. G. G., Bisaz, S., and Bonjour, J.-P. (1973): The Effects of Pyrophosphate and Diphosphonates on Calcium Metabolism. Ciba Foundation Symposium on Hard Tissue Growth Repair and Remineralisation. London, June 1972.
- Florent David, Judith Farley, Hong Huang, Jean-Pierre Lavoie, Sheila Laverty. Cytokine and Chemokine Gene Expression of IL-1b Stimulated Equine Articular Chondrocytes. *Veterinary Surgery* 36:221–227, 2007.
- Fosang AJ, Rogerson FM, East ChJ, Stanton H (2008) ADAMTS-5c the store so far. *European Cells and Materials* 15:11-26.
- Fraser Alexander, Fearon Ursula, Reece Richard, Emery Paul, and Veale Douglas J. Matrix Metalloproteinase 9, Apoptosis, and Vascular Morphology in Early Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 44, No. 9, September 2001, pp 2024–2028.
- Freemont A J, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland J A. Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Annals of the Rheumatic Diseases* 54:2 1997;56:542–549.
- Galasso Olimpio, Familiari Filippo, De Gori Marco, and Gasparini Giorgio. Recent Findings on the Role of Gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and -9) in Osteoarthritis. *Advances in Orthopedics* Volume 2012, Article ID 834208, 7 pages.
- Giuliani N, Pedrazzoni M, Passeri G, Girasole G. Bisphosphonates inhibit IL-6 production by human osteoblast-like cells. *Scand J Rheumatol.* 1998;27(1):38-41.
- Harada H, Nakayama T, Nanaka T, Katsumata T. Effects of bisphosphonates on joint damage and bone loss in rat adjuvant-induced arthritis. *Inflamm Res.* 2004 Feb;53(2):45-52. Epub 2004 Jan 26.
- Hayami T, Pickarski M, Wesolowski GA, McLane J, Bone A, Destefano J, Rodan GA, Duong le T. The role of subchondral bone remodeling in osteoarthritis: reduction of cartilage degeneration and prevention of osteophyte formation by alendronate in the rat anterior cruciate ligament transection model. *Arthritis Rheum.* 2004 Apr;50(4):1193-206.

- Herman S, Krönke G, Schett G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med.* 2008 Jun;14(6):245-53. Epub 2008 May 9.
- Hollander AP. Matrix metalloproteinases as targets for therapy in equine joint diseases. *Equine Vet J.* 1997 Sep;29(5):329-30.
- Huang K, Wu LD Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a Review. *J of International Med. Res.* 36:1149-1160.
- Hulejová H, Baresová V, Klézl Z, Polanská M, Adam M, Senolt L. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone. *Cytokine.* 2007 Jun;38(3):151-6. Epub 2007 Aug 3.
- Jeffry S Nyman, Conor C Lynch, Daniel S Perrien , Sophie Thiolloy ,Elizabeth C O'Quinn, Chetan A Patil ,Xiaohong Bi ,George M Pharr , Anita Mahadevan-Jansen, and Gregory R Mundy. Differential Effects Between the Loss of MMP-2 and MMP-9 on Structural and Tissue-Level Properties of Bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 26, No. 6, June 2011, pp 1252–1260.
- Jorgensen C., Apparailly F., Couret L, Canovast F. Jacquet C., Sany J.. Interleukin-4 and interleukin-10 are chondroprotective. and decrease mononuclear cell recruitment in human rheumatoid synovium in vivo. *Immunology* 1998 93 518-523.
- Jotanovic, Zdravko; Mihelic, Radovan; Sestan, Branko; Dembic, Zlatko. Role of Interleukin-1 Inhibitors in Osteoarthritis: An Evidence-Based Review. *Drugs & Aging: 1May 2012 - Volume 29 - Issue 5 - pp 343-358.*
- Jouglin Maggy, Robert Céline, Valette Jean-Paul, Gavard Françoise, Quintin-Colonna Françoise, Denoix Jean-Marie. Metalloproteinases and tumor necrosis factor-alpha activities in synovial fluids of horses: correlation with articular cartilage alterations. *Vet. Res.* 31 (2000) 507–515.
- Kapoor Mohit, Martel-Pelletier Johanne, Lajeunesse Daniel, Pelletier Jean-Pierre and Fahmi Hassan. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 7, 33-42 (January 2011) | doi:10.1038/nrrheum.2010.196
- Kashiwagi M, Tortorella M, Nagase H, Brew K TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase1 (ADAM-TS4) and aggrecanase2 (ADAM-TS5) *The Journal of Biological Chemistry* 276:12501-12504.
- Kim Kyoung Soo, Choi Hyun Mi Choi, Lee Yeon-Ah, Choi In Ah, Lee Sang-Hoon, Hong Seung-Jae, Yang Hyung-In, Yoo Myung Chul. Expression levels and association of gelatinases MMP-2 and MMP-9 and collagenases MMP-1 and MMP-13 with VEGF in synovial fluid of patients with arthritis. *Rheumatol Int* (2011) 31:543–547.
- Kokebie Rediet, Aggarwal Rohit, Lidder Sukhwinderjit, Hakimiyani Arnavaz A, Rueger David C, Block Joel A and Chubinskaya Susan. The role of synovial fluid markers of catabolism and anabolism in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and asymptomatic organ donors. *Arthritis Research & Therapy* 2011, 13:R50.

- Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci.* 2008 Nov;1143:123-50.
- Le Goff Benoit, Blanchard Frederic, Berthelot Jean-Marie, Heymann Dominique, Maugars Yves. Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 77 (2010) 201–205.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):487-501.
- Locksley RM, Heinzel FP, Shepard HM, Agosti J, Eessalu TE, Aggarwal BB, Harlan JM. Tumor necrosis factors alpha and beta differ in their capacities to generate interleukin 1 release from human endothelial cells. *J Immunol.* 1987 Sep 15;139(6):1891-5.
- Maksymowych WP. Bisphosphonates Anti-inflammatory properties. *Curr. Med. Chem. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2002,1, 15-28.
- Malfait Anne-Marie, Liu Rui-Qin, Ijiri Kosei, Komiya Setsuro and Tortorella Micky D. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 Prevents Aggrecan Degradation in Osteoarthritic Cartilage. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 277, No. 25, Issue of June 21, pp. 22201–22208, 2002.
- Melani Cecilia, Sangaletti Sabina, Barazzetta Francesca M. Amino-Biphosphonate-Mediated MMP-9 Inhibition Breaks the Tumor-Bone Marrow Axis Responsible for Myeloid-Derived Suppressor Cell Expansion and Macrophage Infiltration in Tumor Stroma. *Cancer Res* 2007; 67: (23). December 1, 2007.
- Norrdin R. W., Kawcak C. E., Capwell B. A., McIlwraith C. W. Subchondral Bone Failure in an Equine Model of Overload Arthrosis. *Bone* Vol. 22, No. 2 February 1998:133–139.
- Ohmura K, Nguyen LT, Locksley RM, Mathis D, Benoist C. Interleukin-4 can be a key positive regulator of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 Jun;52(6):1866-75.
- Park Y, Park JY, Han KH, Kim HS. Serum cytokine levels in chronic hepatitis B patients receiving peginterferon alpha-2a therapy. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012 Oct;11(5):499-506.
- Pasternak B, Aspenberg P. Metalloproteinases and their inhibitors-diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics. *Acta Orthop.* 2009 Dec;80(6):693-703.
- Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone.* 2006 39:443-52.
- Polli M, Caggiano N, Rolando J, Perrone G, Marino M, De Simone E, Chiappe Barbará A. (2012) Variación del nivel de citoquinas en líquido sinovial de equinos con enfermedad articular tratados con bisfosfonatos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias en evaluación.*

- Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis.* 1996 Mar;2(1):70-6.
- Robak T, Gladalska A. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Postepy Hig Med Dosw*1997;51(6):621-36.
- Roşu A, Mărgăritescu C, Stepan A, Muşetescu A, Ene M. IL-17 patterns in synovium, serum and synovial fluid from treatment-naïve, early rheumatoid arthritis patients. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):73-80.
- Sahoo Manoranjan, Ceballos-Olvera Ivonne, del Barrio Laura, and Re Fabio. Role of the Inflammasome, IL-1, and IL-18 in Bacterial Infections. *The Scientific World Journal* (2011) 11, 2037–2050.
- Schett G. Erosive arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S2.
- Simard Nathalie, Boire Gilles, de Brum-Fernandes Artur J and St-Pierre Yves. A novel approach to measure the contribution of matrix metalloproteinase in the overall net proteolytic activity present in synovial fluids of patients with arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2006, 8:R125.
- Stashak Ted S. Adams: Claudicación en el caballo. Inter-Médica, 2004.
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 2005 Jan;38(1):73-83.
- Suzuki Yoshiro, Nishiyama Takayukuki, Hasuda Keiichiro, Fujishiro Takaaki, Niikura Takahiro, Hayashi Shinya, Hashimoto Shingo and Kurosaka Masahiro. Effect of etidronate on COX-2 expression and PGE2 production in macrophage-like RAW 264.7 cells stimulated by titanium particles. *J Orthop Sci* (2007) 12:568–577.
- Takaishi H, Kimura T, Dalal S, Okada Y, D'Armiento J. Joint diseases and matrix metalloproteinases: a role for MMP-13. *Curr Pharm Biotechnol.* 2008 Feb;9(1):47-54.
- Thompson C. C. M., Clegg P. D. and Carter S. D. Differential regulation of gelatinases by transforming growth factor beta-1 in normal equine chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* (2001) 9, 325–331.
- Trumble TN, Trotter GW, Oxford JR, McIlwraith CW, Cammarata S, Goodnight JL, Billingham RC, Frisbie DD. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses. *Am J Vet Res.* 2001 Sep;62(9):1467-77.
- Vargova Viola, Pytliak Marek, and Mechurova Viola. Matrix Metalloproteinases. S.P. Gupta (ed.), *Matrix Metalloproteinase Inhibitors*, Experientia Supplementum 103, 2012.
- Verghese Bincy, Sonu Bhatnagar, Ramchander Tanwar and Jayashree Bhattacharjee. Serum Cytokine Profile in Psoriasis-A Case-Control Study in a Tertiary Care Hospital from Northern India. *Indian J Clin Biochem.* 2011 October; 26(4): 373–377.
- von Rechenberg Brigitte. Subchondral Cystic Lesions in Horses: A Possible Explanation of Their Etiology and Pathogenesis at the Level of Local Mediators, Matrix Degrading Enzymes and Cytokines.1999.

- Westacott Carole I. and Sharif Mohammed. Cytokines in Osteoarthritis: Mediators or Markers of Joint Destruction? *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, Vol 25, No 4 (February), 1996: pp 254-272.
- Xue Meilang, March Lyn, Sambrook Philip N. and Jackson Christopher J. Differential Regulation of Matrix Metalloproteinase 2 and Matrix Metalloproteinase 9 by Activated Protein C. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 56, No. 9, September 2007, pp 2864–2874.
- Yang Shun-Fa, Hsieh Yih-Shou, Lue Ko-Huang, Chu Shu-Chen, Chang I-Chang, Lu Ko-Hsiu. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the expression of urokinase plasminogen activator and inhibitor and gelatinases in the early osteoarthritic knee of humans. *Clinical Biochemistry* 41 (2008) 109–116.