

01/08/15 - Análisis del uso terapéutico de anti-TNF-alfa en 3 equinos con osteoartritis crónica.

Vet. Arg. ? Vol. XXXII ? Nº 328 ? Agosto 2015.

De Simone, Emilio; Perrone, Gustavo; Caggiano, Nicolás; Lastra, Yael; Rubatino, Florencia; Ferretto, Araceli; Diaz, Julieta; Chiappe Barbará, María Angelina.

Resumen

Introducción: La Osteoartritis (OA) es una enfermedad inflamatoria que evoluciona hacia la cronicidad. El TNF- α induce liberación de MMP-2 y MMP-9, que participan de manera central en el proceso inflamatorio. La implicancia biológica del TNF- α como factor desencadenante justifica el tratamiento con un anti-TNF- α . **Objetivos:** Evaluar el desarrollo y uso terapéutico del anti-TNF- α en 3 casos de equinos con osteoartritis crónica. **Materiales y métodos:** i) Se desarrolló de suero anti-TNF- α en conejos. ii) Se trató equinos con anti-TNF- α y se evaluó el score clínico pre y post tratamiento. iii) En nuestro laboratorio se evaluó la actividad MMP, IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α y óxido nítrico en el líquido sinovial. **Resultados:** En todos los casos se observó mejoría clínica y una disminución significativa, e incluso valores de cero, en los perfiles de MMPs 2 y 9. Se presentó una mejoría notable en los perfiles de TNF- α , IL-4, IL1- α e IL-6 llevando estos valores a los niveles basales considerados normales. Mientras que respecto al óxido nítrico los resultados fueron variables. **Conclusiones:** La terapia anti-TNF- α resultó alentadora en cuanto a que los animales tratados mejoraron su score clínico y biomarcadores moleculares articulares, permaneciendo esta mejoría durante el tiempo de la experiencia (60 días).

Palabras clave: terapia anti-TNF- α , equinos, osteoartritis, citoquinas, metaloproteasas.

Analysis of the therapeutic use of anti -TNF -alpha in three horses with chronic osteoarthritis.

Summary

Background: Osteoarthritis (OA) is an inflammatory disease of slow evolution to chronic nature. TNF- α induces the release of MMP-2 and MMP-9, both with a central role in the inflammatory process. The biological implications of TNF- α in the OA pathogenesis justify the treatment with an anti-TNF- α antibody. **Objective:** Was to evaluate the development and therapeutic potential use of anti-TNF- α in 3 cases report of the disease. **Materials and methods:** i) development of anti-TNF- α serum in rabbits. ii) 3 horses were treated with anti-TNF- α and treatment response was

assessed with a clinical score. iii) MMP activity, IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α and nitric oxide in synovial fluid were evaluated. *Results:* the three animals improved their clinical score, and MMPs 2 and 9, TNF- α , IL-4, IL-1 α and IL-6 values were significant decrease to baseline normal levels. While nitric oxide results were variable. *Conclusions:* the anti-TNF- α treated animals improved their clinical score and joint molecular biomarkers, remaining this improvement during the time of the experiment (60 days). *Keywords:* anti-TNF α therapy, horses, osteoarthritis, cytokines, metalloproteinases.

Dirección postal: Cátedra de Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias ? UBA. Av. Chorroarín 280 ? C1427CWO ? Buenos Aires ? Argentina.

Dirección electrónica: mach@fvet.uba.ar

Introducción.

La Osteoartritis (OA) es una enfermedad inflamatoria que evoluciona inicialmente con periodos de actividad de fase aguda produciendo, en la reincidencia, cambios degenerativos y pérdida del cartílago articular, instalándose así el cuadro en forma crónica. En el equino deportivo la OA es la principal causa de claudicación y se produce, generalmente, como consecuencia del sobre entrenamiento. Esta enfermedad produce importantes pérdidas económicas, ya que ocasiona el alejamiento temprano de la competencia deportiva en forma temporaria o definitiva (Kidd *et al.*, 2010).

La enfermedad se inicia con la aparición de micro traumas reiterados que no se resuelven y desencadenan el proceso inflamatorio articular. El daño articular se produce como consecuencia de diversos mecanismos que se ponen en marcha en el proceso inflamatorio. El hueso subcondral subyacente participa del proceso inflamatorio mediante el incremento de la actividad resorptiva osteoclástica causada por la alteración de la capacidad biomecánica del cartílago (Hulejova *et al.*, 2007). Los condrocitos aumentan la liberación de factores catabólicos los cuales contribuyen al daño articular y óseo (Sanchez Naranjo *et al.* 2011). Además, los condrocitos liberan mediadores de la inflamación tales como citoquinas, metaloproteasas (MMPs) y óxido nítrico (Attur *et al.*, 2002) (Dean 1991). En el líquido sinovial aparecen en la fase inicial de la fisiopatología de la OA macrófagos y neutrófilos que secretan citoquinas proinflamatorias: IL-1 α , TNF- α e IL-6 (Benito *et al.* 2005) (Bondenson *et al.*, 2006) (Kapoor *et al.*, 2011) (Stow *et al.*, 2009). Las citoquinas inflamatorias inducen liberación de MMPs (Fernandes *et al.*, 2002) (Hulejova *et al.*, 2007) y agregasas (Pratta *et al.*, 2003) (Bondenson *et al.*, 2008) (Nagase *et al.*, 2003), que participan de manera central en la degradación de la matriz extracelular que desencadena la destrucción del cartílago articular (Galleguillos *et al.* 2013).

Las MMP involucradas en este proceso son proteasas que actúan sobre la matriz extracelular en procesos relacionados con el desarrollo, la regeneración y la enfermedad. Varios tipos de MMPs han sido descritos (Massova *et al.*, 1998) siendo la MMP-2 (72kDa) y la MMP-9 (92kDa) con actividad gelatinasa (Sternlicht *et al.*, 2001) (Nagase *et al.*, 1999), las que actúan sobre los productos de degradación del colágeno (Overall *et al.*, 2007) y son las que más se han relacionado con los procesos de osteoartritis. Hasta el momento se ha asociado, de manera directa, la sobreexpresión de las MMPs con los niveles de TNF- α e IL-1 β y en muchos casos también mediado este proceso por el factor NF κ B (Amos *et al.*, 2006). Asimismo la sobreexpresión de MMP-2 y 9 es índice de un pronóstico desfavorable en el cáncer, aumentando la posibilidad de generar metástasis, dada la capacidad de las MMPs de degradar el colágeno tipo IV localizado en las membranas basales e inducir la expresión de factores angiogénicos. (Cascales Agosto *et al.*, 2010). Su actividad aumentada también se ha asociado a procesos neurodegenerativos (Moore *et al.*, 2012).

Respecto a la citoquinas, el TNF- α es una citoquina pleotópica clave en los procesos inflamatorios y un mediador proinflamatorio que a su vez potencia todo el proceso, incrementando la permeabilidad vascular e induciendo al endotelio a expresar moléculas de adhesión que favorecen la diapédesis de leucocitos (Apostolaki *et al.*, 2010). El TNF- α , a pesar de encontrarse incrementado en las fase muy temprana de la artritis pero en muchos casos se dificulta la instantánea detección de su actividad elevada, juega un rol central en los procesos catabólicos crónicos del cartílago (Goldring *et al.*, 2004). El TNF- α promueve la liberación de otras pro-citoquinas inflamatorias, las interleuquinas (ILs) IL4, IL-1 β , IL6, IL8, y estimula la producción de proteasas, leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas y proteínas de fase aguda. La IL-1 β es producida principalmente por células del linaje monocito-macrófago y además de encontrarse elevada de manera local juega un papel importante en la patogenia de la OA, se encuentra elevada de manera sistémica ocasionando fiebre hipertermia y otras respuestas. La IL-1 β participa, también, en la cascada inflamatoria estimulando la síntesis de TNF- α , IL-6, IL-8, PGE2 y Leucotrieno B4. Por otra parte la IL-6 se encuentra involucrada en la degradación del cartílago articular produciendo degradación de proteoglicanos e induciendo proliferación de condrocitos (Jikko *et al.*, 1998), además juega un rol importante en la inflamación y estimula la liberación de Proteína C reactiva (Kishimoto 2006).

Se aplican numerosos tratamientos para las OA que se basan en la utilización de antiinflamatorios esteroideos y AINES. Estos tratamientos si bien desinflan y mejoran transitoriamente la claudicación, generan cambios metabólicos en el hueso y cartílago que llevan a un mayor deterioro de la articulación. Esto llevó a probar

una nueva forma de terapia para las OA. Las terapias biológicas de anticuerpos han presentado un gran avance en la última década en el control de artritis de diferentes etiologías. Por lo tanto la posibilidad de interrumpir el ciclo inflamatorio bloqueando la actividad del TNF- α resulta una terapia sumamente alentadora por los excelentes resultados logrados. En medicina humana se ha utilizado, con éxito, la terapia con anticuerpos en diversas enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide (Maini et al., 1999) y la espondilitis anquilosante (Braun *et al.*, 2000 y 2002), como así también se ha usado en otras enfermedades inflamatorias del aparato digestivo como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa (Delaporte *et al.*, 2013) (Present *et al.*, 1999). Por otra parte han sido descriptos escasos efectos adversos como consecuencia de la terapia con anti-TNF- α entre los que se encuentran el desarrollo de inflamación leve y fenómenos de hipersensibilidad (Braun et al., 2002b). La implicancia biológica del TNF- α en las artritis y otros tipos de procesos reumáticos sugieren el potencial terapéutico de utilizar un anti-TNF- α . Sin embargo estas terapias aun no han podido ser probados en especies de interés veterinario debido al alto costo que implicaría su tratamiento.

El TNF- α soluble corresponde a una proteína de 17 KDa, conformada por 157 aminoácidos, que posee capacidad inmunogénica por lo tanto es muy posible desarrollar anticuerpos contra esta molécula al inmunizar con la misma o con péptidos relacionados. Nuestra propuesta en este trabajo ha sido desarrollar un suero anti-TNF- α en conejos y estudiar el tratamiento de inhibición del TNF- α en artritis equinas. La terapia anti-TNF- α ha resultado de utilidad en procesos diversos de inflamación articular, sobre todo aquellos procesos que tienden a la cronicidad y que afectan al cartílago y al hueso yuxtaarticular (Feldman 2001 y 2002). La terapia anti-TNF- α inhibe la producción de IL-1 β y de otras citoquinas proinflamatorias cortando de esta manera una red de citoquinas inflamatorias desde el inicio e inhibiendo indirectamente la actividad de las principales MMPs involucradas.

Materiales y métodos.

1) Desarrollo de suero anti-TNF- α en conejos, el suero anti TNF- α se desarrolló mediante inmunización de conejos con un péptido de 20 aa correspondiente al dominio de unión del TNF- α equino a su receptor (aa 93-112). Se realizaron cuatro inmunizaciones del péptido unido a la proteína carrier KLH a los días 0, 7, 21 y 28 y posteriormente se realizó el sangrado de los conejos para extraer el suero. El suero de los conejos fue titulado por ELISA. Y luego purificadas las inmunoglobulinas mediante cromatografía de afinidad con proteína A. Asimismo se esterilizó con jeringa filtrando con filtro de 0,22 μ m.

2) Administración de anti-TNF- α en equinos y evaluación de score clínico

Previo a la experiencia se seleccionaron los animales mediante un score clínico cuyo valor se calculaba con: i) Grado de claudicación (0-5) ii) Sensibilidad a la palpación (0-3), iii) Flexión forzada (0-3), iv) Volumen de líquido sinovial extraído (0-3), v) color (0-5) y vi) viscosidad (0-4). Se seleccionaron animales con enfermedad articular no tratados (score clínico > 5). Además los animales presentaban historia de episodios recurrentes de OA y se les realizó evaluación radiográfica previa y posterior.

A los animales se les inyectó por única vez 1mg de IgG de conejo con actividad anti TNF- α por vía intraarticular.

Se tomaron muestras de líquido sinovial de ambos tarsos previo a la dosificación con anti-TNF- α y a los 30 días posteriores.

3) Análisis de la actividad MMP en zimografía con geles de poliacrilamida:

La zimografía de geles de acrilamida con el agregado de gelatina se realizó como se describiera previamente (Gruberg et al., 1996) con ligeras modificaciones utilizando el sistema tetracell de BioRad. La concentración de acrilamida en los geles fue de 10% con el agregado de gelatina de piel porcina (Sigma) (2mg por mL de gel) y SDS al 0,1%. Antes de su aplicación, las muestras se desnaturalizan por calentamiento a 90°C durante 4 minutos. Se realiza la corrida y los geles se lavan dos veces, durante 45 minutos, con Tris 50mM, 5 mM CaCl₂, 150 mM NaCl pH 7,4, que contiene Triton X-100 a] 2,5% (y/y), para eliminar el SDS presente en el gel. a temperatura ambiente. A continuación el gel se incubó durante 24 horas con tampón Tris 50mM, pH 7,5, NaCl 0,1M, CaCl₂ 10mM, Triton X-100 0,1% (y/y), NaN₃ 0,02% (p/v), en el cual la actividad de gelatinasa es máxima. Posteriormente, los geles se tiñen con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) en metanol:ácido acético:agua (5:1:5;) El desteñido del gel se realiza por lavados con ácido acético al 7,5% (v/v) y metanol al 20% (v/v). La actividad gelatinolítica se detecta por la tinción negativa debido a la degradación de la gelatina presente en aquellas zonas del gel donde se localizan las metaloproteinasas. Los resultados de la actividad de MMPs se expresan como porcentaje de MMPs Standard. Las imágenes de las zimografías fueron adquiridas con cámara fotográfica Nikon coolpix L26 y el análisis densitométrico se realizó con el programa Image J. Las MMPs se expresaron como % respecto a una muestra patrón.

4) ELISA de IL-1 β , IL-4, IL-6 y TNF- α La concentración de citoquinas (IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α) en los sobrenadantes articulares fue determinada mediante kit de ELISA comercial BD OptEIA (BD, Biosciences, San Diego, Ca, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones fueron determinadas

mediante curva patrón correspondiente a la respectiva citoquina recombinante que fue suministrada por el kit. Para esta determinación se utilizan 100 microlitros de líquido sinovial y anticuerpos monoclonales provistos por el kit para captura y detección. Los anticuerpos de detección son biotinilados y utilizan el sistema avidina peroxidasa con sustrato TMB (Biosciences, San Diego, Ca, USA). La placa se lee a una longitud de onda primaria de 450nm en lector de microplacas Rayto 2100C (China).

Resultados.

El resumen de los resultados se expone en la tabla 1. La terapia anti-TNF- α resultó alentadora en cuanto a que los animales que presentaron tratamiento mejoraron su score clínico a los 30 días. En cuanto a los perfiles de citoquinas y MMPs se observó mejorías manifiestas post tratamiento a los 30 post tratamiento y se mantuvieron estas mejorías más allá de los 60 días. En los resultados post tratamiento puede observarse un manifiesto descenso e incluso ausencia de la MMP9 que se había detectado en una articulación pretratamiento. Y en cuanto a la MMP 2 se observó descenso o valores similares si estos eran normales. Respecto a los niveles de citoquinas el resultado inhibitorio del anti-TNF- α sobre las ILs fue contundente, encontrándose valores dentro del marco normal en casi todas las muestras post tratamiento.

En cuanto a las RX no se observaron modificaciones manifiestas, ya que en general, una vez instalado el daño óseo este no se revierte rápidamente. Por todo esto el tratamiento con anti-TNF- α parece ser útil para aliviar la inflamación de tejidos blandos articulares y el dolor instalado en forma crónica.

Articulación	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	MMP-2 (% de control)	MMP-9 (% de control)	Ox. Nítric. (μ Mol/L)	Score clínico	Proteínas (g/dl)
Tarso derecho	75.52	326.48	16.81	68.74	402.71	0	17.15	5	-
Tarso izquierdo	83.4	372.45	20.53	61.9	544.96	0	17.7	3.5	-
Tarso derecho	32.65	127.53	3.36	48.78	86.09	0	9.49	4.5	0.15
Tarso izquierdo	27.99	125.75	2.6	48.25	96.02	0	0	2.5	1.12
Tarso derecho	84.93	385.22	21.23	67.97	220.18	0	0	8	1.21
Tarso izquierdo	79.44	341.26	16.76	58.81	229.16	0	16.72	8	1.02
Tarso derecho	32.74	134	3.73	49.93	98.36	7.4	10.39	3.5	2.1
Tarso izquierdo	37.04	147.92	3.21	59.52	97.92	0	0	4.75	1.1
Tarso derecho	74.46	318.7	15.73	54.17	380.43	0	16.29	4.5	1.07
Tarso izquierdo	80.41	351.86	17.81	55.89	329.09	0	0	4.5	0.82
Tarso derecho	29.39	92.49	4.7	46.76	85.77	0	0	2	0.91
Tarso izquierdo	29.92	105.4	2.02	50.24	83.14	0	0	2.5	2.12

Tabla 1. Resultado del score clínico y los biomarcadores moleculares en el líquido sinovial de los equinos evaluados. **Conclusión**

El uso de este tipo de terapias puede ser muy alentador ya que la terapia convencional con antiinflamatorios esteroideos o no esteroideos reducen el dolor pero son inefectivos para controlar la actividad de la enfermedad o modificar el curso de la misma. El bloqueo de TNF- α es alentador y se ha convertido en una estrategia que hasta el momento solo ha sido eficaz mediante terapia biológica con

anticuerpos.

Bibliografía.

AMOS N, LAUDER S, EVANS A, FELDMANN M, BONDESON J. Rheumatology; 45: 1201-9. 2006. Adenoviral gene transfer into osteoarthritis synovial cells using the endogenous inhibitor I β B β reveals that most, but not all, inhibitory and destructive mediators, are NF κ B dependent.

APOSTOLAKI M, ARMAKA M, VICTORATOS P, KOLLIAS G. Curr Dir Autoimmun.;11:1-26. 2010. Cellular Mechanisms of TNF Function in Models of Inflammation and Autoimmunity.

ATTUR MG, DAVE M, AKAMATSU M, KATOH M, AMIN AR. Osteoarthritis Cartilage; 10:1-4. 2002. Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine.

BENITO MJ, VEALE DJ, FITZGERALD O, VAN DEN BERG WB, BRESNIHAN B. Ann Rheum Dis; 64:1263-1267. 2005. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis.

BONDESON J, WAINWRIGHT SD, LAUDER S, AMOS N, HUGHES CE. Arthritis Res. Ther.;8: R187. 2006. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis.

BONDESON J, WAINWRIGHT S, HUGHES C, CATERSON B. Clin Exp Rheumatol; 26: 139-145. 2008. The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review.

BRAUN J, XIANG J, BRANDT J, MAETZEL H, HAIBEL H, WU P, KOHLER S, RUDWALEIT M, SIEGERT S, RADBRUCH A, THIEL A, SIEPER J. Ann Rheum Dis;59(suppl 1):i85-9. 2000. Treatment of spondylarthropathies with antibodies against tumour necrosis factor α : first clinical and laboratory experiences.

BRAUN J, SIEPER J, BREBAN M, COLLANTES-ESTEVEZ E, DAVIS J, INMAN R, MARZO-ORTEGA H, MIELANTS H. Ann Rheum Dis.;61:51-60. 2002a. Anti-tumour necrosis factor α therapy for ankylosing spondylitis: international experience.

BRAUN J1, BRANDT J, LISTING J, ZINK A, ALTEN R, GOLDBER W,

GROMNICA-IHLE E, KELLNER H, KRAUSE A, SCHNEIDER M, SÖRENSEN H, ZEIDLER H, THRIENE W, SIEPER J. Lancet. 359:1187-93. 2002b. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab? a double-blind, placebo-controlled multicenter trial.

BURRAGE PS, MIX KS, BRINCKERHOFF CE. Front. Biosci.; 11:529-543. 2006. Matrix Metalloproteinases: role in arthritis.

CASCALES ANGOSTO M, ÁLVAREZ-GÓMEZ JA. An R Acad Nac Farm. 76 (1): 59-84. 2010. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer.

CLEGG PD, BURKE RM, COUGHLAN AR, RIGGS CM, CARTER SD. Equine Vet J. 29 (5): 335-342. 1997a. Characterization of equine matrix metalloproteinase 2 and 9; and identification of the cellular sources of these enzymes in joints.

CLEGG PD, COUGHLAN AR, RIGGS CM, CARTER SD. Equine Vet J.; 29(5): 343-348. 1997b. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in equine synovial fluids.

DELEPORTE A, VIENNOT S, DUPONT B, GILLETTA C, ALLAIRE M, PRÉVOST F, REIMUND JM. Cytokine and Mediator Research. 5, 11-31. 2013. Efficacy of anti-TNF-alpha monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease treatment International Journal of Interferon.

FELDMAN M., MAINI R. 19: 163-196. 2001. Anti-TNF alpha therapy in rheumatoid Arthritis: What have we learned. Ann Rev Immunology.

FELDMAN M. Nat Rev Immunol. 2: 364-371. 2002. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis.

GALLEGUILLOS M, CARRILLO R, FLORES G, ADARMES H. Avances en Ciencias Veterinarias; 28, 1. 2013. Metaloproteinasas y Osteoartritis.

GRUBER BL, SORBI D, FRENCH DL, MARCHESE MJ, NUOVO GJ, KEW RR, ARBEIT LA. Clin Immunol Immunopathol. 78: 161-71. 1996. Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker.

HULEJOVA H., BARESOVA V, KLEZL Z, POLANSKA M, ADAM M, SENOLT L. Cytokine.; 38, 151-156. 2007. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone.

JIKKO A, WAKISAKA T, IWAMOTO M, HIRANUMA H, KATO Y, MAEDA T, FUJISHITA M, FUCHIHATA H. Cell Biol Int. 22:615-621. 1998. Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures.

KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, PELLETIER JP, FAHMI H. Nature reviews Rheumatology 7, Issue: 1, 33-42.. 2011. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis.

KIDD JA, FULLER C, BARR. Equine Veterinary Education; 13 (3), 160-168. 2001. Osteoarthritis in the horse.

KISHIMOTO T. Arth Res Ther; 8 (2): 1-6. 2006. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine.

MAINI R, ST CLAIR EW, BREEDVELD F, FURST D, KALDEN J, WEISMAN M, SMOLEN J, EMERY P, HARRIMAN G, FELDMANN M, LIPSKY P. Lancet. 354:1932-9. 1999. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group.

MASSOVA I, KOTRA LP, FRIDMAN R, MOBASHERY S. FASEB J; 12: 1075-95. 1998. Matrix metalloproteinases: structure, evolution and diversification.

MOORE CS, CROCKER SJ. Am J Pathol; 180: 12-6. 2012. An alternative perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology.

MURPHY G, KNAUPER V, ATKINSON S, BUTLER G, ENGLISH W, HUTTON M, STRACKE J, CLARK I. Arthritis Res, 4(3):S39-S49. 2002. Matrix metalloproteinases in arthritic disease.

NAGASE H, WOESSNER JF. J Biol Chem. 274:21491-4. 1999. Matrix Metalloproteinases.

NAGASE H, KASHIWAGI M. Arthritis Res Ther; 5: 94-103. 2003. Aggrecanases and cartilage matrix degradation.

OVERALL CM, BLOBEL CP. Nat Rev Mol Cell Biol, 8:245-257. 2007. In search of partners: linking extracellular proteases to substrates.

PRATTA MA, SCHERLE PA, YANG G, LIU RQ, NEWTON RC. Arthritis Rheum. 48:

119-33. 2003. Induction of aggrecanase-1 (ADAM-TS4) by interleukin-1 occurs through activation of constitutively produced protein.

PRESENT DH, RUTGEERTS P, TARGAN S, HANAUER SB, MAYER L, VAN HOGEZAND RA, PODOLSKY DK, SANDS BE, BRAAKMAN T, DEWOODY KL, SCHAIBLE TF, VAN DEVENTER SJ. N Engl J Med.. 340:1398-405. 1999. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease.

SÁNCHEZ NARANJO JC, LÓPEZ ZAPATA DF. Iatreia. 24 167-78. 2011. Fisiopatología celular de la osteoartritis: el condrocito articular como protagonista.

STERNLICHT MD, WERB Z. Annu Rev Cell Dev Biol. 17:463-516. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior.

STOW JL, LOW PC, OFFENHÄUSER C, SANGERMANNI D. IMMUNOBIOLOGY. 214, 601-612. 2009. Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators.

TRUMBLE TN, TROTTER GW, OXFORD JR, MCILWRAITH CW, CAMMARATA S, GOODNIGHT JL, BILLINGHURST RC, FRISBIE DD. Am J vet Res. 62, 1467-1477. 2001. Synovial fluid gelatinase concentrations and matrix metalloproteinase and cytokine expression in naturally occurring joint disease in horses.
