

Avaliação das metaloproteínas de matriz no sangue de reprodutores caprinos naturalmente infectados com Artrite Encefalite Caprina na Região Semiárida do Brasil

Evaluation of Matrix Metalloproteinases in Blood from Buck Naturally Infected with Caprine Arthritis Encephalitis in Semiarid Region of Brazil

Rosivaldo Quirino Bezerra Júnior¹, Ângela Maria Xavier Eloy³, Elizângela Pinheiro Pereira², João Ricardo Furtado³, Kelma Costa de Souza¹, Adriano Rodrigues Lima³, Raymundo Rizaldo Pinheiro³, Alice Andrioli³ & Maria Fátima da Silva Teixeira¹

ABSTRACT

Background: Studies have attempted to understand the importance of metalloproteinase (MMPs) in the pathogenesis of diseases caused by lentiviruses, being the human immunodeficiency virus (HIV) the most investigated. Despite advances in studies with MMPs in others diseases, research correlating the presence and activity of gelatinases in animals affected by caprine arthritis encephalitis virus (CAEV), a lentiviruses, are incipient and there is a need for research aiming to understand the dynamic of these enzymes in animals infected and its relation to pathological condition. The aim of this study was to evaluate the presence and activity of the MMPs in blood serum of chronically infected bucks by CAEV.

Materials, Methods & Results: The experiment was constituted by two groups (n = 5 each group). The first one was composed of five naturally infected bucks (4-5 years) and second group constituted of five seronegative bucks (3-4 years) for CAE. Serology was performed using the Western Blotting (WB) and confirmed by Polymerase Chain Reaction (PCR). These bucks belong to the experimental flock at Embrapa Goats and Sheep and the seropositive bucks were confirmed for CAE in the first two years. Blood samples were collected by puncturing the jugular vein from animals and evaluated by zymography (SDS-PAGE) using gelatin as substratum. Clinical examination was performed by evaluating the temperature (T), cardiac frequency (FC), respiratory frequency (FR) and clinical articular index (IAC). The IAC was calculated by measuring the circumference of carpal joint and metacarpal bone height (difference between greater extent carpal and metacarpal lesser extent). In infected and control groups were found molecular mass bands of 66 kDa (MMP-2), 72 kDa (pro-MMP-2), 86 kDa (MMP-9) and 92 kDa (pro-MMP-9). The correlation analysis between respiratory frequency (RF), cardiac frequency (CF) and temperature (T°C), with MMPs activity (pro-MMP-2 and MMP-2), showed a negative and not significant correlation for RF ($r = -0.1285$) and T ($r = -0.2588$) and positive for CF ($r = 0.01038$), but not significant. Using the gel densitometry analysis it was observed higher activity ($P < 0.05$) of the pro-MMP-2 and MMP-2 in seropositive group.

Discussion: The caprine arthritis encephalitis (CAE) is a multisystem infectious disease that causes production losses when present in flocks, especially the occurrence of arthritis. The higher activity of the MMPs (MMP-2 and MMP-9) in infected group to CAE suggests a role of these proteases in the chronic inflammatory process in goats. It can be explained by the fact that matrix metalloproteinases are regarded to be the key role molecules in inflammation and are involved in pathophysiological remodeling of the vascular wall. The variable presence of active and latent forms of MMP-9 in our study combined to an increased in the seropositive group activity corroborates the findings of other studies. In this study, only one seropositive animal demonstrated apparent arthritis although showed similar MMPs (MMP-2 and MMP-9) activity to others in the seropositive group, leads us to suggest that all the seropositive animals were stricken with an inflammatory process. Although there was statistical difference between the groups regarding to MMPs activity, this was not reflected on clinical symptoms in chronically infected animals, requiring further studies on this subject.

Keywords: CAEV, zymography, metalloproteinase, MMP-2, MMP-9.

Descritores: CAEV, zimografia, metaloproteínase, MMP-2, MMP-9.

Received: 18 September 2014

Accepted: 15 January 2015

Published: 6 February 2015

¹Laboratório de Virologia (LABOVIR). Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. ²Departamento de Ciência Animal, Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral, CE. ³Empresa de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Caprinos e Ovinos), Sobral, CE. CORRESPONDENCE: R.Q. Bezerra Júnior [junior_medvet2009@hotmail.com - Fax: +55 (85) 3101-9849]. LABOVIR, Faculdade de Veterinária, UECE, Avenida Dr. Silas Muguba, n. 1700, Campus do Itaperi. CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil.

INTRODUÇÃO

As metaloproteinases de matriz (MMPs) pertencem à família das endopeptidases zinco-dependentes responsável pela degradação e remodelagem dos componentes da matriz extracelular envolvidos em processos fisiológicos normais e associados a muitas enfermidades [21,27]. Foram identificadas pelo menos 24 MMPs em mamíferos, podendo ser agrupadas em cinco classes: colagenases, gelatinases, estromelisinases, metaloproteinases tipo membrana (MT-MMPs) e outras enzimas. As gelatinases estão presentes nas formas latente e ativa (MMP2 e MMP-9), sendo capazes de degradar colágeno, gelatina, agregcano, laminina, fibronectina, elastina e componentes secundários da matriz extracelular (ME) [24].

O processo inflamatório crônico e consequente ativação das MMPs têm efeito deletério no organismo, sendo observado em patologias crônicas e degenerativas, cujos sintomas são comumente observados em doenças causadas por vírus pertencentes ao gênero Lentivirus. Este gênero, além do vírus da artrite encefalite caprina (CAEV) e Maedi Visna vírus (MVV), contém o vírus da imunodeficiência viral bovina (BIV), humana (HIV-1, HIV-2), felina (FIV) e símia (SIV), como também o vírus da anemia viral equina (AIEV) e o lentivirus puma [13].

Estudos têm tentado compreender a importância das MMPs na patogenia de enfermidades causadas por lentivírus, sendo o HIV o mais investigado. Porém, apesar dos avanços nos estudos com as MMPs em outras doenças, pesquisas correlacionando a atividade das gelatinases em animais infectados pela CAE são incipientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e atividade das MMPs (MMP-2 e MMP-9) no soro sanguíneo de reprodutores cronicamente infectados pela CAE.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização

O experimento foi conduzido entre os meses de junho e outubro (2013) nas instalações da EMBRAPA Caprinos e Ovinos, localizada no município de Sobral (3°45'0,5" Sul, 40°20'45,8" Oeste, 111 m altitude), CE, Brasil. A região semiárida é caracterizada por um clima quente e seco, com precipitação média anual de 713 mm e temperatura média de 27-35°C.

Animais

O trabalho foi constituído de dois grupos, sendo cinco animais por grupo, pertencentes ao rebanho experimental da Embrapa. O primeiro foi composto de animais das raças Saanen (n = 2) e Anglo-Nubiana (n = 3), com idade variando entre 4-5 anos, naturalmente infectados com o CAEV. O segundo grupo consistiu também de animais das raças Saanen (n = 2) e Anglo-Nubiana (n = 3), com idade entre 3-4 anos, soronegativos para a CAE. A comprovação da presença e ausência do vírus foi realizado através do *Western Blotting* (WB) [23] e confirmada pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) [1], ao longo dos dois primeiros anos. Os grupos experimentais foram alojados em baias, e mantidos em sistema semi-intensivo em uma área isolada por cercas duplas, recebendo concentrado balanceado, capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), sal mineral e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos a exame clínico, no qual foram avaliadas a temperatura (T), frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e índice articular clínico (IAC). O índice articular foi calculado pela medição da circunferência das articulações carpianas e ossos metacarpianos e calculada a diferença entre a maior medida do carpo e a menor do metacarpo (Tabela 1) [22]. Para avaliação do IAC foi usado como padrão os seguintes valores: para machos caprinos puros com idade acima de 3.1 anos é considerado normal medida até 6.6 cm; suspeito entre 6.7-7.1 e com provável problema acima de 7.1 cm; para mestiços com idade de 3.1 anos é considerado normal até 6.2 cm, suspeito entre 6.3-6.8 cm e com provável problema acima de 6.8 cm) [22].

Zimografia

Para avaliação das proteínas do sangue foram realizadas quatro coletas mensais, sendo escolhida uma amostra aleatória de cada mês para a realização da zimografia. O sangue foi coletado por venopunção da jugular em tubos sem EDTA, sendo centrifugados posteriormente a 1,500 x g durante 10 min a 4°C. Depois, o sobrenadante foi transferido para microtubos eppendorf e armazenados a -80°C.

A concentração de proteína total foi estimada usando método de Bradford [2], utilizando a albumina sérica bovina (BSA)¹ como padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para realização da eletroforese 1D utilizou-se, aproximadamente, 20 µg de cada amostra em

cada poço em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio 12,5% (SDS-PAGE) contendo 0,2% de gelatina porcina¹ [16,18]. Após a eletroforese, os géis foram lavados por 40 min. em tampão de renaturação (2,5% de Triton X-100) e incubados durante a noite em tampão de desenvolvimento (50 mM Tris, pH 7,8-8,0 e NaCl 150 mM e CaCl₂ 10 mM) à 37°C em agitação constante. Sob estas condições, as gelatinases presentes nas amostras foram renaturadas e ativadas. A presença de zonas brancas de lise é uma indicação da atividade de degradação da gelatina revelada pela coloração com 0,05% de Coomassie Brilliant Blue² R-250 (CCB)² em metanol a 50% e ácido acético a 10% durante a noite. A análise densitométrica dos géis foi realizada utilizando o gel software Analyzer³. Na

corrida eletroforética foi utilizado o padrão LMW-SDS marker kit⁴ para calibração.

Análise estatística

A intensidade das bandas (pixel) mostrada no zimograma foi testada para normalidade utilizando o teste estatístico Kolmogorov-Smirnov. Depois de confirmada a normalidade dos dados, o teste *t* de Student foi aplicado para as amostras contendo atividade da MMP-2, adotando-se a significância estatística de $P < 0.05$. Como o pressuposto da homogeneidade da variância não foi observado para as amostras com atividade da pró-MMP-2, foi aplicada a transformação \log_{10} . O programa estatístico utilizado foi o Statistical Analysis Systems (SAS versão 9.2[®])⁵.

Tabela 1. Classificação do índice articular clínico (IAC) dos grupos soropositivo e soronegativo para CAE de reprodutores caprinos da Região Semiárida do Brasil.

Raça/Identificação	IAC (cm)		
	Normal	Suspeito	Provável problema articular
Puro corte/24 (+)	-	-	7,5
Puro corte /263 (+)	5,0	-	-
Puro corte /1098 (+)	4,5	-	-
Puro leite/1677 (+)	5,4	-	-
Puro leite/1690 (+)	6,0	-	-
Puro corte /974 (-)	5,5	-	-
Puro corte /1120 (-)	6,0	-	-
Puro corte /237 (-)	6,0	-	-
Puro leite/310 (-)	5,5	-	-
Puro leite/366 (-)	6,5	-	-

RESULTADOS

Nos grupos experimental e controle, encontraram-se as massas moleculares de 66 (MMP-2), 72 (pro-MMP-2), 86 (MMP-9) e 92 kDa (pro-MMP-9) [Figura 1]. Em alguns animais foram encontradas proteínas de alto peso molecular (100-138 kDa), não sendo estas, no entanto, o foco deste estudo.

No grupo soropositivo a atividade da pro-MMP-2 ($P = 0.0025$) e MMP-2 ($P = 0.0001$) foi elevada significativamente ($P < 0.05$) em relação ao grupo controle (Figura 2). A pro-MMP-9 e MMP-9 foram detectadas de forma variável em algumas amostras

infectadas e não infectadas (controle) e, apesar deste comportamento, mostraram uma evidente elevação da atividade no grupo soropositivo.

A atividade das MMPs no grupo soropositivo avaliada através da análise densitométrica, foi caracterizada pelo aumento da atividade e maior número de picos em comparação ao grupo controle (Figura 3). Foi observada uma correlação negativa entre as MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) e a FR ($r = -0.1285$) e T ($r = -0.2588$); e, positiva para FC ($r = 0.01038$), porém não significativas ($P < 0.05$). A correlação do IAC ($r = -0.7393$) com as MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) foi negativa.

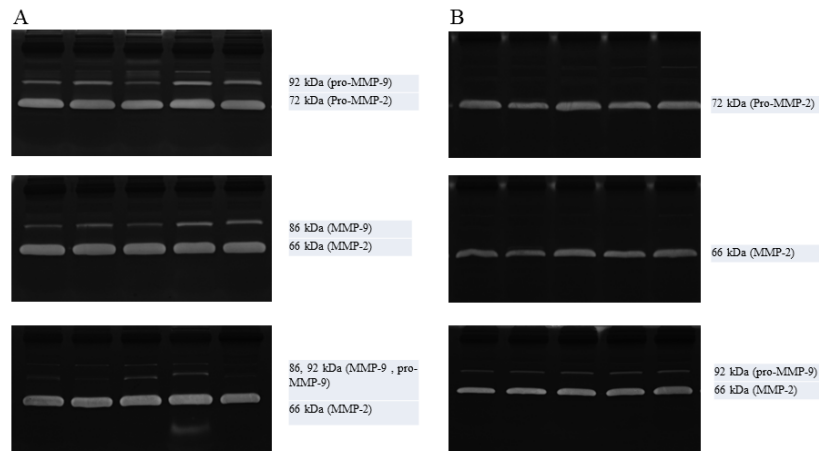


Figura 1. Zimograma representativo das amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos dos grupos soropositivo (A) e soronegativo (B) para CAE.

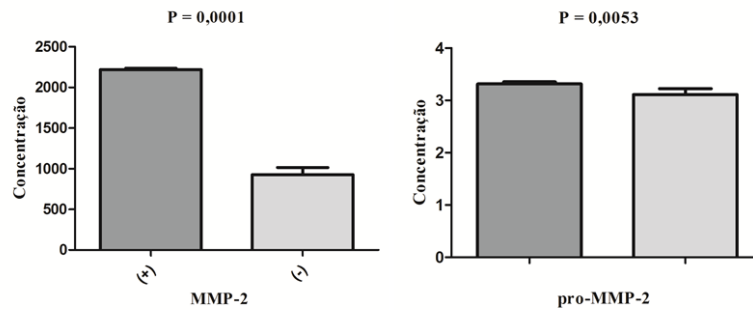


Figura 2. Quantificação das formas latente e ativa da MMP2 de amostras de soro sanguíneo de reprodutores caprinos soropositivos (n = 5) e soronegativos (n = 5) para CAE.

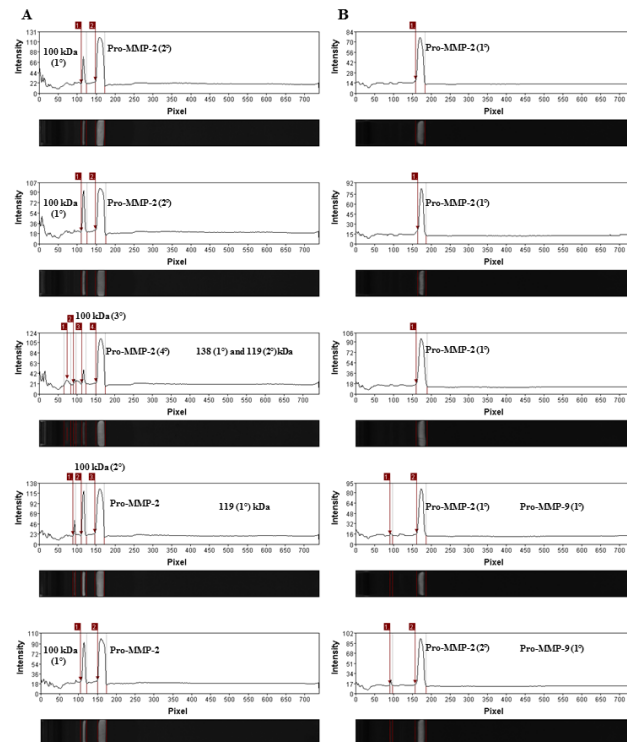


Figura 3. Densitometria dos zimogramas mostrando a diferença da atividade das MMPs entre os reprodutores caprinos soropositivos (A) e soronegativos (B) para CAE. Bandas evidenciadas (setas).

DISCUSSÃO

A CAE é uma doença infectocontagiosa, multissistêmica, que causa perdas na produção quando presente nos rebanhos, principalmente na ocorrência de artrite. A análise dos géis evidenciou a presença das formas latente e ativa da MMP-2 e MMP-9, em animais sadios e infectados pela CAE, mas com elevada atividade nos animais infectados. Achados similares sobre a MMP-2 foram obtidos diante da proposta que a estimulação da MMP-2 pode contribuir para um ambiente neurodegenerativo na degradação fibronectina da ME e colágeno tipo IV [19].

Em outros estudos foi relatado uma elevação da atividade da MMP-2 e MMP-9 em amostras de cérebro de pacientes infectados com HIV ou gatos com FIV, sugerindo que estes vírus têm mecanismo comum de indução das MMPs [14,15]; e em amostras de soro de pacientes com artrite reumatoide (RA) [4]. Isto pode ser explicado pelo fato das MMPs serem consideradas moléculas com papel-chave no processo inflamatório e envolvidas na remodelação fisiopatológica da parede vascular [12,17].

A presença das formas latente e ativa da MMP-9 neste estudo foi variável, mas com elevada atividade no grupo soropositivo, corroborando com achados de trabalhos anteriores [5,25,26]. Como exemplo, a atividade elevada das MMPs após a infecção pelo HIV contribui para a progressão da doença através da degradação, quebra e transposição das barreiras da matriz [20]. Por outro lado, foi descrito que a secreção de MMP-9 em macrófagos derivados de monócitos (MDM) foi acentuadamente regulada negativamente após uma infecção viral [6].

Embora não observada correlação significativa entre os parâmetros clínicos (FR, FC, T e IAC) e sinais clínicos da doença, outros autores encontraram um equilíbrio inversamente proporcional da MMP-9 e TIMP-1, sugerindo um potencial novo mecanismo de desequilíbrio do sistema imunológico pós-trauma e síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) [3]. A estimulação exacerbada e crônica das MMPs resulta em um desequilíbrio entre essas enzimas proteolíticas e seus inibidores, culminando em sintomas patológicos decorrentes da degradação excessiva da ME [24].

Neste estudo, apenas um animal soropositivo apresentou artrite aparente, mas com atividade

das MMPs similares aos demais do grupo, o que sugere a existência de processo inflamatório em todos os animais do grupo, evidenciado através da elevada atividade das MMPs no sangue, mas não externado clinicamente. Tentando compreender o mecanismo da MMP-9 nas doenças das articulações, foi relatado que a pro-MMP-9 é amplamente expressa e secretada por macrófagos enquanto os condrócitos não conseguem produzir esta enzima, embora a eficiência na ativação da pro-MMP-9 requeira proteinases solúveis e associadas a membrana dos condrócitos [7]. É importante mencionar que os condrócitos são células encontradas na cartilagem atuando na produção e manutenção da matriz extracelular destes.

Vale informar que o sangue é um material biológico cuja viabilidade na avaliação da presença e atividade das MMPs foi demonstrada em muitos estudos [8-11].

Como este é o primeiro estudo sobre MMPs em caprinos com CAE, não foi possível uma discussão plena por falta de material bibliográfico sobre o assunto.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que a elevada atividade das MMPs (pro-MMP-2 e MMP-2) em reprodutores infectados cronicamente pela CAE sugere a presença de processo inflamatório em animais com e sem sintomatologia articular, possibilitando utilizar a atividade das MMPs como biomarcadores no monitoramento da infecção. E a análise densitométrica dos zimogramas mostrou ser uma ferramenta complementar na avaliação clínica de caprinos infectados cronicamente a CAE.

MANUFACTURERS

¹Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA.

²Bio-Rad Laboratories. Richmond, CA, USA.

³Copyright 2010 by Dr. Istvan Lazar.

⁴GE-Healthcare, Barrington, IL, USA.

⁵SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

Ethical Approval. This experiment was approved and performed under the guidelines of Ethics Committee for Animal Use of State University of Ceará.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Andrioli A., Gouveia A., Pinheiro R., Rocha M., Martins A. & Santos D. 1999.** Detecção do DNA pró-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 23(3): 420-421.
- 2 **Bradford M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1): 248-254.
- 3 **Brumann M., Kusmenkov T., Ney L., Kanz K.-G., Leidel B., Biberthaler P., Mutschler W. & Bogner V. 2012.** Concentration Kinetics of Serum MMP-9 and TIMP-1 after Blunt Multiple Injuries in the Early Posttraumatic Period. *Mediators of inflammation*. 2012.
- 4 **Chang Y.-H., Lin I., Tsay G.J., Yang S.-C., Yang T.-P., Ho K.-T., Hsu T.-C. & Shiau M.-Y. 2008.** Elevated circulatory MMP-2 and MMP-9 levels and activities in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinical biochemistry*. 41(12): 955-959.
- 5 **Chapel C., Camara V., Clayette P., Salvat S., Mabondzo A., Leblond V., Marce D., Lafuma C. & Dormont D. 1994.** Modulations of 92-kDa Gelatinase B and Its Inhibitors Are Associated with HIV-1 Infection in Human Macrophage Cultures. *Biochemical and biophysical research communications*. 204(3): 1272-1278.
- 6 **Ciborowski P., Enose Y., Mack A., Fladseth M. & Gendelman H.E. 2004.** Diminished matrix metalloproteinase 9 secretion in human immunodeficiency virus-infected mononuclear phagocytes: modulation of innate immunity and implications for neurological disease. *Journal of neuroimmunology*. 157(1): 11-16.
- 7 **Dreier R., Grässel S., Fuchs S., Schaumburger J. & Bruckner P. 2004.** Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Experimental cell research*. 297(2): 303-312.
- 8 **Gerlach R.F., Demacq C., Jung K. & Tanus-Santos J.E. 2007.** Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clinical biochemistry*. 40(1): 119-123.
- 9 **Gerlach R.F., Uzuelli J.A., Souza-Tarla C.D. & Tanus-Santos J.E. 2005.** Effect of anticoagulants on the determination of plasma matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities. *Analytical biochemistry*. 344(1): 147-149.
- 10 **Grossetete M., Phelps J., Arko L., Yonas H. & Rosenberg G.A. 2009.** Elevation of MMP-3 and MMP-9 in CSF and Blood in Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery*. 65(4): 702.
- 11 **Gruber B.L., Sorbi D., French D.L., Marchese M.J., Nuovo G.J., Kew R.R. & Arbeit L.A. 1996.** Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker. *Clinical immunology and immunopathology*. 78(2): 161-171.
- 12 **Hu J., Van den Steen P.E., Sang Q.-X.A. & Opdenakker G. 2007.** Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 6(6): 480-498.
- 13 **International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) releases. 2012.** Disponível em: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=27>. [Acessado em 10/2013].
- 14 **Johnston J., Silva C. & Power C. 2002.** Envelope gene-mediated neurovirulence in feline immunodeficiency virus infection: induction of matrix metalloproteinases and neuronal injury. *Journal of virology*. 76(6): 2622-2633.
- 15 **Johnston J., Jiang Y., Van Marle G., Mayne M., Ni W., Holden J., McArthur J. & Power C. 2000.** Lentivirus infection in the brain induces matrix metalloproteinase expression: role of envelope diversity. *Journal of virology*. 74(16): 7211-7220.
- 16 **Kupai K., Szucs G., Cseh S., Hajdu I., Csonka C., Csont T. & Ferdinandy P. 2010.** Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 61(2): 205-209.
- 17 **Kuzuya M. & Iguchi A. 2002.** Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 10(5): 275-282.
- 18 **Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259): 680-685.
- 19 **Marshall D., Wyss-Coray T. & Abraham C. 1998.** Induction of matrix metalloproteinase-2 in human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 transgenic mouse brains. *Neuroscience letters*. 254(2): 97-100.
- 20 **Mastroianni C.M. & Liuzzi G.M. 2007.** Matrix metalloproteinase dysregulation in HIV infection: implications for therapeutic strategies. *Trends in molecular medicine*. 13(11): 449-459.
- 21 **Matrisian L.M. 1990.** Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genetics*. 6: 121-125.

- 22 **Pinheiro R., Gouveia A., Alves F. & Andrioli A. 2001.** Diagnóstico de problemas articulares através da determinação do índice articular clínico em caprinos no Nordeste do Brasil. *Embrapa Caprinos Comunicado Técnico*, 56. 4p.
- 23 **Rodrigues A.S., Brito R.L.L., Pinheiro R.R., Dias R.P., Alves S.M., Souza T.S. & Teixeira M.F.S. 2014.** Standardization of indirect Elisa and Western Blot for diagnosis of Caprine Arthritis-Encephalitis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(2): 417-424.
- 24 **Skiles J.W., Gonnella N.C. & Jeng A.Y. 2004.** The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 11(22): 2911-2977.
- 25 **Sporer B., Paul R., Koedel U., Grimm R., Wick M., Goebel F.D. & Pfister H-W. 1998.** Presence of Matrix Metalloproteinase-9 Activity in the Cerebrospinal Fluid of Human Immunodeficiency Virus - Infected Patients. *Journal of Infectious Diseases*. 178(3): 854-857.
- 26 **Webster N.L. & Crowe S.M. 2006.** Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. *Journal of leukocyte biology*. 80(5): 1052-1066.
- 27 **Woessner J.F. 1991.** Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal*. 5(8): 2145-2154.