

EXPRESSÃO DA NOS II E ACTIVAÇÃO DO NF- κ B E DO AP-1 EM RESPOSTA À IL-1

O tempo necessário para ocorrer a expressão da NOS II e a produção subsequente de NO varia consoante o tipo de célula e o estímulo considerado. Do mesmo modo, a activação de um dado factor de transcrição também pode ser mais rápida numas células do que noutras e estímulos diferentes podem requerer tempos distintos para activar o mesmo factor de transcrição. Assim, começámos por determinar o tempo e a concentração de IL-1 necessários para ocorrer a expressão da NOS II e a activação do NF- κ B e do AP-1 no modelo experimental utilizado, isto é, em culturas primárias, confluentes, de condrócitos articulares bovinos.

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DA NOS II:

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO E DA CONCENTRAÇÃO DE IL-1

Os resultados apresentados nas figuras 3.1.1, 3.1.2 e 3.1.3 mostram o padrão de expressão e actividade da NOS II, respectivamente, em função do tempo de incubação das células com IL-1 (de 0 a 24 horas) e da concentração desta citocina (de 0 a 40 ng/ml). A expressão da NOS II foi avaliada por detecção dos níveis de ARNm e a sua actividade por doseamento dos nitritos no sobrenadante, livre de células, das culturas de condrócitos.

A figura 3.1.1 mostra que a expressão máxima da NOS II foi obtida em células tratadas com IL-1, 20 ng/ml, durante 6 h. Utilizando esse tempo de incubação como o período óptimo para ocorrer a transcrição do gene da NOS II, verifica-se, na figura

3.1.2, que os níveis de ARNm aumentam em função da concentração de IL-1, atingindo-se o efeito máximo para uma concentração de 20 ng/ml, já que a análise estatística dos resultados mostrou que os níveis de ARNm, nas células tratadas com 20 ng/ml e 40 ng/ml de IL-1, são idênticos.

Figura 3.1.1. Influência do tempo de incubação com IL-1 na expressão da NOS II em condrócitos articulares. As culturas de condrócitos foram tratadas com IL-1, 20 ng/ml, durante os períodos de tempo indicados (0 a 24 h). A extracção do ARN total e a análise de *Northern blot* foram realizadas como descrito no capítulo 2.4. A autorradiografia apresentada é representativa de três ensaios independentes. Os resultados apresentados no gráfico são as médias \pm SD das razões entre as intensidades das bandas relativas à NOS II e à GAPDH, obtidas em três experiências independentes. * $p < 0,05$ e $^{\S}p < 0,01$ relativamente ao período de 6 h de incubação.

Figura 3.1.2. Influência da concentração de IL-1 na expressão da NOS II em condrócitos articulares. As culturas de condrócitos foram tratadas, durante 6 h, com as concentrações de IL-1 indicadas. A extração do ARN total e a análise de *Northern blot* foram realizadas como descrito no capítulo 2.4. A autorradiografia apresentada é representativa de três ensaios independentes. Os resultados apresentados no gráfico são as médias \pm SD das razões entre as intensidades das bandas relativas à NOS II e à GAPDH, obtidas em três experiências independentes. $^{\S}p<0,01$ e $^*p<0,001$ relativamente à concentração de 20 ng/ml.

De acordo com os resultados obtidos relativamente à transcrição do gene da NOS II, a produção de NO, avaliada por doseamento da concentração de nitrito (Figura 3.1.3), também aumentou em função da concentração de IL-1 e do tempo de incubação das células com a citocina. No entanto, há um certo desfasamento entre o tempo de incubação com IL-1 necessário para se detectar o ARNm da NOS II e o tempo necessário para se detectar o aumento da produção de NO. A produção de NO só é significativamente diferente do Controlo nas células tratadas com IL-1 durante 6h (Figura 3.1.3.A), enquanto o ARNm é detectável em células tratadas com IL-1 durante apenas 3h (Figura 3.1.1). Esse desfasamento indica que o aumento da produção de NO é consequência do aumento da expressão da enzima, resultante da transcrição do gene da NOS II em resposta à IL-1. No entanto e ao contrário dos níveis de ARNm, não se

observou um efeito máximo relativamente à produção de nitrito, avaliada em função do tempo de incubação com IL-1. Esse facto deve-se à grande estabilidade dos nitritos que por isso se acumulam no meio de cultura, de modo que a sua concentração vai sempre aumentando ao longo do tempo e enquanto a enzima estiver activa.

Figura 3.1.3. Influência do tempo de incubação e da concentração de IL-1 na actividade da NOS. **A:** Influência do tempo. As culturas de condrócitos foram tratadas com IL-1, 20 ng/ml, durante os períodos de tempo indicados (0 a 24 h). **B:** Influência da concentração. As culturas de condrócitos foram tratadas, durante 16 h, com as concentrações de IL-1 indicadas. O doseamento dos nitritos foi realizado como descrito no capítulo 2.8.1. Os resultados apresentados são a média \pm SD da concentração de nitrito determinada em cinco experiências independentes, cada uma delas realizada em triplicado. * $p < 0,0001$ relativamente ao tempo 0h e $^{\S}p < 0,05$ relativamente à concentração de 0,5 ng/ml.

Com base nestes resultados, as experiências subsequentes foram realizadas utilizando a concentração máxima de IL-1 (20 ng/ml), excepto quando se pretendia estudar o efeito de alguns mediadores intracelulares, designadamente para verificar se o efeito da IL-1 podia ser potenciado ou inibido por esses mediadores. Nesses casos, utilizou-se uma concentração submáxima de IL-1, tendo-se escolhido 5 ng/ml por permitir a obtenção de efeitos claramente visíveis, mas bem distintos do efeito máximo.

3.2. IDENTIFICAÇÃO DA NOS I

Para uma melhor caracterização das fontes de NO no condrócito articular, estudámos a expressão da NOS I nestas células, na presença e na ausência de IL-1.

Figura 3.2. Identificação da NOS I em condrócitos articulares e efeito da IL-1 nos níveis da proteína. Os extractos citoplasmáticos obtidos de culturas de condrócitos não tratados (Controlo) ou tratados com IL-1 (5 ng/ml), durante 30 minutos, foram submetidos a análise de *western blot* para detecção da NOS I, conforme descrito no capítulo 2.7. A autorradiografia apresentada é representativa de três ensaios independentes. Os resultados representados no gráfico são as médias \pm SD das razões entre as intensidades das bandas relativas à NOS I e à actina, obtidas em três experiências independentes. * $p < 0,01$ relativamente ao Controlo.

A análise dos extractos citoplasmáticos, por *western blot* com um anticorpo específico para a NOS I, mostra que as células não tratadas (Controlo) exprimem esta proteína (Figura 3.2). No entanto, em células tratadas com IL-1 (5 ng/ml), a proteína quase não é detectável, indicando que o tratamento dos condrócitos com esta citocina leva à perda da NOS I. Uma vez que as células foram tratadas com IL-1 durante apenas 30 minutos, não é provável que o desaparecimento da proteína se deva a uma diminuição da transcrição ou da estabilidade do ARNm ou à inibição da sua tradução. Pelo contrário, este resultado sugere que a IL-1 induz a degradação da NOS I, expressa de forma constitutiva e já existente na célula aquando da sua adição. O possível significado fisiológico desta acção da IL-1 será discutido no capítulo 4.3.

3.3. CARACTERIZAÇÃO DA ACTIVAÇÃO DO NF- κ B

Para caracterizar a activação do NF- κ B pela IL-1, começámos por avaliar a influência do tempo de incubação com IL-1 na degradação do I κ B- α e na translocação do RelA para o núcleo. Para isso, utilizámos o método de *western blot* para detectar essas proteínas nos extractos citoplasmáticos e nucleares, respectivamente, das células tratadas com IL-1 durante vários períodos de tempo (0 a 30 minutos).

A Figura 3.3.1A mostra que os níveis citoplasmáticos de I κ B- α começam a diminuir a partir dos cinco minutos de incubação com IL-1 (20 ng/ml) e ao fim de 30 minutos a proteína já praticamente não é detectável. Os níveis nucleares de RelA variam no sentido oposto, isto é, aumentam progressivamente ao longo do tempo, sendo a proteína já detectável nos extractos nucleares, ao fim de 5 minutos de incubação das células com IL-1 (Figura 3.3.1B). Assim, estes resultados indicam que, à medida que o I κ B- α é degradado, os dímeros de NF- κ B, contendo RelA, vão-se deslocando para o núcleo.

Para avaliar a actividade dos dímeros presentes no núcleo, utilizámos o “ensaio de desvio da mobilidade electroforética” (EMSA) que detecta a presença de complexos específicos entre esses dímeros e um oligonucleótido que corresponde à sequência do “elemento κ B” e que designámos por “sonda do NF- κ B”. A identificação das bandas específicas foi feita por comparação com as bandas presentes em ensaios de competição, nos quais foi utilizada uma quantidade 100 vezes maior de “sonda do NF- κ B” ou de “sonda do Oct-1” (um factor de transcrição distinto e não relacionado com o NF- κ B) não marcadas com o isótopo radioactivo (Sonda “fria”), relativamente à “sonda do NF- κ B” marcada. Além disso, realizaram-se também ensaios de *supershift* com anticorpos específicos para cada uma das proteínas da família NF- κ B, para identificar as subunidades constituintes dos dímeros activados em resposta à IL-1.

Figura 3.3.1. Influência do tempo de incubação na degradação do $\kappa\text{B-}\alpha$ e na translocação nuclear do RelA induzidas pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com IL-1, 20 ng/ml, durante os períodos de tempo indicados. Os extractos citoplasmáticos (**A**) e nucleares (**B**) foram analisados por *Western blot* para detecção das proteínas $\kappa\text{B-}\alpha$ (**A**) e RelA (**B**), respectivamente, de acordo com o método descrito no capítulo 2.7. As autorradiografias apresentadas são representativas de três ensaios independentes, realizados com extractos citoplasmáticos e nucleares obtidos em três ocasiões diferentes. Os resultados representados nos gráficos são as médias \pm SD das razões entre as intensidades das bandas relativas a cada uma das proteínas em análise e à actina, obtidas naquelas três experiências. * $p < 0,05$ e $^{\S}p < 0,01$ relativamente ao tempo 0.

Figura 3.3.2. Activação e caracterização dos dímeros NF- κ B induzidos pela IL-1. Os extractos nucleares obtidos de culturas de condrócitos não tratados (Controlo) ou tratados com IL-1 (20 ng/ml) durante 30 minutos, foram incubados com um oligonucleótido específico do NF- κ B, marcado com um isótopo radioactivo, conforme o ensaio de EMSA descrito no capítulo 2.6. Para os ensaios de *supershift* e de competição utilizaram-se os extractos nucleares obtidos das células tratadas com IL-1. A autorradiografia apresentada é representativa de três ensaios independentes, realizados com extractos nucleares obtidos em três ocasiões diferentes.

A autorradiografia apresentada na figura 3.3.2 mostra que os extractos nucleares obtidos de células tratadas com IL-1 originam a formação de bandas de menor mobilidade do que a da sonda livre e mais intensas do que as de igual mobilidade

observadas com os extractos obtidos das células Controlo. Essas bandas desapareceram por completo no ensaio de competição com o excesso de “sonda do NF- κ B fria” e não foram afectadas pela adição ao meio de reacção da “sonda do Oct-1 fria”. Assim, conclui-se que as bandas detectadas na autorradiografia resultam da formação de complexos específicos entre as proteínas presentes nos extractos nucleares e o oligonucleótido correspondente ao “elemento κ B” (“Complexos específicos com NF- κ B”) e, portanto, devem-se à presença de dímeros NF- κ B activos nos extractos nucleares das células tratadas com IL-1.

Os ensaios de *supershit* mostraram que a incubação de um anticorpo dirigido especificamente contra o RelA, com os extractos nucleares obtidos das células tratadas com IL-1, antes da adição da “sonda do NF- κ B”, originou a formação de complexos de mobilidade muito reduzida, que aparecem, na autorradiografias, como uma banda situada próximo do ponto de aplicação das amostras (Figura 3.3.2). Além disso, nessas condições, a intensidade das bandas específicas diminuiu, indicando que as bandas retardadas adicionalmente pelo anticorpo, contêm a proteína RelA (“complexos super-retardados”). Em ensaios idênticos, usando um anticorpo anti-p50, não foram detectados “complexos super-retardados”, mas a intensidade dos “complexos específicos com NF- κ B” diminuiu de forma acentuada, especialmente a das duas bandas inferiores desses complexos. Estes resultados indicam que a ligação daquele anticorpo a dímeros NF- κ B contendo a proteína p50, impediu a ligação desses mesmos dímeros à “sonda do NF- κ B” marcada com o radioisótopo, reduzindo, assim, a intensidade dos complexos específicos (Figura 3.3.2). Anticorpos específicos contra cada um dos outros membros da família NF- κ B, nomeadamente anticorpos anti-p52, anti-RelB e anti-cRel, não tiveram efeitos apreciáveis nem na intensidade, nem na mobilidade electroforética das bandas que compõem os complexos específicos com o NF- κ B, indicando, portanto, que essas proteínas não estão presentes nesses complexos (Figura 3.3.2).

Em resumo, os resultados apresentados na figura 3.3.2 mostram que a IL-1 activa o NF- κ B, em condrócitos articulares bovinos, promovendo a sua ligação ao “elemento κ B”. Nestas células, os dímeros NF- κ B activados pela IL-1 são constituídos essencialmente pelas proteínas RelA e p50, provavelmente formando homo e heterodímeros que se ligam à “sonda do NF- κ B” originando complexos de peso molecular

diferente que, por isso, aparecem na autorradiografia como bandas distintas, globalmente designadas por “complexos específicos com NF- κ B” (Figura 3.3.2).

3.4. CARACTERIZAÇÃO DA ACTIVAÇÃO DO AP-1

Tal como para o NF- κ B, utilizámos o ensaio de EMSA para detectar a activação do AP-1, isto é, a presença de proteínas capazes de se ligarem ao elemento que reconhece o AP-1, o TRE, nos extractos nucleares das células tratadas com IL-1. A caracterização desse processo, em função do tempo de incubação com IL-1, será apresentada no capítulo 5 para facilitar a comparação com o padrão de activação deste factor de transcrição em resposta a outros estímulos.

Aquele estudo mostrou que, embora ao fim de 1 h de incubação com IL-1 já se distingam “complexos específicos com AP-1”, só ao fim de 3 h esses complexos atingem a intensidade máxima (Figura 5.1.3), pelo que passou a ser esse o tempo de incubação utilizado nos ensaios subsequentes.

Para identificar as bandas formadas pelos complexos específicos entre as proteínas AP-1 e o oligonucleótido correspondente ao TRE, marcado com o isótopo radioactivo (“sonda do AP-1”), utilizaram-se ensaios de competição quer com um excesso de “sonda do AP-1 fria”, quer com igual excesso de “sonda do Oct-1 fria”. A autorradiografia apresentada na figura 3.4 mostra que os extractos nucleares obtidos de células tratadas com IL-1 (5 ng/ml) durante 3 h, originam a formação de uma banda de menor mobilidade do que a da sonda livre e mais intensa do que a de igual mobilidade observada com os extractos das células Controlo. Os ensaios de competição com o excesso de “sonda do AP-1 fria” e de “sonda do Oct-1 fria” mostraram que essa banda resulta da formação de complexos específicos entre as proteínas presentes nos extractos nucleares e o oligonucleótido correspondente ao TRE (“Complexos específicos com AP-1”) e, portanto, deve-se à presença de dímeros AP-1 activos, nos extractos nucleares das células tratadas com IL-1.

Figura 3.4. Activação e caracterização dos dímeros AP-1 induzidos pela IL-1. Os extractos nucleares, obtidos de culturas de condrócitos não tratados (Controlo) ou tratados com IL-1 (5 ng/ml) durante 3 h, foram incubados com um oligonucleótido, marcado com um isótopo radioactivo, correspondente ao TRE, conforme o ensaio de EMSA descrito no capítulo 2.6. Para os ensaios de competição e de *supershift*, utilizaram-se os extractos nucleares obtidos das células tratadas com IL-1. A autorradiografia apresentada é representativa de três ensaios independentes, realizados com extractos nucleares obtidos em três ocasiões diferentes.

Para identificar a composição desses dímeros, utilizaram-se anticorpos dirigidos especificamente contra os vários membros das famílias Fos e Jun. A figura 3.4 mostra que a incubação dos extractos nucleares, das células tratadas com IL-1, com anticorpos anti-c-Fos e anti-JunD, antes da adição da “sonda do AP-1” marcada com o radioisótopo, origina a formação de complexos que migram mais lentamente no gel, aparecendo junto ao ponto de aplicação das amostras, indicando, portanto, que esses complexos contêm as proteínas c-Fos e JunD. O anticorpo anti-c-Jun não originou a formação de

“complexos super-retardados”, mas diminuiu acentuadamente a intensidade dos “complexos específicos com AP-1”, o que indica que esta proteína também está presente nesses complexos. Os anticorpos dirigidos contra os outros membros daquelas duas famílias, concretamente os anticorpos anti-FosB, anti-Fra1, anti-Fra2 e anti-JunB, não exerceram efeitos apreciáveis, nem na intensidade, nem na mobilidade electroforética dos “complexos específicos com AP-1”. Assim, estes resultados mostram que os dímeros AP-1, induzidos pela IL-1 em condrócitos articulares bovinos, são constituídos fundamentalmente pelas proteínas c-Fos, c-Jun e JunD.

Além disso, a figura 3.4 também mostra que o anticorpo anti c-Fos retardou a mobilidade da totalidade da banda específica do AP-1 que desapareceu completamente da sua localização típica, indicando que todos os complexos AP-1 contêm a proteína c-Fos. Pelo contrário, o anticorpo anti-c-Jun só parcialmente diminuiu a intensidade dos complexos específicos com AP-1 e o anticorpo anti-JunD retardou a mobilidade de apenas parte desses complexos, já que na localização típica, continuou a aparecer uma banda, ainda que menos intensa. Estes resultados mostram, portanto, que cada uma das proteínas c-Jun e JunD faz parte de alguns, mas não de todos os complexos AP-1 formados. Assim e uma vez que as proteínas Fos não formam homodímeros (Angel e Karin, 1991), é provável que as três proteínas identificadas nos complexos AP-1 activados pela IL-1, em condrócitos articulares bovinos, estejam organizadas em dois heterodímeros constituídos por c-Fos:c-Jun e c-Fos:JunD.