

### **ACTIVAÇÃO E FUNÇÃO DO NF- $\kappa$ B COMO MEDIADOR DA EXPRESSÃO DA NOS II INDUZIDA PELA IL-1**

Sendo o NF- $\kappa$ B um factor de transcrição essencial para a expressão da NOS II, na maioria das células e em resposta a uma enorme variedade de estímulos (Eberhardt *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1994), procurámos esclarecer o seu papel como mediador dessa resposta, induzida pela IL-1 em condrócitos articulares. Para isso, estudámos o papel das ROS, das PTK, das MAPK e do próprio NO nos dois processos, procurando estabelecer uma relação entre eles, isto é, verificar se compostos que inibem o NF- $\kappa$ B são também capazes de impedir a expressão da NOS II. Este capítulo será, assim, dividido em várias partes, cada uma dedicada ao estudo do papel desempenhado por cada um desses mediadores na activação do NF- $\kappa$ B e na expressão da NOS II.

#### **4.1. O PAPEL DAS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO NA ACTIVAÇÃO DO NF- $\kappa$ B E NA EXPRESSÃO DA NOS II**

As espécies reactivas de oxigénio (ROS), incluindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o anião superóxido, e de azoto, designadamente o NO, têm vindo a ser progressivamente reconhecidas como intermediárias de muitas das respostas induzidas pela IL-1 em diversos tipos de células (Blanco e Lotz, 1995; Eberhardt *et al.*, 2002; Sen, 1998). Alterações no estado redox das células, resultantes de modificações na produção de ROS e/ou nos níveis intracelulares de antioxidantes, têm sido associadas a mudanças nos seus padrões de expressão genética que, por sua vez, resultam de alterações na actividade de muitos factores de transcrição (Allen e Tresini, 2000; Haddad, 2002; Michiels *et al.*, 2002).

Numerosos estudos indicam que o NF- $\kappa$ B é um dos factores de transcrição cuja actividade é sensível ao estado redox da célula. No entanto, o papel das ROS na activação do NF- $\kappa$ B parece ser extremamente influenciado pelo tipo de célula. De facto, o mesmo estímulo, como por exemplo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode ter efeitos opostos em células diferentes, activando-o nalguns tipos celulares e inibindo-o, ou não tendo qualquer efeito, noutras células (Flescher *et al.*, 1998; Hoare *et al.*, 1999; Lakshminarayanan *et al.*, 1998; Lee e Koh, 2003; Meyer *et al.*, 1993; Wesselborg *et al.*, 1997; Woods *et al.*, 1999). Do mesmo modo, o tratamento de algumas células com enzimas ou compostos antioxidantes impede a activação do NF- $\kappa$ B (Jin *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1993; Oka *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1995; Schreck *et al.*, 1992; Wesselborg *et al.*, 1997), mas também foi demonstrado o efeito oposto, isto é, a activação deste factor de transcrição pelos mesmos antioxidantes (Das *et al.*, 1995).

O papel das ROS na expressão da NOS II parece depender igualmente do tipo de célula (Beck *et al.*, 1998; Duval *et al.*, 1995; Han *et al.*, 2001b, Kuo *et al.*, 2000; Milligan *et al.*, 1996), o que pode reflectir o efeito das ROS na activação do NF- $\kappa$ B, mas, provavelmente, envolve também outros factores de transcrição (Kuo *et al.*, 2000). Além disso, as ROS podem actuar também após a transcrição do gene da NOS II, promovendo a síntese da proteína, como foi observado em células mesangiais de rato (Tetsuka *et al.*, 1996).

A IL-1 estimula os condrócitos articulares de várias espécies a produzirem diversos tipos de ROS, incluindo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Rathakrishnan *et al.*, 1992) e os radicais hidróxilo (Tiku *et al.*, 1998) e anião superóxido (Tawara *et al.*, 1991). Além de ter sido demonstrado que as ROS, produzidas pelo condrócito, promovem a degradação do agregano e do colagénio, contribuindo, assim, para a destruição da matriz cartilaginosa (Tiku *et al.*, 1999; 2000), foi também referido que medeiam a expressão de vários genes induzida pela IL-1, nomeadamente de c-Jun (Lo *et al.*, 1996), c-Fos e colagenase (Lo *et al.*, 1998).

Apesar disso, não é claro se as ROS, em geral, medeiam essas respostas induzidas pela IL-1 ou, pelo contrário, se um tipo específico de ROS é responsável pela activação de uma via de sinalização particular, levando a uma determinada resposta. Depois de confirmarmos que a IL-1 induz a produção de ROS nas condições experimentais utilizadas e uma vez que, em condições apropriadas, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o radical

anião superóxido podem gerar outros tipos de ROS, procurámos verificar se a IL-1 estimula a produção daquelas duas espécies. Depois, procurámos elucidar o papel das ROS em geral, e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e do radical anião superóxido em particular, como mediadores da activação do NF-κB e da expressão da NOS II em condrócitos articulares bovinos.

#### **4.1.1. O difenileniodónio inibe a produção de ROS, a activação do NF-κB e a expressão da NOS II induzidas pela IL-1**

Os compostos de difenileniodónio, nomeadamente o cloreto de difenileniodónio (DPI), inibem, selectivamente, enzimas que utilizam grupos flavonóides como co-factores, pois ligam-se irreversivelmente à região dessas enzimas com afinidade para a flavina. As enzimas inibidas por estes compostos estão envolvidas na produção celular de ROS e incluem a NADPH oxidase, a NADH desidrogenase mitocondrial, a NADH oxidase, a quinona oxidoreductase e a citocromo P450 reductase, bem como a NOS (Li e Trush, 1998; McGuire *et al.*, 1998; O'Donnell *et al.*, 1993; Yea *et al.*, 1990; Stuehr *et al.*, 1991). Além disso, foi também demonstrado que o DPI inibe a expressão de vários genes induzida por citocinas inflamatórias, em diversos tipos de células. Em condrócitos articulares, por exemplo, o DPI inibiu a expressão de c-fos e de colagenase induzidas pela IL-1 (Lo *et al.*, 1998), enquanto em células mesangiais impediu a activação do NF-κB e a expressão do tipo IIA da fosfolipase A<sub>2</sub> em resposta à associação de IL-1 e TNF-α (Dorsam *et al.*, 2000). Como as enzimas sensíveis à acção do DPI e de compostos análogos estão envolvidas na produção celular de ROS (Li e Trush, 1998), estes e outros efeitos desses compostos, a nível do metabolismo celular, têm sido atribuídos à sua capacidade para inibir a produção de ROS (Boota *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 1998; Pagano *et al.*, 1995; Potoka *et al.*, 1998; Rusyn *et al.*, 1999).

Utilizámos, por isso, o DPI para estudar o papel das ROS na activação do NF-κB e na expressão da NOS II induzidas pela IL-1. Para isso e depois de confirmarmos que, nas condições utilizadas, este composto não é tóxico para os condrócitos, verificámos se a IL-1 estimula a produção de ROS em condrócitos articulares e se o DPI é capaz de inibir essa resposta.

**Tabela 4.1.1. Efeito do Difenilenoiodônio na viabilidade dos condrócitos.**

|                 | <b>Absorvência<br/>(Densidade Óptica)</b> |
|-----------------|---|
| Controlo        | 0,359 ± 0,02                              |
| IL-1, 20 ng/ml  | 0,379 ± 0,01                              |
| DPI, 1 µM       | 0,358 ± 0,02                              |
| DPI, 10 µM      | 0,361 ± 0,01                              |
| DPI, 1 µM+IL-1  | 0,372 ± 0,01                              |
| DPI, 10 µM+IL-1 | 0,377 ± 0,03                              |

As culturas de condrócitos foram tratadas com as concentrações de DPI indicadas, durante 2 h. Após esse período, a IL-1 foi adicionada aos poços correspondentes e as placas de cultura foram incubadas durante mais 16 h. A densidade óptica das soluções contendo o formazano resultante da redução do MTT pelos condrócitos viáveis foi medida por espectrofotometria como descrito no capítulo 2.2. Os resultados apresentados são a média ± SD dos resultados obtidos em três experiências independentes, realizadas em triplicado, isto é, utilizando as células de 3 poços distintos para cada condição.

A ausência de toxicidade foi avaliada pelo método de redução do MTT que depende da capacidade redutora das mitocôndrias e, por isso, reflecte a viabilidade celular (Mosmann, 1983). Os resultados obtidos utilizando o método descrito no capítulo 2.2, mostraram que a capacidade dos condrócitos tratados com IL-1 para reduzirem aquele sal é idêntica à dos condrócitos Controlo, o mesmo acontecendo com as células tratadas apenas com DPI, nas concentrações de 1 e 10 µM (Tabela 4.1.1). Do mesmo modo, a quantidade de formazano produzida por condrócitos tratados com 1 e 10 µM de DPI, na presença de IL-1, foi também idêntica à produzida quer pelas células Controlo, quer pelas tratadas apenas com IL-1 (Tabela 4.1.1).

**Tabela 4.1.2. Efeito do DPI na produção de ROS induzida pela IL-1.**

|                   | <b>Intensidade de Fluorescência<br/>(Unidades Arbitrárias)</b> | <b>% Relativamente<br/>ao Controlo</b> |
|-------------------|--|--|
| Controlo          | 1,360 ± 0,035x10 <sup>7</sup>                                  | 100,0 ± 2,5                            |
| IL-1, 20 ng/ml    | 1,761 ± 0,038x10 <sup>7</sup> *                                | 129,5 ± 2,8                            |
| DPI, 1 µM + IL-1  | 1,655 ± 0,029x10 <sup>7</sup> §‡                               | 121,7 ± 2,1                            |
| DPI, 2 µM + IL-1  | 1,518 ± 0,026x10 <sup>7</sup> §‡                               | 111,6 ± 1,9                            |
| DPI, 10 µM + IL-1 | 1,358 ± 0,030x10 <sup>7</sup> ‡                                | 99,9 ± 2,2                             |

As culturas de condrócitos, carregados com DCFH<sub>2</sub>-DA, foram tratadas com as concentrações de DPI indicadas, durante 30 minutos. A IL-1 (20 ng/ml) foi então adicionada e as células incubadas por mais 30 minutos. A intensidade de fluorescência foi medida conforme descrito no capítulo 2.3. Os resultados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias e em percentagem da intensidade de fluorescência das células Controlo que, tal como nas outras condições, foram incubadas com DCFH<sub>2</sub>-DA, mas não foram tratadas com IL-1, nem com DPI. Os resultados apresentados são a média ± SD de três experiências independentes, cada uma realizada em triplicado. \**p*<0.001 e §*p*<0,05 relativamente ao Controlo; ‡*p*<0.05 relativamente à IL-1.

O diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA), uma sonda que é retida no interior da célula após hidrólise por esterases intracelulares e que se torna fluorescente por oxidação (Bass *et al.*, 1983; LeBel *et al.*, 1990), foi utilizado para medir a produção intracelular de ROS em resposta à IL-1 e para avaliar a capacidade do DPI para inibir esse processo, conforme o método descrito no capítulo 2.3. Os resultados apresentados na tabela 4.1.2 mostram que a IL-1 aumenta a intensidade de fluorescência das células em cerca de 30%, relativamente às células não tratadas, e que o tratamento dos condrócitos com DPI, antes da adição de IL-1, impede esse aumento de uma forma dependente da concentração, sendo a inibição completa com uma concentração de 10 µM de DPI.

Figura 4.1.1. O DPI inibe a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com as concentrações de DPI indicadas, durante 2 h, antes de se adicionar a IL-1 (20 ng/ml), após o que foram incubadas por mais 30 minutos. Os extractos nucleares, preparados como descrito no capítulo 2.5, foram utilizados para detectar, por EMSA, a formação de complexos específicos entre os dímeros NF- $\kappa$ B e um oligonucleótido correspondente ao elemento  $\kappa$ B. A autorradiografia apresentada é representativa dos resultados obtidos em três experiências independentes.

Para verificar se as ROS são ou não necessárias para a activação do NF- $\kappa$ B, as culturas de condrócitos foram tratadas com várias concentrações de DPI (1 a 10  $\mu$ M) durante 2 h, antes da adição de IL-1 (20 ng/ml) e depois incubadas durante mais 30 minutos na presença desta citocina. A análise de EMSA mostrou que a intensidade dos complexos específicos com NF- $\kappa$ B é menor nos extractos nucleares das células tratadas com DPI antes da adição de IL-1, do que nos extractos das células tratadas apenas com IL-1 (Figura 4.1.1). A intensidade desses complexos diminuiu progressivamente com o aumento da concentração de DPI e a sua formação foi quase completamente inibida pela concentração mais elevada de DPI (10  $\mu$ M) (Figura 4.1.1).

Figura 4.1.2. O DPI inibe a síntese do ARNm da NOS II induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com as concentrações de DPI indicadas durante 2 h. Após esse período, foi adicionada a IL-1 (20 ng/ml) e as células foram incubadas por mais 6 h. O ARNm foi detectado por *Northern blot*, de acordo com o método 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 aos níveis de ARNm da NOS II e da GAPDH obtidas naquelas três experiências. \* $p < 0,05$  e  $^{\S} p < 0,001$  relativamente à IL-1.

Do mesmo modo, os níveis de ARNm (Figura 4.1.2) e de proteína (Figura 4.1.3) da NOS II foram também reduzidos progressivamente pelo aumento da concentração de DPI (1 a 10  $\mu$ M). Na concentração mais elevada (10  $\mu$ M), o DPI inibiu quase completamente a síntese do ARNm (Figura 4.1.2) e da proteína (Figura 4.1.3), tendo reduzido os níveis respectivos para cerca de 10% dos observados nas células tratadas apenas com IL-1. Estes resultados indicam que o DPI impede a expressão da NOS II por actuar a nível da transcrição, inibindo a síntese do ARNm e a síntese subsequente da proteína.

A produção de NO, avaliada pela quantidade de nitrito acumulada no sobrenadante das culturas celulares, foi também inibida pelo DPI, de uma forma dependente da concentração (Figura 4.1.4A). Além disso, o DPI foi tão eficaz quando adicionado às culturas celulares antes da IL-1, como quando foi adicionado depois da remoção desta citocina (Figura 4.1.4B). As concentrações necessárias para reduzir a

produção de NO em 50 % ( $IC_{50}$ ) foram idênticas, independentemente da adição de DPI ter ocorrido antes ( $IC_{50} = 0,031 \pm 0,004 \mu M$ ) ou após ( $IC_{50} = 0,039 \pm 0,003 \mu M$ ) a acção da IL-1. Neste último caso, os condrócitos foram tratados com IL-1 durante uma noite (cerca de 16 h) e depois a citocina foi removida antes da adição de DPI. Nestas condições, a expressão da NOS II ocorreu antes da adição de DPI, de modo que a inibição da produção de NO observada (Figura 4.1.4B) resultou apenas da acção a nível da actividade da enzima e não a nível dos processos envolvidos na sua expressão. Este efeito directo do DPI na actividade da NOS II está de acordo com outros estudos que demonstraram a capacidade do DPI para inibir a actividade desta enzima por se ligar irreversivelmente ao seu domínio de ligação da flavina (O'Donnell *et al.*, 1993; Yea *et al.*, 1990; Stuehr *et al.*, 1991).

Figura 4.1.3. O DPI impede a síntese de proteína da NOS II induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com as concentrações de DPI indicadas durante 2 h. Após esse período, foi adicionada a IL-1 (20 ng/ml) e as células foram incubadas por mais 16 h. Os níveis de proteína foram detectados por *Western blot*, de acordo com o método descrito no capítulo 2.7. 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 aos níveis de proteína da NOS II e da actina, obtidas naquelas três experiências.  $^{\S}p < 0,001$  relativamente à IL-1.

Figura 4.1.4. Efeito do DPI na produção de NO induzida pela IL-1. **A:** as culturas de condrócitos foram tratadas com as concentrações de DPI indicadas, durante 2 h, após o que foi adicionada a IL-1 (20 ng/ml) e as células incubadas durante mais 16 h. **B:** as culturas de condrócitos foram incubadas com IL-1 (20 ng/ml) durante uma noite. Após esse período, o meio de cultura foi removido e, depois de lavadas três vezes para eliminar completamente a IL-1, as células foram incubadas durante mais 16 h, em meio contendo as concentrações de DPI indicadas. A concentração de nitrito no sobrenadante das culturas foi determinada pelo método de Griess, como descrito no capítulo 2.8.1. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  SD da concentração de nitrito determinada em seis experiências independentes, cada uma delas realizada em triplicado. \* $p < 0,01$  relativamente à IL-1.

#### 4.1.2. A IL-1 induz a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de anião superóxido

Para identificar as ROS produzidas em resposta à IL-1, utilizámos a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do anião superóxido ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), levando à formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e oxigénio molecular (eq. 4.1), e a catalase que converte o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água e oxigénio molecular (eq. 4.2). As culturas de condrócitos, depois de incubadas com DCFH<sub>2</sub>-DA, foram tratadas com catalase (80 U/ml) ou com SOD (80 U/ml) antes da adição de IL-1, como descrito no capítulo 2.3. Para permitir a acção intracelular destas duas enzimas, as células foram permeabilizadas por adição de 0,00002% digitonina ao meio de cultura.

Os resultados obtidos (Tabela 4.1.3) mostram que o tratamento das culturas de condrócitos com IL-1 (5 ng/ml), durante 30 minutos, aumentou a intensidade de fluorescência em cerca de 18%, relativamente às células não tratadas (Controlo). O tratamento prévio com catalase reverteu o efeito da IL-1, de modo que, nessas condições, a intensidade de fluorescência não aumentou relativamente às células Controlo. Estes resultados indicam que a IL-1 induziu a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, ao ser hidrolisado pela catalase, não permitiu a oxidação da DCFH<sub>2</sub>.

Pelo contrário, quando as células foram tratadas com SOD, a intensidade de fluorescência aumentou mais do que nas células tratadas apenas com IL-1. Isto pode ser explicado por a DCFH<sub>2</sub> ser mais sensível à oxidação pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do que pelo anião superóxido (Bass *et al.*, 1983; LeBel *et al.*, 1990), de modo que, nas células tratadas com SOD, a conversão dos radicais superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentou um pouco mais a quantidade de sonda oxidada e, conseqüentemente, a intensidade de fluorescência das células. Esta interpretação é também apoiada por ter sido demonstrado, em granulócitos, que 20% da quantidade de anião superóxido produzido durante o *burst* respiratório não é

convertido em  $H_2O_2$  e que todo o  $H_2O_2$  produzido resulta da dismutação do anião superóxido (Root e Metcalf, 1977).

**Tabela 4.1.3. Efeito da Catalase e da Superóxido Dismutase na produção de ROS induzida pela IL-1.**

|                        | Unidades Arbitrárias              | % Relativamente ao Controlo |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Controlo               | $2,059 \pm 0,027 \times 10^7$     | $100,0 \pm 1,3$             |
| IL-1, 5 ng/ml          | $2,437 \pm 0,025 \times 10^7$ *   | $118,4 \pm 1,2$             |
| Catalase, 80 U/ml+IL-1 | $2,041 \pm 0,033 \times 10^7$ §   | $99,2 \pm 1,6$              |
| SOD, 80 U/ml+IL-1      | $2,562 \pm 0,017 \times 10^7$ * § | $124,5 \pm 0,8$             |

A intensidade de fluorescência das culturas de condrócitos carregados com DCFH<sub>2</sub>-DA foi medida após incubação com IL-1, na presença ou ausência de catalase ou superóxido dismutase (SOD), de acordo com o método descrito no capítulo 2.3. Os resultados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias e em percentagem da intensidade de fluorescência das células Controlo que, tal como nas outras condições, foram incubadas com DCFH<sub>2</sub>-DA e permeabilizadas com 0.00002% digitonina. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  SD de três experiências independentes, cada uma realizada em duplicado. \* $p < 0.05$  relativamente ao Controlo e § $p < 0.05$  relativamente à IL-1.

#### **4.1.3. O anião superóxido, mas não o $H_2O_2$ , medeia a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão da NOS II induzidas pela IL-1**

O  $H_2O_2$  é a ROS mais frequentemente implicada na activação do NF- $\kappa$ B e mais utilizada experimentalmente para estudar o papel das ROS na indução desse processo (Allen e Tresini, 2000). Assim e uma vez que a IL-1 induz a sua produção pelos condrócitos, estudámos a capacidade do  $H_2O_2$  para activar o NF- $\kappa$ B e a expressão da NOS II por si só e para modular, inibindo ou potenciando, o efeito da IL-1. Para detectar a activação do NF- $\kappa$ B, determinámos os níveis de  $\kappa$ B- $\alpha$  nos extractos citoplasmáticos obtidos de células tratadas com  $H_2O_2$ , na presença ou ausência de IL-1. Os extractos nucleares correspondentes foram usados para detectar a presença de dímeros NF- $\kappa$ B activos por EMSA, de acordo com o método descrito no capítulo 2.6. A expressão da

NOS II foi avaliada por *Northern blot* e por *Western blot* para determinação dos níveis de ARNm e de proteína, respectivamente, conforme descrito no capítulo 2.

Figura 4.1.5. Efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ , na presença e na ausência de IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 30 minutos, com as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas, na presença ou na ausência de IL-1 (5 ng/ml). Os extractos citoplasmáticos preparados a partir dessas células, foram usados para detectar a proteína I $\kappa$ B- $\alpha$  por *Western blot*, como descrito no capítulo 2.7. A autorradiografia apresentada é representativa de seis experiências independentes. Os resultados apresentados no gráfico são a média  $\pm$  SD das razões entre as intensidades das bandas relativas ao I $\kappa$ B- $\alpha$  e à actina, obtidas naquelas seis experiências. \* $p$ <0,01 relativamente ao Controlo e  $^{\S}$  $p$ <0,01 relativamente à IL-1.

Os resultados apresentados na figura 4.1.5 mostram que o tratamento dos condrócitos com IL-1 (5 ng/ml) e com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300  $\mu$ M), simultaneamente, durante 30 minutos, não altera a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ , relativamente ao que ocorre nas células tratadas só com IL-1. Por outro lado, os níveis citoplasmáticos de I $\kappa$ B- $\alpha$ , relativamente aos obtidos nas células Controlo, não foram modificados por tratamento das células apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em concentrações de 50 a 300  $\mu$ M, durante o mesmo período de tempo, indicando, assim, que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por si só, não induz a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  (Figura 4.1.5).

Figura 4.1.6. Efeito do  $H_2O_2$  na ligação do NF- $\kappa$ B ao oligonucleótido específico, na presença e na ausência de IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 30 minutos, com as concentrações de  $H_2O_2$  indicadas, na presença ou na ausência de IL-1 (5 ng/ml). Os extractos nucleares preparados a partir dessas células, foram usados para detectar, por EMSA, a formação de complexos específicos entre os dímeros NF- $\kappa$ B e um oligonucleótido correspondente ao elemento  $\kappa$ B, de acordo com o método descrito no capítulo 2.6. A autorradiografia apresentada é representativa de seis experiências independentes.

Utilizando o método de EMSA, verificámos que, em comparação com os extractos obtidos das células Controlo, nenhuma das concentrações de  $H_2O_2$  testadas (50 a 300  $\mu$ M) foi capaz de originar a formação de complexos específicos entre proteínas presentes nos extractos nucleares e o oligonucleótido específico do NF- $\kappa$ B (Figura 4.1.6). Do mesmo modo, a intensidade dos complexos específicos com NF- $\kappa$ B é idêntica nos extractos obtidos de células tratadas apenas com IL-1 e nos obtidos de células tratadas simultaneamente com IL-1 e com  $H_2O_2$  (50 a 300  $\mu$ M) (Figura 4.1.6).

Em conjunto, os resultados apresentados nas figuras 4.1.5 e 4.1.6 mostram que o  $H_2O_2$ , por si só, não tem qualquer efeito na degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ , nem na afinidade dos

dímeros NF- $\kappa$ B para o elemento  $\kappa$ B, indicando, portanto, que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não activa o NF- $\kappa$ B, em condrócitos articulares bovinos. Além disso, estes resultados também mostram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não inibe, nem potencia, a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1.

Figura 4.1.7. A SOD, mas não a catalase, impede a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos foram permeabilizadas com 0,00002% digitonina, tratadas com catalase (80 U/ml) ou com SOD (80 U/ml) durante 30 minutos, antes da adição de IL-1 (5 ng/ml), e depois incubadas durante mais 30 minutos. Os extractos citoplasmáticos preparados a partir dessas células foram usados para detectar a proteína I $\kappa$ B- $\alpha$  por *Western blot*, como descrito no capítulo 2.7. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  SD das razões entre as intensidades das bandas relativas ao I $\kappa$ B- $\alpha$  e à actina, obtidas nessas três experiências. \* $p$ <0,05 e  $^{\S}$  $p$ <0,001 relativamente ao Controlo;  $^{\ddagger}$  $p$ <0,01 relativamente à IL-1.

No entanto, estes resultados não excluem a possibilidade de o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ser necessário, embora não suficiente, para a activação do NF- $\kappa$ B pela IL-1. Para elucidarmos esta questão, tratámos as culturas de condrócitos com catalase e com SOD, antes da adição de IL-1, e determinámos os níveis citoplasmáticos de I $\kappa$ B- $\alpha$ . A figura 4.1.7 mostra que o tratamento das células com SOD, antes da adição de IL-1, preveniu a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ , enquanto o tratamento com catalase não teve qualquer efeito.

Figura 4.1.8. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não altera a expressão, nem a actividade da NOS II. **A**: efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos níveis de ARNm da NOS II, na presença ou na ausência de IL-1; **B**: efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos níveis de proteína da NOS II, na presença ou na ausência de IL-1. **C**: efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na actividade da NOS II induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas simultaneamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300 µM em **A** e **B**; 100 µM em **C**) e com IL-1 (5 ng/ml em **A** e **B**; concentrações indicadas em **C**) ou apenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nas concentrações indicadas (50 a 300 µM), durante 6 h (**A**) ou 16 h (**B** e **C**). Os níveis de ARNm e de proteína da NOS II foram avaliados por *Northern blot* e por *Western blot*, respectivamente, e a actividade da NOS II foi determinada por doseamento da [<sup>3</sup>H]citrulina, conforme descrito no capítulo 2. As autorradiografias apresentadas em **A** e **B** e os resultados apresentados em **C** são representativos de seis experiências independentes. No painel **C**, os resultados apresentados são a média ± SD da radioactividade expressa em (dpm/mg proteína)×10<sup>5</sup>, medida em cada amostra, analisada em triplicado, de acordo com o método descrito no capítulo 2.8.2. A análise estatística mostrou que não há diferenças significativas entre os resultados obtidos nas células tratadas apenas com IL-1 e os obtidos nas células tratadas com a mesma concentração de IL-1, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Uma vez que o tratamento com catalase inibiu eficazmente a oxidação da DCFH<sub>2</sub> e o conseqüente aumento da fluorescência dos condrócitos, o facto de não ter inibido a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  indica que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apesar de ser produzido, não é necessário como mediador desta resposta à IL-1. Mais, o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que resulta da dismutação adicional do anião superóxido quando as células são tratadas com SOD, não pode ser responsável pela inibição da degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  observada nas células tratadas com esta enzima, já que nem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sozinho, nem a catalase tiveram qualquer efeito nessa resposta. Então, essa inibição deve-se, provavelmente, à diminuição da concentração de anião superóxido. Assim, pode concluir-se que a activação do NF- $\kappa$ B, em resposta à IL-1, requer a produção do anião superóxido que é necessário como mediador da degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  e da conseqüente activação do NF- $\kappa$ B. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pelo contrário, não parece ser necessário para a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1, em condrócitos articulares bovinos.

Figura 4.1.9. A SOD, mas não a catalase, impede a síntese do ARNm da NOS II induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos, permeabilizadas com 0,00002% digitonina, foram tratadas com catalase (80 U/ml) ou SOD (80 U/ml) durante 30 minutos, antes da adição de IL-1 (5 ng/ml), e depois incubadas durante mais 6 h. Os níveis de ARNm da NOS II foram avaliados por *Northern blot*, conforme descrito no capítulo 2.4. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências 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 naquelas três experiências. \* $p < 0,01$  relativamente à IL-1.

Figura 4.1.10. A SOD, mas não a catalase, inibe a síntese da proteína e a actividade da NOS II induzidas pela IL-1. **A**: efeito da catalase e da SOD nos níveis de proteína da NOS II induzidos pela IL-1; **B**: efeito da catalase e da SOD na actividade da NOS II induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos, permeabilizadas com 0,00002% digitonina, foram tratadas com catalase (80 U/ml) ou SOD (80 U/ml) durante 30 minutos, antes da adição de IL-1 (5 ng/ml), e depois incubadas durante mais 16 h. Os níveis de proteína da NOS II foram avaliados por *Western blot* e a actividade da NOS II foi determinada por doseamento da concentração de nitrito no sobrenadante das culturas celulares, conforme os métodos descritos no capítulo 2. A autorradiografia apresentada em **A** é representativa de três experiências independentes. Os resultados apresentados no gráfico em **A** são as médias  $\pm$  SD das razões entre as intensidades das bandas relativas à NOS II e à actina, obtidas naquelas três experiências. No painel **C**, os resultados apresentados são a média  $\pm$  SD da concentração de nitrito determinada em três experiências independentes, cada uma realizada em triplicado. \* $p < 0,01$  relativamente à IL-1.

Os ensaios de *Northern* e *Western blot* mostraram que os níveis de ARNm (Figura 4.1.8A) e de proteína (Figura 4.1.8B) nas células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sozinho ou em associação com IL-1, são idênticos aos obtidos nas células Controlo e nas células tratadas apenas com IL-1, respectivamente. A actividade enzimática da NOS II, avaliada pela produção de [<sup>3</sup>H]Citrulina, também não foi afectada pelo tratamento das células com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quer na ausência, quer na presença de várias concentrações de IL-1 (Figura 4.1.8C), mostrando, assim, que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não potencia, nem reduz o efeito daquela citocina. Em conjunto, estes resultados mostram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não induz a expressão da NOS II, nem modifica a resposta induzida pela IL-1, o que, provavelmente, reflecte a ausência de efeito na activação do NF-κB.

O tratamento das culturas de condrócitos com catalase, antes da adição de IL-1, também não modificou os níveis de ARNm (Figura 4.1.9), nem de proteína (Figura 4.1.10A) da NOS II e, do mesmo modo, não alterou a actividade da enzima, avaliada por doseamento da concentração de nitrito (Figura 4.1.10B), em comparação com as respostas observadas nas células tratadas apenas com IL-1. Pelo contrário, o tratamento das células com SOD reduziu a expressão (Figuras 4.1.9 e 4.1.10A) e a actividade (Figura 4.1.10B) da NOS II induzidas pela IL-1. Assim e tal como observado relativamente à activação do NF-κB, o anião superóxido, e não o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, parece ser a ROS necessária, em condrócitos articulares bovinos, para ocorrer a expressão da NOS II em resposta à IL-1.

#### 4.1.4. Discussão dos resultados

Os resultados apresentados nas tabelas 4.1.2 e 4.1.3 indicam que, nas condições de cultura utilizadas, a IL-1 estimula os condrócitos articulares a produzirem ROS, particularmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e anião superóxido. Estas observações estão de acordo com outros estudos, em que foi igualmente demonstrada a capacidade da IL-1 para estimular a produção destas duas ROS, pelos condrócitos (Rathakrishnan *et al.*, 1992; Tawara *et al.*, 1991).

As concentrações de DPI que inibiram a produção de ROS (Tabela 4.1.2), impediram, com a mesma eficácia, a activação do NF-κB (Figura 4.1.1) e a expressão da

NOS II (Figuras 4.1.2 e 4.1.3). Isto significa que impedir a produção de ROS foi suficiente para inibir a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão da NOS II, permitindo, assim, concluir que as ROS produzidas em resposta à IL-1 medeiam e são necessárias para a activação do NF- $\kappa$ B cuja actividade, por sua vez, é indispensável para ocorrer a expressão subsequente da NOS II.

Por outro lado, os resultados apresentados na figura 4.1.4 indicam que, além de impedir a expressão da NOS II, o DPI inibe directamente a actividade da enzima já sintetizada. Na concentração de 10  $\mu$ M, o DPI reduziu maximamente, embora não totalmente, os níveis de ARNm (Figura 4.1.2) e de proteína (Figura 4.1.3) da NOS II induzidos pela IL-1. No entanto, 0,1  $\mu$ M foi suficiente para eliminar, por completo, a produção de NO, isto é, a actividade da NOS II, induzida pela IL-1 (Figura 4.1.4). Assim, as concentrações de DPI necessárias para impedir a expressão da NOS II são mais elevadas do que as requeridas para a inibição da actividade da enzima. Estes resultados sugerem, então, que o mecanismo subjacente à expressão da NOS II, isto é, a inibição de enzimas envolvidas na produção de ROS, é menos sensível à acção do DPI do que a própria NOS II.

Num modelo de artrite inflamatória induzida em murganhos, o DPI reduziu eficazmente a progressão da doença, diminuindo os sinais inflamatórios e a degradação da cartilagem, o que foi atribuído à inibição simultânea da NADPH oxidase e da NOS (Miesel *et al.*, 1996). Os resultados apresentados no presente trabalho esclarecem, pelo menos em parte, os mecanismos intracelulares envolvidos na acção anti-artrítica do DPI. Esses mecanismos envolvem, por um lado, a inibição de enzimas produtoras de ROS, com a conseqüente inibição da activação do NF- $\kappa$ B e da expressão de genes dependentes deste factor de transcrição, nomeadamente da NOS II, e, por outro lado, a inibição directa da actividade da NOS II. A diferença entre as concentrações de DPI necessárias para se obter cada um desses efeitos sugere que poderá ser possível dissociar os dois mecanismos através da manipulação adequada das doses de DPI.

Em muitas células, o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lee e Koh, 2003; Manna *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1993; Wesselborg *et al.*, 1997) ou com enzimas que aumentam a sua concentração intracelular, como a SOD (Schmidt *et al.*, 1995), resulta na activação do NF- $\kappa$ B. Em concordância com essas observações, a activação deste factor de transcrição

por diversos estímulos é inibida por tratamento com antioxidantes, como a N-acetilcisteína (Meyer *et al.*, 1993; Oka *et al.*, 2000) e o ditiocarbamato de pirrolidina (Meyer *et al.*, 1993; Schreck *et al.*, 1992), ou com enzimas antioxidantes, nomeadamente a catalase (Han *et al.*, 2001b; Schmidt *et al.*, 1995) e a peroxidase da tioredoxina (Jin *et al.*, 1997).

No entanto, estudos realizados noutras células sugerem que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode não desempenhar um papel significativo na activação do NF-κB, podendo mesmo impedir esse processo. Em vários tipos de células, o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não activou o NF-κB (Hoare *et al.*, 1999; Lakshminarayanan *et al.*, 1998; Woods *et al.*, 1999), enquanto noutras, a sobre-expressão de catalase não inibiu a activação deste factor de transcrição induzida quer pelo TNF, quer por ésteres do forbol (Suzuki *et al.*, 1995). Em linfócitos T, pelo contrário, a exposição aguda ou crónica ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bloqueou a activação deste factor de transcrição (Flescher *et al.*, 1998). Num outro estudo, a sobre-expressão da SOD, numa linha celular de cancro da mama, aboliu por completo a activação do NF-κB induzida pelo TNF, mas também potenciou o efeito indutor resultante da acção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, não sendo claro qual o papel das ROS, nem qual a espécie envolvida na activação deste factor de transcrição naquelas células (Manna *et al.*, 1998). Em suma, o papel das ROS e, particularmente do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, na activação do NF-κB varia consoante o tipo de célula considerado (Haddad, 2002; Michiels *et al.*, 2002) e, pelo menos, parte desta variabilidade pode resultar de diferenças na concentração de ROS, embora o limiar de concentração que leva à activação ou à inibição do NF-κB seja ainda desconhecido (Michiels *et al.*, 2002).

Assim e tendo em conta que, mesmo nas células em que o NF-κB é sensível ao estado redox da célula, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outras ROS podem regular positiva ou negativamente a activação deste factor, o aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nos condrócitos, tanto podia potenciar, como inibir as respostas induzidas pela IL-1. Os resultados obtidos mostram que nestas células, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto isoladamente como em associação com a IL-1, não teve qualquer efeito na activação do NF-κB (Figuras 4.1.5 e 4.1.6), nem na expressão da NOS II (Figura 4.1.8), indicando que, além de não induzir estas respostas por si só, também não potencia, nem inibe as acções da IL-1. A ausência de efeitos inibitórios por tratamento dos condrócitos com catalase (Figuras 4.1.7, 4.1.9 e 4.1.10) indica que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

não é necessário e, portanto, não é um mediador da activação do NF- $\kappa$ B e da expressão da NOS II induzidas pela IL-1.

Por outro lado, Tiku e colaboradores (1998) mostraram que a formação do radical hidróxilo, em condrócitos, requer a adição de ferro e a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como verificámos que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não participa na activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1, os resultados destes autores também excluem a possibilidade de ser o radical hidróxilo ou qualquer outra ROS produzida a partir do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a espécie que medeia a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão subsequente da NOS II induzidas pela IL-1, em condrócitos articulares.

O tratamento com SOD impediu a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  (Figura 4.1.7) e a expressão da NOS II (Figuras 4.1.9 e 4.1.10) induzidas pela IL-1. Estes efeitos inibitórios, teoricamente pelo menos, podiam resultar quer da redução da concentração de anião superóxido, quer do aumento adicional da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, decorrentes da acção da SOD (Eq. 4.1). Como o envolvimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nesses processos foi excluído, resta a possibilidade de ser o anião superóxido a espécie envolvida. Assim, a diminuição da sua concentração é, provavelmente, o factor responsável pelos efeitos inibitórios observados nas culturas de condrócitos tratadas com SOD. Em conjunto, estes resultados indicam que o anião superóxido é a ROS que medeia a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  em resposta à IL-1, da qual resulta a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão subsequente da NOS II e de outros genes cuja indução também dependa da actividade deste factor de transcrição.

Estudos recentes sugerem que o anião superóxido pode ter um papel importante como mediador de algumas respostas induzidas pela IL-1. Em células mesangiais glomerulares, por exemplo, o anião superóxido intensifica a activação do NF- $\kappa$ B e do AP-1 induzidas pela IL-1, resultando daí o aumento da expressão da gelatinase B (MMP-9) que requer a actividade dos dois factores de transcrição (Eberhardt *et al.*, 2000). Num outro estudo, foi demonstrado que o anião superóxido medeia a activação da p42/p44<sup>MAPK</sup> e a expressão da MMP-9 induzidas pela IL-1, em células musculares lisas vasculares (Gurjar *et al.*, 2001). Noutros estudos foi demonstrado que a exposição de células mesangiais (Beck *et al.*, 1998) e de hepatócitos (Kuo *et al.*, 2000) a compostos geradores de anião superóxido aumenta a expressão da NOS II induzida pela IL-1, o que,

embora não demonstre o envolvimento do anião superóxido como mediador dessa resposta, mostra a sua capacidade para activar a transcrição daquele gene.

É igualmente interessante um trabalho recente em que a administração de SOD reduziu os sinais inflamatórios num modelo de artrite induzida em ratos (Corvo *et al.*, 2002), permitindo especular que tal eficácia pode ter como mecanismo subjacente, a inibição da activação do NF- $\kappa$ B e da expressão de genes cujos produtos estão envolvidos na génese e manutenção do processo inflamatório, nomeadamente da NOS II.

Por outro lado, o peroxinitrito que resulta da reacção entre o anião superóxido e o NO, é outra ROS que ultimamente tem vindo a ser apontada como mediador de várias respostas induzidas pela IL-1 em diversos tipos de células. Em condrócitos articulares bovinos, nomeadamente, foi observado que o peroxinitrito medeia a inibição da síntese de proteoglicanos que ocorre em resposta à IL-1 (Oh *et al.*, 1998). No entanto, é pouco provável que a inibição da activação do NF- $\kappa$ B e da expressão da NOS II que observámos nas células tratadas com SOD (Figuras 4.1.7, 4.1.9 e 4.1.10), seja o resultado da ausência de peroxinitrito. Por um lado, verificámos que a NOS I, uma isoforma constitutiva da NOS que constatámos ser expressa nos condrócitos, é rapidamente degradada nas células tratadas com IL-1 (Figura 3.2), enquanto a isoforma indutível (NOS II) demora algumas horas a ser expressa e a produzir NO (Figuras 3.1.1 e 3.1.3A). Deste modo, imediatamente após a adição de IL-1 às células, a concentração de NO deve ser muito diminuta e, portanto, a formação de quantidades apreciáveis de peroxinitrito é improvável. Verificámos também que o NO exerce um efeito inibitório na activação do NF- $\kappa$ B e na expressão da NOS II (*vide* capítulo 4.3), o que também não apoia o envolvimento do peroxinitrito na indução daquelas respostas pela IL-1.

Em resumo, os resultados apresentados mostram que as ROS são necessárias para a activação do NF- $\kappa$ B e para a expressão subsequente da NOS II, induzidas pela IL-1 e que o anião superóxido é a ROS que medeia essas respostas, em condrócitos articulares bovinos. Por outro lado, estes resultados também indicam que, nestas células, o NF- $\kappa$ B é indispensável para ocorrer a expressão da NOS II em resposta à IL-1.

## 4.2. O PAPEL DAS CINASES DE TIROSINA E DAS MAPK NA ACTIVAÇÃO DO NF- $\kappa$ B E NA EXPRESSÃO DA NOS II

Diversos sistemas de cinases de proteínas têm sido implicados nas vias de sinalização intracelulares que convertem os sinais veiculados por uma grande variedade de estímulos, na expressão da NOS II. No entanto, existe uma grande variabilidade nas vias de sinalização utilizadas, não só por estímulos diferentes, mas até pelo mesmo estímulo ao actuar em células distintas. Em muitos casos, o mesmo mediador intracelular pode, numa célula, promover a expressão da NOS II e noutras ter o efeito oposto.

Algumas isoformas da PKC, por exemplo, são necessárias para a expressão da NOS II em macrófagos (Díaz-Guerra *et al.*, 1996) e em astrócitos (Chen *et al.*, 1998), mas não em hepatócitos embrionários (Lee *et al.*, 1997a) ou em células epiteliais do intestino (Kleinert *et al.*, 1998b), enquanto em células musculares cardíacas, a activação da PKC diminui a síntese de proteína, mas não de ARNm, da NOS II induzida pela IL-1 (LaPointe e Sitkins, 1996).

O papel do cAMP e da “cinase de proteínas dependente do cAMP” (PKA) é igualmente variável e específico do tipo de célula considerado, promovendo a expressão da NOS II em diversos tipos de células (Boese *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999; LaPointe e Sitkins, 1996; Martel-Pelletier *et al.*, 1999; Oddis *et al.*, 1996), mas inibindo-a ou não tendo qualquer efeito noutras células (Lee *et al.*, 1997a; Pahan *et al.*, 1997). Em condrócitos articulares, a PKC e a PKA são necessárias para a expressão da NOS II induzida pela IL-17 (Martel-Pelletier *et al.*, 1999), mas não parecem desempenhar qualquer função quando o estímulo é o LPS ou a IL-1 (Geng *et al.*, 1995).

As PTK são necessárias para a expressão da NOS II em muitos tipos de células (Corbett *et al.*, 1994; Doi *et al.*, 2002; Kleinert *et al.*, 1998a,b; LaPointe e Sitkins, 1996; Lee *et al.*, 1997a), incluindo condrócitos, nos quais participam na expressão da NOS II, quer quando o estímulo é a IL-17 (Martel-Pelletier *et al.*, 1999), quer quando se trata da IL-1 ou do LPS (Geng *et al.*, 1995). No entanto, em células musculares lisas da artéria pulmonar de rato, as PTK parecem desempenhar uma função oposta, inibindo a expressão da NOS II (Finder *et al.*, 2001).

Dos vários membros das MAPK, a p38<sup>MAPK</sup> e a p42/44<sup>MAPK</sup> têm sido as mais estudadas em relação ao seu papel na expressão da NOS II, devido à existência de inibidores específicos de cada uma delas. Assim, diversos estudos têm demonstrado o envolvimento de uma só ou destas duas enzimas na expressão da NOS II induzida por diversos estímulos, numa grande variedade de células (Chen e Wang, 1999; Da Silva *et al.*, 1997; Kristof *et al.*, 2001; LaPointe e Isenovi, 1999; Martel-Pelletier *et al.*, 1999). No extremo oposto, foi também observado que a actividade da p38<sup>MAPK</sup> pode constituir um mecanismo repressor da expressão da NOS II induzida pela IL-1 (Finder *et al.*, 2001; Guan *et al.*, 1997).

Por outro lado, algumas das cascatas de sinalização que conduzem à activação dos três membros das MAPK, JNK, p38<sup>MAPK</sup> e p42/44<sup>MAPK</sup>, podem também estar envolvidas na activação do NF-κB e na expressão subsequente da NOS II (Chen e Wang, 1999; Janssen-Heininger *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 1997b; Lee e Koh, 2003). No entanto, foi igualmente observado que a activação da p42/44<sup>MAPK</sup> inibe o NF-κB (Janssen-Heininger *et al.*, 1999).

Existem, pois, diferenças muito significativas entre as famílias de cinases de proteínas necessárias para a expressão da NOS II em células diferentes e em resposta a estímulos distintos, reforçando a noção de que a região promotora do gene da NOS II é regulada de uma forma específica do tipo de célula e do estímulo considerados. Assim, procurámos estudar o papel das PTK e das MAPK, p38<sup>MAPK</sup> e p42/44<sup>MAPK</sup>, como mediadoras da activação do NF-κB e da expressão da NOS II, induzidas pela IL-1 em condrócitos articulares bovinos.

#### **4.2.1. O Tirfostin B42, a Genisteína e o SB 203580 inibem a expressão da NOS II induzida pela IL-1**

Para estudar o papel das PTK na expressão e actividade da NOS II, usámos a Genisteína que é um inibidor selectivo das PTK em geral (Akiyama e Ogawara, 1991) e o Tirfostin B42 (também designado por AG-490) que inibe especificamente a “cinase Janus”-2 (“Janus kinase”-2, JAK2) (Meydan *et al.*, 1996), uma PTK pertencente à família Janus que inclui várias enzimas envolvidas na fosforilação e conseqüente activação dos

factores de transcrição “transdutores de sinais e activadores da transcrição” (“Signal Transducers and Activators of Transcription”, STAT) que desempenham funções importantes na regulação das respostas a muitas citocinas e no desenvolvimento e sobrevivência celulares (O’Shea *et al.*, 2002).

Do mesmo modo, utilizámos dois inibidores específicos, o SB 203580 e o PD 98059, para avaliar o papel da p38<sup>MAPK</sup> e da p42/44<sup>MAPK</sup>, respectivamente, na expressão e actividade da NOS II. O SB 203580 é um composto piridinilimidazólico que inibe a actividade da p38<sup>MAPK</sup> com elevada especificidade (Han *et al.*, 1994; Tong *et al.*, 1997). O PD 98059, por sua vez, é um inibidor específico da “cinase 1 das MAPK” (“MAPK kinase 1”, MAPKK1, MKK1 ou MEK1) que é a enzima que activa directamente a p42/44<sup>MAPK</sup>. O PD 98059 é, por isso, um inibidor específico da activação da p42/44<sup>MAPK</sup> (Dudley *et al.*, 1995).

Os sobrenadantes das culturas de condrócitos tratadas com estes compostos foram usados para dosear os nitritos, de modo a determinar os seus efeitos na actividade da NOS II induzida pela IL-1. As células correspondentes foram utilizadas para avaliar o efeito daqueles compostos na viabilidade celular. Utilizando o método de redução do MTT descrito no capítulo 2.2, verificámos que nenhum dos quatro compostos, em nenhuma das concentrações utilizadas (iguais às indicadas na Tabela 4.2.1), reduziu a viabilidade dos condrócitos, quer em comparação com as células Controlo, quer com as células tratadas com IL-1 (resultados não apresentados). Concluímos, portanto, que nas condições experimentais utilizadas, nenhum dos inibidores utilizados exerceu efeitos tóxicos nos condrócitos em cultura.

Para dosear os nitritos acumulados no meio de cultura, as células foram tratadas com Tirfostin B42, Genisteína, SB 203580 ou PD 98059 durante 2 h e depois incubadas na presença ou ausência de IL-1 (20 ng/ml) e dos inibidores durante mais 18h. Não se apresentam estes resultados, mas na ausência de IL-1, nenhum dos compostos afectou a concentração de nitrito no sobrenadante das culturas celulares, relativamente aos valores obtidos no Controlo.

**Tabela 4.2.1. Efeito dos inibidores das PTK e das MAPK na produção de NO induzida pela IL-1**

|  | Concentração de Nitrito ( $\mu\text{M}$ ) <sup>a</sup> | % do Nitrito produzido em resposta à IL-1 <sup>b</sup> |
|--|--|--|
| IL-1, 20 ng/ml                         | 30.9 $\pm$ 1.1   | 100 $\pm$ 3.5  |
| Tirfostin B42, 10 $\mu\text{M}$ + IL-1 | 21.1 $\pm$ 0.4*  | 68.1 $\pm$ 1.3   |
| Tirfostin B42, 25 $\mu\text{M}$ + IL-1 | 14.1 $\pm$ 0.9 <sup>‡</sup>                            | 45.5 $\pm$ 2.9   |
| Tirfostin B42, 50 $\mu\text{M}$ + IL-1 | 6.1 $\pm$ 0.5 <sup>‡</sup>                             | 19.6 $\pm$ 1.6   |
| Genisteína, 15 $\mu\text{M}$ + IL-1    | 24.4 $\pm$ 0.4*  | 78.9 $\pm$ 1.4   |
| Genisteína, 30 $\mu\text{M}$ + IL-1    | 18.4 $\pm$ 0.2*  | 59.7 $\pm$ 0.7   |
| Genisteína, 60 $\mu\text{M}$ + IL-1    | 6.4 $\pm$ 0.6 <sup>‡</sup>                             | 20.7 $\pm$ 1.9   |
| SB 203580, 10 $\mu\text{M}$ + IL-1     | 13.9 $\pm$ 0.8 <sup>‡</sup>                            | 45.0 $\pm$ 2.5   |
| SB 203580, 20 $\mu\text{M}$ + IL-1     | 11.1 $\pm$ 0.3 <sup>‡</sup>                            | 36.0 $\pm$ 1.0   |
| SB, 203580, 40 $\mu\text{M}$ + IL-1    | 7.9 $\pm$ 0.9 <sup>‡</sup>                             | 25.7 $\pm$ 2.8   |
| PD 98059, 15 $\mu\text{M}$ + IL-1      | 34.7 $\pm$ 0.6 <sup>§</sup>                            | 112.4 $\pm$ 1.9  |
| PD 98059, 30 $\mu\text{M}$ + IL-1      | 31.6 $\pm$ 0.1 <sup>§</sup>                            | 102.4 $\pm$ 0.4  |
| PD 98059, 60 $\mu\text{M}$ + IL-1      | 29.5 $\pm$ 1.3 <sup>§</sup>                            | 95.6 $\pm$ 4.1   |

<sup>a</sup> Os valores apresentados são a média  $\pm$  SD da concentração de nitrito determinada em, pelo menos, três experiências independentes, cada uma realizada em triplicado, de acordo com o método descrito no capítulo 2.8.1. <sup>b</sup> Os valores apresentados representam a concentração de nitrito expressa na forma de percentagem, em relação à concentração obtida nas células tratadas apenas com IL-1. \* $p < 0,005$ , <sup>‡</sup> $p < 0,001$  e <sup>§</sup>não significativo relativamente à IL-1.

Os resultados apresentados na tabela 4.2.1 mostram que tanto a Genisteína, como o Tirphostin B42 reduziram a acumulação de nitrito induzida pela IL-1, indicando, portanto, que estes compostos inibem a produção de NO. Essa redução foi tanto maior, quanto mais elevadas as concentrações utilizadas, tendo sido quase completa ( $\approx 80\%$ ) com 60  $\mu\text{M}$  de Genisteína e com 50  $\mu\text{M}$  de Tirfostin B42 (Tabela 4.2.1).

Os resultados obtidos nas células tratadas com os inibidores das MAPK mostram que o SB 203580, mas não o PD 98059, inibiu a produção de NO induzida pela IL-1, de

uma forma dependente da concentração. Na concentração mais alta utilizada (40  $\mu\text{M}$ ), o SB 203580 inibiu a produção de NO em cerca de 74%.

Figura 4.2.1. Efeito dos inibidores das MAPK e das PTK nos níveis de ARNm da NOS II induzidos pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com cada um dos inibidores durante 2h, antes da adição de IL-1 (20 ng/ml) e depois incubadas por mais 6h. O ARNm foi detectado por *Northern blot*, de acordo com o método 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 ao ARNm da NOS II e da GAPDH, obtidas naquelas três experiências. \* $p < 0,001$  relativamente à IL-1.

Para determinar se a inibição da produção de NO resultava de efeitos a nível da expressão da NOS II, avaliámos os níveis de ARNm e de proteína nos extractos celulares obtidos de células tratadas com os vários inibidores na presença ou ausência de IL-1. O Tirfostin B42 (50  $\mu\text{M}$ ), a Genisteína (60  $\mu\text{M}$ ) e o SB 203580 (40  $\mu\text{M}$ ) reduziram os níveis de ARNm (Figura 4.2.1) e de proteína da NOS II (Figura 4.2.2) sintetizados em resposta à

IL-1, em cerca de 82%, 78% e 77,6%, respectivamente. A percentagem de inibição da expressão da NOS II originada por cada um destes compostos é idêntica à obtida em relação à produção de NO (Tabela 4.2.1). Assim, concluímos que estes compostos diminuíram a produção de NO por inibirem a transcrição do gene da NOS II, com a consequente redução da síntese do ARNm e da proteína. Uma vez que a Genisteína e o Tirfostin B42 inibem especificamente PTK e o SB 203580 é um inibidor específico da p38<sup>MAPK</sup>, estes resultados também indicam que a indução da expressão da NOS II, em condrócitos articulares e em resposta à IL-1, requer a actividade destes dois grupos de enzimas.

Figura 4.2.2. Efeito dos inibidores das MAPK e das PTK nos níveis de proteína da NOS II induzidos pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com cada um dos inibidores durante 2h, antes da adição de IL-1 (20 ng/ml) e depois incubadas por mais 18h. A proteína foi detectada por *Western blot*, de acordo com o método descrito no capítulo 2.7. 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 proteína da NOS II e da actina, obtidas naquelas três experiências. \* $p < 0,001$  relativamente à IL-1.

Pelo contrário, mas de acordo com a ausência de efeito em relação à produção de NO, o PD 98059 não teve qualquer efeito nos níveis de ARNm (Figura 4.2.1) e de proteína (Figura 4.2.2) da NOS II, apesar da concentração utilizada nestas últimas experiências (60  $\mu$ M) ser o dobro da necessária para inibir completamente a actividade da MEK1 (Dudley *et al.*, 1995). Assim, estes resultados indicam que a MEK1 e, conseqüentemente, a p42/44<sup>MAPK</sup> não participam na indução da expressão da NOS II em resposta à IL-1, em condrócitos articulares bovinos.

#### **4.2.2. A Genisteína e o Tirfostin B42, mas não o SB 203580, inibem a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1**

Para verificarmos se a inibição da expressão da NOS II é o reflexo de um efeito idêntico a nível da activação do NF- $\kappa$ B, as culturas de condrócitos foram tratadas com Tirfostin B42, Genisteína ou SB 203580, isto é, com os compostos que inibiram a expressão da NOS II, induzida pela IL-1.

Os resultados apresentados na Figura 4.2.3 mostram que o Tirfostin B42 e a Genisteína reduziram a intensidade das bandas correspondentes aos complexos com NF- $\kappa$ B, comparativamente com a intensidade da banda observada nos extractos obtidos das células tratadas apenas com IL-1. Além disso, o efeito inibitório observado com o Tirfostin B42 aumentou com o incremento da sua concentração. O SB 203580, pelo contrário, não teve qualquer efeito na intensidade daqueles complexos, apesar de na mesma concentração (40  $\mu$ M), ter inibido, quase completamente, a expressão da NOS II (Figura 4.2.1).

Em conjunto, estes resultados indicam que as PTK medeiam a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1, enquanto a p38<sup>MAPK</sup> não parece estar envolvida nesse processo.

#### **4.2.3. Discussão dos resultados**

Em conjunto, os resultados apresentados (Tabela 4.1.1 e Figuras 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3) mostram que a Genisteína e o Tirfostin B42 inibem a activação do NF- $\kappa$ B e a

expressão da NOS II em resposta à IL-1. Além disso, as concentrações dos dois inibidores que reduziram a expressão da NOS II, impediram também a activação do NF- $\kappa$ B. Isto indica que os dois processos estão relacionados, isto é, que a expressão da NOS II depende da activação do NF- $\kappa$ B que, por sua vez, requer a actividade de PTK. Sendo o Tirfostin B42 um inibidor específico da JAK2, a sua capacidade para inibir a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão da NOS II sugere que esta enzima participa nestes processos.

Figura 4.2.3. Os inibidores das PTK, mas não o inibidor da p38<sup>MAPK</sup>, impedem a activação do NF- $\kappa$ B. As culturas de condrócitos foram tratadas com as concentrações indicadas de cada um dos três inibidores, durante 2h, antes de ser adicionada a IL-1 (20 ng/ml), após o que foram incubadas por mais 30 minutos. Os extractos nucleares, preparados como descrito no capítulo 2.5, foram utilizados para detectar, por EMSA, a formação de complexos específicos entre os dímeros NF- $\kappa$ B e um oligonucleótido correspondente ao elemento  $\kappa$ B. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes.

Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior em que foi demonstrado o envolvimento de PTK na expressão da NOS II, induzida pela IL-1, em condrócitos articulares (Geng *et al.*, 1995) e com estudos noutras células em que PTK, incluindo a JAK2, foram igualmente implicadas na activação do NF- $\kappa$ B e na expressão da NOS II, particularmente em resposta ao interferon- $\gamma$  (Lee *et al.*, 1997a; Nishiya *et al.*, 1995).

Porém, a capacidade da IL-1 para activar a JAK2 só recentemente foi observada nalgumas células (Doi *et al.*, 2002; Finder *et al.*, 2001) e os efeitos daí resultantes na expressão da NOS II, são diametralmente opostos. Finder e colaboradores (2001) verificaram que a activação da JAK2 pela IL-1, em células musculares lisas vasculares de rato, constitui um mecanismo que se opõe à expressão da NOS II. Contudo, Doi e colaboradores (2002), utilizando o mesmo tipo de células, verificaram que tanto o Tirfostin B42, como a introdução nessas células de um gene mutante da JAK2 com acção dominante negativa, inibem a expressão da NOS II, induzida pela IL-1 ou pelo TNF- $\alpha$ . Neste último estudo foi também observado que as PTK e a JAK2, em particular, não são necessárias para a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1 e pelo TNF- $\alpha$ , ao contrário do que observámos em condrócitos articulares (Figura 4.2.2) e do que acontece também noutras células, em resposta a estímulos diferentes (Lee *et al.*, 1997a; Nishiya *et al.*, 1995). Como não existem estudos que demonstrem a capacidade da IL-1 para activar a JAK2 em condrócitos articulares, não podemos afirmar, com rigor, que esta PTK esteja envolvida na activação do NF- $\kappa$ B e na expressão da NOS II. Assim, os resultados obtidos neste trabalho indicam que a IL-1 activa uma via de sinalização intracelular mediada por PTK que está associada e é essencial para a activação do NF- $\kappa$ B e para a expressão subsequente da NOS II, em condrócitos articulares bovinos. A JAK2 poderá ser uma das PTK envolvida nessa via de sinalização intracelular, mas só a demonstração da sua activação em resposta à IL-1, nestas células, poderá confirmar esta possibilidade.

Foi demonstrado que a IL-1 activa os três membros principais das MAPK em condrócitos articulares (Lo *et al.*, 1996; Scherle *et al.*, 1997) e que a p38<sup>MAPK</sup> é necessária para a expressão da NOS II nestas células (Badger *et al.*, 1998). De acordo com este estudo, os resultados apresentados na Tabela 4.2.1 e nas Figuras 4.2.1 e 4.2.2 também mostram que, além das PTK, a p38<sup>MAPK</sup> está envolvida na expressão da NOS II induzida

pela IL-1. A actividade da p42/44<sup>MAPK</sup>, pelo contrário, não parece ser necessária para esta resposta (Tabela 4.2.1 e Figuras 4.2.1 e 4.2.2).

Noutras células, o papel da p38<sup>MAPK</sup> e da p42/44<sup>MAPK</sup> na expressão da NOS II induzida quer pela IL-1, quer por outros estímulos, é bastante variável. Por exemplo, em células musculares cardíacas tratadas com IL-1 (LaPointe e Isenovi, 1999) e em células epiteliais pulmonares estimuladas com várias citocinas e com LPS associado ao interferon- $\gamma$  (Kristof *et al.*, 2001), ambas as MAPK participam na indução da expressão da NOS II. Já em astrócitos, o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\alpha$  associados induzem a expressão da NOS II por um mecanismo que envolve a p38<sup>MAPK</sup>, mas não a p42/44<sup>MAPK</sup> (Da Silva *et al.*, 1997). Um outro estudo concluiu que a expressão da NOS II, induzida pelo LPS, requer a p38<sup>MAPK</sup>, mas não a p42/44<sup>MAPK</sup> (Chen e Wang, 1999), enquanto outro, utilizando a mesma linha celular de macrófagos, concluiu que nenhuma das duas MAPK é necessária para essa resposta (Paul *et al.*, 1999). Resultados idênticos a estes últimos foram também observados em macrófagos de rato estimulados com interferon- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (Chan *et al.*, 1999). Outro estudo, numa linha de células epiteliais intestinais, também concluiu que nenhuma daquelas MAPK está envolvida na expressão da NOS II, induzida por uma mistura de citocinas contendo interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Kleinert *et al.*, 1998b).

Por outro lado, num estudo em que foram utilizados condrócitos articulares humanos obtidos de doentes com osteoartrite, a inibição de cada uma daquelas MAPK impediu a expressão da NOS II em resposta à IL-17 (Martel-Pelletier *et al.*, 1999), mas noutro estudo em que foram utilizados condrócitos humanos obtidos de doadores sem história de doença artrítica, só a inibição da p38<sup>MAPK</sup> reduziu a expressão da NOS II, em resposta à mesma citocina (Shalom-Barak *et al.*, 1998). Assim, a p38<sup>MAPK</sup> parece ser indispensável para a expressão da NOS II, quer em resposta à IL-17, quer à IL-1 (Tabela 4.2.1 e Figuras 4.2.1 e 4.2.2; Badger *et al.*, 1998). Pelo contrário, a função da p42/44<sup>MAPK</sup> parece depender do estímulo e do estado metabólico da célula. De facto, a p42/44<sup>MAPK</sup> é necessária para a expressão da NOS II em resposta à IL-17 em condrócitos artríticos (Martel-Pelletier *et al.*, 1999), mas não em condrócitos normais (Shalom-Barak *et al.*, 1998) e é também dispensável em resposta à IL-1, pelo menos em condrócitos normais (Tabela 4.2.1 e Figuras 4.2.1 e 4.2.2). Da mesma forma, a PKC e a PKA participam na expressão da NOS II induzida pela IL-17 em condrócitos artríticos (Martel-Pelletier *et al.*,

1999), mas não são necessárias para a resposta à IL-1 em condrócitos normais (Geng *et al.*, 1995), o que, além das diferenças resultantes da utilização de estímulos diferentes, pode igualmente reflectir a importância do estado metabólico das células, condicionado pela existência ou ausência de um processo patológico. Embora a espécie a partir da qual foram obtidos os condrócitos possa também contribuir para as discrepâncias observadas, esse não parece ser o factor fundamental, uma vez que os estudos relativos à PKC e à PKA, quer com a IL-17 (Martel-Pelletier *et al.*, 1999), quer com a IL-1 (Geng *et al.*, 1995), foram realizados em condrócitos humanos.

Diversos estudos indicam que as MAPK podem participar na activação do NF- $\kappa$ B. No entanto, os mecanismos que podem estar envolvidos nesse processo podem ser muito variáveis, indo desde a activação do complexo IKK, até à activação da capacidade de indução da transcrição, particularmente do RelA, sem interferência com a translocação dos dímeros ou com a sua afinidade para o DNA. Por exemplo, a “cinase 1 da MEK” (“MEK kinase” 1, MEKK1) que é uma cinase fundamental para a activação da JNK em várias células (Chang e Karin, 2001), foi implicada na activação do complexo IKK e, conseqüentemente, do NF- $\kappa$ B (Janssen-Heininger *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1997b; Lee e Koh, 2003). A própria JNK foi também implicada na activação do NF- $\kappa$ B, embora o mecanismo subjacente não seja conhecido, mas pareça não implicar a fosforilação directa do I $\kappa$ B- $\alpha$  (Meyer *et al.*, 1996).

Nalgumas células, a via MEK1/p42/44<sup>MAPK</sup> e a p38<sup>MAPK</sup> foram também implicadas na activação do NF- $\kappa$ B através de vários mecanismos distintos, mas a importância de cada uma destas enzimas varia de célula para célula. Por exemplo, em linfócitos B imaturos, o PD 98059 que inibe a via MEK1/p42/44<sup>MAPK</sup>, inibiu a ligação do NF- $\kappa$ B ao elemento  $\kappa$ B induzida pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Lee e Koh, 2003), enquanto em células musculares lisas vasculares estimuladas com IL-1, o mesmo inibidor impediu a degradação do I $\kappa$ B- $\beta$ , mas não do I $\kappa$ B- $\alpha$ , e a activação prolongada do NF- $\kappa$ B (Jiang *et al.*, 2001). Num estudo muito recente, foi demonstrado que a via MEK1/p42/p44<sup>MAPK</sup> é necessária para que o RelA adquira a capacidade de activar a transcrição dos genes alvo (Vermeulen *et al.*, 2003). Numa linha celular de macrófagos, pelo contrário, a inibição desta via de sinalização não teve qualquer efeito na ligação do NF- $\kappa$ B ao elemento  $\kappa$ B, nem na expressão da NOS II. Assim, neste último tipo de células, a via MEK1/p42/p44<sup>MAPK</sup> não

parece desempenhar qualquer papel na indução da afinidade dos dímeros NF- $\kappa$ B para o DNA, e também não afecta a capacidade desses dímeros para activarem a transcrição (Chen e Wang, 1999). Já em células epiteliais pulmonares de rato, a activação da MEK1/p42/44<sup>MAPK</sup> parece exercer um efeito repressor da actividade do NF- $\kappa$ B (Janssen-Heininger *et al.*, 1999).

De forma análoga, o papel da p38<sup>MAPK</sup> na activação do NF- $\kappa$ B e o mecanismo celular subjacente também variam consoante o tipo de célula. Nalgumas células, a inibição da p38<sup>MAPK</sup> impede a ligação do NF- $\kappa$ B ao elemento  $\kappa$ B (Chen e Wang, 1999). Noutras células, a p38<sup>MAPK</sup> participa na activação da transcrição de genes dependentes do NF- $\kappa$ B, sem interferir com a translocação dos dímeros para o núcleo, nem com a sua ligação ao DNA (Bergmann *et al.*, 1998; Wesselborg *et al.*, 1997), mas sendo necessária para esses dímeros adquirirem a capacidade de indução da transcrição dos genes alvo (Bergmann *et al.*, 1998; Vermeulen *et al.*, 2003; Wesselborg *et al.*, 1997). Os resultados apresentados na Figura 4.2.3 mostram que, em condrócitos articulares, a inibição da p38<sup>MAPK</sup> não tem qualquer efeito na afinidade dos dímeros NF- $\kappa$ B para o elemento  $\kappa$ B. Porém, não podemos excluir a possibilidade desta enzima ser necessária para a indução da actividade transcrricional desses dímeros, uma vez que o SB 203580 impediu a expressão da NOS II (Figuras 4.2.1 e 4.2.2).

Diversas cinases de proteínas têm sido implicadas na fosforilação do RelA que é essencial para a indução da sua capacidade de activar a transcrição (Ghosh e Karin, 2002; Vermeulen *et al.*, 2002). Entre essas enzimas destacam-se a “cinase de proteínas activada por mitogénios e stress”-1 (“Mitogen and Stress-activated protein Kinase”-1, MSK1) e as “cinases de proteínas activadas pelas MAPK” (“MAPK-activated protein kinase”, MAPKAPK). A MSK1 é activada pela p38<sup>MAPK</sup> em resposta a stress físico (radiação ultra-violeta) e químico (oxidantes, citocinas pró-inflamatórias) e pela p42<sup>MAPK</sup> em resposta a factores de crescimento e a ésteres do forbol (Deak *et al.*, 1998) e foi demonstrado que fosforila o RelA conferindo-lhe capacidade para activar a transcrição de genes dependentes do NF- $\kappa$ B (Vermeulen *et al.*, 2003). A MAPKAPK1 e a MAPKAPK2/3 são activadas de forma específica pela p42/44<sup>MAPK</sup> (Alessi *et al.*, 1995) e pela p38<sup>MAPK</sup> (Cuenda *et al.*, 1995), respectivamente, tendo sido sugerido que podem também participar na indução da actividade transcrricional do NF- $\kappa$ B (Martel-Pelletier *et al.*, 1999).

Assim, é possível que a activação do NF- $\kappa$ B e a activação das MAPK, particularmente da p38<sup>MAPK</sup>, sejam mediadas por vias de sinalização distintas, mas que convergem a nível nuclear, levando à indução da actividade transcricional do RelA e, conseqüentemente, à transcrição de genes alvo do NF- $\kappa$ B (Vermeulen *et al.*, 2002; Wesselborg *et al.*, 1997).

É, pois, possível que, nos condrócitos tratados com SB 203580, a inibição da p38<sup>MAPK</sup> tenha impedido a activação de uma outra cinase de proteínas, como a MSK1 ou a MAPKAPK2/3, tendo como consequência a inibição da fosforilação do RelA e da sua capacidade de activar a transcrição. Desse modo, a expressão da NOS II não pôde ocorrer (Figuras 4.2.1 e 4.2.2), embora a afinidade dos dímeros NF- $\kappa$ B para o elemento  $\kappa$ B não tivesse sido alterada. Porém, estes resultados podem ter outra explicação, já que a p38<sup>MAPK</sup> foi também implicada na activação de outros factores de transcrição (Goh *et al.*, 1999; Mayo *et al.*, 2001). Desta forma, é igualmente possível que a inibição da p38<sup>MAPK</sup> tenha impedido a activação de outro factor de transcrição que, além do NF- $\kappa$ B, seja também indispensável para a expressão da NOS II em resposta à IL-1, em condrócitos articulares.

### 4.3. O PAPEL DO NO NA ACTIVAÇÃO DO NF- $\kappa$ B E NA EXPRESSÃO DA NOS II

O papel do NO como mediador de algumas das respostas catabólicas induzidas pela IL-1 em condrócitos articulares é bem conhecido (*vide* capítulo 1.4.4). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos através dos quais o NO promove ou inibe a transcrição de genes cuja expressão é regulada pela IL-1.

Estudos em vários tipos de células mostraram que o NO é capaz de modular a actividade de vários factores de transcrição, entre os quais o NF- $\kappa$ B. Não obstante, em células diferentes, o NO tanto pode promover (Lander *et al.*, 1993; Mühl e Pfeilschifter, 1995; Zouki *et al.*, 2001), como inibir (Colasanti *et al.*, 1995; dela Torre *et al.*, 1999; Katsuyama *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1995; Spiecker *et al.*, 1997) a actividade deste factor de transcrição, induzida por citocinas e outros estímulos.

Por outro lado, o NO também é capaz de regular a sua própria produção em resposta à IL-1 e a outras citocinas, tanto por modular a expressão da NOS II (Colasanti *et al.*, 1995; Katsuyama *et al.*, 1998; Mühl e Pfeilschifter, 1995; Park *et al.*, 1997; Togashi

*et al.*, 1997), como por inibir directamente a sua actividade catalítica (Assreny *et al.*, 1993; Griscavage *et al.*, 1993; Mühl e Pfeilschifter, 1995). A nível da transcrição, o NO aumenta a expressão da NOS II induzida pela IL-1 em células mesangiais glomerulares de rato (Mühl e Pfeilschifter, 1995), mas tem o efeito oposto, ou seja, inibe a transcrição do gene da NOS II, em células da glia (Colasanti *et al.*, 1995; Park *et al.*, 1997) e em células musculares lisas vasculares (Katsuyama *et al.*, 1998). Em macrófagos estimulados com LPS, o NO impede a síntese da proteína, mas não exerce qualquer efeito a nível da transcrição do gene da NOS II (Han *et al.*, 2001b). Outros estudos em que foram utilizados inibidores da actividade da NOS, ainda que indirectamente, também favorecem a possibilidade de o NO exercer um efeito negativo na expressão da NOS II. Por exemplo, num modelo de inflamação hepática crónica, situação em que a expressão da NOS II está aumentada, a inibição da sua actividade aumentou significativamente os níveis de ARNm e de proteína, embora a produção de nitrito diminuísse de forma acentuada (Luss *et al.*, 1994). A exposição de células endoteliais, tratadas com interferon- $\gamma$  e LPS, ao NO produzido por macrófagos cultivados conjuntamente com aquelas células, inibiu a expressão da VCAM-1 que depende do NF- $\kappa$ B, enquanto o tratamento com inibidores da actividade da NOS, aumentou a expressão da VCAM-1 e da NOS II em cada um daqueles tipos de célula, respectivamente, (Peng *et al.*, 1998).

Os efeitos antagónicos que o NO exerce na expressão da NOS II, em diferentes células, têm sido atribuídos à sua capacidade para induzir a activação do NF- $\kappa$ B numas células e para a impedir noutras. Por isso, estudámos a capacidade do NO para modular, inibindo ou promovendo, a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão da NOS II induzidas pela IL-1, em condrócitos articulares bovinos. Para tal, usámos a S-Nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) que, em solução aquosa, liberta NO.

#### **4.3.1. O NO inibe a expressão da NOS II induzida pela IL-1**

Os resultados apresentados na Figura 4.3.1A mostram que, em concentrações de 10 a 300  $\mu$ M, a adição de SNAP às culturas de condrócitos não induziu a transcrição do gene da NOS II. Não obstante, nas culturas celulares tratadas com SNAP (300  $\mu$ M) e com IL-1 (5 ng/ml) em simultâneo, a intensidade da banda de ARNm diminuiu

significativamente em relação à obtida nas células tratadas apenas com IL-1. Do mesmo modo, o dador de NO, por si só, não induziu a síntese de proteína da NOS II em nenhuma uma das concentrações testadas (10 a 300  $\mu\text{M}$ ), mas quando adicionado às culturas de condrócitos conjuntamente com a IL-1, reduziu, de forma acentuada, a quantidade de proteína sintetizada, em comparação com a obtida nas células tratadas apenas com IL-1 (Figura 4.3.1B).

Para avaliarmos a actividade da NOS nas células tratadas com SNAP, medimos a produção de [ $^3\text{H}$ ]citrulina a partir de [ $^3\text{H}$ ]arginina, em vez de dosearmos os nitritos acumulados no meio, já que o nitrito resultante da oxidação espontânea do NO libertado pelo SNAP, iria contribuir para a concentração total de nitrito no sobrenadante das culturas celulares, independentemente de eventuais efeitos na expressão ou na actividade da NOS II. Assim, as culturas celulares foram incubadas durante 16h, com várias concentrações de IL-1 (0 a 20 ng/ml), na ausência ou na presença de SNAP (300  $\mu\text{M}$ ) adicionado em simultâneo. A actividade da NOS foi então doseada nos extractos celulares totais, conforme descrito no capítulo 2.8.2.

A figura 4.3.2 mostra que a quantidade de [ $^3\text{H}$ ]citrulina produzida foi idêntica nos extractos celulares obtidos das células não tratadas (IL-1, 0 ng/ml) e nos obtidos a partir das culturas tratadas apenas com SNAP (300  $\mu\text{M}$ ). Nos extractos celulares obtidos a partir das células tratadas com várias concentrações de IL-1 e com SNAP (300  $\mu\text{M}$ ) houve, porém, uma redução acentuada da quantidade de [ $^3\text{H}$ ]citrulina produzida em comparação com os resultados obtidos nas células tratadas com a concentração de IL-1 correspondente. Essa redução tornou-se significativa para concentrações de IL-1 iguais ou superiores a 5 ng/ml. O efeito resultante da adição de SNAP não pode ser devido à inibição directa da actividade da NOS pelo NO libertado. De facto, a sua libertação a partir daquele composto é muito rápida e eficiente e o próprio NO libertado também se oxida rapidamente a nitrito. Deste modo, o NO libertado pelo SNAP não pode ter permanecido no meio de cultura durante o tempo necessário para ocorrer a síntese da NOS II induzida pela IL-1 (*vide* Capítulo 3). Assim sendo, o decréscimo da quantidade de [ $^3\text{H}$ ]citrulina produzida nas células tratadas simultaneamente com IL-1 e com SNAP só pode resultar da redução da síntese da enzima e não da inibição da actividade da enzima já formada.

Figura 4.3.1. A adição de NO inibe a expressão da NOS II induzida pela IL-1. **A**: Efeito do dador de NO, SNAP, nos níveis de ARNm da NOS II; **B**: Efeito do SNAP nos níveis de proteína da NOS II. As culturas de condrócitos foram tratadas simultaneamente com as concentrações de SNAP indicadas (10 a 300  $\mu$ M) e com IL-1 (5 ng/ml) ou apenas com SNAP (300  $\mu$ M), durante 6h (**A**) ou 16h (**B**). O ARNm e a proteína foram detectados por *Northern blot* e por *Western blot*, respectivamente, de acordo com os métodos descritos no capítulo 2. Cada uma das autorradiografias apresentadas é representativa de três ensaios independentes. Os resultados apresentados nos gráficos são as médias  $\pm$  SD das razões entre as intensidades das bandas relativas à NOS II (ARNm em **A** e proteína em **B**) e à GAPDH (**A**) ou à actina (**B**), obtidas naquelas três experiências.  $^{\S}$ p<0,001 relativamente à IL-1.

Para confirmarmos que o efeito inibitório observado nas células tratadas com SNAP resulta do NO libertado, utilizámos a N-acetilpenicilamina (NAP), um composto análogo ao SNAP, mas que não contém o grupo –NO, pelo que não liberta este radical. O gráfico inserido na figura 4.3.2 representa a quantidade de [<sup>3</sup>H]citrulina produzida pelos extractos celulares obtidos a partir das células tratadas em simultâneo com IL-1 (5 ng/ml) e com várias concentrações de NAP (50 a 300 µM). Os resultados apresentados nesse gráfico mostram que a actividade da NOS, induzida pela IL-1, não foi afectada pela adição simultânea de NAP, confirmando assim que o efeito inibitório observado com o SNAP resulta do NO libertado por esse composto.

Figura 4.3.2. Efeito do dador de NO, SNAP, na actividade da NOS. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 16h, com as concentrações de IL-1 indicadas (gráfico principal e “insert”), na ausência ou na presença de SNAP (300 µM) ou de NAP (50-300 µM). O doseamento da [<sup>3</sup>H]citrulina produzida foi feito conforme descrito no capítulo 2.8.2. Os resultados apresentados são a média ± SD da radioactividade, expressa em (dpm/mg proteína)×10<sup>5</sup>, medida para cada amostra em quatro experiências independentes, cada uma realizada em triplicado. \*p<0,05 em comparação com a concentração de IL-1 correspondente.

#### **4.3.2. O NO impede a activação do NF-κB induzida pela IL-1**

Para estudar o papel do NO na activação do NF-κB, tratámos as culturas de condrócitos durante 30 minutos, com várias concentrações de SNAP (10 a 300 µM) na

presença ou ausência de IL-1 (5 ng/ml), como indicado nas figuras 4.3.3 e 4.3.4. Os resultados obtidos mostram que a adição de SNAP não teve qualquer efeito na quantidade de I $\kappa$ B- $\alpha$  presente nos extractos citoplasmáticos das células tratadas apenas com o dador de NO, nas concentrações indicadas (Figura 4.3.3). Pelo contrário, nos extractos citoplasmáticos obtidos das células tratadas com SNAP (300  $\mu$ M) e com IL-1 (5 ng/ml), a quantidade daquela proteína é significativamente superior à encontrada nas células tratadas apenas com IL-1 e aproxima-se da existente nas células controlo (Figura 4.3.3).

Figura 4.3.3. Efeito do dador de NO, SNAP, na degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ ; As culturas de condrócitos foram tratadas durante 30 minutos, com IL-1 (5 ng/ml) e/ou com as concentrações de SNAP indicadas. Os extractos citoplasmáticos obtidos dessas células foram utilizados para determinar os níveis de I $\kappa$ B- $\alpha$  por Western blot, conforme o método descrito no capítulo 2.7. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes. Os resultados apresentados no gráfico são as médias  $\pm$  SD das razões entre as intensidades das bandas relativas ao I $\kappa$ B- $\alpha$  e à actina, obtidas naquelas três experiências. \* $p < 0,001$  relativamente à IL-1.

A figura 4.3.4 mostra que a adição de SNAP (10 a 300  $\mu$ M) reduziu, de uma forma dependente da sua concentração, a intensidade dos complexos específicos NF- $\kappa$ B:oligonucleótido induzidos pela IL-1. No entanto, o tratamento das culturas celulares com SNAP, na ausência de IL-1, não alterou a intensidade desses complexos relativamente à observada nas células controlo, não sujeitas a qualquer tratamento.

Em conjunto, os resultados apresentados nas Figuras 4.3.3 e 4.3.4 indicam que a adição de NO às culturas de condrócitos inibiu a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ , impedindo, conseqüentemente, a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1.

Figura 4.3.4. Efeito do dador de NO, SNAP, na capacidade de ligação do NF- $\kappa$ B ao elemento  $\kappa$ B. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 30 minutos, com IL-1 (5 ng/ml) e/ou com as concentrações de SNAP indicadas. Os extractos nucleares obtidos dessas células foram utilizados para detectar a ligação do NF- $\kappa$ B a um oligonucleótido específico por EMSA, conforme o método descrito no capítulo 2.6. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes.

#### **4.3.3. Discussão dos Resultados**

Os resultados apresentados neste subcapítulo mostram que a adição de NO, libertado pelo SNAP, às culturas de condrócitos estimuladas com IL-1, reduziu significativamente a síntese de ARNm e de proteína da NOS II, em comparação com os níveis encontrados nas células tratadas apenas com a citocina (Figura 4.3.1). Assim, em

condrócitos articulares, o NO parece regular de forma negativa a expressão da NOS II e, conseqüentemente, a sua própria síntese.

Verificámos também que o tratamento das culturas celulares com SNAP não teve qualquer efeito na activação do NF- $\kappa$ B, mas inibiu a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  induzida pela IL-1 (Figura 4.3.3), bem como a formação de complexos entre os dímeros NF- $\kappa$ B e o oligonucleótido específico deste factor de transcrição (Figura 4.3.4). Uma vez que o NF- $\kappa$ B parece ser essencial para a expressão da NOS II em condrócitos articulares (Capítulos 4.1 e 4.2), estes resultados também indicam que a capacidade do NO para inibir a expressão da NOS II advém do seu efeito na activação daquele factor de transcrição. Noutras células, foi igualmente observada a inibição da activação do NF- $\kappa$ B e da expressão da NOS II pelo NO (Colasanti *et al.*, 1995; Katsuyama *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1997), mas o mecanismo subjacente a essa inibição não é claro, variando entre células diferentes.

Em células endoteliais, o NO parece inibir a activação do NF- $\kappa$ B por induzir a expressão do I $\kappa$ B- $\alpha$  e a sua translocação para o núcleo, com o conseqüente transporte dos dímeros NF- $\kappa$ B eventualmente presentes no núcleo, de volta ao citoplasma (Peng *et al.*, 1995; Spiecker *et al.*, 1997). Num outro trabalho, os mesmos autores verificaram que o NO não afecta a fosforilação e degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  (Spiecker *et al.*, 1998). O mecanismo oposto, isto é, a inibição pelo NO da fosforilação e degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  induzidas pela IL-1, foi observado em células musculares lisas vasculares de rato (Katsuyama *et al.*, 1998). Noutras células, pelo contrário, foi demonstrado que o NO impede a activação do NF- $\kappa$ B por inibir a sua afinidade para o DNA, sem afectar a translocação dos dímeros livres para o núcleo (Park *et al.*, 1997). O mecanismo subjacente a essa inibição da afinidade para o DNA parece envolver a nitrosilação do resíduo de cisteína na posição 62 do p50, afectando a afinidade dos homodímeros, mas igualmente a dos heterodímeros que contêm essa subunidade, em particular do heterodímero RelA:p50 (de la Torre *et al.*, 1999).

Os resultados apresentados na Figura 4.3.3 indicam que nos condrócitos articulares, a adição de NO impediu a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  induzida pela IL-1, o que, por si só, é suficiente para impedir a translocação dos dímeros para o núcleo e a ligação subsequente ao elemento  $\kappa$ B na região promotora dos genes alvo, o que, *in vitro*, se

traduz na diminuição da intensidade dos complexos NF- $\kappa$ B:oligonucleótido específico, detectados no ensaio de desvio da mobilidade electroforética (Figura 4.3.4). No entanto, e tendo em conta que a subunidade p50 é um componente importante dos dímeros NF- $\kappa$ B detectados nos condrócitos estimulados com IL-1 (Figura 3.3.2), estes resultados não excluem a possibilidade de ocorrer paralelamente a reacção do NO com o p50 e a consequente redução da afinidade desses dímeros.

Independentemente dos mecanismos moleculares envolvidos, todos os estudos citados acima, incluindo os resultados que obtivemos em condrócitos articulares, implicam o NO na regulação da sua própria síntese, por um mecanismo de retroalimentação negativo que impede a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão subsequente da NOS II. Já em 1995, Colasanti e colaboradores tinham sugerido que baixas concentrações de NO, produzido pelas isoformas constitutivas da NOS, poderiam constituir um mecanismo repressor, cuja função fisiológica seria impedir a indução accidental e potencialmente perigosa da expressão da NOS II.

Apoiando esta hipótese (Colasanti *et al.*, 1995), diversos estudos mostraram que o NO produzido pelas isoformas “constitutivas”, NOS I e NOS III, participa na regulação da activação do NF- $\kappa$ B e da expressão da NOS II. Por exemplo, em preparações de coração isolado perfundido, a indução de isquémia seguida de reperfusão aumenta mais intensamente a expressão da NOS II nos corações de murganhos sem o gene da NOS III, do que nos de animais não modificados geneticamente (Kanno *et al.*, 2000). Em células endoteliais, a inibição da produção constitutiva de NO levou à activação do NF- $\kappa$ B (Peng *et al.*, 1995). Em células da glia, o NF- $\kappa$ B é activado por um composto que sequestra o NO e esse processo é muito mais rápido e intenso quando essas células são obtidas de murganhos *knockout* para o gene da NOS I, do que quando são obtidas de murganhos normais (Togashi *et al.*, 1997).

Por outro lado, foi também observado que estímulos que induzem a expressão da NOS II, como o TNF- $\alpha$  e a associação de interferon- $\gamma$  e LPS, diminuem simultaneamente os níveis de ARNm da NOS I (Reiling *et al.*, 1994; Yoshizumi *et al.*, 1993). Outros autores observaram que a associação de interferon- $\gamma$  e LPS promove a fosforilação da NOS I em resíduos de tirosina, inibindo, assim, a sua actividade catalítica (Colasanti *et al.*, 1999).

Em suma, muitos dos estímulos que induzem a expressão da NOS II, especialmente em células que também exprimem as isoformas constitutivas, inibem inicialmente a produção de NO por essas isoformas. Este mecanismo parece ser essencial para que a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão da NOS II possam ocorrer. No entanto, além da inibição da actividade das isoformas constitutivas, outros mecanismos poderão contribuir para a eliminação da produção constitutiva de NO, em especial a degradação proteolítica dessas enzimas. De facto, é de há muito reconhecido que as várias isoformas da NOS, particularmente a NOS I e a NOS II, são reguladas por proteólise selectiva pelo sistema ubiquitina-proteassoma e pela calpaína (Osawa *et al.*, 2003). Concretamente, a degradação proteolítica da NOS I foi observada em resposta a estímulos neurotóxicos (Hajimohammadreza *et al.*, 1997) e a alguns compostos considerados inibidores da actividade da NOS, como a N<sup>G</sup>-metil-L-arginina e a N<sup>5</sup>-(1-iminoetil)-L-ornitina (Noguchi *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos em condrócitos articulares mostraram que as células controlo, não submetidas a qualquer tratamento, contêm a proteína NOS I (Figura 3.2) e produzem NO, conforme indica a quantidade mensurável de [<sup>3</sup>H]citrulina detectada nos extractos obtidos dessas células (Figura 4.3.2). Contudo, o tratamento das culturas de condrócitos com IL-1 induziu o desaparecimento da NOS I que, ao fim de 30 minutos de exposição à citocina, já não era detectável nos extractos citoplasmáticos dessas células (Figura 3.2), sugerindo que a IL-1 induz a rápida degradação da NOS I. Assim, é provável que nos condrócitos, tal como em células da glia (Togashi *et al.*, 1997) ou em células endoteliais (Peng *et al.*, 1995), a produção constitutiva de NO também funcione como um mecanismo repressor da activação accidental ou indesejável do NF- $\kappa$ B e da expressão subsequente da NOS II, como sugere o facto da adição de NO ter impedido a IL-1 de induzir essas respostas (Figuras 4.3.1, 4.3.3 e 4.3.4). De acordo com este mecanismo, a activação do NF- $\kappa$ B e a expressão subsequente da NOS II só podem ocorrer quando um estímulo apropriado, como observámos com a IL-1, elimina a produção constitutiva de NO, quer por inibir a actividade da NOS I (Colasanti *et al.*, 1999) ou da NOS III, quer por induzir a degradação da NOS I (Figura 3.2).

Será possível que o NO produzido pela NOS II recém-sintetizada possa, por um mecanismo de retroalimentação negativo, impedir a indução continuada do NF- $\kappa$ B e/ou a

sua activação em resposta a um segundo estímulo? Assim sendo, este processo só poderia ocorrer de novo quando a actividade da NOS II tivesse diminuído suficientemente, quer por inibição da actividade da enzima pelo próprio NO sintetizado, quer por degradação da proteína. Porém, uma vez que a produção de NO pela NOS II cessasse, que mecanismo poderia continuar a prevenir a activação inadequada do NF- $\kappa$ B? Ocorrerá simultaneamente a ressíntese das isoformas constitutivas? Será esse processo modulado pelo próprio NO, mas no sentido inverso àquele em que actua em relação à NOS II, isto é, poderá o NO induzir a síntese da NOS I e da NOS III?

Conforme sugerido por Colasanti e Suzuki (2000), a visão clássica de que baixas concentrações de NO, produzido pelas isoformas constitutivas, estão envolvidas em processos fisiológicos, enquanto concentrações elevadas, resultantes da actividade da NOS II, desempenham um papel em processos patológicos, é claramente insuficiente para explicar os mecanismos moleculares que regulam a síntese e as acções do NO. A este propósito, será especialmente importante uma melhor caracterização dos mecanismos que regulam a expressão das isoformas constitutivas, em particular no que respeita ao papel do NO, ou da sua concentração, nesse processo.

#### **4.4. A INIBIÇÃO DO NF- $\kappa$ B E DA EXPRESSÃO DA NOS II COMO MECANISMOS DA ACÇÃO ANTI-ARTRÍTICA DA DIACEREÍNA E DA REÍNA**

A diacereína e a reína que é um metabolito daquela com actividade farmacológica, são compostos de estrutura antraquinónica que mostraram reduzir a intensidade dos sinais da osteoartrite, quer no homem (Taccoen e Berdah, 1993; Nguyen *et al.*, 1994), quer em modelos animais da doença (Brandt *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999). A diacereína é considerada por alguns autores como um fármaco de referência no tratamento da osteoartrite (Chantre *et al.*, 2000; Leblan *et al.*, 2000) e recentemente, foi também observado que impede o desenvolvimento de artrite induzida por estimulação do sistema imune, em ratos (Tamura e Ohmori, 2001).

Além de melhorar os sinais e sintomas da osteoartrite, alguns estudos indicam que a diacereína e a reína também exercem acções condroprotectoras. A nível celular, foi

demonstrado que estes fármacos reduzem alguns dos efeitos catabólicos da IL-1 em condrócitos articulares, nomeadamente a inibição da síntese de proteoglicanos e colagénio e a indução da síntese de colagenase (Boittin *et al.*, 1993; Pujol *et al.*, 2000). Noutro estudo, a diacereína e a reína inibiram a síntese de IL-1 induzida pelo LPS em culturas de membrana sinovial obtida de doentes com osteoartrite, enquanto em condrócitos osteoartíticos diminuíram o número de moléculas do IL-1RI e a síntese de estromelisina-1 (MMP-3) induzida pela IL-1 (Martel-Pelletier *et al.*, 1998). Em cartilagem obtida de doentes com osteoartrite, os dois fármacos inibiram a síntese da IL-1 $\beta$  e da enzima responsável pela sua activação (a caspase 1 ou ICE, *vide* capítulo 1.4.1), bem como a síntese de IL-18 (Moldovan *et al.*, 2000). A síntese e actividade da NOS II, induzida pela IL-1 em condrócitos osteoartíticos, foi também inibida por estes fármacos, mas ao mesmo tempo promoveram a síntese e actividade da ciclooxigenase-2 (Pelletier *et al.*, 1998b). Outro estudo mostrou que o tratamento de condrócitos articulares bovinos com diacereína induz a expressão de TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 2, tanto na ausência, como na presença de IL-1 (Felisaz *et al.*, 1999).

Apesar da sua utilização clínica ter sido iniciada há já mais de dez anos, estudos recentes sugerem que a diacereína e a reína podem apresentar efeitos secundários indesejáveis, ainda incompletamente caracterizados, que podem diminuir a sua utilidade terapêutica. Desses efeitos, a diarreia é o referido com maior frequência em relação com a administração de diacereína (Chantre *et al.*, 2000; Leblan *et al.*, 2000), o que está de acordo com as conhecidas propriedades laxantes dos glicósidos antraquinónicos, presentes em maior abundância em plantas dos géneros *Senna* e *Cascara*. Outros efeitos estão menos bem caracterizados, mas são potencialmente mais graves. Alguns glicósidos antraquinónicos comportaram-se como promotores tumorais, ainda que fracos, num modelo de carcinogénese do cólon em ratos (Mereto *et al.*, 1996) e um outro estudo, em células da medula óssea de murganhos, mostrou que a reína e outras antraquinonas naturais podem provocar alterações cromossómicas e exercer outros efeitos genotóxicos, ainda que pouco potentes (Mukhopadhyay *et al.*, 1998). Apesar destes estudos sugerirem que o potencial cancerígeno e genotóxico da diacereína e da reína é pequeno, a necessidade de administração prolongada, para o tratamento de doenças artríticas, acarreta o risco de exacerbar esse potencial e, portanto, de poderem ocorrer efeitos secundários graves em consequência dessa utilização prolongada.

De qualquer forma, o conhecimento dos mecanismos celulares responsáveis pelas propriedades anti-artríticas da diacereína e da reína é importante, pois a identificação dos seus alvos celulares e moleculares poderá contribuir para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos tóxicos. Assim e tendo em conta a importância do NF- $\kappa$ B na expressão de genes cujos produtos proteicos contribuem para o desenvolvimento e progressão das doenças artríticas, incluindo a osteoartrite e as artrites inflamatórias, o objectivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da diacereína e da reína para impedirem a activação deste factor de transcrição pela IL-1. Além disso, avaliámos o efeito de ambos os fármacos na expressão da NOS II induzida pela IL-1, procurando, deste modo, avaliar a sua eficácia como inibidores da expressão de genes que dependem do NF- $\kappa$ B.

#### **4.4.1. Avaliação da toxicidade da Diacereína e da Reína**

A influência da diacereína e da reína na viabilidade dos condrócitos foi avaliada pelo método de redução do MTT, descrito no capítulo 2.2. Os resultados obtidos (Figura 4.4.1) mostraram que a viabilidade dos condrócitos cultivados na ausência de FBS, diminuiu significativamente e de forma dependente da concentração e do tempo total de incubação com os fármacos (6,5h em A e cerca de 22h em B). Na presença de 5% FBS, pelo contrário, nenhuma das concentrações de diacereína e de reína testadas diminuiu significativamente a viabilidade celular, mesmo nas culturas expostas aos dois fármacos pelo período mais longo.

Estes resultados mostram, então, que a diacereína e a reína apresentam uma elevada toxicidade para os condrócitos na ausência, mas não na presença de FBS. Assim, nas experiências subsequentes, os condrócitos obtidos após o processo de isolamento, foram sempre mantidos em meio de cultura contendo 5% FBS.

Figura 4.4.1. Efeito da diacereína e da reína na viabilidade dos condrócitos, em função da ausência ou da presença de soro no meio de cultura. **A:** as culturas de condrócitos, na ausência ou na presença de 5% FBS, foram tratadas com as concentrações de diacereína e reína indicadas durante 6h, antes da adição de IL-1 (20 ng/ml) e então incubadas por mais 30 minutos. **B:** as culturas de condrócitos, na ausência ou na presença de 5% FBS, foram tratadas durante 6h, com as concentrações de diacereína e reína indicadas, após o que foram incubadas na presença de IL-1 (20 ng/ml) durante mais 16h. Os resultados apresentados são a média  $\pm$  SD da viabilidade celular, expressa em percentagem relativamente às células controlo (isentas de qualquer tratamento), determinada para cada condição em três experiências independentes. \* $p < 0,05$ , † $p < 0,01$  e § $p < 0,001$  relativamente ao controlo.

#### **4.4.2.A Diacereína e a Reína impedem a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1**

Figura 4.4.2. Efeito da Diacereína e da Reína na capacidade de ligação do NF- $\kappa$ B ao oligonucleótido específico. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 6h com as concentrações de diacereína e de reína indicadas e depois foram incubadas durante mais 30 minutos na presença de IL-1 (20 ng/ml). Os extractos nucleares foram analisados por EMSA, de acordo com o método descrito no capítulo 2.6. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes.

Os resultados apresentados na Figura 4.4.2 mostram que a intensidade dos complexos específicos entre as proteínas NF- $\kappa$ B activadas e o oligonucleótido correspondente ao elemento  $\kappa$ B é menor com os extractos nucleares obtidos dos condrócitos tratados com IL-1 (20 ng/ml) na presença de diacereína e de reína, do que nos extractos nucleares obtidos das células tratadas apenas com IL-1. Além disso, a

Figura 4.4.3. A diacereína e a reína impedem a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  e a translocação do RelA para o núcleo induzidas pela IL-1. **A**: efeito na degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  induzida pela IL-1. **B**: efeito na translocação do RelA para o núcleo induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 6h, com as concentrações de diacereína e de reína indicadas e depois foram incubadas durante mais 30 minutos na presença de IL-1 (20 ng/ml). Os níveis de I $\kappa$ B- $\alpha$  e de RelA nos extractos citoplasmáticos e nucleares, respectivamente, foram determinados por *Western blot*, como descrito no capítulo 2.7. As autorradiografias apresentadas são representativas de três experiências independentes. Os resultados apresentados nos gráficos são a média  $\pm$  SD das razões entre as intensidades das bandas correspondentes ao I $\kappa$ B- $\alpha$  (**A**) ou ao RelA (**B**) e à actina, determinadas naquelas três experiências. \* $p$ <0,05 relativamente ao Controlo e  $^{\S}$  $p$ <0,05 relativamente à IL-1.

intensidade desses complexos diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de diacereína e de reína. Na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , ambos os fármacos preveniram, quase completamente, a formação dos complexos específicos NF- $\kappa\text{B}$ :oligonucleótido. Estes resultados mostram, portanto, que quer a diacereína, quer a reína inibem eficazmente a capacidade de ligação do NF- $\kappa\text{B}$  ao elemento  $\kappa\text{B}$ .

Figura 4.4.4. Efeito da diacereína e da reína nos níveis de ARNm da NOS II sintetizados em resposta à IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 6h, com as concentrações de diacereína e de reína indicadas e depois foram incubadas durante mais 6h na presença de IL-1 (20 ng/ml). O ARNm foi detectado por *Northern blot*, conforme o método descrito no capítulo 2.4. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências 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 naquelas três experiências.  $\S p < 0,01$  relativamente à IL-1.

Para uma melhor caracterização do mecanismo através do qual os dois fármacos impedem a activação do NF- $\kappa\text{B}$  induzida pela IL-1, estudámos os seus efeitos a nível da degradação do  $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$  e da translocação da subunidade RelA para o núcleo. A detecção destas proteínas por *Western blot*, nos extractos citoplasmáticos e nucleares, respectivamente, obtidos das células tratadas com IL-1 na presença das concentrações indicadas de cada um dos fármacos, mostrou que o tratamento das células com

diacereína (1 a 100  $\mu\text{M}$ ) e com reína (1 a 100  $\mu\text{M}$ ) impediu a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  (Figura 4.4.3.A) e a translocação do RelA para o núcleo (Figura 4.4.3.B), processos esses que foram eficazmente induzidos pela IL-1. Embora não se apresentem os resultados, nenhum dos dois fármacos teve qualquer efeito na degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  e na translocação nuclear do Rel A quando foram adicionados isoladamente às culturas celulares.

Figura 4.4.5. Efeito da diacereína e da reína nos níveis de proteína da NOS II sintetizados em resposta à IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 6h, com as concentrações de diacereína e de reína indicadas e depois foram incubadas durante mais 16h na presença de IL-1 (20 ng/ml). A proteína foi detectada por *Western blot*, conforme o método descrito no capítulo 2.7. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes. Os resultados apresentados no gráfico são as médias  $\pm$  SD das razões entre as intensidades das bandas relativas à NOS II e à actina, obtidas naquelas três experiências. \* $p < 0,01$  relativamente ao controlo e  $^{\S}p < 0,01$  relativamente à IL-1.

Os resultados apresentados na Figura 4.4.3.A também mostram que, nos extractos citoplasmáticos das células tratadas com concentrações crescentes de diacereína e de reína, a quantidade de I $\kappa$ B- $\alpha$  detectada se aproximou, mas não excedeu, a observada nas células Controlo (não tratadas), sugerindo que estes fármacos não induziram a síntese de novo daquela proteína.

Em conjunto, os resultados apresentados nas figuras 4.4.2 e 4.4.3 indicam que a diacereína e a reína impediram a activação do NF- $\kappa$ B induzida pela IL-1 e que isso

resultou da inibição da degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ . Por seu turno, a inibição deste último processo impediu a libertação e translocação para o núcleo dos dímeros NF- $\kappa$ B activados, como indicam a inibição, dependente da concentração de fármaco, da translocação do RelA para o núcleo (Figura 4.4.3.B) e da formação de complexos NF- $\kappa$ B:oligonucleótido específicos (Figura 4.4.2).

#### 4.4.3.A Diacereína e a Reína impedem a expressão da NOS II induzida pela IL-1

**Tabela 4.4.1. Efeito da Diacereína e da Reína na produção de NO induzida pela IL-1**

|                                    | Concentração de Nitrito, $\mu$ M |
|------------------------------------|----------------------------------|
| Controlo                           | 2.5 $\pm$ 0.1                    |
| IL-1, 20 ng/ml                     | 27.3 $\pm$ 1.9                   |
| DAR, 2 $\mu$ M + IL-1, 20 ng/ml    | 25.5 $\pm$ 0.8                   |
| DAR, 8 $\mu$ M + IL-1, 20 ng/ml    | 14.5 $\pm$ 0.1*                  |
| DAR, 10 $\mu$ M + IL-1, 20 ng/ml   | 11.4 $\pm$ 0.4*                  |
| DAR, 20 $\mu$ M + IL-1, 20 ng/ml   | 5.5 $\pm$ 0.3*                   |
| Reína, 2 $\mu$ M + IL-1, 20 ng/ml  | 25.5 $\pm$ 0.9                   |
| Reína, 8 $\mu$ M + IL-1, 20 ng/ml  | 12.9 $\pm$ 0.9*                  |
| Reína, 10 $\mu$ M + IL-1, 20 ng/ml | 10.0 $\pm$ 0.5*                  |
| Reína, 20 $\mu$ M + IL-1, 20 ng/ml | 4.8 $\pm$ 0.3*                   |

As culturas de condrócitos foram tratadas durante 6h, com 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 20  $\mu$ M de diacereína e de reína e depois foram incubadas durante mais 16h na presença de IL-1 (20 ng/ml). Para simplificação, na tabela, foram omitidos os resultados relativos à concentração de 4 $\mu$ M. A concentração de nitritos acumulados no sobrenadante das culturas celulares foi determinada como descrito no capítulo 2.8.1. Os valores apresentados são a média  $\pm$  SD da concentração de nitritos determinada em cinco experiências independentes, cada uma realizada em triplicado. \* $p$ <0,001 relativamente à IL-1.

O tratamento das culturas de condrócitos com diacereína e com reína impediu, de uma forma dependente da dose, a síntese de ARNm (Figura 4.4.4) e de proteína (Figura 4.4.5) da NOS II, bem como a produção de NO (Tabela 4.4.1), induzidas pela IL-1. Na concentração máxima utilizada (100  $\mu$ M), a diacereína e a reína inibiram a síntese de ARNm da NOS II em 70,1% e 73,6%, respectivamente, enquanto a inibição da síntese de proteína foi de 62,9% e 64,3%, respectivamente. As concentrações de diacereína e de reína que inibem a produção de NO em 50% (IC<sub>50</sub>), calculadas pelo método de *Hill plot*, são 8,2  $\mu$ M e 7,7  $\mu$ M para cada um dos fármacos, respectivamente.

#### 4.4.4. Discussão dos resultados

Os resultados apresentados neste capítulo mostram que a diacereína e a reína impedem eficazmente a activação do NF- $\kappa$ B (Figura 4.4.2) induzida pela IL-1 em condrócitos articulares bovinos. Este efeito resulta da inibição da degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  (Figura 4.4.3.A), o que impede a translocação dos dímeros NF- $\kappa$ B para o núcleo (Figura 4.4.3.B) e, conseqüentemente, a sua interacção com os genes alvo deste factor de transcrição.

A inibição do NF- $\kappa$ B, especialmente da sua actividade prolongada, pode também envolver a indução da síntese *de novo* do I $\kappa$ B- $\alpha$  mediada pelo próprio NF- $\kappa$ B (Ito *et al.*, 1994; Tzen *et al.*, 1994). Neste caso, a activação do NF- $\kappa$ B precede e é necessária para a expressão do gene do I $\kappa$ B- $\alpha$  e para a síntese subsequente da proteína, de tal modo que a capacidade de um dado estímulo para induzir a síntese deste inibidor é tomada, frequentemente, como índice da actividade do NF- $\kappa$ B (Blais e Rivest *et al.*, 2001).

Assim, se o efeito inibitório da diacereína e da reína que observámos, tivesse resultado da indução da síntese de I $\kappa$ B- $\alpha$ , os dois fármacos deveriam ter sido capazes de activar o NF- $\kappa$ B por si sós, ainda que transitoriamente. Porém, nenhum destes fármacos induziu, por si só, a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ , a translocação do RelA para o núcleo ou a formação de complexos específicos entre as proteínas NF- $\kappa$ B e o oligonucleótido correspondente ao elemento  $\kappa$ B (resultados não apresentados). Além disso, os níveis citoplasmáticos de I $\kappa$ B- $\alpha$  nas células tratadas com diacereína ou reína na presença de IL-1, aproximaram-se, mas não excederam os observados nas células controlo (Figura

4.4.3.A), o que seria de esperar se estes fármacos induzissem a expressão daquele inibidor. Concluimos, portanto, que a inibição da degradação do  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  é o principal mecanismo através do qual a diacereína e a reína impedem a activação do NF- $\kappa\text{B}$  induzida pela IL-1, em condrócitos articulares bovinos.

Para avaliarmos a capacidade da diacereína e da reína para inibirem a expressão genética dependente da actividade do NF- $\kappa\text{B}$ , estudámos os seus efeitos nos níveis de ARNm e de proteína da NOS II. Os resultados obtidos mostram que ambos os fármacos inibiram eficazmente a expressão da NOS II induzida pela IL-1 (Figuras 4.4.4 e 4.4.5) com a conseqüente redução da sua actividade, evidenciada pela inibição da produção de NO (Tabela 4.4.1). As concentrações de cada um dos fármacos que inibiram a expressão da NOS II são da mesma ordem de grandeza das que impediram a activação do NF- $\kappa\text{B}$ , o que constitui evidência bastante segura de que a diacereína e a reína são capazes de impedir a expressão de genes mediada por este factor de transcrição.

Em conjunto, os resultados apresentados contribuem para um melhor conhecimento dos mecanismos de acção da diacereína e da reína a nível celular e permitem explicar, pelo menos em parte, a sua acção anti-osteoartrítica. Por um lado e considerando a importância do NO na fisiopatologia das artrites (*vide* capítulo 1.4.4), a capacidade da diacereína e da reína para impedirem a expressão da NOS II e a produção subsequente de NO (Figuras 4.4.4 e 4.4.5, Tabela 4.4.1; Pelletier *et al.*, 1998b) pode ser um mecanismo importante subjacente à sua eficácia na redução dos sinais e sintomas associados à osteoartrite (Brandt *et al.*, 1997; Nguyen *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1999; Taccoen e Berdah, 1993). Mais ainda, a inibição da produção de NO pode explicar, a nível molecular, algumas das acções da diacereína observadas *in vitro*, nomeadamente, a sua capacidade para reduzir a produção de colagenase e a inibição da síntese de proteoglicanos e de colagénio induzidas pela IL-1 (Boittin *et al.*, 1993; Pujol *et al.*, 2000) que se sabe serem acções desta citocina mediadas pelo NO (Häuselmann *et al.*, 1994b; Lo *et al.*, 1998; Taskiran *et al.*, 1994).

Por outro lado, a eficácia da diacereína e da reína como inibidores do NF- $\kappa\text{B}$  (Figuras 4.4.2 e 4.4.3) contribui para explicar algumas acções destes fármacos que não podem ser directamente atribuídas à redução da síntese de NO. Um estudo recente

mostrou que a diacereína e a reína diminuem a síntese de IL-1 $\beta$  em cartilagem obtida de doentes com osteoartrite (Moldovan *et al.*, 2000) e noutro estudo foi observado que a diacereína diminui os níveis de IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no granuloma formado em redor de cartilagem de rato implantada sob a pele de murganhos (Moore *et al.*, 1998). Uma vez que a expressão dos genes que codificam a síntese daquelas citocinas é regulada pelo NF- $\kappa$ B (Lee e Burckart, 1998; Pahl, 1999), a capacidade dos dois fármacos para inibirem a activação deste factor de transcrição é um mecanismo que provavelmente contribui para a inibição da síntese desses mediadores observada naqueles estudos (Moldovan *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 1998).

Em conclusão, a importância do NF- $\kappa$ B na fisiopatologia das doenças inflamatórias crónicas, incluindo a artrite reumatóide (Palombella *et al.*, 1998), sugere que, além dos efeitos antiosteoartríticos, a diacereína e a reína poderão também exercer efeitos benéficos nas artrites inflamatórias. De acordo com esta hipótese, foi recentemente observado que a diacereína e a reína são capazes de reduzir a resposta inflamatória em modelos animais de doenças inflamatórias, incluindo um modelo de artrite inflamatória induzida por estimulação do sistema imune (Moore *et al.*, 1998; Tamura e Ohmori, 2001).