

### ACTIVAÇÃO E FUNÇÃO DO AP-1 NA EXPRESSÃO DA NOS II INDUZIDA PELA IL-1

O AP-1 é reconhecido como um factor de transcrição essencial para a expressão de várias MMPs em diversos tipos de células, incluindo condrócitos articulares e sinoviócitos (Catterall *et al.*, 2001; Lafyatis *et al.*, 1990; Mengshol *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002; Tardif *et al.*, 2001; Zafarullah *et al.*, 1992). Não obstante, a importância do AP-1 na transcrição de outros genes, cujas regiões promotoras também contêm a sequência específica de ligação a este factor de transcrição (o TRE), é ainda pouco clara.

O gene da NOS II é um desses genes em relação aos quais o papel do AP-1 parece variar consoante o tipo de célula e o estímulo considerados. De facto, em células diferentes, o AP-1 tanto pode induzir (Giri *et al.*, 2002; Kristof *et al.*, 2001; Marks-Konczalik *et al.*, 1998), como reprimir (Kleinert *et al.*, 1998a; Pance *et al.*, 2002) a transcrição do gene da NOS II. Esta variabilidade parece resultar, por um lado, do facto das proteínas da família AP-1 se poderem combinar entre si de múltiplas formas, originando complexos distintos que têm afinidades para o TRE e capacidades de activação da transcrição distintas, de modo que podem regular de forma diferente a transcrição de genes específicos (Karin *et al.*, 1997; Shaulian and Karin, 2002). Por outro lado, a composição dos dímeros pode variar ao longo do tempo e também em função do estímulo e do tipo de célula, o que contribui igualmente para a diversidade das funções fisiológicas do AP-1 (Woodgett *et al.*, 1995).

Um número crescente de estudos indica que a actividade do AP-1 é sensível ao estado redox da célula. No entanto e tal como acontece em relação ao NF- $\kappa$ B, o papel das ROS e das espécies reactivas de azoto, particularmente do NO, na activação do AP-1 parece estar intimamente associado ao tipo de célula, uma vez que o mesmo

estímulo oxidativo, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Flescher *et al.*, 1998; Lakshminarayanan *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1993) ou o NO (Rossi *et al.*, 2000; Zouki *et al.*, 2001), tanto pode induzir, como inibir a actividade deste factor de transcrição ao actuar em células diferentes. De facto, os mecanismos envolvidos na regulação do AP-1 parecem ser específicos de cada tipo de célula (Karin *et al.*, 1997; Shaulian e Karin, 2002).

Em condrócitos articulares, as ROS são necessárias para ocorrer a activação da JNK e a expressão dos genes c-jun (Lo *et al.*, 1996), c-fos e colagenase-1 (Lo *et al.*, 1998) em resposta à IL-1. Foi também demonstrado que, nestas células, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de activar a JNK (Lo *et al.*, 1996) e a p42/p44<sup>MAPK</sup> (Asada *et al.*, 1999), bem como a expressão de c-fos (Lo e Cruz, 1995) e de c-jun (Lo *et al.*, 1996). Por outro lado, o NO também é capaz de activar a JNK por si só (Lo *et al.*, 1996) e funciona como mediador da activação desta MAPK e da expressão de c-fos e de colagenase em resposta à IL-1 (Lo *et al.*, 1998). Como os heterodímeros formados pelas proteínas c-Jun (Lo *et al.*, 1996) e c-Fos são os que apresentam maior afinidade para o elemento TRE e maior actividade transcricional (Angel e Karin, 1991), em conjunto, aqueles estudos sugerem que as ROS e o NO podem também actuar como mediadores da activação do AP-1, em condrócitos articulares. No entanto, a sua capacidade para efectivamente mediar essa resposta não é conhecida.

Assim, procurámos estudar o papel das ROS, particularmente do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e do NO na activação do AP-1 induzida pela IL-1, em condrócitos articulares bovinos e depois procurámos, também, verificar se o AP-1 regula a expressão da NOS II e de que forma, isto é, se funciona como indutor ou como repressor da sua expressão.

## **5.1. AS ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO E O NO COMO MEDIADORES DA ACTIVAÇÃO DO AP-1**

### **5.1.1. O difenileniodónio impede a activação do AP-1 induzida pela IL-1**

Para verificarmos se as ROS e o NO são necessários para a activação do AP-1 em resposta à IL-1, utilizámos o DPI, já que inibe a produção de ambos (*vide* capítulos

4.1 e 4.3). O tratamento das culturas de condrócitos com DPI (5  $\mu$ M) durante 2h, impediu eficazmente a activação do AP-1 em resposta à IL-1 (5 ng/ml), como indica o ensaio de desvio da mobilidade electroforética (Figura 5.1.1) em que não se observam complexos específicos com o oligonucleótido correspondente ao TRE. Esta inibição não é devida a efeitos tóxicos, uma vez que o DPI, pelo menos em concentrações até 10  $\mu$ M, não afecta a viabilidade dos condrócitos (Tabela 4.1.1). Assim, estes resultados sugerem que quer as ROS, quer o NO, produzidos em resposta à IL-1, podem contribuir para a activação do AP-1, em condrócitos articulares bovinos.

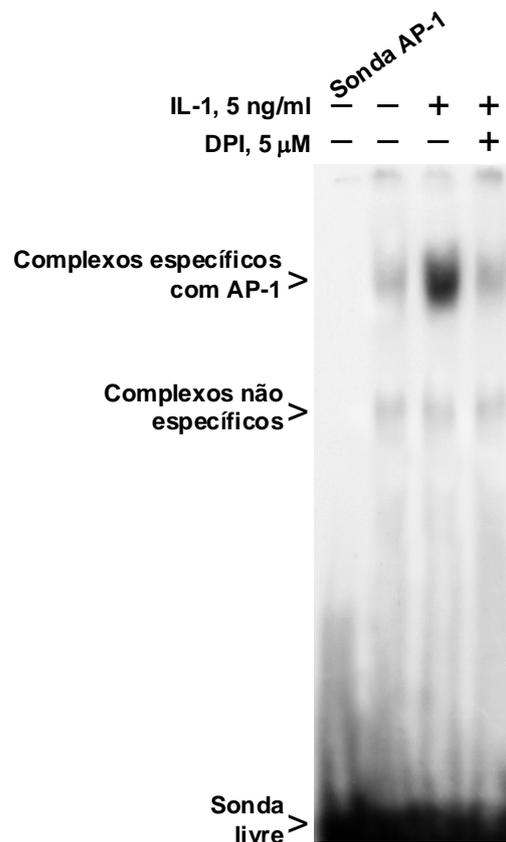


Figura 5.1.1. A inibição da produção de ROS e/ou NO impede a activação do AP-1 induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com DPI (5  $\mu$ M) durante 2h, antes da adição de IL-1 (5 ng/ml) e depois incubadas por mais 3h. Os extractos nucleares, preparados como descrito no capítulo 2.5, foram utilizados para detectar, por EMSA, a formação de complexos específicos entre os dímeros AP-1 e um oligonucleótido correspondente ao TRE. A autorradiografia apresentada é representativa dos resultados obtidos em três experiências independentes.

### 5.1.2. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o NO activam o AP-1

Os resultados apresentados na Figura 5.1.2 mostram que os extractos nucleares obtidos a partir dos condrócitos tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50-300 μM) e com o dador de NO, SNAP (300 μM), originam a formação de complexos que migram de forma idêntica à dos complexos específicos originados pelo tratamento com IL-1 (5 ng/ml), indicando, portanto, que qualquer um destes estímulos é suficiente para activar o AP-1. Além disso, ensaios de competição com um excesso de “sonda do AP-1 fria” e de “sonda do Oct-1 fria” (Figura 5.1.4) mostraram que a banda detectada nos extractos das células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulta da formação de complexos específicos entre as proteínas presentes nos extractos nucleares e o oligonucleótido específico do AP-1 (“Complexos específicos com AP-1”) e, portanto, deve-se à presença de dímeros AP-1 activos nos extractos nucleares das células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Por outro lado, a capacidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para activar o AP-1 depende da concentração utilizada, uma vez que a intensidade dos complexos específicos com AP-1 aumentou em função da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adicionada às células (Figura 5.1.2).

No capítulo 3.4, identificámos a composição dos dímeros AP-1 formados em resposta à IL-1, em condrócitos articulares bovinos, tendo observado que são compostos pelas proteínas c-Fos, c-Jun e JunD, provavelmente arranjadas em heterodímeros c-Fos:c-Jun e c-Fos:JunD. Para avaliarmos a relevância fisiológica da activação do AP-1 pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, caracterizámos a composição dos dímeros induzidos pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o padrão de activação do AP-1, em função do tempo de incubação das células quer com IL-1, quer com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A figura 5.1.3 mostra que os complexos específicos com AP-1 já são detectáveis nos extractos obtidos das células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) durante 30 minutos, alcançando a intensidade máxima ao fim de 3h de incubação e decrescendo de intensidade a partir daí. Em contraste, esses complexos não são detectáveis nos extractos nucleares das células tratadas com IL-1 (5 ng/ml) por períodos inferiores a 1h e, a partir daí, a intensidade dos complexos aumenta de forma idêntica à observada com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O facto de o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activar o AP-1 mais rapidamente do que a IL-1, sugere que a activação deste factor de transcrição por esta citocina requer a produção prévia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,

reforçando, assim, a conclusão de que as ROS, particularmente o  $H_2O_2$ , medeiam esta resposta.

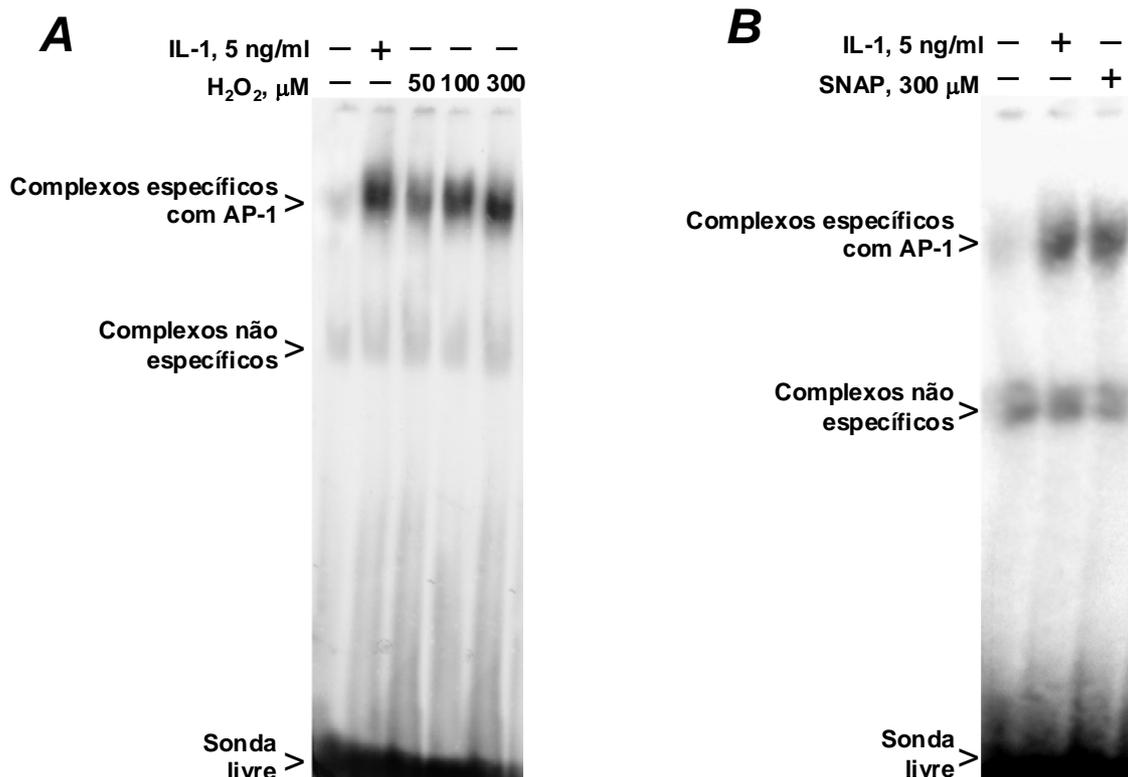


Figura 5.1.2. As espécies reactivas de oxigénio e o NO são suficientes para activar o AP-1. **A**: Efeito do  $H_2O_2$  na activação do AP-1. **B**: Efeito do NO na activação do AP-1. As culturas de condrócitos foram tratadas durante 3h, com as concentrações de  $H_2O_2$  ou do dador de NO, SNAP, indicadas ou com IL-1 (5 ng/ml). Os extractos nucleares foram analisados por EMSA, para detectar a formação de complexos entre os dímeros AP-1 e um oligonucleótido específico para esse factor de transcrição, conforme descrito no capítulo 2.6. A autorradiografia apresentada em **A** é representativa de quatro experiências independentes e a apresentada em **B** é representativa de três experiências independentes.

Para caracterizar e comparar a composição dos dímeros AP-1 induzidos pelo  $H_2O_2$ , com a composição dos dímeros induzidos pela IL-1, realizaram-se ensaios de *supershift* com anticorpos dirigidos especificamente contra os vários membros das famílias Fos e Jun. A figura 5.1.4 mostra que a adição de anticorpos anti-c-Fos e anti-JunD aos extractos nucleares das células tratadas com  $H_2O_2$ , antes da adição da “sonda do AP-1” marcada com o radioisótopo, retarda adicionalmente a migração dos complexos específicos, indicando, portanto, que esses complexos contêm as proteínas

c-Fos e JunD. Além disso, o anticorpo anti-c-Fos retardou a mobilidade da totalidade da banda específica do AP-1, enquanto o anticorpo anti-JunD retardou a mobilidade de apenas parte dos complexos constituintes da banda específica, o que indica que todos os complexos AP-1 contêm a proteína c-Fos, mas só uma parte contém JunD. O anticorpo anti-c-Jun não originou a formação de “complexos super-retardados”, mas diminuiu de forma acentuada, embora incompletamente, a intensidade dos “complexos específicos com AP-1”, indicando que esta proteína também está presente em parte desses complexos.

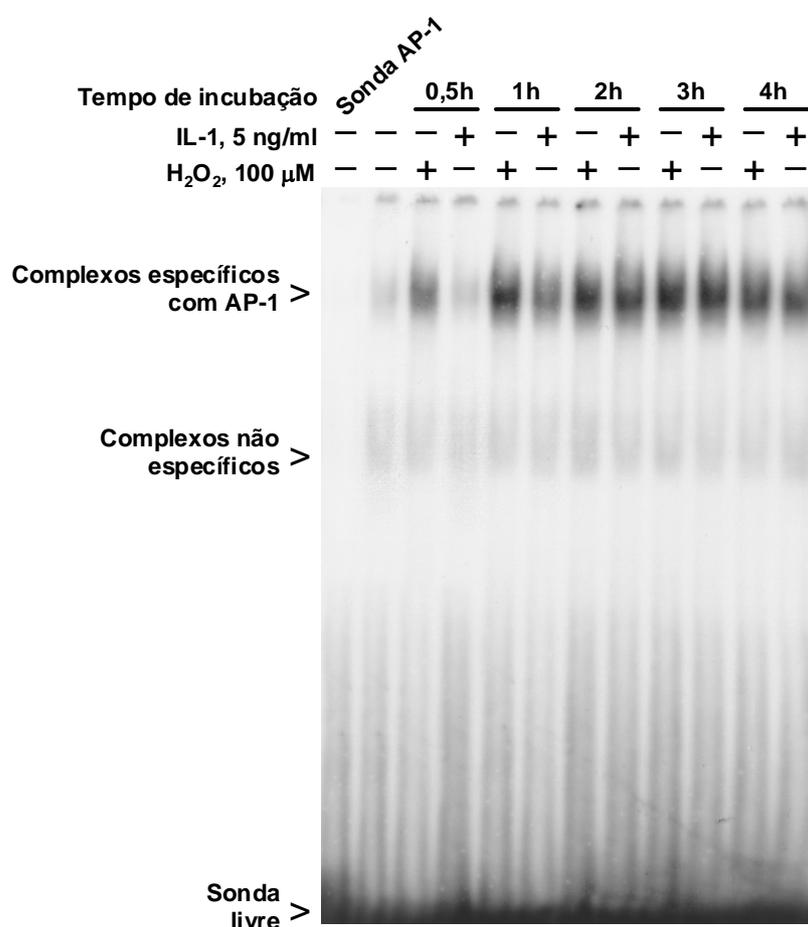


Figura 5.1.3. Efeito do tempo de incubação na activação do AP-1 pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) ou com IL-1 (5 ng/ml) durante os períodos de tempo indicados. Os extractos nucleares foram analisados por EMSA, para detectar a formação de complexos entre os dímeros AP-1 e um oligonucleótido específico para esse factor de transcrição, conforme descrito no capítulo 2.6. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes.

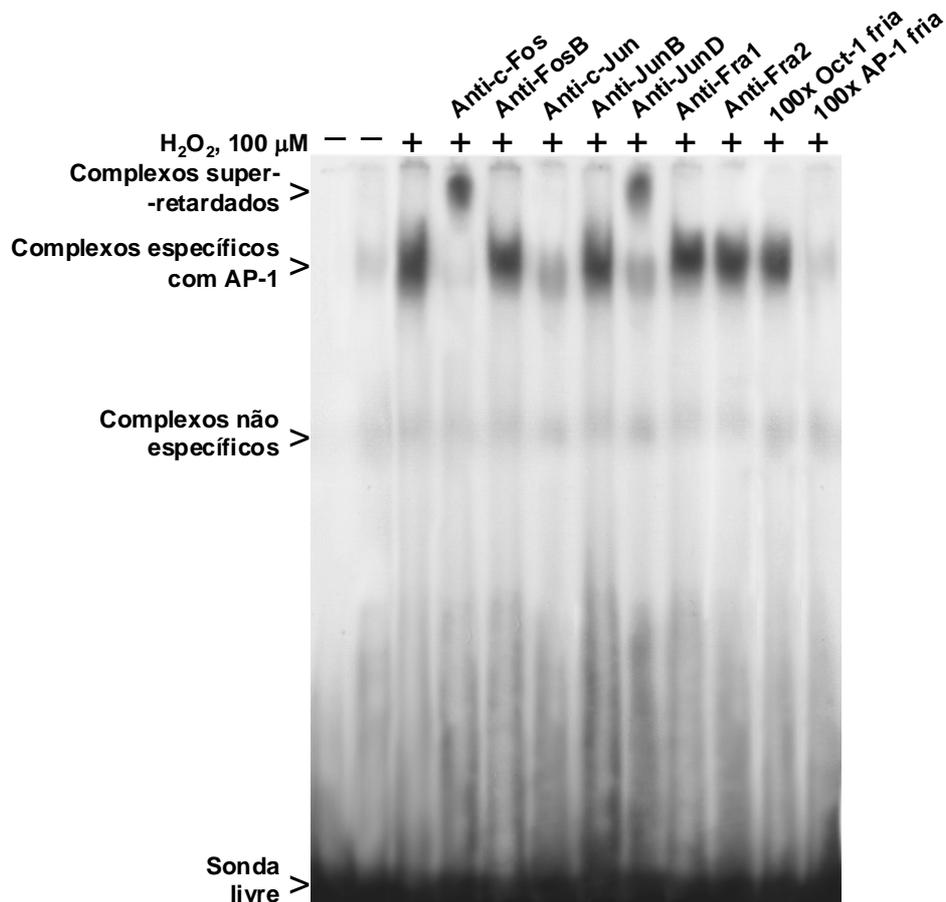


Figura 5.1.4. Caracterização dos complexos AP-1 induzidos pelo  $H_2O_2$ . Os extractos nucleares obtidos a partir das culturas de condrócitos não tratadas (Controlo) ou tratadas com  $H_2O_2$  (100  $\mu M$ ) durante 3 h, foram analisados por EMSA, com um oligonucleótido específico para o AP-1. Os ensaios de competição e de *supershift* foram realizados conforme descrito no capítulo 2.6. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes.

Os anticorpos dirigidos contra os outros membros daquelas duas famílias, concretamente os anticorpos anti-FosB, anti-Fra1, anti-Fra2 e anti-JunB, não modificaram significativamente a intensidade, nem a mobilidade electroforética dos “complexos específicos com AP-1”. Assim, estes resultados mostram que os dímeros AP-1, induzidos pelo  $H_2O_2$  em condrócitos articulares bovinos, são constituídos fundamentalmente pelas proteínas c-Fos, c-Jun e JunD, provavelmente organizadas em dois heterodímeros diferentes, ambos contendo c-Fos, ou seja, são idênticos aos formados em resposta à

IL-1 (Figura 3.4), reforçando, mais uma vez, a conclusão de que a activação do AP-1, induzida pela IL-1, é mediada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Em conjunto, estes resultados (Figuras 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3 e 5.1.4) mostram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o NO são suficientes para activar o AP-1 em condrócitos articulares bovinos e indicam que ambos podem contribuir para a activação deste factor de transcrição em resposta à IL-1.

### 5.1.3. Discussão dos resultados

Em concordância com outros estudos (Palmer *et al.*, 1993; Rathakrishnan *et al.*, 1992; Stadler *et al.*, 1991; Tawara *et al.*, 1991; Tiku *et al.*, 1998), verificámos que os condrócitos articulares respondem à IL-1 produzindo ROS, das quais uma grande fracção é constituída por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabelas 4.1.2 e 4.1.3), e NO (Figura 3.1.3). Também verificámos que o DPI, um inibidor selectivo de enzimas que contêm grupos flavonóides (*vide* capítulo 4.1.1), impede a produção de ROS (Tabela 4.1.2) e de NO (Figura 4.1.4), a activação do NF-κB (Figura 4.1.1) e a expressão da NOS II (Figuras 4.1.2 e 4.1.3) induzidas pela IL-1. Os resultados apresentados neste capítulo mostram que o DPI também impede a activação do AP-1 induzida pela IL-1 (Figura 5.1.1), indicando assim que a produção de ROS e/ou de NO é um requisito essencial para a activação deste factor de transcrição.

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem sido o estímulo oxidativo mais utilizado para o estudo da função das ROS em numerosos processos celulares, incluindo a activação do AP-1. A capacidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para activar este factor de transcrição, em diferentes tipos de células, está bem documentada (Lakshminarayanan *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001). Contudo, o efeito oposto também tem sido referido, isto é, a inibição da activação do AP-1 por estímulos oxidantes ou a sua indução por antioxidantes foram igualmente observadas (Flescher *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1993; Wesselborg *et al.*, 1997), reflectindo a diversidade e especificidade dos mecanismos que regulam a actividade do AP-1 em células diferentes (Karin *et al.*, 1997; Shaulian e Karin, 2002).

Os resultados apresentados neste capítulo mostram que, em culturas de condrócitos, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa o AP-1 de uma forma dependente da concentração e que se assemelha à resposta induzida pela IL-1 (Figura 5.1.2A). A composição proteica dos

dímeros activados em resposta ao  $H_2O_2$  (Figura 5.1.4) é idêntica à dos dímeros induzidos pela IL-1 (Figura 3.4). No entanto, a formação de dímeros com afinidade para o oligonucleótido correspondente ao TRE, é mais rápida nas células tratadas com  $H_2O_2$ , do que nas tratadas com IL-1 (Figura 5.1.3), indicando que a produção de  $H_2O_2$  precede e é necessária para ocorrer a activação do AP-1, em resposta à IL-1. Assim, concluímos que o  $H_2O_2$  é um importante mediador da activação do AP-1 e, conseqüentemente, da expressão de genes que requerem este factor de transcrição. Além disso, a inibição da produção de ROS é uma estratégia eficaz para suprimir a activação do AP-1 induzida pela IL-1 (Figura 5.1.1).

Por outro lado, o tratamento das culturas de condrócitos com o dador de NO, SNAP, durante 3h, foi também suficiente para activar o AP-1, de uma forma análoga à observada com a IL-1 (Figura 5.1.2.B). Porém, esse tempo de incubação das células com IL-1 não é suficiente para ocorrer um aumento significativo da produção de NO, o que só acontece ao fim de 6h de incubação (Figura 3.1.3A). Assim, não é provável que o NO, produzido em resposta à IL-1, seja essencial para a activação inicial do AP-1, embora possa ser fundamental para a manutenção de um estado de activação mais prolongado. Os resultados apresentados neste subcapítulo sugerem, pois, que as ROS, em especial o  $H_2O_2$ , produzidas rapidamente após a adição de IL-1 às células (Tabelas 4.1.2 e 4.1.3), desencadeiam a activação do AP-1 que depois pode ser mantida por acção do NO, à medida que a sua produção vai aumentando em consequência da expressão da NOS II. Deste modo, a capacidade da NOS II para produzir NO durante longos períodos, pode permitir a manutenção do AP-1 num estado activado e, conseqüentemente, pode levar à expressão continuada de genes dependentes deste factor de transcrição, como é o caso da colagenase-1 e da colagenase-3 cuja síntese está muito aumentada nas doenças artríticas (Han *et al.*, 2001a; Lindy *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1995; Shinmei *et al.*, 1990; Walakovits *et al.*, 1992).

## 5.2. AVALIAÇÃO DO PAPEL DO AP-1 NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA NOS II

### 5.2.1. O PD 98059, mas não o SB 203580, impede a activação do AP-1 induzida pela IL-1

A activação do AP-1 requer a actividade de vários membros das MAPK, mas a relevância de cada uma nesse processo depende do tipo de célula e do estímulo considerados. A JNK é a principal enzima envolvida na activação do c-Jun, embora a p38<sup>MAPK</sup> também possa contribuir para esse processo, pelo menos nalgumas células. A JNK está também envolvida na activação do JunD. Por sua vez, a activação do c-Fos depende essencialmente da p42/44<sup>MAPK</sup>, embora a p38<sup>MAPK</sup> e a JNK também possam participar nesse processo, nalgumas células e em resposta a determinados estímulos (Karin *et al.*, 1997; Shaulian e Karin, 2002).

Para avaliarmos a importância da p38<sup>MAPK</sup> e da p42/44<sup>MAPK</sup> na activação do AP-1, induzida pela IL-1 em condrócitos articulares, utilizámos, mais uma vez, o SB 203580 e o PD 98059 que inibem, respectivamente a p38<sup>MAPK</sup> e a MEK1 que é a enzima responsável pela activação da p42/44<sup>MAPK</sup>. Procurámos, assim, relacionar a eventual capacidade de cada um desses compostos para impedirem a activação do AP-1, com os seus efeitos na expressão da NOS II (*vide* capítulo 4.2).

A Figura 5.2.1 mostra que o tratamento das culturas de condrócitos com PD 98059 (60 µM) preveniu, por completo, a activação do AP-1 em resposta à IL-1 (20 ng/ml), pois a intensidade dos complexos específicos é idêntica à obtida nas células não sujeitas a qualquer tratamento (controlo). Pelo contrário, o tratamento das células com SB 203580 (40 µM) não alterou a intensidade dos complexos específicos, em relação aos observados com os extractos nucleares obtidos das células tratadas apenas com IL-1 (20 ng/ml). Estes resultados mostram, portanto, que a p42/44<sup>MAPK</sup>, ao contrário da p38<sup>MAPK</sup>, é essencial para a activação do AP-1 em resposta à IL-1.

No capítulo 4.2 apresentámos resultados que demonstram a inibição da expressão da NOS II pelo SB 203580, mas não pelo PD 98059. Esses resultados, em conjunto com os apresentados na Figura 5.2.1, mostram que o PD 98059 não teve qualquer efeito na expressão da NOS II, numa concentração que impediu eficazmente a activação do AP-1, enquanto a concentração de SB 203580 que inibiu a expressão da

NOS II, não impediu a activação do AP-1. Assim, concluímos que o AP-1 não participa na activação da transcrição do gene da NOS II em resposta à IL-1, em condrócitos articulares bovinos.

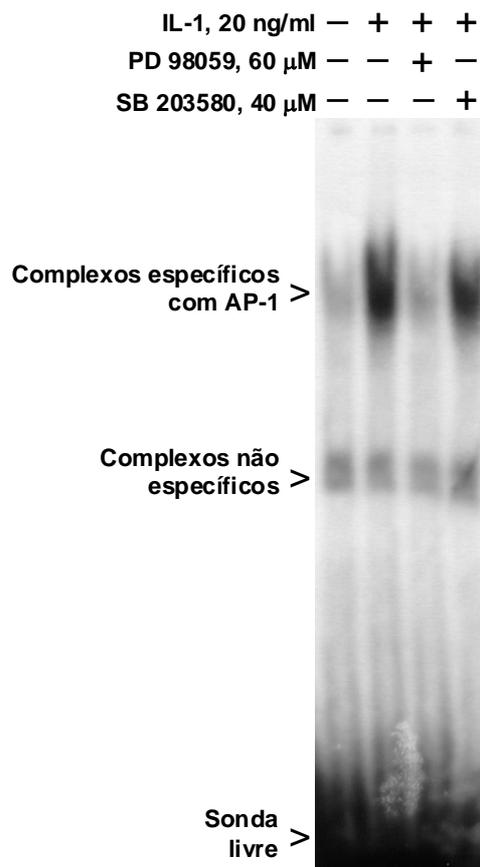


Figura 5.2.1. O PD 98059 impede a activação do AP-1 induzida pela IL-1. As culturas de condrócitos foram tratadas com PD 98059 (60  $\mu$ M) ou com SB 203580 (40  $\mu$ M) durante 2h antes da adição de IL-1 e depois incubadas por mais 3h. Os extractos nucleares foram analisados por EMSA, com um oligonucleótido específico para o AP-1, como descrito no capítulo 2.6. A autorradiografia apresentada é representativa de três experiências independentes.

### 5.2.2. A presença de AP-1 activado não impede a expressão da NOS II induzida pela IL-1

Embora os resultados apresentados no ponto anterior indiquem que o AP-1 não é necessário para a expressão da NOS II, isso não exclui a possibilidade deste factor de transcrição regular negativamente a expressão deste gene.

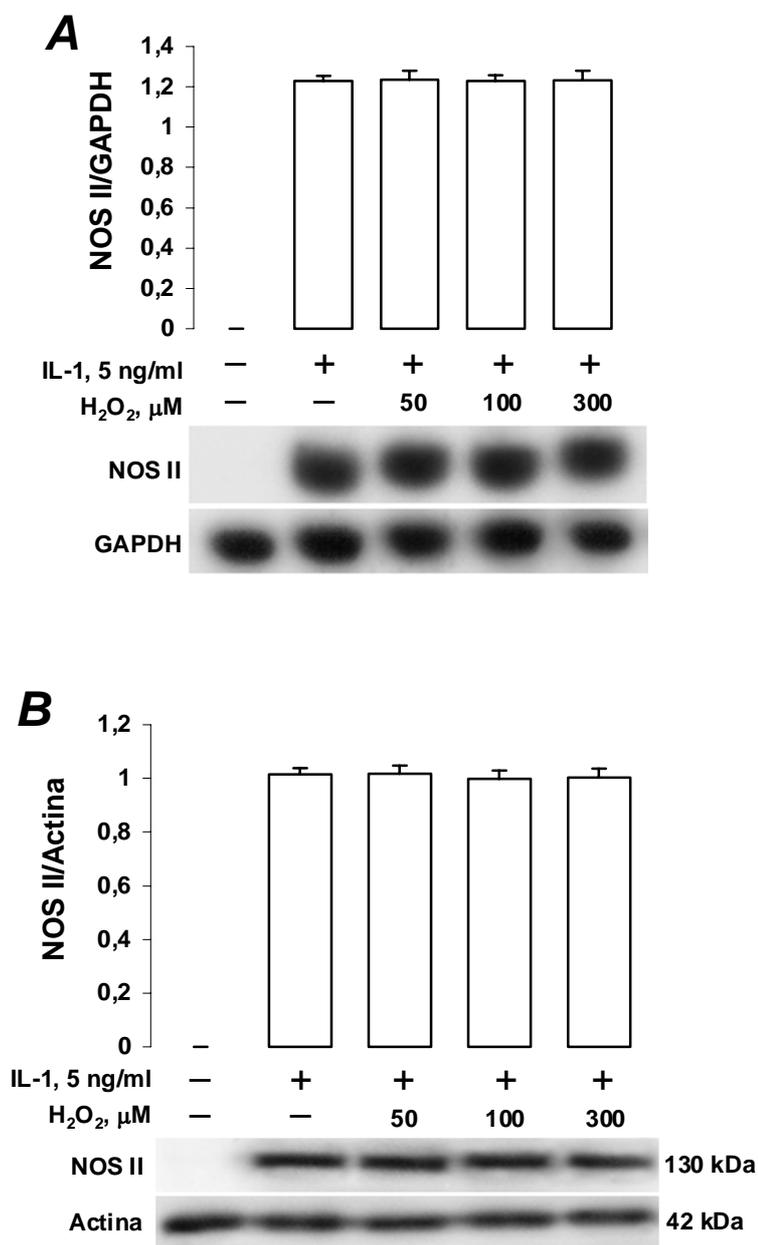


Figura 5.2.2. A pré-activação do AP-1 não afecta a expressão da NOS II induzida pela IL-1. **A:** efeito nos níveis de ARNm da NOS II; **B:** efeito nos níveis de proteína da NOS II. Antes da adição de IL-1 (5 ng/ml), as culturas de condrócitos foram tratadas com as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicadas, durante 2h e depois incubadas durante mais 5h (**A**) ou 16h (**B**) na presença da citocina. Os níveis de ARNm e de proteína da NOS II foram detectados por *Northern blot* e por *Western blot*, como descrito nos capítulos 2.4 e 2.7, respectivamente. Cada uma das autorradiografias apresentadas é representativa de três experiências independentes.

Para elucidarmos esta questão, tirámos partido da capacidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para activar o AP-1, sem induzir ou sequer ser necessário para a expressão da NOS II. Assim, tratámos as culturas de condrócitos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50-300 µM) durante 2h, o que é suficiente para induzir, quase maximamente, a activação do AP-1 (Figura 5.1.3). Após esse período, as células foram tratadas com IL-1 (5 ng/ml) durante 5h ou 16h, para determinação dos níveis de ARNm e de proteína da NOS II, respectivamente.

Os resultados apresentados na Figura 5.2.2 mostram que os níveis de ARNm e de proteína da NOS II nas células tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, antes da adição de IL-1, são idênticos aos obtidos nas células tratadas apenas com a citocina. Isto significa que a presença de AP-1 activado na célula, aquando da adição do estímulo, não impediu a expressão da NOS II.

### 5.2.3. Discussão dos resultados

A região promotora do gene da NOS II contém locais de ligação específicos para o AP-1 (Lowenstein *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1998). Porém, o papel deste factor de transcrição na expressão da NOS II varia consideravelmente entre células diferentes. Por exemplo, o AP-1 é necessário para a expressão da NOS II em células epiteliais pulmonares humanas (Marks-Konczalik *et al.*, 1998; Kristof *et al.*, 2001) e numa linha de células da glia (Giri *et al.*, 2002), mas a sua activação impede a expressão da NOS II, em células epiteliais obtidas de tumores do cólon humanos (Kleinert *et al.*, 1998; Pance *et al.*, 2002).

O papel do AP-1 na expressão da NOS II em condrócitos, quer bovinos, quer humanos, tanto quanto sabemos, não é conhecido. Os resultados apresentados na Figura 5.2.1, em conjunto com os apresentados na Figura 4.2.2 mostram que, apesar de a IL-1 activar o AP-1, este factor de transcrição não é necessário para a expressão da NOS II, pelo menos em condrócitos articulares bovinos. De facto, estas figuras mostram que o inibidor da MEK1 (PD 98059) impediu a activação do AP-1, mas não teve qualquer efeito na expressão da NOS II. Inversamente, o inibidor da p38<sup>MAPK</sup> que inibiu a expressão da NOS II, não impediu a activação do AP-1. Contudo, estes resultados não excluem a possibilidade de o AP-1 poder funcionar como regulador negativo da região

promotora do gene da NOS II, reprimindo a sua transcrição, tal como acontece noutras células (Kleinert *et al.*, 1998; Pance *et al.*, 2002). Nesse caso e tendo em conta a capacidade do NO para activar o AP-1 (Figura 5.1.2), poderia estabelecer-se um mecanismo de regulação adicional que, em paralelo com o bloqueio da activação do NF- $\kappa$ B (*vide* capítulo 4.3), reforçaria o efeito inibitório do NO na expressão da NOS II.

Procurámos esclarecer esta questão, isto é, averiguar se o AP-1 funciona como repressor da transcrição do gene da NOS II ou se não regula este processo, induzindo a actividade deste factor de transcrição, antes dos condrócitos serem estimulados com IL-1. Desse modo, poderíamos observar mais facilmente o efeito da presença de dímeros AP-1 activos quando fossem desencadeados, pela IL-1, os processos intracelulares que promovem a transcrição do gene da NOS II. Para isso, aproveitámos a capacidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para activar especificamente o AP-1 (Figuras 5.1.2, 5.1.3 e 5.1.4), sem interferir com a expressão da NOS II (*vide* capítulo 4.1). Os resultados obtidos mostram que a pré-activação do AP-1, resultante do tratamento dos condrócitos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes da adição de IL-1, não modificou os níveis de ARNm, nem de proteína da NOS II, em comparação com os obtidos nas células tratadas apenas com a citocina (Figura 5.2.2). Estes resultados significam, pois, que o AP-1 não funciona como repressor da região promotora do gene da NOS II e, portanto, não impede a transcrição deste gene induzida pela IL-1, em condrócitos articulares bovinos.

Foi sugerido recentemente que dímeros AP-1 distintos podem desempenhar funções diferentes na regulação da transcrição de genes específicos (Karin *et al.*, 1997; Shaulian e Karin, 2002). Embora o heterodímero c-Fos:c-Jun seja o que apresenta maior afinidade e actividade transcricional, estudos recentes indicam que outros dímeros AP-1 podem participar na regulação da expressão genética, nomeadamente da NOS II. Entre os diferentes dímeros AP-1 que foram implicados na expressão da NOS II em várias células, contam-se complexos contendo Fra2:JunD (Marks-Konczalik *et al.*, 1998; Kristof *et al.*, 2001), JunB, c-Jun, JunD (Cho *et al.*, 2002) e também Fra1 (Giri *et al.*, 2002). Assim, pelo menos parte das discrepâncias acerca do papel do AP-1 na regulação da expressão da NOS II, podem resultar da indução de dímeros AP-1 distintos, em resposta a um dado estímulo em células diferentes, ou em resposta a estímulos distintos no mesmo tipo de célula. Não obstante, como a presença de dímeros AP-1 activos nos

condrócitos, aquando da estimulação com IL-1, não alterou a expressão da NOS II, estes resultados excluem a possibilidade de o AP-1, independentemente da sua composição, participar na regulação da transcrição da NOS II, em condrócitos articulares bovinos.

Apesar de não serem necessários para a expressão da NOS II, os complexos AP-1 induzidos pela IL-1, pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e pelo NO podem ser relevantes na indução de outros genes cujas proteínas também desempenham papéis significativos na fisiopatologia das doenças artríticas. Uma dessas proteínas é a IL-8, uma quimiocina cuja produção é induzida pela IL-1 em condrócitos articulares (Recklies e Golds, 1992; Pulsatelli *et al.*, 1999). O mais interessante é que a expressão de IL-8 induzida pelo TNF- $\alpha$  e pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células epiteliais, é mediada pelo heterodímero c-Fos:JunD (Lakshminarayanan *et al.*, 1998) que é também induzido em condrócitos articulares, quer pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quer pela IL-1 (Figura 5.1.4). Por outro lado, o mesmo heterodímero liga-se também a locais específicos para o AP-1 presentes na região promotora do gene da colagenase-1, sendo indispensável para ocorrer a sua transcrição (White e Brinckerhoff, 1995). Assim, os resultados apresentados sugerem que o heterodímero c-Fos:JunD, induzido por intermédio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e/ou do NO produzidos em resposta à IL-1, pode também desempenhar um papel importante na expressão de genes dependentes do AP-1, nomeadamente da IL-8 e da colagenase-1, em condrócitos articulares. Mais ainda, tendo em conta a importância da IL-1 na fisiopatologia das doenças artríticas, o esclarecimento das funções específicas de cada um dos heterodímeros, c-Fos:c-Jun e c-Fos:JunD, na regulação da expressão dos vários genes induzidos pela IL-1 em condrócitos articulares, bem como o conhecimento dos mecanismos que regulam a actividade e especificidade desses complexos, poderá permitir a identificação de mecanismos fisiopatológicos que poderão constituir novos alvos terapêuticos susceptíveis de manipulação farmacológica.