

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Este trabalho teve como principais objectivos esclarecer as funções desempenhadas pelos factores de transcrição NF- κ B e AP-1 na regulação da expressão da NOS II induzida pela IL-1, em condrócitos articulares, e identificar mecanismos celulares relevantes como mediadores destas respostas à IL-1.

Na primeira parte deste trabalho, caracterizámos a expressão e actividade da NOS II em função do tempo de incubação e da concentração de IL-1 (capítulo 3.1). Pesquisámos também a presença da isoforma constitutiva, NOS I, em condrócitos articulares (capítulo 3.2). Nesta parte do trabalho, caracterizámos ainda a activação do NF- κ B (capítulo 3.3) e do AP-1 (capítulo 3.4) e identificámos a composição dos dímeros respectivos, activados em resposta à IL-1. Os resultados obtidos mostram que a IL-1 induz a transcrição do gene da NOS II, com o consequente aumento da actividade da enzima, sendo estes efeitos dependentes da concentração e do tempo de incubação das células com a citocina. Verificámos também que a NOS I é expressa de forma constitutiva em condrócitos articulares, sendo rapidamente degradada em resposta à estimulação com IL-1. Verificámos ainda que a IL-1 activa os dois factores de transcrição, NF- κ B e AP-1, com cinéticas diferentes. As proteínas RelA e p50, provavelmente arranjadas em homo e heterodímeros, e as proteínas c-Fos, c-Jun e JunD, formando os heterodímeros c-Fos:c-Jun e c-Fos:JunD, constituem, respectivamente, os dímeros NF- κ B e AP-1 activados pela IL-1.

Na segunda parte do trabalho, abordámos alguns aspectos relacionados com os mecanismos envolvidos na activação do NF- κ B em resposta à IL-1, e estudámos os efeitos resultantes da inibição desses processos, na expressão da NOS II. Os resultados obtidos indicam que a produção de ROS, em especial do radical anião superóxido (capítulo 4.1), e a activação de cinases de resíduos de tirosina (capítulo 4.2) são

processos indispensáveis para a activação do NF- κ B e para a expressão da NOS II em resposta à IL-1.

Verificámos, também, que a inibição da actividade da p38^{MAPK} impediu a expressão da NOS II, sem interferir com a activação do NF- κ B, designadamente com a afinidade para o elemento κ B (capítulo 4.2). Estes resultados indicam que a activação do NF- κ B induzida pela IL-1 em condrócitos articulares, é independente da actividade da p38^{MAPK}. Não obstante, é possível que esta enzima participe na indução da actividade transcricional do NF- κ B, depois deste ter sido libertado do complexo com o I κ B e de se ter deslocado para o núcleo e ligado ao elemento κ B. De facto, é possível que a p38^{MAPK} seja necessária para a activação de uma outra enzima, como a MSK1 ou a MAPKAPK 2/3, que, por sua vez, promove a fosforilação do RelA, conferindo-lhe a capacidade de activar a transcrição dos genes alvo do NF- κ B. Alternativamente, é também possível que, em condrócitos articulares, a p38^{MAPK} esteja envolvida numa cascata de sinalização independente do NF- κ B que leve à activação de outro factor de transcrição, igualmente indispensável para a expressão da NOS II, em resposta à IL-1.

Ainda no capítulo 4, verificámos que o NO, adicionado às culturas de condrócitos, inibe a sua própria produção, como resultado de impedir a degradação do I κ B- α e a consequente activação do NF- κ B e expressão da NOS II (capítulo 4.3). Estes resultados, em conjunto com a capacidade da IL-1 para induzir a degradação da NOS I, interrompendo, assim, a produção constitutiva de NO (capítulo 3.2), estão de acordo com estudos realizados noutras células que indicam que o NO produzido pelas isoformas “constitutivas”, NOS I e NOS III, impede a activação do NF- κ B (Kanno et al., 2000; Peng et al., 1995; Togashi et al., 1997). Fisiologicamente, esta acção do NO poderá constituir um mecanismo supressor que impeça a indução acidental e potencialmente perigosa do NF- κ B (Colasanti et al., 1995). De acordo com este mecanismo, a activação do NF- κ B e a expressão subsequente da NOS II só podem ocorrer quando um estímulo adequado, como a IL-1, leva à eliminação da produção constitutiva de NO, quer por inibir a actividade das isoformas constitutivas (Colasanti et al., 1999), quer por induzir a sua degradação (capítulo 3.2). Por outro lado, os resultados apresentados no capítulo 4.3 também sugerem que o NO produzido pela NOS II sintetizada em resposta à IL-1, poderá, por um mecanismo de retroalimentação negativo, impedir a indução continuada

do NF- κ B e/ou a sua activação em resposta a um segundo estímulo. Embora os resultados apresentados apontem para a existência deste mecanismo de regulação da activação do NF- κ B e, conseqüentemente, da expressão dos seus genes alvo, mais estudos são necessários para determinar a sua relevância *in vivo*, especialmente em condrócitos artríticos.

No capítulo 4.4, verificámos que a diacereína e o seu metabolito activo, a reína, impedem a degradação do I κ B- α induzida pela IL-1, prevenindo, assim, a translocação dos dímeros NF- κ B para o núcleo e a expressão subsequente de genes alvo deste factor de transcrição, nomeadamente da NOS II. A eficácia da diacereína e da reína como inibidores do NF- κ B e da produção de NO pode explicar, a nível molecular, algumas das acções destes dois fármacos observadas *in vitro* e *in vivo*. Além disso, considerando a importância do NF- κ B e do NO na fisiopatologia das doenças artríticas (*vide* capítulo 1.4), os resultados apresentados no capítulo 4.4 também sugerem que, além dos efeitos anti-osteoartríticos, a diacereína e a reína poderão exercer efeitos igualmente benéficos nas artrites inflamatórias.

Na terceira e última parte do trabalho, demonstrámos que o NO, bem como o H₂O₂, activam o AP-1, imitando a resposta induzida pela IL-1 que depende, em absoluto, da capacidade da célula para produzir ROS e/ou NO (capítulo 5). O intervalo de tempo que decorre desde o início da produção de H₂O₂, até começar a síntese de NO, em resposta à IL-1, sugere que, inicialmente, a activação do AP-1 é mediada pelo H₂O₂, podendo, mais tarde, ser mantida pelo NO produzido pela NOS II recém-sintetizada. Deste modo, é possível que o H₂O₂ desencadeie a expressão de genes dependentes do AP-1, sendo depois o NO necessário para assegurar a expressão prolongada desses mesmos genes, como por exemplo a colagenase-1 e a colagenase-3 cuja síntese está muito aumentada nas doenças artríticas.

Ainda no mesmo capítulo, verificámos que o AP-1 não participa na expressão da NOS II, pois a inibição da p42/44^{MAPK} impediu a activação deste factor de transcrição, mas não interferiu com a transcrição e síntese da NOS II (capítulo 5.2). De acordo com esta observação, a presença de dímeros AP-1 activos na célula também não modificou a resposta induzida pela IL-1, indicando que este factor de transcrição não funciona como repressor da expressão do gene da NOS II (capítulo 5.2). Apesar de não participarem na

regulação da expressão da NOS II, os dímeros AP-1, designadamente os heterodímeros c-Fos:c-Jun e c-Fos:JunD, activados em resposta à IL-1, utilizando o H₂O₂ e o NO como mediadores, podem ser relevantes na indução de outros genes cujas proteínas também desempenham papéis significativos na fisiopatologia das doenças artríticas. Assim, o esclarecimento das funções específicas de cada um dos heterodímeros AP-1 activados em resposta à 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.

Em resumo, os resultados apresentados nos capítulos 3, 4 e 5 indicam que, em condrócitos articulares bovinos:

- o NF- κ B medeia a transcrição do gene da NOS II em resposta à IL-1, pois todos os compostos que impediram a activação deste factor de transcrição, inibiram, nas mesmas condições, a síntese do ARNm e da proteína da NOS II;
- o anião superóxido e as PTK, possivelmente incluindo também a JAK2, são indispensáveis para a activação do NF- κ B e para a expressão subsequente da NOS II;
- a p38^{MAPK} é necessária para a expressão da NOS II, mas não para a activação do NF- κ B. O mecanismo através do qual a p38^{MAPK} participa na expressão da NOS II pode envolver a indução da actividade transcripcional do NF- κ B ou a activação de outro factor de transcrição igualmente essencial para a transcrição do gene da NOS II;
- o NO impede a activação do NF- κ B e a expressão da NOS II em resposta à IL-1. Por sua vez, esta citocina induz a degradação da NOS I. Estas observações implicam o NO num mecanismo de auto-regulação que poderá impedir a activação accidental do NF- κ B e poderá também contribuir para restringir a indução continuada deste factor de transcrição e/ou a sua activação em resposta a um segundo estímulo;

- a diacereína e a reína impedem a degradação do I κ B- α e, conseqüentemente, a activação do NF- κ B e a expressão de genes que dependem deste factor de transcrição, em particular da NOS II. Estas acções dos dois fármacos constituem um mecanismo de acção que pode explicar muitos dos seus efeitos anti-osteoartríticos e que sugere igualmente a possibilidade de exercerem efeitos anti-inflamatórios e condroprotectores noutros tipos de doenças artríticas, designadamente nas artrites inflamatórias;
- as ROS, particularmente o H₂O₂, e o NO, provavelmente actuando de forma sequencial, medeiam a activação do AP-1 induzida pela IL-1, mas este factor de transcrição não participa na expressão da NOS II, seja como indutor, seja como supressor.
- O difenileniodónio, um inibidor de enzimas que contém grupos flavonóides, impediu tanto a activação do NF- κ B, como do AP-1, em resposta à IL-1, indicando que a inibição da produção celular de ROS é suficiente para impedir a activação destes dois factores de transcrição.

Em conclusão, os resultados apresentados identificam alguns mecanismos celulares relevantes para a regulação da actividade do NF- κ B e do AP-1 e da expressão da NOS II, induzidas pela IL-1 em condrócitos articulares. Tendo em conta o papel destes dois factores de transcrição na indução de genes cujas proteínas, incluindo a NOS II, contribuem para a degradação da cartilagem e para a inflamação articular, é plausível que fármacos que impeçam a activação de ambos, como acontece com o DPI ao inibir a produção celular de ROS e de NO, possam constituir uma estratégia terapêutica, simultaneamente, anti-inflamatória e condroprotectora.

Os resultados obtidos evidenciam, ainda, duas acções opostas do NO: por um lado, a sua capacidade para activar o AP-1 e, por outro, a sua eficácia como inibidor do NF- κ B. Esta dualidade de funções do NO levanta algumas questões quanto ao seu real papel na fisiopatologia das doenças artríticas. Será, de facto, o NO um mediador que promove o desenvolvimento e progressão das doenças artríticas? Se é verdade que o NO, ao activar o AP-1, pode contribuir para a expressão de enzimas catabólicas e de quimiocinas que promovem a degradação da cartilagem e agravam a inflamação,

também é possível que, ao inibir o NF- κ B, o NO impeça a expressão dessas mesmas proteínas. Por exemplo, a expressão da colagenase-1 (Vincenti et al., 1998), da colagenase-3 (Mengshol et al., 2000), da gelatinase B (Eberhardt et al., 2000) e da IL-8 (Lakshminarayanan et al., 1998; Lee e Burckart, 1998; Pahl et al., 1999) requer tanto a actividade do NF- κ B, como do AP-1. Se fosse possível dissociar estes dois efeitos do NO, promovendo a sua acção inibitória em relação ao NF- κ B e suprimindo a sua capacidade de activar o AP-1, talvez se pudessem restabelecer os mecanismos fisiológicos de regulação e, eventualmente, o metabolismo normal do condrócito.

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. Apesar do enorme interesse que tem despertado, o NO continua a levantar inúmeras questões, cujas respostas contribuirão, certamente, para uma melhor compreensão dos processos fisiopatológicos em que participa e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes que permitam modular e aproveitar da melhor forma as suas múltiplas capacidades.