

ÍNDICE

RESUMO	1
SUMMARY	5
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Estrutura e Funções da Articulação Sinovial	12
1.2. A Cartilagem Articular	13
1.2.1. Composição da matriz cartilaginosa	13
1.2.1.1. O colagénio	14
1.2.1.2. Os proteoglicanos	15
1.2.1.3. As proteases da matriz e seus inibidores	16
1.2.2. Organização estrutural e biomecânica da cartilagem	19
1.2.3. O condrócito	21
1.2.3.1. Regulação do metabolismo do condrócito	24
1.2.3.1.1. Sinais mecânicos	26
1.2.3.1.2. Componentes da matriz	28
1.2.3.1.3. Mediadores intercelulares	33
a) Factores anabólicos	34
b) Factores catabólicos	37
1.3. Interações entre as Células Articulares:	
Papel das Citocinas Pró- e Anti-Inflamatórias nas Artrites	41
1.4. A Interleucina-1:	
Caracterização, Mecanismos de Sinalização Celular e Respostas Induzidas no Condrócito	48
1.4.1. Síntese e funções das proteínas da família da IL-1	49
1.4.2. Componentes e funções do sistema de receptores da IL-1	50
1.4.3. Activação dos factores de transcrição NF- κ B e AP-1 e regulação da expressão genética em resposta à IL-1	55
1.4.3.1. Funções fisiológicas e regulação do NF- κ B	56

1.4.3.1.1. Estrutura, activação e regulação do NF- κ B	58
1.4.3.2. Funções fisiológicas e regulação do AP-1	63
1.4.3.2.1. Estrutura, activação e regulação do AP-1	64
1.4.4. Biossíntese e funções do NO como mediador das acções da IL-1 em condrócitos articulares	69
1.5. Objectivos e Organização da Dissertação	75
2. MÉTODOS E MATERIAIS	77
2.1. Preparação de Culturas Primárias de Condrócitos Articulares	77
2.1.1. Isolamento dos condrócitos articulares bovinos	77
2.1.2. Condições de cultura	78
2.2. Avaliação da Toxicidade dos Compostos Usados	78
2.3. Determinação da Produção de Espécies Reactivas de Oxigénio	79
2.4. Extracção do ARN Total e Análise de <i>Northern Blot</i>	80
2.5. Preparação de Extractos Citoplasmáticos e Nucleares	81
2.6. Ensaio de Desvio da Mobilidade Electroforética	82
2.7. Análise de <i>Western Blot</i> ou <i>Imunoblot</i>	83
2.8. Determinação da Actividade da NOS	84
2.8.1. Doseamento de nitritos	85
2.8.2. Doseamento de L-[3 H]citrulina	85
2.9. Análise Estatística	86
2.10. Materiais	86
3. EXPRESSÃO DA NOS II E ACTIVAÇÃO DO NF-κB E DO AP-1 EM RESPOSTA À IL-1	89
3.1. Caracterização da Expressão da NOS II:	
Influência do Tempo de Incubação e da Concentração de IL-1	89
3.2. Identificação da NOS I	93
3.3. Caracterização da Activação do NF-κB	94
3.4. Caracterização da Activação do AP-1	98

4. ACTIVACÃO E FUNÇÃO DO NF-κB COMO MEDIADOR DA EXPRESSÃO DA NOS II	
INDUZIDA PELA IL-1	101
4.1. O Papel das Espécies Reactivas de Oxigénio na Activação do NF-κB e na Expressão da NOS II	101
4.1.1. O difenilenoiodónio inibe a produção de ROS, a activação do NF-κB e a expressão da NOS II induzidas pela IL-1	103
4.1.2. A IL-1 induz a produção de H ₂ O ₂ e de anião superóxido	110
4.1.3. O anião superóxido, mas não o H ₂ O ₂ , medeia a activação do NF-κB e a expressão da NOS II induzidas pela IL-1	111
4.1.4. Discussão dos resultados	118
4.2. O Papel das Cinases de Tirosina e das MAPK na Activação do NF-κB e na Expressão da NOS II	123
4.2.1. O Tirfostin B42, a Genisteína e o SB 203580 inibem a expressão da NOS II induzida pela IL-1	124
4.2.2. A Genisteína e o Tirfostin B42, mas não o SB 203580, inibem a activação do NF-κB induzida pela IL-1	129
4.2.3. Discussão dos resultados	129
4.3. O Papel do NO na Activação do NF-κB e na Expressão da NOS II	135
4.3.1. O NO inibe a expressão da NOS II induzida pela IL-1	136
4.3.2. O NO impede a activação do NF-κB induzida pela IL-1	139
4.3.3. Discussão dos resultados	141
4.4. A Inibição do NF-κB e da Expressão da NOS II como Mecanismos da Acção Anti-Artrítica da Diacereína e da Reína	145
4.4.1. Avaliação da toxicidade da Diacereína e da Reína	147
4.4.2. A Diacereína e a Reína impedem a activação do NF-κB induzida pela IL-1	149
4.4.3. A Diacereína e a Reína impedem a expressão da NOS II induzida pela IL-1	153
4.4.4. Discussão dos resultados	154

5. ACTIVACÃO E FUNÇÃO DO AP-1 NA EXPRESSÃO DA NOS II INDUZIDA PELA IL-1	157
5.1. As Espécies Reactivas de Oxigénio e o NO como Mediadores da Activação do AP-1	158
5.1.1. O difenilenoiodónio impede a activação do AP-1 induzida pela IL-1	158
5.1.2. O H ₂ O ₂ e o NO activam o AP-1	160
5.1.3. Discussão dos resultados	164
5.2. Avaliação do Papel do AP-1 na Regulação da Expressão da NOS II	166
5.2.1. O PD 98059, mas não o SB 203580, impede a activação do AP-1 induzida pela IL-1	166
5.2.2. A presença de AP-1 activado não impede a expressão da NOS II induzida pela IL-1	167
5.2.3. Discussão dos resultados	169
6. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	173
BIBLIOGRAFIA	179