

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

As doenças artríticas ou artrósicas afectam as articulações sinoviais ou diartroses, englobando um grande número de patologias distintas, quer quanto à etiologia, quer em relação às características fisiopatológicas e evolução clínica. Apesar dessa diversidade, todas as doenças artríticas apresentam como característica mais proeminente e comum, a destruição da cartilagem articular, responsável pela perda de mobilidade e pela dor que acompanham e caracterizam estas patologias. Além disso, é também comum a todos os processos artríticos ou artrósicos a presença de uma reacção inflamatória, mais ou menos intensa.

Embora as designações *artrite* e *artrose* se utilizem praticamente como sinónimos, na verdade, traduzem características diferentes. À primeira está subjacente a presença de processo inflamatório — mais intenso nas chamadas artrites inflamatórias, de que a artrite reumatóide é o paradigma —, enquanto a segunda implica alterações degenerativas, mais associadas ao envelhecimento que são características da osteoartrose (também chamada osteoartrite, sobretudo na literatura de origem anglo-saxónica). No entanto, o componente inflamatório, ainda que clinicamente possa não ser muito evidente, está presente em todas as doenças articulares, incluindo a osteoartrite (Attur *et al.*, 2000; Fernandes *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2002), pelo que passaremos a utilizar o termo *artrite* para designar, em geral, estas patologias.

As doenças artríticas são a principal causa de deficiência e incapacidade motora a nível mundial, sendo a osteoartrite a mais comum. Esta forma de artrite caracteriza-se, fundamentalmente, pela degradação da cartilagem e do osso subjacente, acompanhada de dor, rigidez e perda da mobilidade articular, sendo altamente incapacitante. A frequência da osteoartrite aumenta com a idade, o que associado ao progressivo aumento da esperança de vida e ao envelhecimento da população que se vêm a verificar

nos países desenvolvidos, faz com que a osteoartrite represente um problema de saúde pública cada vez mais importante (Bird, 1998; Muir, 1990).

A artrite reumatóide, por outro lado, é a mais frequente das artrites inflamatórias e afecta cerca de 1% da população mundial (Wolfe, 1968). Esta doença, de etiologia ainda desconhecida, parece ser de natureza auto-imune e caracteriza-se por inflamação crónica e proliferação do tecido sinovial formando o “pannus” que invade e destrói a cartilagem. Parece haver também uma forte associação entre a artrite reumatóide e factores genéticos, envolvendo especialmente variações genéticas associadas com os antigénios da classe DR do Complexo Major de Histocompatibilidade (MHC). No entanto, o papel destes factores genéticos na artrite reumatóide é ainda controverso na medida em que alguns estudos sugerem que determinados haplótipos de moléculas MHC estão associados a um risco acrescido de desenvolvimento da doença (Iwakura, 2002), enquanto noutros estudos a influência desses factores parece estar mais relacionada com a gravidade, do que com a susceptibilidade individual à doença (Nguyen e Firestein, 1998). A artrite reumatóide inicia-se, geralmente, entre os 40 e os 50 anos de idade, sendo mais frequente nas mulheres do que nos homens, e podendo evoluir de uma forma mais ou menos benigna, apresentando apenas sintomas articulares de intensidade moderada, ou acompanhar-se de manifestações gerais graves que podem levar à morte (Dinant e Dijkmans, 1999).

Embora as doenças artríticas sejam mais frequentes a partir dos 40 anos, podem também afectar crianças e adultos jovens. Alguns tipos de artrite estão associados à ocorrência de outras patologias, como a gota e infecções prévias, ou de traumatismos mecânicos. Noutras formas da doença, como a artrite crónica juvenil, a causa é desconhecida, sendo por isso consideradas artrites idiopáticas. Independentemente da causa próxima, parece haver uma relação estreita, embora não universal, entre os diversos tipos de artrite e variações específicas dos haplótipos de moléculas MHC, particularmente da classe B (Roitt, 1994).

A importância sócio-económica e o impacto das doenças artríticas em termos de saúde pública, são enormes, tanto mais que as terapêuticas disponíveis para estas patologias são, acima de tudo, paliativas, não havendo ainda nenhuma terapêutica capaz de induzir a regeneração de cartilagem perfeitamente funcional. Embora nem todos os mecanismos de acção sejam conhecidos, os fármacos utilizados actualmente na

terapêutica das artrites dirigem-se, sobretudo, às manifestações do processo inflamatório crónico, sem de facto actuarem nas suas causas ou, sequer, originarem a produção de cartilagem estrutural e funcionalmente eficaz. A principal razão para este facto é a insuficiência dos conhecimentos actuais em relação aos factores etiológicos e processos patogénicos envolvidos nestas doenças, bem como em relação ao metabolismo articular e à sua regulação. Na última década e graças ao desenvolvimento e aplicação das metodologias da Biologia Celular e Molecular ao estudo da fisiologia da cartilagem e da patogénese das artrites, foram identificados vários processos celulares que parecem desempenhar um papel relevante na génese e progressão destas doenças e são susceptíveis de manipulação farmacológica, constituindo, assim, novos alvos para a terapêutica das doenças artríticas.

Na primeira parte deste capítulo introdutório, será feita uma breve revisão acerca do estado actual dos conhecimentos sobre os mecanismos celulares que desencadeiam e mantêm a degradação da cartilagem e a reacção inflamatória características das doenças artríticas. Assim, apresentar-se-á, de forma sucinta, a anatomia e fisiologia da articulação sinovial, em particular da cartilagem articular, para depois se abordar, mais especificamente, o papel do condrócito — a única célula da cartilagem articular — na manutenção e regulação funcional e estrutural deste tecido. Seguir-se-á uma breve descrição das interacções estabelecidas entre o condrócito e outras células presentes na articulação, para depois se abordar o papel da interleucina-1 na fisiopatologia das doenças artríticas e os mecanismos celulares que medeiam as suas acções.

A segunda parte deste capítulo será dedicada à exposição dos objectivos que determinaram o trabalho experimental realizado e à apresentação do conteúdo e organização desta dissertação.

1.1. ESTRUTURA E FUNÇÕES DA ARTICULAÇÃO SINOVIAL

Nas articulações sinoviais ou diartroses (Figura 1.1), a superfície articular dos ossos é revestida por uma camada espessa de cartilagem articular. Este é um tecido conjuntivo altamente especializado, resistente, mas, ao mesmo tempo, elástico e flexível, de forma a poder suportar e distribuir uniformemente por toda a superfície articular, as forças compressivas a que as extremidades dos ossos estão sujeitas. A intensidade dessas forças é muito ampla, podendo variar de 1-2 atmosferas em decúbito (Grushko *et al.*, 1989) até 100-200 atmosferas na posição ortostática e oscilando entre 40 e 50 atmosferas durante a marcha (Afoke *et al.*, 1987), o que exige uma grande capacidade de adaptação para que a cartilagem responda eficazmente, em cada momento, a qualquer alteração da pressão que sobre ela incide.

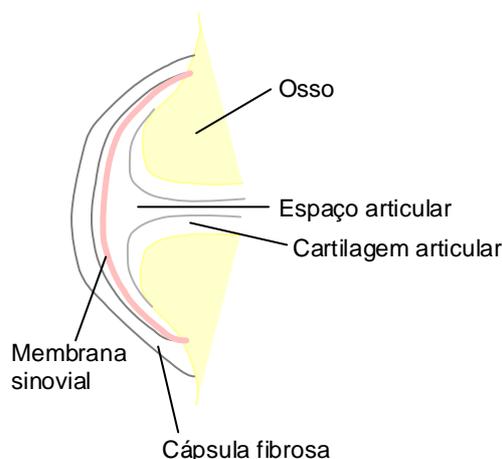


Figura 1.1. Representação esquemática das principais estruturas da articulação sinovial. Adaptado de Feldmann *et al.*, 1996.

A cartilagem articular é um tecido avascular, desprovido de inervação e composto por um único tipo de célula, o condrócito (Clarke *et al.*, 1991). A substância intercelular ou matriz extracelular — geralmente chamada *matriz cartilaginosa* — é muito abundante e complexa e nela se encontram embebidos os condrócitos, únicos responsáveis pela síntese e manutenção dos seus diversos componentes moleculares (Muir, 1995).

O espaço intra-articular, situado entre as duas extremidades ósseas opostas, contém o líquido sinovial que lubrifica as superfícies articulares, diminuindo o atrito, e funciona como veículo para a difusão de nutrientes desde os vasos sanguíneos da membrana sinovial até aos condrócitos da cartilagem articular. Para a nutrição da cartilagem articular contribuem também os vasos sanguíneos do osso subjacente, a partir dos quais ocorre a difusão de nutrientes para a cartilagem. A eliminação dos produtos finais do metabolismo celular ocorre também por difusão, através da cartilagem, até aos vasos sanguíneos e linfáticos do osso e da membrana sinovial (Kuettner et al., 1990; Maroudas, 1970).

Internamente, a cápsula articular que delimita o espaço articular, é revestida pela membrana sinovial. Esta membrana encontra-se muito próxima da superfície da cartilagem, separada apenas pelo líquido sinovial, e é constituída por dois folhetos em que o mais interno, a íntima sinovial, é desprovido de membrana basal e composto por uma a quatro camadas de células. O folheto mais externo, que une a parede interna da cápsula fibrosa com a íntima sinovial, é formado por tecido conjuntivo frouxo com capilares fenestrados. A íntima sinovial é composta por dois tipos de células: as do tipo A, semelhantes a macrófagos, derivam de precursores da linha monocítica provenientes da medula óssea; as do tipo B, habitualmente designadas por *sinoviócitos*, apresentam características de fibroblastos (Watanabe *et al.*, 1986). A membrana sinovial funciona como uma membrana de diálise que, devido à maior pressão hidrostática capilar, permite a ultrafiltração do sangue, sendo o líquido sinovial constituído pelo ultrafiltrado que passa dos capilares sinoviais para a cavidade articular (Knox *et al.*, 1988).

1.2. A CARTILAGEM ARTICULAR

1.2.1. Composição da matriz cartilaginosa

Para que a cartilagem suporte eficazmente as forças que, em cada momento, se exercem sobre a articulação, necessita de manter uma elevada resistência e flexibilidade que lhe são conferidas pelas fibrilhas de colagénio e pela substância intercelular amorfa que se encontra embebida na rede colagénica e que é composta por água e por grandes

aglomerados de proteoglicanos e ácido hialurônico. A água é o principal componente da matriz (70 a 80%) e é precisamente esse elevado teor de água, que se encontra associada às moléculas de proteoglicanos muito hidrófilas, que funciona como uma mola biomecânica, absorvendo choques e conferindo à cartilagem articular a deformabilidade necessária para suportar as forças compressivas a que é normalmente sujeita (Kempson *et al.*, 1973; Muir, 1995).

A matriz cartilaginosa contém também pequenos electrólitos, particularmente os catiões Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , cujas concentrações são muito superiores às encontradas no soro e no líquido sinovial, e uma pequena quantidade de aniões Cl^- (Mobasheri *et al.*, 1998), como se indica na tabela I.

Tabela I. Concentrações iónicas na cartilagem, soro e líquido sinovial humanos

	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Ca^{2+} (mM)	Cl^- (mM)
Matriz Cartilaginosa	240-350	7-12	6-20	60-100
Soro e Líquido Sinovial	140	5	1,5	145

(adaptado de Mobasheri *et al.*, 1998)

1.2.1.1. O colagénio

Na cartilagem articular, encontram-se diversos tipos de colagénio, dos quais os tipos II, IX, X e XI são específicos deste tecido, sendo produzidos exclusivamente por condrócitos (Eyre *et al.*, 1991; Muir, 1995). O colagénio do tipo II é o mais abundante na cartilagem articular (90-95%) e é um homotrímero formado por três cadeias $\alpha 1$ do tipo II que se organizam em fibrilhas (Miller e Lunde, 1973). Essas fibrilhas formam ligações cruzadas com pequenas quantidades de colagénio do tipo IX que, por si só, não forma fibrilhas, originando uma rede tridimensional que permite um certo grau de deformação quando a cartilagem é sujeita a forças compressivas ou de tracção (Mendler *et al.*, 1989). A manutenção da estrutura fibrillar do colagénio é essencial para a integridade funcional da cartilagem e a sua ruptura parece ser uma alteração que ocorre precocemente no desenvolvimento das patologias artríticas (Kempson *et al.*, 1973).

1.2.1.2. Os proteoglicanos

Os proteoglicanos específicos da cartilagem, em particular o agregcano e o sindecano, são constituídos por uma proteína central que forma um eixo em torno e ao longo do qual se dispõem numerosas moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados, os sulfatos de condroitina 4 e 6 e o sulfato de queratina. Os glicosaminoglicanos são polissacarídeos constituídos por unidades dissacarídicas sulfatadas que se repetem, formando cadeias relativamente curtas e não ramificadas. A cada proteína central podem ligar-se até 100 cadeias de sulfato de condroitina e 30 de sulfato de queratina, além de vários oligossacarídeos não sulfatados, formando uma estrutura que se assemelha a uma escova cilíndrica (Kuettnner *et al.*, 1990), como se representa esquematicamente na figura 1.2.

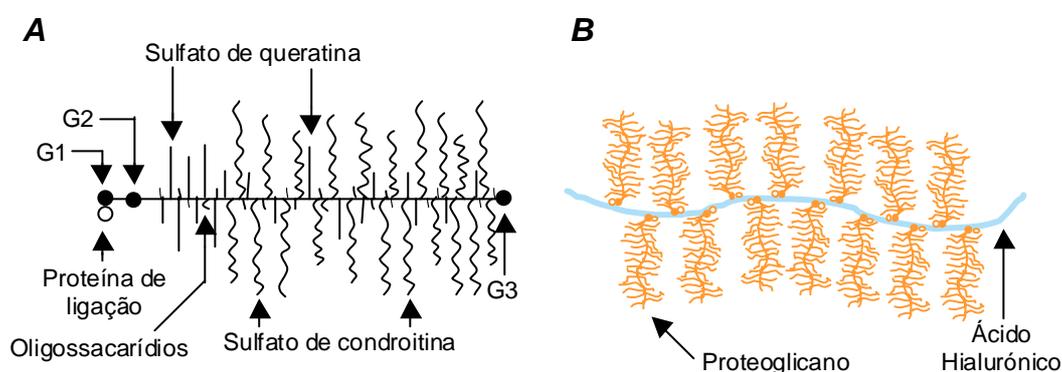


Figura 1.2. Representação esquemática da estrutura dos proteoglicanos (A) e dos agregados com o ácido hialurônico (B). G1: região globular 1 de ligação ao ácido hialurônico; G2: região globular 2; G3: região globular 3, terminal carboxílico. Adaptado de Kuettnner *et al.*, 1990.

Os proteoglicanos fazem parte de uma família de proteínas que se caracteriza por se ligar ao ácido hialurônico que é um glicosaminoglicano de cadeia muito longa (Hascall, 1977). A formação de agregados entre os proteoglicanos e o ácido hialurônico é reforçada através de uma pequena glicoproteína, designada por proteína de ligação, que torna esses agregados mais estáveis (Poole *et al.*, 1982). A cada cadeia de ácido hialurônico podem ligar-se, com elevada afinidade, numerosas moléculas de proteoglicanos formando enormes agregados multimoleculares (Figura 1.2) (Hascall, 1977; Kuettnner *et al.*, 1990; Muir, 1995; Poole *et al.*, 1982). No entanto, as moléculas de

proteoglicanos recém-sintetizadas têm pequena afinidade para o ácido hialurônico, sendo lentamente processadas, quer *in vivo*, quer *in vitro*, de forma a adquirirem elevada afinidade (Muir, 1995). Esse processo que se torna mais lento com a idade (Sandy *et al.*, 1989), envolve, provavelmente, rearranjos de ligações dissulfureto e permite a difusão das moléculas recém-sintetizadas para longe da célula produtora, até se imobilizarem por ligação ao hialuronato (Hardingham e Muir, 1974).

Além dos grandes proteoglicanos, o condrócito sintetiza também outros proteoglicanos de baixo peso molecular que se pensa desempenharem um papel importante na organização da matriz cartilaginosa (Demoor-Fossard *et al.*, 1999). A decorina, um desses pequenos proteoglicanos, parece ter especial importância pois liga-se às fibrilhas de colagénio e influencia a formação da tripla hélice característica (Scott, 1988).

1.2.1.3. As proteases da matriz e seus inibidores

A homeostasia da cartilagem requer a renovação constante da matriz cartilaginosa, o que implica a substituição das moléculas velhas ou danificadas. Os condrócitos e também os sinoviócitos são responsáveis pela síntese de várias enzimas que hidrolisam especificamente os diversos componentes da matriz. Essas enzimas desempenham um papel importante no processo de renovação da cartilagem, mas estão também implicadas na degradação excessiva da matriz que ocorre nas patologias artríticas, nomeadamente, na osteoartrite (Shinmei *et al.*, 1990; Okada *et al.*, 1992; Pelletier *et al.*, 1983) e na artrite reumatóide (Han *et al.*, 2001a; Lindy *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1995; Walakovits *et al.*, 1992).

Entre essas enzimas destacam-se:

1) as metaloproteases da matriz (“matrix metalloproteinases”, MMPs) que diferem entre si pela especificidade para diferentes substratos (Tabela II) e se distinguem de outras classes de proteases por a sua actividade requerer iões metálicos (particularmente, Zn^{2+}) e pH neutro (Birkedal-Hansen, 1995; Brinckerhoff e Matrisian, 2002; Mengshol *et al.*, 2002) e onde se incluem, entre outras, as collagenases que são as únicas enzimas capazes de clivar a tripla hélice dos colagénios I, II e III (Billinghurst *et al.*, 1997; Brinckerhoff e Matrisian, 2002; Mengshol *et al.*, 2002);

2) as serina proteases, entre as quais se destacam a plasmina e a elastase que hidrolisa as ligações cruzadas das fibrilhas de colagénio (Shinmei *et al.*, 1990);

3) as agrecanases que fazem parte de uma família de proteases designada por “desintegrina-metaloproteases com domínios idênticos à trombospondina” (“Desintegrin-Metalloproteinases with Thrombospondin motifs”, ADAMTS), hidrolisam o agrecano num local distinto daquele onde actuam as MMPs (Little *et al.*, 1999; Tortorella *et al.*, 1999); a expressão destas enzimas é regulada diferencialmente por diversos estímulos catabólicos (Flannery *et al.*, 1999a);

4) as catepsinas que se distinguem por diferentes mecanismos catalíticos, actuam sequencialmente após as MMPs, continuando a hidrólise dos fragmentos de colagénio e de proteoglicanos (Shinmei *et al.*, 1990).

A actividade destas enzimas é controlada a três níveis distintos, dependendo da transcrição dos genes que codificam a sua síntese sob a forma de pro-enzimas ou zimogéneos, da activação das formas pro-enzimáticas segregadas e da expressão dos “inibidores tissulares das metaloproteases” (“Tissue Inhibitors of Metalloproteinases”, TIMPs) que são proteínas que inibem especificamente a actividade das MMPs e são produzidas por diversos tipos de células, incluindo condrócitos articulares e sinoviócitos (Dean *et al.*, 1989; Günther *et al.*, 1994; Lum *et al.*, 1996; MacNaul *et al.*, 1990; Okada *et al.*, 1992).

A nível transcricional, a expressão das diversas proteases que degradam a matriz cartilaginosa, particularmente das MMPs, em condrócitos articulares, pode ser regulada, positiva ou negativamente, por diversos factores, incluindo sinais químicos provenientes da própria matriz (Arner e Tortorella, 1995; Forsyth *et al.*, 2002; Millward-Sadler *et al.*, 2000) e várias citocinas e factores de crescimento (Catterall *et al.*, 2001; Conquer *et al.*, 1992; Imai *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2001a; Okada *et al.*, 1992; Tardif *et al.*, 1999). Algumas MMPs, como a “MMP de tipo membranar”-1 (MT1-MMP) e a MMP-2, são expressas de forma constitutiva na cartilagem, enquanto outras, particularmente as MMPs-1, -3, -9 e -13, só são produzidas em resposta a determinados estímulos, como as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1) e factor de necrose tumoral- α (TNF) (Mengshol *et al.*, 2002).

Tabela II. Principais membros da família das metaloproteases da matriz (MMPs) e seus substratos*

Enzima	Substratos
Colagenase-1 (MMP-1)	Colagénios I, II, III, VII, VIII e X; agrecano
Colagenase-3 (MMP-13)	Colagénios I, II, III, IV, X e XIV; gelatina; fibronectina; agrecano; proMMP-9
Estromelisina-1 (MMP-3)	Agrecano; colagénios III, IV, IX e XI; gelatina, fibronectina; laminina; elastina; caseína; proMMP-13
Gelatinase B (MMP-9)	Gelatina, colagénios III, IV e V; proteoglicano; elastina; entactina
MT1-MMP (MMP-14)	Colagénios I, II e III; proteoglicano; fibronectina, vitronectina; laminina; proMMP-2; proMMP-13
MT3-MMP (MMP-16)	Colagénios I, II e III; proMMP-2
MT4-MMP (MMP-17)	TNF- α convertase

MT-MMP, metaloproteases da matriz de tipo membranar, assim designadas por permanecerem ligadas à superfície da célula.

*Dados compilados de várias referências, em especial de Billinghamurst *et al.*, 1997 e Mengshol *et al.*, 2002.

Exceptuando as MMPs de tipo membranar (MT-MMP) que são activadas no interior das células e que, ao ligarem-se à face externa da membrana citoplasmática, contribuem para a activação das outras MMPs (Brinckerhoff e Matrisian, 2002; Cowell *et al.*, 1998; Imai *et al.*, 1997), estas enzimas são segregadas na forma de zimogéneos. A sua activação no meio extracelular envolve a acção de diversas enzimas proteolíticas, como a plasmina que, por sua vez, é activada a partir do plasminogénio por um complexo sistema de proteínas activadoras e inibidoras também segregadas pelo condrócito (Campbell *et al.*, 1991a; Martel-Pelletier *et al.*, 1991; Shinmei *et al.*, 1990; Sadowski e Steinmeyer, 2002). A acção da plasmina e de outras proteases, incluindo as próprias MMPs (Knauper *et al.*, 1996), inicia uma cascata de acontecimentos que culmina na excisão do péptido responsável pela inactividade da enzima, originando, assim, a forma cataliticamente activa (Birkedal-Hansen, 1995; Brinckerhoff e Matrisian, 2002).

Por outro lado, também a expressão dos TIMPs e dos componentes do sistema plasminogénio/plasmina, nos condrócitos, pode ser induzida ou inibida por várias citocinas e factores de crescimento (Campbell *et al.*, 1991a; Häuselmann *et al.*, 1996; Lum *et al.*, 1996; Sadowski e Steinmeyer, 2002). Diversos estudos mostraram que a produção de TIMPs é menor na cartilagem artrítica do que na cartilagem normal (Dean *et al.*, 1989; Lum *et al.*, 1996; MacNaul *et al.*, 1990; Okada *et al.*, 1992), ao passo que a produção de MMPs, especialmente das MMPs-1, -3, -9 e -13, está aumentada, quer na osteoartrite (Billinghurst *et al.*, 1997; Shinmei *et al.*, 1990; Okada *et al.*, 1992; Pelletier *et al.*, 1983), quer nas artrites inflamatórias (Han *et al.*, 2001a; Lindy *et al.*, 1997; Maeda *et al.*, 1995; Shinmei *et al.*, 1990; Walakovits *et al.*, 1992). Assim, na articulação artrítica, há um desequilíbrio entre os níveis de MMPs e de TIMPs segregados, indicando que a manutenção do equilíbrio entre estes dois factores é importante para a integridade da cartilagem.

1.2.2. Organização estrutural e biomecânica da cartilagem

Uma vez sintetizados e segregados pelo condrócito, os complexos hialuronato-proteoglicanos e o colagénio reúnem-se por si próprios, originando complexos perfeitamente estruturados e adaptados para suportarem as forças de compressão e de tracção a que a articulação está sujeita.

A cartilagem articular é um tecido muito complexo e heterogéneo, apresentando-se estratificado em três zonas que diferem em relação à composição bioquímica, organização macromolecular e propriedades biomecânicas, diferenças essas que, em última análise, resultam da especialização metabólica dos condrócitos residentes em cada zona (Muir, 1995; Häuselmann *et al.*, 1996). Esta heterogeneidade reflecte-se também na fisiopatologia das artrites, uma vez que a localização inicial das lesões, a sua progressão e a susceptibilidade das diferentes zonas aos efeitos catabólicos induzidos por citocinas estão relacionadas com a estratificação da cartilagem (Häuselmann *et al.*, 1996; Hollander *et al.*, 1995).

A disposição das fibrilhas de colagénio na matriz cartilaginosa também contribui para essa heterogeneidade. As fibrilhas de colagénio dispõem-se na matriz segundo uma arquitectura bem determinada, formando “arcadas” em que as fibrilhas mais exteriores se

dispõem paralelamente à superfície, tornando-se mais perpendiculares à medida que penetram profundamente na cartilagem (Figura 1.3) (Muir, 1995).

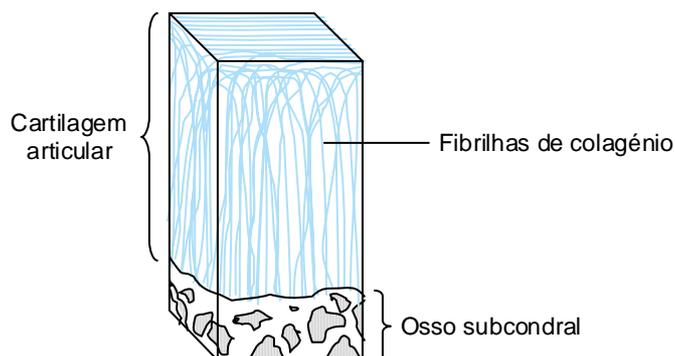


Figura 1.3. Representação esquemática da disposição tridimensional das fibrilas colagénias na cartilagem articular. Adaptado de Tajana, 1991.

Os espaços moleculares definidos pelas fibrilas colagénias são ocupados pelos grandes agregados de proteoglicanos e ácido hialurónico que, devido ao seu grande tamanho, são retidos no esqueleto de fibrilas colagénias. O elevado número de resíduos sulfatados em cada molécula de proteoglicano origina uma elevada carga negativa no interior da rede colagénia, o que atrai iões positivos, particularmente Na^+ , criando uma elevada pressão osmótica que, por sua vez, atrai água para o interior da cartilagem. Esta tendência da cartilagem para intumescer é contrariada pela força tênsil exercida pela rede de fibrilas colagénias que, por isso, estão sob tensão constante, mesmo quando nenhuma força actua sobre a cartilagem (Maroudas, 1976). A tensão exercida pelas fibrilas colagénias impede a acumulação excessiva de água que tornaria a cartilagem mais mole e incapaz de acomodar as forças compressivas a que está sujeita (Kempson *et al.*, 1973; Muir, 1995).

Quando a cartilagem é submetida a forças compressivas, a água retida pelos proteoglicanos é libertada proporcionalmente à força exercida, sendo recuperada quando cessa a força de compressão. A quantidade de água que pode ser expelida pela matriz cartilaginosa é limitada pelas próprias cargas negativas dos proteoglicanos que, ao serem comprimidos, tendem a repelir-se, determinando assim, um certo grau de

incompressibilidade, para além do qual não é possível acomodar forças mais intensas (Maroudas, 1976).

Por outro lado, a capacidade da cartilagem articular para suportar forças mais ou menos intensas é directamente proporcional à concentração de proteoglicanos na matriz e depende da manutenção da sua integridade. De facto, mesmo um pequeno grau de degradação das cadeias de ácido hialurónico ou dos proteoglicanos pode reduzir o tamanho dos agregados multimoleculares que, então, são retidos com menos eficácia pela rede colagénia, comprometendo, assim, a eficácia da cartilagem como mola biomecânica, amortecedora de forças compressivas e de tracção e ruptura (Muir, 1983; Muir, 1995; Mobasheri *et al.*, 2002a).

1.2.3. O condrócito

O condrócito é uma célula com origem no mesênquima, altamente especializada que garante a homeostasia e funcionalidade da cartilagem articular, regulando com precisão e selectivamente os processos de síntese e degradação dos vários componentes da matriz. Apesar do condrócito ser a única célula da cartilagem e o principal responsável por estes processos, a cartilagem articular contém um número de células bastante pequeno em comparação com os outros tecidos, sendo a densidade celular inversamente proporcional à espessura da cartilagem (Muir, 1995). Além disso, a densidade celular, bem como a morfologia e o metabolismo dos condrócitos variam consoante se encontram localizados mais à superfície ou mais profundamente na cartilagem (Häuselmann *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1992).

Na cartilagem adulta, os condrócitos têm uma vida longa, dividindo-se muito raramente, embora mantenham a capacidade de divisão que se revela, por exemplo, quando a integridade da matriz é comprometida, como acontece na proximidade de lesões osteoartíticas (Muir, 1995). Por outro lado, a capacidade de sobrevivência do condrócito é fundamental para a manutenção da integridade da matriz. Porém, ao longo da vida, o número de condrócitos na cartilagem articular adulta (Mitrovic *et al.*, 1983) e a sua capacidade proliferativa (Dominice *et al.*, 1986) vão diminuindo progressivamente, ao mesmo tempo que aumenta a frequência de alterações degenerativas e a incidência de osteoartrite (Hashimoto *et al.*, 1998; Ishibashi *et al.*, 1995), sugerindo que a diminuição da

viabilidade e da capacidade proliferativa dos condrócitos podem ser factores determinantes do envelhecimento e degeneração da cartilagem (Hashimoto *et al.*, 1998). A morte celular por apoptose parece ser o principal mecanismo subjacente à diminuição da viabilidade dos condrócitos observada na cartilagem osteoartrítica (Blanco *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 1998).

Dada a sua natureza avascular, a cartilagem é um tecido fisiologicamente sujeito a uma baixa tensão de oxigénio que varia entre menos de 10% à superfície da cartilagem e menos de 1% nas camadas mais profundas (Grimshaw e Mason, 2001). O condrócito adaptou-se a este ambiente de baixa tensão de oxigénio recorrendo a um metabolismo fundamentalmente anaeróbio (Rajpurohit *et al.*, 1996). Embora contenha algumas mitocôndrias e, como tal, seja capaz de suportar tensões de oxigénio superiores às que existem habitualmente na cartilagem articular, o condrócito utiliza fundamentalmente a glicólise como fonte de ATP, mesmo em condições de aerobiose (Marcus e Srivastava, 1973; Stefanovic-Racic *et al.*, 1994a).

Apesar do baixo rendimento energético da glicólise, o condrócito é uma célula com intensa actividade sintética, para o que necessita de um fornecimento regular de glicose que optimize a produção de ATP e, assim, assegure a manutenção da actividade metabólica da célula. Além disto, a glicose é indispensável para a síntese dos glicosaminoglicanos. A glicose chega ao condrócito por difusão simples a partir da membrana sinovial e através da matriz cartilaginosa e, dado o seu pequeno peso molecular e carga neutra, distribui-se igualmente entre a matriz e o líquido sinovial (Maroudas, 1970). Assim, a passagem através da membrana plasmática é o passo limitante do metabolismo da glicose pelo condrócito. Recentemente, foram identificados, em condrócitos humanos, quatro transportadores específicos para a difusão facilitada da glicose (Mobasheri *et al.*, 2002b; Shikhman *et al.*, 2001). Estes transportadores podem constituir um importante mecanismo de adaptação, assegurando o fornecimento regular de glicose ao condrócito e, conseqüentemente, a manutenção da sua homeostasia e a integridade da cartilagem, mesmo quando ocorrem alterações da concentração de glicose no microambiente extracelular do condrócito (Mobasheri *et al.*, 2002b). Por outro lado, a expressão de dois desses transportadores (GLUT1 e GLUT9) é aumentada por citocinas catabólicas (Shikhman *et al.*, 2001), o que pode representar uma adaptação do

condrócito ao aumento das necessidades energéticas em consequência da estimulação do seu metabolismo por essas citocinas.

Na cartilagem, cada condrócito está rodeado por uma região bem definida, de estrutura complexa e distinta da do resto da matriz. A porção da matriz extracelular que envolve o condrócito — *matriz pericelular* — é muito rica em colagénio do tipo VI, contendo também colagénio dos tipos II e IX, proteoglicanos e ácido hialurónico (Poole *et al.*, 1988; Wotton *et al.*, 1991). Além disso, o condrócito sintetiza diversas glicoproteínas, como a fibronectina (Chevalier *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1987), a vitronectina (Durr *et al.*, 1993) e a trombospondina (Miller e McDevitt, 1988), que embora presentes na matriz cartilaginosa em pequena concentração, parecem desempenhar funções importantes na regulação do metabolismo condrocitário e, provavelmente, na organização da matriz. Entre essas proteínas, a fibronectina que interage simultaneamente com o colagénio II, com os proteoglicanos (Burton-Wuster e Lust, 1989) e com o condrócito, desempenha um papel relevante na modulação do metabolismo destas células, em particular por induzir a síntese de proteoglicanos (Arner e Tortorella, 1995; Clancy *et al.*, 1997).

A matriz pericelular interage fisicamente com o condrócito através da ligação dos seus componentes a receptores membranares específicos. As principais moléculas de adesão expressas à superfície do condrócito, pertencem à família das integrinas. Estas são glicoproteínas transmembranares, heterodiméricas formadas por uma subunidade do tipo α e outra do tipo β . Entre as diversas integrinas expressas pelo condrócito, destacam-se os complexos $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_6\beta_1$ que constituem receptores para a fibronectina, para a vitronectina e para a trombospondina, a osteopontina e a laminina, respectivamente, enquanto as integrinas $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{10}\beta_1$ têm afinidade para os colagénios II e VI (Dürr *et al.*, 1993; Enomoto *et al.*, 1993; Salter *et al.*, 1992; Woods *et al.*, 1994; Loeser *et al.*, 1995, 2000).

Além das integrinas, existem outras moléculas de adesão na superfície do condrócito, como o CD106 (ou “molécula de adesão da célula vascular”-1, VCAM-1) e o CD54 (ou “molécula de adesão intercelular”-1, ICAM-1) que medeiam a adesão de linfócitos T ao condrócito (Kienzle e von Kempis, 1998). O CD44 é outra molécula de adesão expressa pelo condrócito e constitui o receptor para o ácido hialurónico, desempenhando um papel importante na regulação do metabolismo deste componente

da matriz e na transdução de sinais que modulam o metabolismo do condrócito e envolvem a sua adesão ao ácido hialurónico (Aguiar *et al.*, 1999; Ishida *et al.*, 1997).

O condrócito, juntamente com a sua matriz pericelular e com uma rede de finas fibrilhas de colagénio, orientadas em várias direcções e envolvendo-o, embora não formando uma verdadeira cápsula individualizada, constitui o *condrónio* que é a unidade morfo-funcional da cartilagem e cuja formação é intrínseca ao próprio condrócito (Poole *et al.*, 1988; Häuselmann *et al.*, 1994a). O condrónio parece desempenhar um papel fundamental na percepção e resposta dos condrócitos a sinais extracelulares, mecânicos e químicos, que regulam a actividade biossintética e catabólica do condrócito, modulando qualitativa e quantitativamente, os processos de síntese e degradação dos componentes da matriz e, conseqüentemente, a homeostasia da cartilagem (Buschmann *et al.*, 1995; Poole *et al.*, 1988).

1.2.3.1. Regulação do metabolismo do condrócito

A manutenção da homeostasia da cartilagem envolve a regulação da proliferação e funções secretoras do condrócito, para a qual concorrem vários tipos de sinais extracelulares. As respostas do condrócito a esses factores reguladores dependem do seu estado funcional que, por sua vez, é determinado pelo grau de diferenciação e maturação celular (Blanco *et al.*, 1995a; de Haart *et al.*, 1999; Guerne *et al.*, 1994; Lemare *et al.*, 1998), e da fase do ciclo celular em que a célula se encontra no momento de actuação do estímulo (Vivien *et al.*, 1993). A zona da cartilagem onde se localiza o condrócito (Häuselmann *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1996; Nguyen *et al.*, 1992), bem como as características físico-químicas da matriz cartilaginosa, designadamente a composição iónica, a pressão osmótica e o pH (Urban *et al.*, 1993; Wilkins e Hall, 1995), também influenciam o metabolismo do condrócito, modulando as suas respostas a diferentes estímulos. Por outro lado, a existência de um processo patológico, seja uma artrite inflamatória ou a osteoartrite (Franchimont e Bassleer, 1991), e a idade do indivíduo (Franchimont e Bassleer, 1991; Guerne *et al.*, 1995) também condicionam a capacidade de resposta do condrócito a um determinado estímulo. Independentemente destes factores fisiopatológicos, as condições de cultura *in vitro* do condrócito, nomeadamente a concentração de soro no meio de cultura (Flannery *et al.*, 1999a; Vivien

et al., 1991; van Susante *et al.*, 2000) e a densidade celular das culturas (de Haart *et al.*, 1999; Galéra *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 2001, Lemare *et al.*, 1998), também condicionam as respostas destas células a um dado estímulo.

Dependendo do tipo de estímulo extracelular, o condrócito pode ser induzido a desenvolver, preferencialmente, um programa funcional catabólico que leva à degradação da matriz ou um programa anabólico que promove a sua síntese. O programa catabólico caracteriza-se pela síntese e segregação de MMPs, mediadores inflamatórios e citocinas catabólicas e pela supressão da síntese dos componentes da matriz (Franchimont e Bassleer, 1991; Lotz *et al.*, 1995a), inibição da proliferação (Blanco e Lotz, 1995) e, provavelmente, indução da morte do condrócito por apoptose (Blanco *et al.*, 1995b). O programa anabólico, por seu turno, está associado à síntese e segregação de inibidores das MMPs e de citocinas anti-catabólicas, à produção dos componentes da matriz e à proliferação do condrócito (Franchimont e Bassleer, 1991; Lotz *et al.*, 1995a).

Os factores extracelulares que modulam a proliferação e a actividade biossintética e catabólica do condrócito, podem agrupar-se em três categorias principais: *sinais mecânicos* resultantes das forças que actuam sobre a cartilagem articular; *sinais químicos* resultantes da interacção do próprio condrócito com *componentes da matriz*; e *sinais químicos* gerados por *mediadores intercelulares* que actuam no condrócito de forma endócrina, parácrina ou mesmo autócrina (Hering *et al.*, 1999). A actuação simultânea ou sequencial de diferentes estímulos no condrócito pode levar à adição ou potenciação dos seus efeitos ou, pelo contrário, à sua inibição ou antagonismo. Assim, o normal funcionamento da cartilagem implica a existência de um equilíbrio dinâmico entre todos esses factores, uns que favorecem mais os processos anabólicos, outros que estimulam a actividade catabólica necessária para a renovação da cartilagem. Qualquer perturbação desse equilíbrio pode levar a alterações qualitativas e quantitativas dos genes normalmente expressos pelo condrócito, com a consequente modificação da composição e/ou estrutura da matriz cartilaginosa, levando, assim, ao desenvolvimento do processo artrítico (Franchimont e Bassleer, 1991; Hering, 1999; Lotz *et al.*, 1995a).

1.2.3.1.1. Sinais mecânicos

A percepção dos sinais mecânicos resultantes das forças exercidas sobre a cartilagem e a resposta adequada a esses estímulos são fundamentais para a manutenção da integridade estrutural e funcional da matriz cartilaginosa. Diversos estudos mostraram que a incorporação de sulfato (que é uma medida da actividade sintética e, particularmente, da produção de glicosaminoglicanos pelos condrócitos) aumenta quando a cartilagem é sujeita a forças dinâmicas, dependendo a intensidade dessa estimulação da frequência, intensidade e duração das forças compressivas exercidas (Hall *et al.*, 1991; Parkkinen *et al.*, 1992; Sah *et al.*, 1989). Pelo contrário, a compressão estática, contínua produz o efeito oposto (Gray *et al.*, 1988). Por outro lado, um estudo mais recente indica que a aplicação cíclica de forças de tensão de alta intensidade e frequência, a culturas de condrócitos articulares de coelho e a uma linha celular de condrócitos imortalizados, induz a síntese de uma citocina pró-inflamatória e de MMPs, ao mesmo tempo que reduz a síntese de proteoglicanos, sugerindo que a estimulação mecânica excessiva induz a produção de factores catabólicos que podem levar à degradação da cartilagem (Fujisawa *et al.*, 1999).

O processo através do qual o condrócito detecta a estimulação mecânica e lhe responde alterando o seu estado metabólico, nomeadamente modulando os processos de síntese e degradação da matriz, designa-se por *mecanotransdução* (Gray *et al.*, 1988; Sah *et al.*, 1989). Se bem que ainda mal compreendido, este processo parece iniciar-se com alterações do meio extracelular que desencadeiam modificações da membrana plasmática, às quais se sucede a abertura de canais iónicos e a activação de cascatas de sinalização intracelular que resultam em alterações da expressão de determinados genes, conduzindo ao aumento da expressão do colagénio II (Holmvall *et al.*, 1995) e do agrecano (Holmvall *et al.*, 1995; Millward-Sadler *et al.*, 2000) e à diminuição da expressão de MMPs (Millward-Sadler *et al.*, 2000), ou, pelo contrário, levando à síntese de factores catabólicos (Fujisawa *et al.*, 1999).

Os primeiros acontecimentos envolvidos no processo de mecanotransdução parecem incluir a distorção mecânica da membrana plasmática e do núcleo do condrócito (Guilak *et al.*, 1999), efeitos físico-químicos resultantes de alterações das pressões hidrostática e osmótica, da composição iónica e do pH da matriz pericelular (Mobasheri *et*

al., 1998; Mow *et al.*, 1999) e a geração de correntes eléctricas (Lai *et al.*, 2000; Mow *et al.*, 1999). Pensa-se que estas alterações iniciais dão lugar à abertura de canais iónicos sensíveis à distensão mecânica, nomeadamente de canais que medeiam o influxo de Na^+ (Trujillo *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 1992; 1996) que, por sua vez, provoca a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem (Guilak *et al.*, 1999, Vittur *et al.*, 1994). O influxo de Ca^{2+} resultante leva à activação de canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} , o que tem como consequência a hiperpolarização da membrana do condrócito (Lee *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 1996) (Figura 1.4).

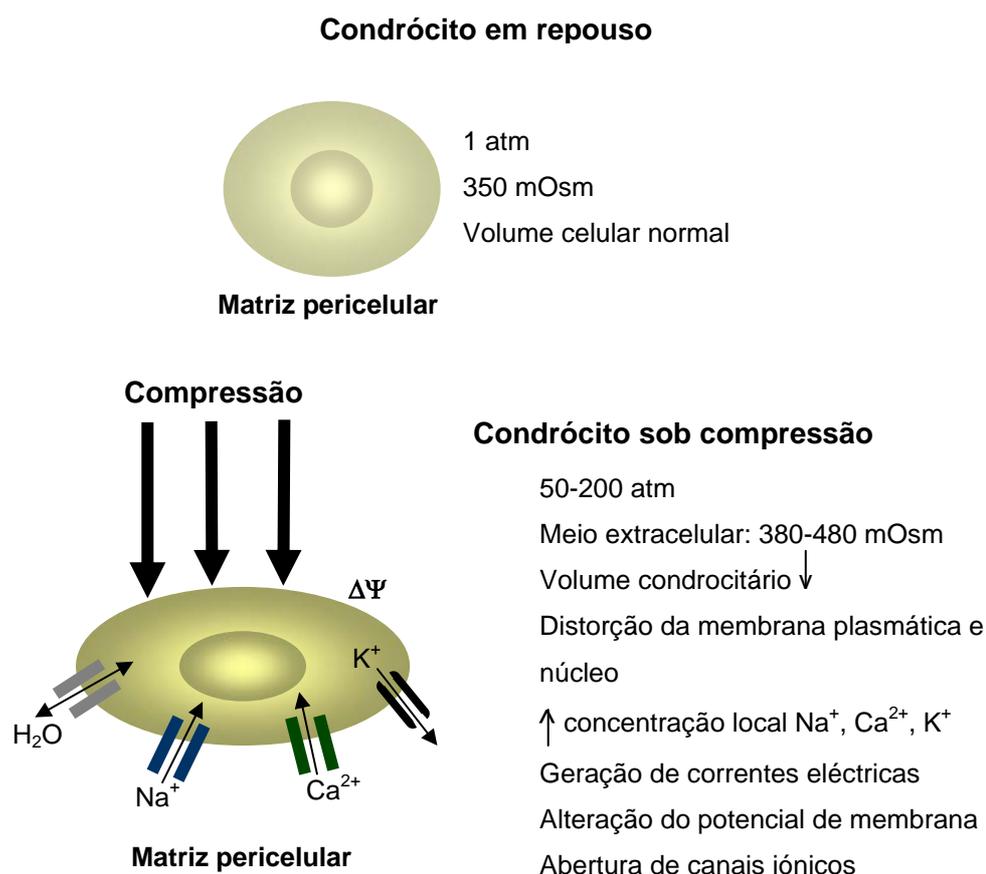


Figura 1.4. Representação esquemática das alterações iniciais que ocorrem no condrócito em resposta a estímulos mecânicos. A compressão da cartilagem provoca deformações das membranas plasmática e nuclear, o aumento da $[\text{Na}^+]$, $[\text{Ca}^{2+}]$ e $[\text{K}^+]$, com o consequente aumento da pressão osmótica extracelular, geração de correntes eléctricas, alteração do potencial de membrana e abertura de canais iónicos. $\Delta\Psi$ representa a alteração do potencial de membrana do condrócito. Adaptado de Mobasher *et al.*, 2002a.

O aumento da concentração intracelular de cálcio que ocorre em consequência do processo de mecanotransdução, pode, por si só, desencadear a activação de cascatas de sinalização intracelulares que levam à activação ou inibição da expressão de genes específicos. Em última análise, é o conjunto de genes expressos em cada momento que determina a composição da matriz e as características fenotípicas, crescimento e sobrevivência do condrócito (Mobasher *et al.*, 2002a).

O processo de mecanotransdução parece estar, também, intimamente ligado às interacções que o condrócito estabelece com a matriz, particularmente por intermédio das integrinas. A integrina $\alpha_5\beta_1$, concretamente, tem sido implicada no processo de mecanotransdução, havendo evidências de que a sua activação por estímulos mecânicos desencadeia cascatas de sinalização intracelulares que envolvem a activação de canais iónicos sensíveis à distensão, de proteínas associadas ao citoesqueleto e de vias de transdução que incluem a fosfolipase C, a calmodulina, a “cinase C de proteínas” (“Protein Kinase C”, PKC) e “cinases de resíduos de tirosina” (“Protein Tyrosine Kinases”, PTK) que fosforilam diversas proteínas reguladoras, nomeadamente a “cinase das adesões focais” (“focal adhesion kinase”, FAK) (Wright *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2000).

A compressão mecânica cíclica parece ser o estímulo mecânico que mais eficazmente induz a actividade anabólica do condrócito, havendo evidências de que a hiperpolarização característica da resposta à estimulação mecânica, envolve as integrinas e depende da segregação de uma citocina condroprotectora, a interleucina-4, que actua de forma autócrina no condrócito (Millward-Sadler *et al.*, 1999).

1.2.3.1.2. Componentes da matriz

O condrócito interage com as proteínas da sua matriz pericelular, por meio de receptores expressos à sua superfície. Através de mecanismos complexos de sinalização intracelular, essas interacções permitem transpor a informação estrutural da matriz para o interior da célula, adaptando, assim, o metabolismo do condrócito às condições do meio envolvente (Hering, 1999).

As integrinas são as principais moléculas de adesão envolvidas na interacção entre o condrócito e a matriz pericelular (Woods *et al.*, 1994), desempenhando um papel importante na detecção e transdução de sinais do exterior para o interior da célula que

resultam em alterações da expressão de genes específicos (Arner e Tortorella, 1995; Attur *et al.*, 2000; Clancy *et al.*, 1997; Forsyth *et al.*, 2002; Shakibaei *et al.*, 1999) e da capacidade de sobrevivência e proliferação do condrócito (Enomoto-Iwamoto *et al.*, 1997; Hirsch *et al.*, 1997; Pulai *et al.*, 2002; Shakibaei *et al.*, 1999, 2001). Há também evidências que indicam que as interações entre os condrócitos e a matriz, mediadas por integrinas, estão alteradas na osteoartrite, o que pode constituir um mecanismo fisiopatológico importante (Lapadula *et al.*, 1998).

Por outro lado, as integrinas estão também sujeitas a processos de regulação intracelulares que são gerados em resposta à activação de receptores membranares para hormonas, factores de crescimento e citocinas (Calderwood *et al.*, 2000). Esses sinais podem, por um lado, alterar a expressão celular das integrinas (Arner e Tortorella, 1995; Jobanputra *et al.*, 1996; Loeser, 1997) e, por outro, activá-las, tornando os seus domínios extracelulares adesivos, quer por induzirem alterações conformacionais que aumentam a sua afinidade para diferentes substratos, quer por promoverem a sua agregação em multímeros (Danen *et al.*, 1995; Kinashi *et al.*, 2000). A actividade das integrinas pode também ser regulada por processos que modificam as proteínas do citoesqueleto, levando a alterações da actividade e/ou da localização subcelular de enzimas e substratos que integram vias de sinalização intracelulares que, simultaneamente, também dependem dessas mesmas integrinas (Calderwood *et al.*, 2000). Estas várias formas de modulação da actividade das integrinas podem operar de forma complementar, regulando a afinidade para diferentes substratos e os processos activados subsequentemente a essa ligação (Hato *et al.*, 1998).

A adesão do condrócito ou de outras células a proteínas da matriz extracelular, por intermédio das integrinas, resulta na formação de agregados destes receptores, a cujos domínios citoplasmáticos se unem diversas proteínas estruturais e de sinalização formando complexos multimoleculares designados por “adesões focais” (Hocking *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1997). Estes complexos são estruturas adesivas especializadas que constituem a ligação estrutural entre a matriz extracelular e o citoesqueleto, funcionando também como locais especializados para a transdução de sinais extracelulares (Burrige *et al.*, 1988; Turner e Burrige, 1991). Além dos domínios citoplasmáticos das integrinas, as adesões focais contêm proteínas que medeiam a ligação desses receptores ao citoesqueleto, nomeadamente a talina, a

α -actinina, a β -actina e a vinculina (Luo *et al.*, 1997; Miyamoto *et al.*, 1995; Shakibaei *et al.*, 1999), bem como proteínas com funções de sinalização intracelular, nomeadamente a proteína adaptadora paxilina (Hildebrand *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 1990) e PTK, como a FAK (Clancy *et al.*, 1997; Schaller *et al.*, 1995; Schlaepfer e Hunter, 1996; Shakibaei *et al.*, 1999). A activação de PTK, designadamente da FAK, é um acontecimento fulcral quer na formação e organização das adesões focais, quer na propagação dos sinais desencadeados por activação das integrinas (Burrige *et al.*, 1988; Parsons, 1996). Uma vez activada por fosforilação em resíduos de tirosina (Burrige *et al.*, 1992), a FAK desempenha um papel crucial no recrutamento de moléculas estruturais e com funções de sinalização para as adesões focais (Chen *et al.*, 1995a; Hildebrand *et al.*, 1995; Schlaepfer *et al.*, 1994). Entre essas, destacam-se as proteínas da família Src (o correspondente em células de mamíferos, a uma proteína primeiramente identificada no vírus do sarcoma de Rous) que, por sua vez, recrutam outras proteínas adaptadoras para as adesões focais, como o complexo Grb2/SOS (“growth factor receptor-bound protein 2”/“Son of Sevenless”) que é necessário para a activação da proteína Ras, uma pequena proteína G (“guanine nucleotide-binding protein”) (Schlaepfer *et al.*, 1994; Schlaepfer e Hunter, 1996; Miyamoto *et al.*, 1995). A Ras é uma importante proteína reguladora que, na forma ligada a GTP, activa várias outras proteínas G, como as da família Raf e as da família Rho. Estas, por seu turno, activam diversas cascatas de sinalização intracelular, nomeadamente, os três membros principais da família das “cinases de proteínas activadas por mitogénios” (“mitogen-activated protein kinases”, MAPK) que levam à activação de vários factores de transcrição, regulando assim a expressão genética (Franklin *et al.*, 1994, Minden *et al.*, 1995; Pawson, 1995). Em diversos tipos de células, incluindo condrócitos articulares, todas estas proteínas e vias de sinalização intracelulares foram observadas em resposta à activação de várias integrinas e à adesão das células a diferentes substratos (Clancy *et al.*, 1997; del Pozo *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 1995; Shakibaei *et al.*, 1999, 2001).

Por outro lado, a formação de adesões focais em resposta à ligação das integrinas aos seus substratos, parece desempenhar um papel fundamental na modulação das respostas dos condrócitos a mediadores intercelulares como citocinas e factores de crescimento. Diversos estudos mostraram que as interacções do condrócito com componentes da matriz, nomeadamente com a fibronectina e com o colagénio II, e a

formação subsequente de adesões focais são imprescindíveis para ocorrerem as respostas a factores de crescimento que promovem a síntese de proteoglicanos e a sobrevivência celular (Clancy *et al.*, 1997; Shakibaei *et al.*, 1999), mas também para que citocinas como a IL-1 desencadeiem as respostas pró-inflamatórias e catabólicas características (Luo *et al.*, 1997).

Em oposição a estes estudos, foi recentemente verificado em condrócitos bovinos, que a activação do complexo $\alpha_v\beta_3$ modula negativamente a produção de mediadores inflamatórios, induzida quer por activação da integrina $\alpha_5\beta_1$, quer por citocinas pró-inflamatórias (Attur *et al.*, 2000). Assim, a cooperação entre integrinas e outros receptores poderá traduzir-se tanto em efeitos sinérgicos como antagónicos, dependendo das integrinas envolvidas. Além disso, as diferentes integrinas parecem modular-se reciprocamente, de tal modo que as interações estabelecidas determinam as respostas que podem ser geradas pelo condrócito em cada momento.

Os condrócitos também são capazes de reconhecer e responder a fragmentos peptídicos resultantes da degradação de componentes da matriz. Os fragmentos resultantes da degradação da fibronectina têm especial importância, pois foram encontrados em concentrações elevadas nas articulações e líquido sinovial de doentes com diversas formas de artrite, nomeadamente com artrite reumatóide e osteoartrite (Jones *et al.*, 1987; Vartio *et al.*, 1981; Xie *et al.*, 1992).

Diversos estudos mostraram que os fragmentos de fibronectina, ao contrário da proteína intacta, induzem a degradação dos proteoglicanos em culturas de cartilagem (Homandberg *et al.*, 1992), bem como a expressão e actividade de várias MMPs, incluindo colagenases e estromelinas, quer em culturas de condrócitos humanos (Forsyth *et al.*, 2002), quer de coelho (Arner e Tortorella, 1995). A resposta do condrócito aos fragmentos de fibronectina parece depender do tempo de exposição a esses fragmentos, pois a exposição contínua e prolongada aumenta a síntese e segregação de mediadores catabólicos e de estromelina-1, levando à depleção dos proteoglicanos da matriz, enquanto a exposição curta induz, após remoção dos fragmentos de fibronectina, uma resposta compensatória com aumento da síntese e deposição de proteoglicanos (Homandberg e Wen, 1998).

As diferenças entre as respostas induzidas no condrócito pela fibronectina intacta e pelos seus vários fragmentos parecem estar relacionadas com o facto de

regiões distintas da molécula de fibronectina desempenharem funções diversas no reconhecimento celular e nos mecanismos de transdução do sinal (Homandberg *et al.*, 1986, 1989; Hocking *et al.*, 1998). De acordo com esta interpretação, foi recentemente demonstrado, em culturas de condrócitos humanos, que as MAPK podem ser activadas tanto em resposta a fragmentos de fibronectina que contêm a sequência específica de ligação às integrinas (Forsyth *et al.*, 2002), como em resposta a fragmentos que não contêm essa sequência (Gemba *et al.*, 2002). Isto sugere que as respostas aos diversos fragmentos de fibronectina podem ser mediadas por integrinas distintas ou envolver receptores independentes das integrinas (Gemba *et al.*, 2002).

Outros estudos sugerem que as respostas aos diferentes fragmentos de fibronectina podem dever-se, sobretudo, à ruptura da ligação dos condrócitos à sua matriz que ocorre como resultado da competição entre a fibronectina nativa, produzida pelos próprios condrócitos, e os fragmentos monoméricos adicionados às culturas celulares (Forsyth *et al.*, 2002).

Foi também observado que o tratamento de culturas de condrócitos com colagenase (Hering *et al.*, 1994), mas não com proteoglicanases (Lee *et al.*, 1994), induz a síntese de proteoglicanos (Hering *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994), o que, tal como sugerido para a fibronectina, pode ser consequência da ruptura da adesão ao colagénio da matriz e/ou depender de sinais veiculados pelos fragmentos resultantes da sua degradação. A importância da interacção do condrócito com o colagénio é reforçada por um outro estudo em que a adição de colagénio II à cultura de condrócitos articulares potenciou significativamente a síntese de proteoglicanos, nomeadamente do agregano, induzida por factores de crescimento (Qi e Scully, 1998). Posteriormente, foi demonstrado que esses efeitos moduladores do colagénio II ocorrem por intermédio da integrina $\beta 1$ (Lee *et al.*, 2002).

Em conjunto, estes estudos sugerem que a regulação do metabolismo condrocitário pode depender tanto da ruptura da ligação a componentes específicos da matriz, como da activação directa de integrinas específicas e/ou de outros receptores de adesão, quer pelos componentes nativos da matriz, como a fibronectina e o colagénio II, quer pelos fragmentos resultantes da sua degradação. Os mecanismos que determinam as respostas resultantes da activação desses receptores por ligandos diferentes e as interacções entre os vários tipos de receptores são ainda largamente desconhecidos,

mas é cada vez mais evidente que as interações entre o condrócito e as moléculas presentes na matriz modulam o seu metabolismo e determinam o tipo de respostas que a célula pode gerar em cada momento. Por outro lado, a matriz cartilaginosa não é inerte, nem estática. Encontra-se em equilíbrio com o líquido sinovial e, embora o condrócito seja o principal responsável pela sua manutenção, outras células, nomeadamente os sinoviócitos, podem influenciar a composição da cartilagem, particularmente através da produção de MMPs (Boyle *et al.*, 1997; Chin *et al.*, 1985; MacNaul *et al.*, 1990; Okada *et al.*, 1992) e de citocinas catabólicas (Sakurada *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1986; Webb *et al.*, 1998). Deste modo, os sinoviócitos podem modular a interação da matriz com os condrócitos, o que, em última análise, determina as propriedades biomecânicas da cartilagem articular.

1.2.3.1.3. Mediadores intercelulares

Um grande número de mediadores intercelulares, incluindo citocinas, factores de crescimento, hormonas e vitaminas, regula o metabolismo do condrócito e, conseqüentemente, a estrutura e composição da matriz cartilaginosa (Hering, 1999). Estes mediadores podem chegar à cartilagem por difusão, a partir da corrente sanguínea para o líquido sinovial, ou a partir do osso subcondral. Podem também ser produzidos localmente nos tecidos articulares, quer pelos próprios condrócitos, quer pelos sinoviócitos e macrófagos da íntima sinovial e ainda por diversos tipos de leucócitos que se infiltram na membrana sinovial, especialmente no decurso das artrites inflamatórias (Falta e Kotzin, 1998; Guerne *et al.*, 1994).

A resposta do condrócito articular a cada um desses mediadores pode ser modificada por diversos factores que determinam o seu estado funcional (como o seu grau de diferenciação e maturação, o local da cartilagem onde se situa e as características físico-químicas da matriz cartilaginosa) e que regulam o seu metabolismo (nomeadamente os estímulos mecânicos e a interação com componentes da matriz). Além disto, a modulação do metabolismo do condrócito por mediadores intercelulares, presentes em simultâneo ou *à priori* no meio extracelular, pode condicionar a resposta celular a um dado mediador. Essas interações entre mediadores distintos podem traduzir-se na potenciação aditiva ou sinérgica dos efeitos induzidos por cada estímulo (Caterall *et al.*, 2001; Chevalier e Tyler, 1996; Chopra e Anastassiades, 1998; Webb *et*

al., 1998), mas também podem resultar em antagonismo (Chevalier e Tyler, 1996; Lum *et al.*, 1996; Olee *et al.*, 1999; Pulsatelli *et al.*, 1999).

Uma característica comum a todos os estímulos que modulam o metabolismo do condrócito, é a capacidade de desencadear a produção de outros factores reguladores que, ao serem segregados, vão actuar no condrócito por processos autócrinos de retroalimentação positiva ou negativa, isto é, reforçando ou antagonizando o programa funcional anabólico ou catabólico induzido pelo estímulo inicial (Lotz *et al.*, 1995a). Além disso, muitas citocinas e factores de crescimento alteram a expressão dos receptores de outros factores reguladores, modificando conseqüentemente, a capacidade de resposta do condrócito a esses estímulos (Pronost *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1998).

a) Factores Anabólicos

A estimulação da proliferação celular e da síntese dos componentes da matriz específicos da cartilagem articular, particularmente do colagénio II e dos proteoglicanos, têm sido os critérios mais usados e estudados para classificar um dado estímulo como anabólico em relação aos condrócitos articulares. O “factor de crescimento transformante”- β (“Transforming Growth Factor”- β , TGF- β) (Lotz *et al.*, 1995a) e o “factor de crescimento semelhante à insulina”-1 (“Insulin-like Growth Factor”-1, IGF-1 (Franchimont e Bassleer, 1991) são considerados os principais factores anabólicos em condrócitos articulares. Estas células não são apenas sensíveis às acções destes factores, são igualmente capazes de os sintetizar (Tsukazaki *et al.*, 1994; Villiger e Lotz, 1992).

O TGF- β e o IGF-1, actuando nos condrócitos articulares de forma autócrina ou parácrina, induzem a síntese de proteoglicanos e de colagénio II (Franchimont e Bassleer, 1991; Lum *et al.*, 1996; Miyazaki *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 1988; van Susante *et al.*, 2000). Além disto, promovem a síntese de um proteoglicano designado por “proteína da zona superficial” (“Superficial Zone Protein”), cuja expressão ocorre especificamente em condrócitos localizados à superfície da cartilagem articular e nalgumas células da íntima sinovial (Flannery *et al.*, 1999b). A estrutura deste proteoglicano sugere que pode ter propriedades lubrificantes e citoprotectoras, impedindo a adesão de células sinoviais aos condrócitos articulares, de modo que alterações da sua síntese e estrutura, em

situações patológicas, poderão facilitar a adesão e invasão da cartilagem pelos sinoviócitos (Flannery *et al.*, 1999b).

Outra acção do TGF- β , especialmente relevante do ponto de vista fisiopatológico, é a sua capacidade para estimular os condrócitos a sintetizarem TIMP-1 (Gunther *et al.*, 1994; Lum *et al.*, 1996) e TIMP-3 (Li e Zafarullah, 1998).

A síntese dos componentes da matriz específicos da cartilagem articular, isto é, do colagénio II e dos proteoglicanos, é também induzida por outros mediadores intercelulares, entre os quais se destacam as “proteínas morfogenéticas ósseas”-2 e -7 (“Bone Morphogenetic Protein”-2 e -7, BMP-2 e -7) que integram a família do TGF- β (Flechtenmacher *et al.*, 1996; van Beuningen *et al.*, 1998), o “factor de crescimento derivado das plaquetas” (“Platelet Derived Growth Factor”, PDGF) (Chopra e Anastassiades, 1998), a hormona de crescimento, quer directamente, quer por induzir a síntese de IGF-1 (Franchimont e Bassleer, 1991; Tsukazaki *et al.*, 1994), a calcitonina, os androgénios (Franchimont e Bassleer, 1991) e a histamina (Sohen *et al.*, 2001).

Numerosos estudos mostraram que o TGF- β e o IGF-1 são potentes indutores da proliferação de condrócitos articulares de várias espécies (Boumediene *et al.*, 1995; Franchimont e Bassleer, 1991; Guerne *et al.*, 1994, 1995; Miyazaki *et al.*, 2000; Osaki *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 1988). No entanto, as condições de cultura *in vitro* dos condrócitos, particularmente a concentração de soro no meio de cultura, poderão influenciar a capacidade dos dois factores para induzirem esta resposta. De facto, nenhum dos dois factores foi capaz de aumentar a síntese de ADN em condrócitos cultivados na ausência de soro (van Susante *et al.*, 2000, Vivien *et al.*, 1991; Guerne *et al.*, 1994; 1995).

Alguns estudos divergem quanto à potência relativa das três isoformas do TGF- β na indução da síntese de ADN pelos condrócitos e também quanto ao tempo necessário para cada uma dessas isoformas induzir um aumento significativo do conteúdo celular em ADN. Essas discrepâncias podem, por um lado, dever-se a diferenças nas condições de cultura, nomeadamente quanto ao número inicial de células e ao tempo de incubação antes e após a adição do estímulo. Por outro, aquelas diferenças podem igualmente resultar da utilização de condrócitos de espécies diferentes, designadamente condrócitos de coelho (Boumediene *et al.*, 1995) e condrócitos humanos (Guerne *et al.*, 1994).

Mesmo em condrócitos humanos, diversos factores, como a idade do dador e a presença ou ausência de lesões artríticas na cartilagem a partir da qual foram isolados os condrócitos, podem modificar a resposta destas células *in vitro*. Por exemplo, em culturas de condrócitos de dadores adultos, as três isoformas do TGF- β induziram aumentos semelhantes da proliferação celular, tendo sido mais potentes que o IGF-1, o “factor de crescimento dos fibroblastos” (“Fibroblast Growth Factor”, FGF) e o PDGF, ao passo que, em condrócitos de dadores jovens, este último foi o factor mais potente (Guerne *et al.*, 1995). Além destes, outros factores, como a hormona de crescimento (Tsukazaki *et al.*, 1994; Franchimont e Bassleer, 1991), a calcitonina, os androgénios, testosterona e nandrolona (Franchimont e Bassleer, 1991), e o “factor de crescimento epidermal” (“Epidermal Growth Factor”, EGF) (Jakob *et al.*, 2001; Ribault *et al.*, 1997), induzem eficazmente a proliferação dos condrócitos de várias espécies.

A proliferação dos condrócitos articulares, *in vitro*, leva à perda das suas características específicas, um processo designado por “desdiferenciação” em que o condrócito deixa de sintetizar colagénio II e agrecano, substituindo-os pelos colagénios I e III e por versicano (um proteoglicano que não é específico da cartilagem articular), e altera a sua morfologia que se torna mais semelhante à dos fibroblastos, apresentando numerosos prolongamentos citoplasmáticos, em vez da forma esférica característica (de Haart *et al.*, 1999; Galéra *et al.*, 1992; Jakob *et al.*, 2001, Lemare *et al.*, 1998). Este processo de desdiferenciação *in vitro* pode ser impedido e as características fenotípicas específicas do condrócito articular conservadas, se estas células forem mantidas em condições não proliferativas, isto é, em cultura primária, em monocamada confluenta, ou em cultura tridimensional, por inclusão das células num gel de agarose, colagénio ou alginato (Adolphe e Benoit, 1994; Galéra *et al.*, 1992).

A manutenção do fenótipo diferenciado é um objectivo fundamental no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as doenças artríticas, baseadas no transplante de condrócitos modificados *in vitro* para substituição da cartilagem lesada (Weisser *et al.*, 2001). Por isso, o estudo de métodos de modulação do metabolismo do condrócito, nomeadamente utilizando vários factores de crescimento, isoladamente ou em combinação, que possam promover a formação de cartilagem funcionalmente eficaz *in vivo*, é uma área de investigação em crescente desenvolvimento (de Haart *et al.*, 1999; Fortier *et al.*, 1997; Weisser *et al.*, 2001).

A possibilidade de utilização terapêutica de factores considerados anabólicos, para promoverem a regeneração da cartilagem nas doenças artríticas, é questionada pelo facto desses mesmos factores também poderem exercer efeitos catabólicos. O TGF- β , concretamente, promove a calcificação da matriz cartilaginosa e a formação de condro-osteófitos, podendo, assim, contribuir para o desenvolvimento de osteoartrite (van Beuningen *et al.*, 1998; van den Berg, 1995). Este factor de crescimento também induz a síntese e actividade de enzimas que promovem a deposição extracelular de pirofosfato inorgânico (Lotz *et al.*, 1995b; Rosenthal e Henry, 1996) que, ao precipitar sob a forma de pirofosfato de cálcio dihidratado, desencadeia a doença artrítica (Pritzker *et al.*, 1988). O EGF, por seu lado, promove o efluxo de protões a partir do condrócito (Lui *et al.*, 2002), o que, diminuindo o pH extracelular, pode inibir a síntese dos componentes da matriz (Wilkins e Hall, 1995), favorecendo, assim, o aparecimento de lesões artríticas. Mais ainda, o TGF- β_1 , o IGF-1, o FGF e o PDGF são capazes de induzir a síntese de colagenase-1 (MMP-1) e de colagenase-3 (MMP-13), em culturas de condrócitos provenientes de cartilagem osteoartrítica, enquanto o TGF- β_2 só induz a síntese de colagenase-1 (Tardif *et al.*, 1999; 2001). Alguns estudos em sinoviócitos também indicam que o TGF- β pode exercer acções nestas células que promovem e contribuem para a degradação da cartilagem (Cheon *et al.*, 2002; Yamanishi *et al.*, 2002).

b) Factores Catabólicos

A IL-1 e o TNF- α são potentes citocinas pró-inflamatórias que induzem o programa funcional catabólico no condrócito articular e desempenham papéis importantes na génese e progressão das doenças artríticas (Feldmann *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 2002; Lotz *et al.*, 1995a). No líquido sinovial e no plasma de doentes com diversas patologias artríticas, incluindo a artrite reumatóide e a osteoartrite (Farahat *et al.*, 1993; Loyau e Pujol, 1990; Westacott *et al.*, 1990), encontram-se concentrações elevadas destas citocinas que são produzidas pelos sinoviócitos e macrófagos da membrana sinovial (He *et al.*, 2002; Tucci *et al.*, 2002) e pelos condrócitos articulares (Attur *et al.*, 2000; Henrotin *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1998). Estudos imunohistológicos mostraram que ambas as citocinas são expressas de forma mais intensa na cartilagem articular osteoartrítica, do que na cartilagem normal (Moos *et al.*, 1999; Towle *et al.*, 1997).

As duas principais citocinas catabólicas, a IL-1 e o TNF- α , actuam no condrócito de forma autócrina e/ou parácrina, desencadeando uma multiplicidade de respostas que contribuem para as duas principais características fisiopatológicas das doenças artríticas: a degradação da cartilagem e a inflamação. A degradação da cartilagem resultante da acção destas citocinas foi observada tanto em estudos *in vivo* (O'Byrne *et al.*, 1990; Pettipher *et al.*, 1986), como *in vitro* (Arner e Pratta, 1989) e resulta da indução da síntese de MMPs pelos condrócitos articulares e também pelos sinoviócitos (Conquer *et al.*, 1992; Han *et al.*, 2001a; MacNaul *et al.*, 1990; Morin *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 1992). Ao mesmo tempo, ocorre a inibição da síntese dos componentes da matriz, nomeadamente dos proteoglicanos (Häuselmann *et al.*, 1994b; Taskiran *et al.*, 1994) e dos colagénios II, IX e XI que são substituídos pelos colagénios I e III (Goldring *et al.*, 1988, 1994; Reginato *et al.*, 1993). Estes últimos tipos de colagénio não possuem as propriedades biomecânicas essenciais à manutenção da integridade funcional da matriz cartilaginosa, pelo que a sua síntese não compensa, funcionalmente, a perda dos colagénios específicos da cartilagem articular. Assim, as zonas da cartilagem lesadas por acção das MMPs e de outras enzimas proteolíticas, não podem ser reparadas e a erosão da cartilagem vai progredindo. Além disto, a IL-1 e o TNF- α impedem a síntese de TIMPs e dos inibidores do sistema plasminogénio/plasmina, permitindo, assim, a acção das MMPs e facilitando a activação das proenzimas recém-sintetizadas (Campbell *et al.*, 1991a; Lum *et al.*, 1996; MacNaul *et al.*, 1990; Sadowski e Steinmeyer, 2002).

A resposta inflamatória induzida por estas citocinas é complexa e envolve quer os condrócitos articulares, quer as células da membrana sinovial, que sob a sua influência sintetizam e segregam diversos mediadores inflamatórios, entre os quais se destacam os derivados do ácido araquidónico, especialmente a prostaglandina E2 (Berenbaum *et al.*, 1996; Blanco e Lotz, 1995; Conquer *et al.*, 1992; Henrotin *et al.*, 1998; Tawara *et al.*, 1991), e o monóxido de azoto (geralmente designado por “óxido nítrico”, NO) (Grabowski *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1993; Stadler *et al.*, 1991).

A IL-1 e o TNF- α também estimulam a sua própria síntese e a de outras citocinas, pelos condrócitos articulares e sinoviócitos (Henrotin *et al.*, 1996; Tucci *et al.*, 2002). Algumas dessas citocinas são dotadas de acções pró-inflamatórias e catabólicas, como a interleucina-6 (IL-6) (Guerne *et al.*, 1990; Henrotin *et al.*, 1996), a interleucina-18 (IL-18) (Olee *et al.*, 1999) e o “factor inibitório da leucemia” (“leukemia inhibitory factor”,

LIF) (Henrotin *et al.*, 1996), enquanto outras, com acção predominantemente quimiotáctica, contribuem sobretudo para o recrutamento de leucócitos para o espaço articular. Entre estas últimas destacam-se os “factores estimulantes de colónias de granulócitos” (“granulocyte colony stimulating factor”, G-CSF) e de colónias de granulócitos-monócitos” (“granulocyte-monocyte colony stimulating factor”, GM-CSF) (Alsalameh *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1991b) e vários membros da família da IL-8/GRO (“growth-related oncogene”) (Pulsatelli *et al.*, 1999; Recklies e Golds, 1992) e das famílias da “proteína quimiotáctica dos monócitos” (“monocyte chemotactic protein”, MCP) e da “proteína inflamatória de macrófagos” (“macrophage inflammatory protein”, MIP) (Pulsatelli *et al.*, 1999).

Além destas, muitas outras citocinas, produzidas pelos condrócitos articulares e/ou pelas células sinoviais e leucócitos que invadem a membrana sinovial, especialmente no decurso das artrites inflamatórias, actuam nas células articulares, nomeadamente no condrócito, desencadeando respostas que contribuem para o desenvolvimento do processo artrítico. Entre essas, inclui-se a IL-17, uma citocina produzida por linfócitos T activados (Fossiez *et al.*, 1996) que actua nos condrócitos articulares induzindo a expressão de genes associados com a degradação da cartilagem e com a produção de mediadores inflamatórios (Attur *et al.*, 1997; Koshy *et al.*, 2002; Martel-Pelletier *et al.*, 1999; Shalom-Barak *et al.*, 1998).

A oncostatina M, uma citocina da família da IL-6 produzida por macrófagos sinoviais artríticos, encontra-se elevada no plasma e no líquido sinovial de doentes com artrite reumatóide (Cawston *et al.*, 1998) e induz a síntese de MMPs em condrócitos articulares (Cawston *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001a). Além disso, potencia os efeitos catabólicos exercidos pela IL-1 (Rowan *et al.*, 2001) e pela IL-17 (Koshy *et al.*, 2002), sugerindo, portanto, que pode estar envolvida na fisiopatologia da artrite reumatóide e, provavelmente, de outros tipos de artrite.

Embora a IL-6 seja geralmente considerada uma citocina catabólica (Feldmann *et al.*, 1996), o seu papel na regulação do metabolismo do condrócito e, conseqüentemente, na fisiopatologia das artrites, não é claro. Por um lado, a IL-6, isoladamente, parece não exercer efeitos catabólicos na cartilagem (Kandel *et al.*, 1990; van de Loo *et al.*, 1995). No entanto, outros estudos sugerem que a IL-6 pode favorecer os processos catabólicos. Foi observado, por exemplo, que a IL-6 induz a expressão do

receptor do TNF em culturas de condrócitos articulares humanos, o que, tornando estas células mais sensíveis à acção desta última citocina, pode contribuir para a progressão das doenças artríticas (Webb *et al.*, 1998). Noutros estudos, a IL-6 potenciou a produção de colagenases e a degradação do colagénio induzidas pela IL-17 (Koshy *et al.*, 2002) e pela IL-1 (Rowan *et al.*, 2001), mas, neste último caso, esse efeito requeria a presença da forma solúvel do seu receptor (sIL-6R). A necessidade da presença deste receptor é patente noutro estudo em que a associação IL-6/sIL-6R diminuiu a expressão do colagénio II, da proteína central do agregano e da proteína de ligação em culturas de condrócitos articulares (Legendre *et al.*, 2003). Assim, é possível que as discrepâncias observadas quanto aos efeitos catabólicos da IL-6, particularmente em relação à sua capacidade para promover a degradação da cartilagem, estejam relacionadas com a presença ou ausência da forma solúvel do seu receptor nos modelos utilizados para estudar as suas acções.

De qualquer modo, a maioria das citocinas consideradas catabólicas exerce, de facto, uma multiplicidade de acções nos condrócitos articulares que não são exclusivamente catabólicas ou pró-inflamatórias. Assim, estas citocinas estimulam a produção de factores que podem antagonizar, pelo menos, parte dos seus efeitos catabólicos e pró-inflamatórios. Por exemplo, em condrócitos humanos, a IL-1 induz a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, e do “antagonista do receptor da IL-1” (IL-1Ra ou IRAP), um membro da família da IL-1 que funciona como seu antagonista natural, competindo com esta citocina pela ligação ao seu receptor (Henrotin *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou que quer a IL-1 β , quer o TNF- α , tal como o TGF- β que é o protótipo de mediador anabólico, induzem a expressão de uma proteína que potencia a inibição da plasmina e exerce acções anti-inflamatórias *in vivo* (Maier *et al.*, 1996).

O interferon- γ , uma citocina produzida por linfócitos T, também actua no condrócito articular, exercendo simultaneamente efeitos catabólicos e anti-catabólicos. Por exemplo, Henrotin e colaboradores (2000) observaram que o interferon- γ , em culturas de condrócitos articulares humanos, estimula a síntese de IL-6, NO e prostaglandina E₂, ao mesmo tempo que inibe a síntese de IL-10 e de proteoglicanos, efeitos que, conjuntamente, favorecem a inflamação e degradação da cartilagem. Mas simultaneamente, também induz a síntese de IL-1Ra e inibe a produção de estromelina que tendem a contrariar aqueles efeitos inflamatórios e catabólicos. Noutro estudo, foi

demonstrado que o interferon- γ e a IL-1 actuam de forma sinérgica como indutores da síntese de NO, IL-6 e IL-1Ra e como inibidores da produção de proteoglicanos. Estudos mais antigos tinham já demonstrado que o interferon- γ inibe, por um lado, a produção de colagenase induzida pela IL-1 (Andrews *et al.*, 1990) e, por outro, a síntese de colagénio II, levando à sua substituição por colagénio I (Reginato *et al.*, 1993).

A oncostatina M, a par dos efeitos catabólicos, também estimula a produção de TIMPs pelo condrócito (Cawston *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2001a) e a IL-6, cujos efeitos catabólicos são ainda controversos, induz a produção de TIMPs e inibe também a degradação da cartilagem que ocorre espontaneamente *in vitro* e que se pensa ser mediada pela produção autócrina de IL-1 (Shingu *et al.*, 1995). Estudos em murganhos que não produzem IL-6 também indicam que esta citocina pode ter um papel protector em relação à destruição da cartilagem que ocorre nos processos artríticos (van de Loo *et al.*, 1997). Por outro lado, a IL-6 inibe a proliferação de sinoviócitos obtidos de doentes com artrite reumatóide, o que sugere que pode ter um efeito protector em relação à invasão da cartilagem por aquelas células (Nishimoto *et al.*, 2000).

Todas estas observações salientam que, apesar dos enormes progressos registados nas últimas décadas quanto ao papel fisiopatológico das várias citocinas presentes nas articulações artríticas, muito há ainda a esclarecer, quer quanto às acções individuais de cada uma no condrócito e nas outras células articulares, quer quanto às interacções entre citocinas distintas e à modulação recíproca dos seus efeitos.

1.3. INTERACÇÕES ENTRE AS CÉLULAS ARTICULARES:

PAPEL DAS CITOCINAS PRÓ- E ANTI-INFLAMATÓRIAS NAS ARTRITES

As artrites inflamatórias, de que a artrite reumatóide é o paradigma, caracterizam-se pela inflamação crónica e hiperplasia do tecido sinovial, associadas à intensa infiltração de leucócitos sanguíneos, particularmente linfócitos T e B, neutrófilos e monócitos/macrófagos, todos eles mostrando sinais de activação. Ao mesmo tempo, ocorre o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos, potenciando ainda mais a reacção inflamatória. O tecido sinovial inflamado e hiperplástico que se designa por “pannus”,

torna-se invasivo e destrói progressivamente a cartilagem e, eventualmente, o osso subjacente (Choy, 1998; Dinant e Dijkmans, 1999; Feldmann *et al.*, 1996).

As células articulares, incluindo os condrócitos, os sinoviócitos hiperplásticos e os leucócitos infiltrados na articulação, produzem diversas citocinas e factores de crescimento que, actuando de forma autócrina e parácrina, mantêm e modulam as interacções entre todas essas células. Assim, na articulação artrítica existe uma verdadeira rede de citocinas que contribui, senão para a génese, pelo menos, para a perpetuação da resposta inflamatória e catabólica, determinando a progressão da doença artrítica. As relações causa-efeito nestas interacções continuam difíceis de definir e a importância relativa das diferentes células é ainda controversa. Além disso, os mecanismos envolvidos na perpetuação da doença podem ser diferentes e até obscurecer os que a desencadeiam. Duas hipóteses principais, uma que dá primazia ao papel dos linfócitos T activados, a outra às citocinas produzidas pelos monócitos/macrófagos e células articulares, têm sido evocadas para explicar o desenvolvimento da artrite reumatóide e de outras artrites inflamatórias (Choy, 1998; Falta e Kotzin, 1998).

Independentemente da importância relativa das células T e das citocinas pró-inflamatórias na patogénese das artrites inflamatórias, o papel destas últimas na perpetuação da doença está bem estabelecido. Nas articulações artríticas, designadamente na artrite reumatóide, encontra-se sistematicamente o mesmo conjunto de citocinas pró-inflamatórias, produzidas em grande quantidade por monócitos/macrófagos (Dinant e Dijkmans, 1999; Feldmann *et al.*, 1996). Entre essas citocinas destacam-se a IL-1, o TNF- α , o GM-CSF, a IL-6, a IL-8 e vários factores angiogénicos. A produção contínua destas citocinas mantêm e propaga a inflamação, a infiltração de leucócitos, a proliferação dos sinoviócitos e a produção de enzimas proteolíticas, com a consequente invasão e degradação da cartilagem (Choy, 1998; Dinant e Dijkmans, 1999). Na figura 1.5 representa-se esquematicamente uma articulação artrítica, mostrando os principais tipos de células envolvidos na inflamação e degradação da cartilagem e a rede de citocinas implicada na progressão das artrites inflamatórias e, em particular, da artrite reumatóide.

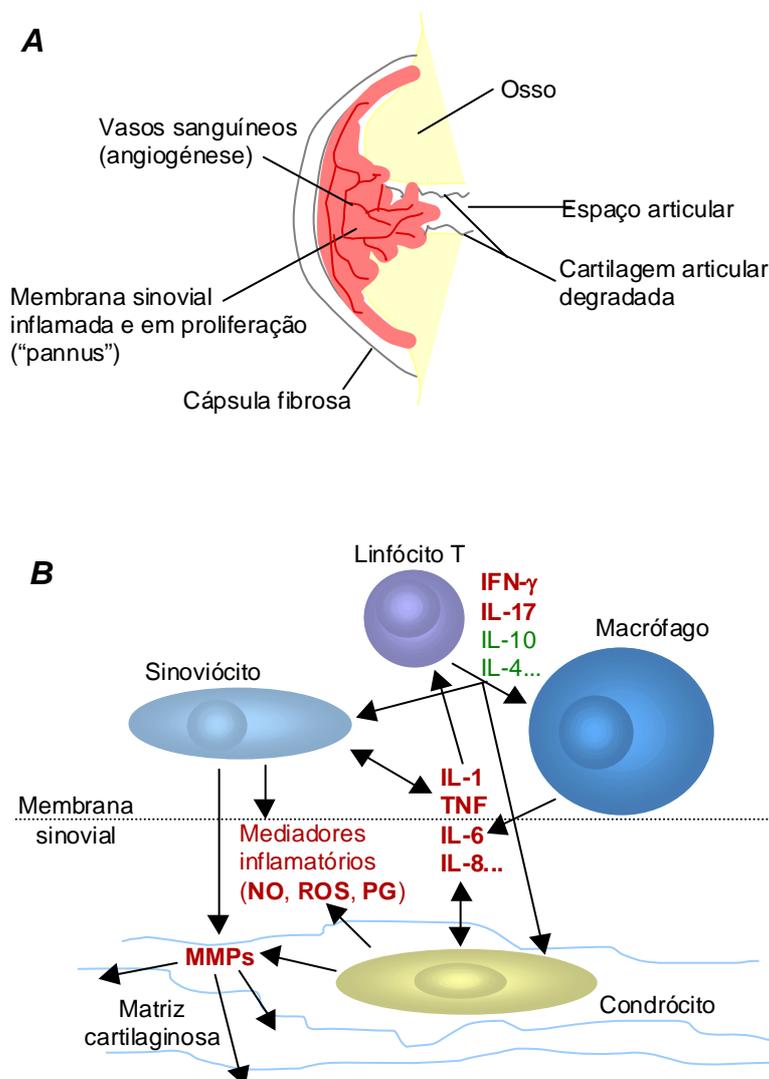


Figura 1.5. Representação esquemática de uma articulação artrítica (A) e das interações entre as células envolvidas na inflamação e degradação da cartilagem (B). IFN- γ , interferon- γ ; IL, interleucina; MMPs, metaloproteases da matriz; NO, monóxido de azoto; PG, prostaglandinas; ROS, espécies reactivas de oxigénio; TNF, factor de necrose tumoral. Adaptado de Feldmann *et al.*, 1996 e de Dinant e Dijkmans, 1999.

Durante muito tempo, a osteoartrite foi considerada uma doença não inflamatória, pois não se observava infiltração de leucócitos, quer na membrana sinovial, quer no espaço articular, nem proliferação de sinoviócitos e os sinais clínicos da inflamação eram de intensidade reduzida, pelo menos na fase inicial. Porém, à medida que a doença progride, o componente inflamatório torna-se mais evidente e, hoje, é

consensual o seu envolvimento na progressão da osteoartrite (Bird, 1998; Fernandes *et al.*, 2002).

Estudos recentes têm permitido caracterizar melhor esse componente inflamatório, evidenciando a importância de vários mediadores pró-inflamatórios na osteoartrite. Entre esses, destacam-se a IL-1 β , o TNF- α e a IL-6 que estão presentes na cartilagem, membrana sinovial e líquido sinovial de doentes com osteoartrite, ainda que em concentrações inferiores às observadas nas artrites inflamatórias (Farahat *et al.*, 1993; Moos *et al.*, 1999; Towle *et al.*, 1997; Westacott *et al.*, 1990). Além disso, os condrócitos e sinoviócitos isolados, respectivamente, da cartilagem e da membrana sinovial de articulações osteoartíticas, são capazes de produzir IL-1 β , TNF- α , IL-6 e também IL-8, prostaglandinas e NO, espontaneamente ou em resposta a vários estímulos (Attur *et al.*, 1997, 2000; He *et al.*, 2002; Melchiorri *et al.*, 1998).

Por outro lado, em membranas sinoviais osteoartíticas humanas, foi também observada a acumulação preferencial de linfócitos T CD4 positivos, entre os quais predominava o subtipo Th1 (Ishii *et al.*, 2002) que medeia a imunidade celular e tem sido implicado na patogénese de várias doenças inflamatórias e infecciosas, incluindo a artrite reumatóide (Miossec, 1998). Num estudo histológico e imunohistoquímico da membrana sinovial de doentes com osteoartrite de vários graus, foram observadas alterações inflamatórias, nomeadamente espessamento da íntima sinovial, infiltração de leucócitos, vascularização aumentada e produção de citocinas pró-inflamatórias, cuja intensidade aumentava proporcionalmente à gravidade e duração da doença (Smith *et al.*, 1997).

De todos estes estudos, ressalta o envolvimento, na osteoartrite, de processos inflamatórios, qualitativamente não muito diferentes dos envolvidos nas artrites inflamatórias. Por isso, actualmente considera-se que a degradação da cartilagem, a característica fisiopatológica mais proeminente da osteoartrite, envolve uma complexa rede de mediadores intercelulares que culmina na produção de enzimas proteolíticas. Neste contexto, as citocinas pró-inflamatórias produzidas na articulação osteoartítica, podem contribuir decisivamente para o desenvolvimento e progressão da doença por induzirem a produção de MMPs e inibirem a síntese dos componentes necessários para restaurar a integridade da matriz (Fernandes *et al.*, 2002). Assim e mesmo quando a inflamação é clinicamente pouco evidente, ocorre sempre um certo grau de inflamação, designada por *inflamação molecular*, isto é, produção de citocinas e mediadores

inflamatórios, que contribui decisivamente para o desequilíbrio da homeostasia da cartilagem, resultando na sua degeneração progressiva (Attur *et al.*, 2000).

Quer nas artrites inflamatórias, quer na osteoartrite, ao mesmo tempo que são produzidas as citocinas pró-inflamatórias e catabólicas, ocorre também a produção dos seus inibidores, particularmente o IL-1Ra (Henrotin *et al.*, 2000; Matsukawa *et al.*, 1997) e a forma solúvel do receptor do TNF (Brennan *et al.*, 1995; Steiner *et al.*, 1995). Simultaneamente, são também segregadas citocinas anti-inflamatórias, entre as quais se destacam a IL-10 (Bucht *et al.*, 1996; Foey *et al.*, 2002; Henrotin *et al.*, 2000; Moos *et al.*, 1999) e o TGF- β (Bucht *et al.*, 1996; Moos *et al.*, 1999; Taketazu *et al.*, 1994).

Por isso, a perspectiva actual em relação ao papel das citocinas nas patologias artríticas, especialmente na artrite reumatóide, considera a existência de uma complexa rede de citocinas pro- e anti-inflamatórias que não se compensam completamente, de modo que o equilíbrio está desviado no sentido do predomínio das acções inflamatórias (Feldmann *et al.*, 1996) (Figura 1.6). Intimamente associada e decorrente desta perspectiva, surge a possibilidade de utilização de citocinas anti-inflamatórias e de anticorpos que bloqueiem as citocinas inflamatórias, tanto no tratamento das artrites inflamatórias (Dinant e Dijkmans, 1999), como da osteoartrite (Fernandes *et al.*, 2002).

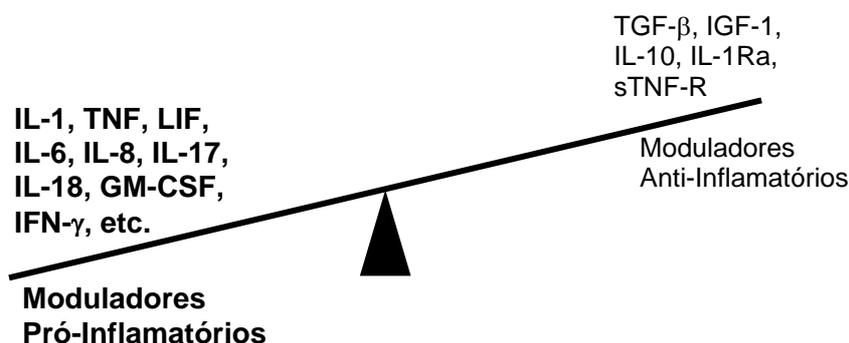


Figura 1.6. Desequilíbrio entre a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias nas articulações artríticas, especialmente nas artrites inflamatórias. GM-CSF, “factor estimulante de colónias de granulócitos-macrófagos”; IFN- γ , interferon- γ ; IGF-1, “factor de crescimento semelhante à insulina-1”; IL-1Ra, antagonista do receptor da IL-1; TGF- β , “factor de crescimento transformante”- β ; TNF, “factor de necrose tumoral”; sTNF-R, receptor solúvel do TNF. Adaptado de Feldmann *et al.*, 1996.

Diversos estudos têm demonstrado a eficácia de várias citocinas anti-inflamatórias, incluindo as produzidas na articulação artrítica e, ainda, a IL-4 e a IL-13, como antagonistas de, pelo menos, algumas das respostas induzidas pela IL-1, pelo TNF- α e por outros estímulos pró-inflamatórios e catabólicos, quer *in vitro* em culturas de condrócitos e de sinoviócitos normais e artríticos (Alaaeddine *et al.*, 1999; Alsalameh *et al.*, 1994; Jovanovic *et al.*, 1998; Koshy *et al.*, 2002; Lubberts *et al.*, 2000; Lum *et al.*, 1996), quer *in vivo* em modelos animais de vários tipos de artrite inflamatória (Glansbeek *et al.*, 1998; Joosten *et al.*, 1996, 1999a; Lubberts *et al.*, 1998, 2000).

A possibilidade de utilização da terapia génica para se obter uma elevada expressão das citocinas anti-inflamatórias, particularmente da IL-4 e do TGF- β , na articulação, começou já a ser experimentada em modelos animais de vários tipos de artrites inflamatórias. Por exemplo, num modelo de artrite induzida pela formação intra-articular de complexos imunes, a expressão da IL-4 na articulação artrítica, obtida por inoculação de um vector viral contendo o gene desta citocina, teve alguns efeitos benéficos, concretamente a inibição da activação de MMPs e a diminuição da erosão da cartilagem, sem, no entanto, haver alteração dos sinais inflamatórios (van Lent *et al.*, 2002). Num outro estudo que utilizou como modelo a artrite induzida pelo colagénio, a expressão intra-articular de IL-4 reduziu significativamente a degradação dos proteoglicanos, a acumulação de leucócitos polimorfonucleares, a expressão da estromelina-3, da MIP-2, da IL-1 β e do TNF- α e a produção de NO no tecido sinovial, ao mesmo tempo que a síntese de proteoglicanos foi significativamente estimulada, embora, mais uma vez, a inflamação sinovial não tenha diminuído apreciavelmente (Lubberts *et al.*, 1999). A administração intra-articular de IL-4 também potenciou o efeito anti-artrítico observado por administração de IL-10, num modelo de artrite induzida por antígenos bacterianos (Lubberts *et al.*, 1998).

Em conjunto, estes estudos indicam que a administração de citocinas anti-inflamatórias, independentemente do método usado, isto é, seja recorrendo à terapia génica ou à injeção intra-articular da proteína, pode ser um meio eficaz de reduzir a progressão das lesões artríticas, senão na osteoartrite em relação à qual não há ainda estudos *in vivo*, pelo menos, nas artrites em que o componente inflamatório é mais intenso.

A eficácia terapêutica da administração de TGF- β é mais controversa. Por um lado, num modelo de artrite inflamatória induzida por antígenos bacterianos, a expressão de TGF- β , obtida por administração intramuscular de um plasmídeo contendo o gene humano desta citocina, reduziu a inflamação, a extensão do “pannus”, a degradação da cartilagem e do osso subjacente e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Song *et al.*, 1998). Porém, num outro estudo mais recente, o mesmo grupo observou que a expressão intra-articular de TGF- β 1, em murghanos normais, provocava alterações histopatológicas na membrana sinovial idênticas às que ocorrem na osteoartrite, nomeadamente hiperplasia e formação de condro-osteófitos (Bakker *et al.*, 2001), o que está de acordo com estudos *in vitro* em que foram observados os mesmos efeitos (van Beuningen *et al.*, 1998; van den Berg, 1995). Além disso e considerando outros estudos, em condrócitos e em sinoviócitos, em que o TGF- β induziu a expressão de collagenases (Cheon *et al.*, 2002; Tardif *et al.*, 1999, 2001) e de agreganase (Yamanishi *et al.*, 2002), esta citocina não parece ser a mais adequado para utilização terapêutica.

A administração dos inibidores naturais das citocinas pró-inflamatórias, particularmente IL-1Ra e receptores solúveis da IL-1 e do TNF- α , e de anticorpos bloqueadores dessas citocinas, poderá também reduzir a inflamação e o catabolismo da articulação artrítica. Os resultados de alguns ensaios clínicos foram já relatados, indicando que esta estratégia terapêutica pode ser eficaz, embora sejam necessários estudos mais alargados, quer em relação ao número de doentes, quer quanto à duração do tratamento e do período de avaliação a longo prazo (Dinant e Dijkmans, 1999). Desses estudos, os que originaram melhorias mais significativas em doentes com artrite reumatóide, foram a administração sistémica ou intra-articular de IL-1Ra e do receptor solúvel do TNF (Campion *et al.*, 1996; Moreland *et al.*, 1997). No entanto, apesar dos efeitos anti-inflamatórios obtidos, estas terapêuticas não impediram a destruição da cartilagem, nem a progressão do “pannus” (Dinant e Dijkmans, 1999).

Estas observações salientam a necessidade de uma melhor caracterização dos efeitos destas citocinas e dos mecanismos de sinalização intracelular através dos quais geram essas respostas, quer a nível da membrana sinovial, quer do condrócito. O conhecimento desses processos permitirá, por um lado, seleccionar as terapêuticas anti-citocinas que apresentem maiores efeitos benéficos e menos acções indesejáveis e,

por outro, identificar novos alvos moleculares, relevantes do ponto de vista fisiopatológico e susceptíveis de manipulação farmacológica.

1.4. A INTERLEUCINA-1:

CARACTERIZAÇÃO, MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR E RESPOSTAS INDUZIDAS NO CONDROCITO

Embora a IL-1 e o TNF- α apresentem muitas acções em comum e até redundantes, alguns estudos sugerem que a IL-1 pode desempenhar um papel dominante na degradação da cartilagem e no recrutamento de células inflamatórias para a articulação, enquanto o TNF- α pode contribuir mais para a inflamação sinovial (Joosten *et al.*, 1996, 1999b; Kuiper *et al.*, 1998; van de Loo *et al.*, 1995).

Recentemente, a obtenção de animais modificados geneticamente que desenvolvem processos artríticos de características idênticas às observadas na artrite reumatóide, reforçou o reconhecimento do papel crucial da IL-1 na patogénese das doenças artríticas. Entre as modificações genéticas que levaram ao desenvolvimento da patologia artrítica contam-se murganhos em que foi introduzido o gene humano da IL-1 α (Niki *et al.*, 2001) e outros em que o gene do IL-1Ra foi suprimido (Horai *et al.*, 2000). Outro estudo mostrou que murganhos em que os genes da IL-1 foram eliminados, são resistentes ao desenvolvimento de artrite induzida pelo colagénio (Saijo *et al.*, 2002).

Estes e muitos outros estudos têm contribuído, nas últimas décadas, para uma melhor compreensão das funções fisiológicas da IL-1 como mediador de respostas locais e sistémicas à infecção e a qualquer outra agressão celular, e do seu papel patológico em muitas doenças inflamatórias, agudas e crónicas, incluindo as doenças artríticas (Dinarello, 1996). Além disso, a IL-1 deixou de ser considerada apenas um mediador importante da resposta imune inata, para ser, hoje, encarada como um elemento fundamental na interface entre essa resposta e a resposta imune adaptativa (Martin e Wesche, 2002).

1.4.1. Síntese e funções das proteínas da família da IL-1

A IL-1 α , a IL-1 β e o IL-1Ra (ou IRAP), codificados por três genes distintos, são os membros principais da família da IL-1. A IL-1 α e a IL-1 β são agonistas, enquanto o IL-1Ra tem afinidade para o receptor da IL-1 (IL-1R), mas comporta-se como antagonista, não sendo capaz de promover a sua activação. As regiões promotoras dos três genes apresentam características idênticas, mas outras claramente distintas, indicando que estão sujeitos a diferentes processos de regulação da transcrição. Os três genes apresentam sequências de ligação específicas para o factor de transcrição “Factor Nuclear-kappaB” (“Nuclear Factor-kappaB”, NF- κ B) que regula a expressão de muitos genes relacionados com a inflamação e a resposta imune (Lee e Burckart, 1998; Pahl, 1999), mas só os genes da IL-1 β e do IL-1Ra contêm uma sequência “TATA” típica, característica dos genes cuja expressão é induzida em resposta a estímulos adequados, bem como locais de ligação específicos para os factores de transcrição “Proteína Activadora-1” (“Activating Protein-1”, AP-1) e “Proteína que liga o Elemento que Responde ao Monofosfato de Adenosina Cíclico” (“Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein”, CREB) (Dinarello *et al.*, 1996; Stylianou e Saklatvala, 1998). Recentemente, foram identificadas outras proteínas com características idênticas às dos membros principais da família da IL-1, mas as suas funções são ainda desconhecidas (Debets *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2000).

Ao contrário do IL-1Ra que é imediatamente segregado ao ser sintetizado, a IL-1 α e a IL-1 β são sintetizadas na forma de precursores (pro-IL-1 α e pro-IL-1 β). A pro-IL-1 α é biologicamente activa e permanece no interior da célula, ao passo que a pro-IL-1 β é inactiva e é retida no citoplasma da célula até ser activada por proteólise e, então, segregada. A pro-IL-1 α é libertada por morte da célula, podendo ser activada por proteases extracelulares. As calpaínas, proteases dependentes de cálcio, associadas à membrana e que são activas em resíduos de cisteína, também podem hidrolisar a pro-IL-1 α , pelo que a sua activação pode ocorrer na ausência de morte celular. No entanto, a pro-IL-1 α parece funcionar, essencialmente, como um factor de crescimento intracelular, tendo sido implicada na regulação do envelhecimento celular, especialmente em células epiteliais e endoteliais (Dinarello, 1996). A enzima responsável pela activação da IL-1 β é a caspase-1 (anteriormente designada por “IL-1 β -converting enzyme”, ICE),

que é o protótipo de uma família de caspases inflamatórias activadas em resposta a antígenos microbianos, como o lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas (LPS), e a factores endógenos libertados quando há lise celular (Martinon *et al.*, 2002).

A síntese e actividade dos três membros principais da família da IL-1 (IL-1 α , IL-1 β e IL-1Ra) é controlada a vários níveis, desde a transcrição, à activação por proteólise. A síntese das três proteínas é induzida por uma grande variedade de estímulos, incluindo antígenos microbianos e citocinas, entre os quais a própria IL-1. Outros estímulos são mais selectivos, induzindo preferencialmente a síntese de IL-1, particularmente IL-1 β , ou de IL-1Ra. As citocinas anti-inflamatórias, com destaque para a IL-10 e a IL-4, são exemplo de estímulos que induzem a síntese de IL-1Ra, mas não de IL-1 β (Dinarello, 1996; Lubberts *et al.*, 1998).

1.4.2. Componentes e funções do sistema de Receptores da IL-1

O sistema de receptores da IL-1 (Figura 1.7) compreende as formas transmembranares e solúveis dos receptores do tipo I (IL-1RI) e do tipo II (IL-1RII), cujas porções extracelulares são idênticas, caracterizando-se por apresentarem três “domínios semelhantes às imunoglobulinas”, mas que diferem em relação à porção citoplasmática que está ausente no receptor do tipo II e também nas formas solúveis (Martin e Wesche, 2002). Por isso, só o receptor do tipo I é capaz de transmitir sinais intracelulares em resposta à ligação à IL-1 (Sims *et al.*, 1993). Para isso, o IL-1RI requer a associação com outro membro desta família, a “Proteína Acessória do Receptor da IL-1” (“Interleukin-1 Receptor Accessory Protein”, IL-1RAcP) (Greenfeder *et al.*, 1995). A IL-1RAcP não tem afinidade para nenhuma das proteínas da família da IL-1, funcionando, antes, como um co-receptor essencial para a transdução do sinal em resposta à ligação da citocina ao receptor do tipo I (Cullinan *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1997; Wesche *et al.*, 1997a).

O receptor do tipo II e as formas solúveis dos dois tipos de receptor (sIL-1RI e sIL-1RII) não têm funções de sinalização, mas, ao ligarem a IL-1, diminuem a sua disponibilidade para se ligar ao IL-1RI e, conseqüentemente, atenuam as acções da citocina, constituindo, assim, importantes mecanismos de regulação das suas acções (Colotta *et al.*, 1993). No entanto, os dois receptores solúveis apresentam diferentes afinidades para cada uma das três proteínas da família da IL-1. A ordem de afinidades

para o sIL-1RI é $IL-1Ra > IL-1\alpha > IL-1\beta$ e para o sIL-1RII é $IL-1\beta > IL-1\alpha > IL-1Ra$ (Dinarello, 1996), o que está de acordo com estudos em que o sIL-1RII inibiu preferencialmente as respostas mediadas pela $IL-1\beta$, enquanto o sIL-1RI foi mais eficaz em relação à $IL-1\alpha$ (Burger *et al.*, 1995).

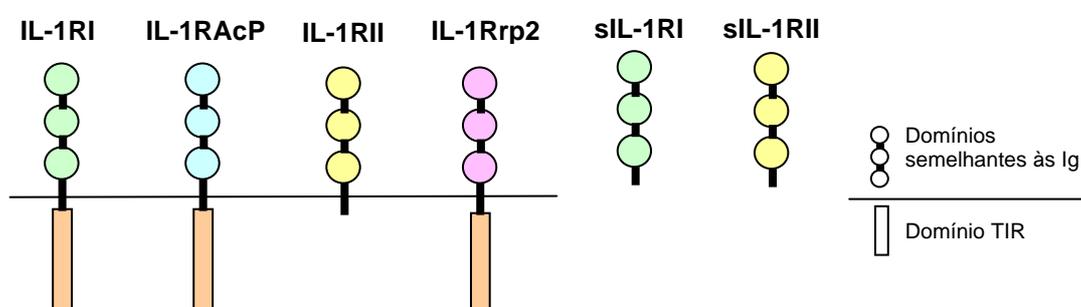


Figura 1.7. A família de receptores da IL-1. IL-1RI, receptor da IL-1 do tipo I; IL-1RAcP, proteína acessória do receptor da IL-1; IL-1RII, receptor da IL-1 do tipo II; IL-1Rrp2, proteína 2 relacionada com o receptor da IL-1; sIL-1RI e sIL-1RII, formas solúveis dos receptores da IL-1 dos tipos I e II, respectivamente. Adaptado de Martin e Wesche, 2002.

Recentemente, foi identificado um novo membro da família de receptores da IL-1 (Figura 1.7), designado por “proteína 2 relacionada com o receptor da IL-1” (“IL-1R-related protein 2”; IL-1Rrp2), que tem afinidade para duas novas formas da IL-1, a $IL-1\delta$ e a $IL-1\epsilon$, que funcionam como antagonista e como agonista do receptor, respectivamente (Debets *et al.*, 2001).

As porções citoplasmáticas do IL-1RI, da IL-1Rrp2 e da IL-1RAcP são constituídas por um motivo designado por “domínio Toll-Interleucina-1” (TIR) que é idêntico ao dos receptores de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-18, e ao dos receptores que reconhecem antígenos microbianos. Em conjunto, estes receptores constituem a família dos “Receptores Toll-Interleucina-1” (TIR), assim agrupados, não só por partilharem semelhanças estruturais, mas por todos funcionarem como importantes receptores envolvidos na resposta imune (Martin e Wesche, 2002).

A ligação da $IL-1\alpha$ ou β ao domínio extracelular do receptor do tipo I induz o recrutamento da IL-1RAcP, que é essencial para a formação do complexo funcional, eficaz na transdução do sinal. A ligação do IL-1Ra ao receptor, pelo contrário, não induz

o recrutamento da IL-1RAcP e, conseqüentemente, não se forma o complexo de sinalização que transmite o sinal (Greenfeder *et al.*, 1995). A ligação da IL-1 ao receptor do tipo II também parece promover a associação da IL-1RAcP à porção extracelular desse receptor, mas, como este não possui o domínio TIR citoplasmático, o complexo formado não é funcional e, portanto, não ocorre a transdução do sinal. Assim, ao ser recrutada pelo IL-1RII, a IL-1RAcP fica menos disponível para se ligar ao receptor do tipo I, passando a ser um factor limitante da transdução de sinais intracelulares em resposta à IL-1 (Lang *et al.*, 1998).

Por sua vez, a formação do complexo transmembranar entre o IL-1RI, ligado à citocina, e a IL-1RAcP permite a associação dos seus domínios TIR citoplasmáticos e, em seguida, a sua interacção com uma proteína citoplasmática adaptadora, designada por MyD88 que também contém um domínio TIR (Wesche *et al.*, 1997b). A associação desta proteína ao complexo do receptor activado permite o recrutamento e subsequente activação da isoforma 1 da “cinase de proteínas associada ao receptor da IL-1” (“IL-1 Receptor-Associated Kinase-1”, IRAK-1) que é uma cinase de resíduos de serina/treonina (Cao *et al.*, 1996a). Pensa-se que, na célula em repouso, esta cinase se encontra associada a uma outra proteína adaptadora, Tollip, que impede a dimerização da IRAK-1, prevenindo, assim, a sua activação (Burns *et al.*, 2000). Ao ocorrer a activação do IL-1RI, o complexo IRAK-1/Tollip é rapidamente recrutado para o complexo citoplasmático do receptor, associando-se à MyD88. Isto provoca a dissociação da Tollip, permitindo a dimerização e auto-fosforilação rápida da IRAK-1 ligada à MyD88. A auto-fosforilação da IRAK-1 envolve, de facto, uma cascata de fosforilações em vários aminoácidos (Martin e Wesche, 2002). Recentemente, foi identificado um novo membro da família IRAK, a IRAK-4 (Li *et al.*, 2002a), que parece ser responsável pela fosforilação inicial da IRAK-1 que, então, procede à sua própria fosforilação em vários outros aminoácidos (Suzuki *et al.*, 2002).

Na forma hiperfosforilada, a IRAK-1 dissocia-se do complexo do receptor e associa-se, transitoriamente, a uma proteína adaptadora designada por “Factor 6 Associado ao Receptor do TNF” (“TNF Receptor-Associated Factor 6”, TRAF6) (Cao *et al.*, 1996b). Ao mesmo tempo, a IRAK-1 interage com outra proteína adaptadora, a “proteína 2 que liga a cinase 1 activada pelo TGF- β ” (“TGF- β -activated kinase 1 binding protein 2”, TAB2), que se encontra na membrana citoplasmática. Assim, a interacção

simultânea da IRAK-1 com a TRAF6 e com a TAB2 permite, por mecanismos ainda desconhecidos, a deslocação destas três proteínas para o citosol, onde formam um complexo com a “cinase-1 activada pelo TGF- β ” (“TGF- β -activated kinase 1”, TAK1) que, por sua vez, está ligada à TAB1 (Qian *et al.*, 2001; Takaesu *et al.*, 2000). Entretanto, a IRAK-1 hiperfosforilada é rapidamente degradada por proteólise (Yamin e Miller, 1997), tendo sido sugerido que este processo pode determinar a dissociação do complexo que contém a TRAF6, limitando, assim a duração da resposta à IL-1 (Martin e Wesche, 2002). O complexo TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2 permite a adição de vários resíduos de ubiquitina à TRAF6 que, nesta forma, facilita directamente a activação da TAK1 por auto-fosforilação (Kishimoto *et al.*, 2000; Takaesu *et al.*, 2000). A TAK1, por seu turno, activa outras cinases que iniciam várias cascatas de sinalização intracelulares que levam à activação de factores de transcrição, com a consequente alteração da expressão de vários genes, gerando, assim, a resposta celular à IL-1 (Figura 1.8).

O NF- κ B é um dos factores de transcrição que parece ser activado por esta via. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos não estão ainda completamente elucidados (Li *et al.*, 2001b; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Qian *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001) e é possível que outros processos também contribuam para a activação deste factor de transcrição (Martin e Wesche, 2002; Vermeulen *et al.*, 2002).

Alguns estudos indicam que a TAK1 activada é essencial para a activação de alguns membros da família das MAPK, designadamente da p38^{MAPK} e da “cinase do terminal amínico da proteína c-Jun” (“c-Jun NH₂-terminal kinase”, JNK) (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001), que levam à activação de vários factores de transcrição, nomeadamente do AP-1. No entanto, outros autores observaram que a activação da JNK, em resposta à IL-1, não requer a IRAK-1, nem a TAK-1 (Li *et al.*, 2001b; Qian *et al.*, 2001) e foi, também, proposto que as vias de sinalização intracelular que levam à activação do NF- κ B e da JNK divergem a nível da TRAF6, utilizando, a partir deste ponto, mecanismos independentes (Kobayashi *et al.*, 2001).

A relação entre os processos de sinalização intracelular iniciados pelo complexo MyD88:IRAK:Tollip e outros processos celulares, igualmente activados pela IL-1, é pouco clara, não se sabendo, ainda, se há um primeiro acontecimento que desencadeia todos os outros, ou se ocorrem vários processos simultaneamente (Dinarello, 1996). Por exemplo, não está esclarecido se a IRAK-1 medeia a activação da “cinase da posição 3

do fosfatidilinositol” (“phosphatidylinositol 3-kinase”, PI-3-K) em resposta à IL-1 (Reddy *et al.*, 1997), ou, pelo contrário, se a PI-3-K interage directamente com o IL-1RI, sem envolver a IRAK-1 (Marmioli *et al.*, 1998).

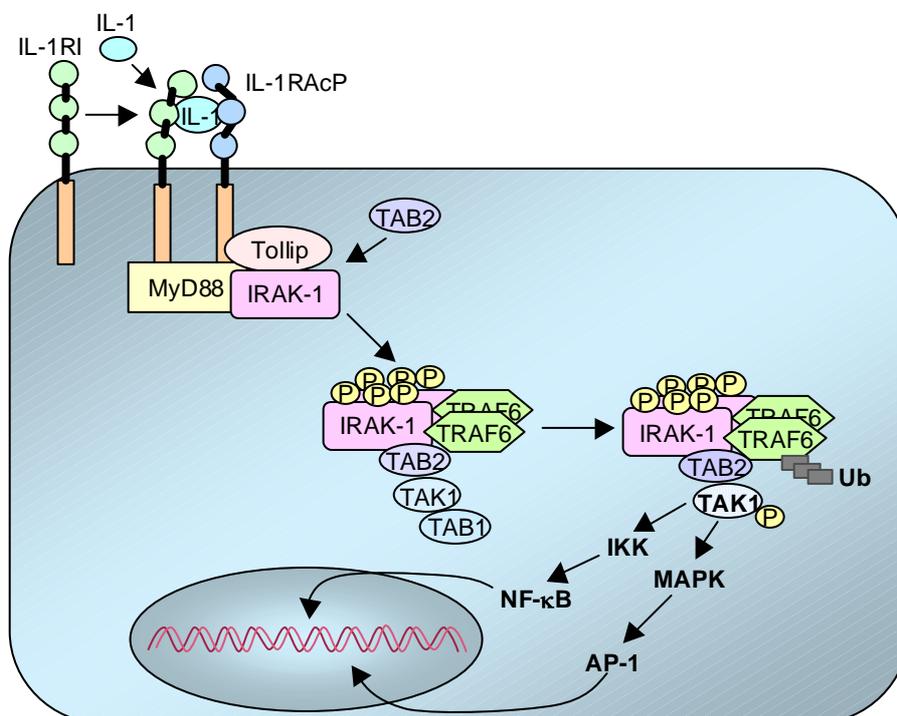


Figura 1.8. Mecanismos iniciais de transdução do sinal em resposta à activação do receptor da IL-1. A ligação da IL-1 ao IL-1RI promove a sua associação à IL-1RAcP, o que desencadeia o recrutamento da MyD88 para o complexo do receptor, permitindo, por sua vez, a associação do complexo Tollip/IRAK-1. Isto provoca a dissociação da Tollip, permitindo a dissociação e auto-fosforilação da IRAK-1. Na forma hiperfosforilada, a IRAK-1 sofre dimerização e recruta a TAB2 e a TRAF6. A associação da TRAF6 à IRAK-1, permite a sua dimerização e consequente activação, recrutando, simultaneamente para o complexo duas outras proteínas, a TAK1 e a TAB1 que se encontram associadas no citoplasma. Entretanto, a dimerização e activação da TRAF6 permite a sua ubiquitinação, o que promove a dissociação da TAB1 e a activação da TAK1 por fosforilação. A TAK1 activada vai, por sua vez, activar outras cinases, como o complexo IKK e as MAPK, desencadeando várias cascatas de sinalização que culminam na activação de factores de transcrição e na expressão subsequente de genes regulados por esses mesmos factores. AP-1: proteína activadora-1; IKK: cinase do κ B; IL-1RI: receptor da IL-1 do tipo I; IL-1RAcP: proteína acessória do receptor da IL-1; IRAK-1: cinase 1 associada ao receptor da IL-1; MAPK: cinases de proteínas activadas por mitogénios; NF- κ B: factor nuclear-kapaB; TAB: proteína que liga a cinase 1 activada pelo TGF- β ; TAK1: cinase-1 activada pelo TGF- β ; TRAF6: factor 6 associado ao receptor do TNF; Ub: ubiquitina. Adaptado de Martin e Wesche, 2002.

1.4.3. Activação dos factores de transcrição NF- κ B e AP-1 e regulação da expressão genética em resposta à IL-1

Os efeitos exercidos pela IL-1 a nível celular resultam, fundamentalmente, de alterações da expressão de vários genes, o que depende de interacções complexas entre vários factores de transcrição. Entre esses, o NF- κ B e o AP-1 têm especial relevância, pois são necessários para a expressão de muitas das proteínas responsáveis pelos efeitos catabólicos e inflamatórios da IL-1. A actividade destes factores de transcrição é regulada por cascatas de sinalização intracelular que envolvem a acção de diversas enzimas e segundos mensageiros.

As vias de sinalização intracelular activadas em resposta à IL-1 variam consoante o tipo de célula em que actua esta citocina (Dinarello, 1996). Os sistemas de sinalização intracelular implicados nas respostas induzidas pela IL-1, em condrócitos articulares de várias espécies, incluem as PTK (Geng *et al.*, 1995), os membros das três principais sub-famílias das MAPK (ou seja, as p42/44^{MAPK}, a p38^{MAPK} e as JNK) (Geng *et al.*, 1996; Scherle *et al.*, 1997) e, ainda, a “guanilato ciclase” e a “fosfodiesterase” (Geng *et al.*, 1998). A IL-1 também estimula a libertação de ácido araquidónico e a síntese subsequente de prostaglandina E₂ (Blanco e Lotz, 1995; Conquer *et al.*, 1992; Henrotin *et al.*, 1998; Tawara *et al.*, 1991), para o que contribui a indução da expressão da fosfolipase A₂ (Massaad *et al.*, 2000) e da ciclooxigenase-2 (COX-2) (Knott *et al.*, 1994; Morisset *et al.*, 1998).

Ao contrário do que acontece em muitos outros tipos de células, nos condrócitos articulares, a concentração intracelular de cálcio aumenta em resposta à IL-1 (Luo *et al.*, 1997). As espécies reactivas de oxigénio (“Reactive Oxygen Species”, ROS), particularmente o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Rathakrishnan *et al.*, 1992), o radical anião superóxido (Oh *et al.*, 1998; Tawara *et al.*, 1991) e o radical hidróxilo (Tiku *et al.*, 1998), e as espécies reactivas de azoto, designadamente o NO (Grabowski *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1993; Stadler *et al.*, 1991), são também produzidas pelo condrócito em resposta à IL-1 e medeiam muitas das suas respostas catabólicas e inflamatórias (Blanco *et al.*, 1995b; Blanco e Lotz, 1995; Lo *et al.*, 1998; Taskiran *et al.*, 1994; Tiku *et al.*, 1999, 2000).

Os mecanismos moleculares que relacionam todos estes mediadores intracelulares com a activação de factores de transcrição específicos não estão ainda bem esclarecidos. Na maior parte dos casos sabe-se, apenas, que alguns deles são necessários para a activação de um determinado factor de transcrição, em resposta à IL-1, num determinado tipo de célula.

1.4.3.1. Funções fisiológicas e regulação do NF- κ B

O NF- κ B foi primeiro identificado, por Sen e Baltimore (1986), em linfócitos B, como sendo uma proteína nuclear com afinidade para um conjunto de dez nucleótidos (GGGACTTCC) presente na região promotora do gene das cadeias leves κ das imunoglobulinas. A transcrição deste gene, em linfócitos B e plasmócitos, requeria a actividade daquele factor de transcrição e daí o seu nome.

Actualmente, sabe-se que o NF- κ B é um factor de transcrição expresso num grande número de células e rapidamente activado em resposta a uma enorme variedade de estímulos que compreende desde agentes externos, incluindo agentes físicos (como as radiações γ e ultra-violeta), químicos (desde tóxicos ambientais, a fármacos utilizados em terapêutica humana) e microbianos (especialmente bactérias, vírus e produtos por eles produzidos), até mediadores intercelulares (com especial relevo para várias citocinas pró-inflamatórias, factores de crescimento e hormonas) relevantes em muitos processos fisiopatológicos, nomeadamente a hiperglicémia, a hemorragia, a regeneração hepática, a degeneração neuronal e muitos outros (Lee e Burckart, 1998; Pahl, 1999).

A multiplicidade de estímulos que activam o NF- κ B leva a que este factor de transcrição seja considerado um elemento fundamental na regulação das respostas a, praticamente, qualquer tipo de agressão celular (Pahl, 1999). Na maior parte dos casos, essas respostas traduzem-se na expressão de genes envolvidos na resposta imune e inflamatória, entre os quais se destacam (Lee e Burckart, 1998; Pahl, 1999):

- os genes de várias citocinas, incluindo os genes da IL-1 α e β , do TNF- α e β e da IL-6;
- quimiocinas, como a IL-8, e factores de crescimento, nomeadamente o G-CSF e o GM-CSF;

- moléculas de adesão celular, especialmente importantes para a migração de leucócitos do sangue para o tecido lesado e incluindo, por exemplo, a E-selectina e a VCAM-1;
- receptores envolvidos no reconhecimento imunológico, como os genes de moléculas do Complexo Major de Histocompatibilidade e de outras proteínas envolvidas na apresentação de antígenos;

Outra classe de genes regulados pelo NF- κ B inclui uma série de enzimas efectoras cuja expressão só ocorre em resposta a estímulos adequados, ou seja, enzimas indutíveis que participam na síntese de mediadores inflamatórios e na remodelação dos tecidos. Entre as primeiras, destacam-se a “isoforma indutível da sintase do NO” (“inducible NO synthase”, iNOS ou NOS II), responsável pela produção de grandes quantidades de NO (Geller *et al.*, 1993), e a COX-2 (também designada por “isoforma indutível da sintase da prostaglandina H”), envolvida na produção de prostaglandinas (Yamamoto *et al.*, 1995). Entre os genes que participam na remodelação dos tecidos e cuja expressão é regulada pelo NF- κ B, destacam-se a colagenase-1 (Vincenti *et al.*, 1998), a colagenase-3 (Mengshol *et al.*, 2000) e a gelatinase B (Eberhardt *et al.*, 2000).

O NF- κ B desempenha também um papel importante na activação de genes envolvidos no metabolismo celular e na regulação da apoptose, da diferenciação e da proliferação celulares (Li *et al.*, 2002b; Pahl., 1999).

As múltiplas funções desempenhadas pelo NF- κ B sugerem que a modulação da sua actividade pode ser uma estratégia terapêutica eficaz no combate a uma grande variedade de doenças, desde as doenças inflamatórias crónicas, nomeadamente as artrites, e auto-ímmunes, às doenças alérgicas, como a asma, e a qualquer outra doença em que esteja implicada a hiperactivação de respostas imunes que fisiologicamente são benéficas (Ghosh e Karin, 2002). Mas, além de doenças que apresentam um componente inflamatório importante, a activação excessiva do NF- κ B tem sido também implicada na fisiopatologia do cancro (Ghosh e Karin, 2002) e de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Lukiw e Bazan, 1998).

1.4.3.1.1. Estrutura, activação e regulação do NF- κ B

Nos mamíferos, a designação NF- κ B, ou Rel/NF- κ B, engloba cinco proteínas distintas, estruturalmente relacionadas por conterem uma região semelhante e conservada ao longo da evolução que se designa por “domínio de homologia Rel” (“Rel homology domain”, RHD). Esta região é responsável pela dimerização, localização nuclear, ligação ao ADN e associação a proteínas inibitórias. No entanto, a partir deste domínio e em direcção ao extremo carboxílico, as sequências das várias proteínas desta família diferem, constituindo duas classes. A primeira destas classes inclui as proteínas NF- κ B1 (p50 e o seu precursor p105) e NF- κ B2 (p52 e o seu precursor p100). A segunda classe engloba as proteínas RelA (p65), RelB e c-Rel que, ao contrário das da primeira, contêm um ou mais domínios de transactivação da transcrição (Gilmore, 1999; Ghosh e Karin, 2002).

As proteínas precursoras p105 e p100 são inactivas, originando as formas activas por proteólise limitada ou por paragem precoce da tradução do ARNm (Gilmore, 1999). Enquanto a activação da p105 a p50 ocorre de forma constitutiva, determinando a existência na célula de quantidades aproximadamente iguais das duas proteínas (Lin *et al.*, 1998), a activação da p100 a p52 é regulada, isto é, só ocorre em resposta a estímulos adequados (Xiao *et al.*, 2001). Por outro lado, foi demonstrado que estímulos que activam o NF- κ B, também induzem a degradação completa do p105, o que não origina p50, mas regula a formação de homodímeros desta última proteína e a sua disponibilidade para interagir com outras proteínas que modulam a sua actividade transcricional (Heissmeyer *et al.*, 1999).

As proteínas da família NF- κ B podem existir na forma de homo e heterodímeros, excepto o RelB que apenas forma heterodímeros (Gilmore, 1999). Além disso, alguns dímeros formam-se mais facilmente que outros e nem todas as combinações possíveis ocorrem naturalmente, reflectindo a maior afinidade entre determinadas proteínas. Por exemplo, o heterodímero p50:RelA forma-se preferencialmente em relação ao homodímero p50:p50, e este mais facilmente que o homodímero RelA:RelA (Chen e Ghosh, 1999).

Na forma dimérica, estas proteínas têm afinidade para o ADN e funcionam como factores de transcrição, excepto os homodímeros de p50 e de p52 que funcionam como

repressores da transcrição dos seus genes alvo, pois a p50 e a p52 não contêm domínios de transactivação (Ghosh e Karin, 2002). A interacção com o ADN resulta da ligação específica a um conjunto de dez nucleótidos, designado por “local κ B” ou “elemento κ B” (“ κ B site” ou “ κ B element”), com a estrutura geral 5'-GGGRN Y YYCC-3', em que R é uma das bases púricas, N é qualquer um dos quatro nucleótidos e Y é uma das bases pirimídicas. Assim, existem muitos elementos κ B distintos, para os quais os vários dímeros das proteínas NF- κ B apresentam diferentes afinidades e capacidades de activação da transcrição (Chen e Ghosh, 1999). O heterodímero p50/RelA é o protótipo desta família de factores de transcrição, sendo rapidamente activado em resposta à maioria dos estímulos que induzem a transcrição de genes que contêm elementos κ B. De qualquer modo, a capacidade de diferentes dímeros para reconhecerem preferencialmente determinados elementos κ B, em detrimento de outros ligeiramente diferentes, indica que a expressão de genes dependentes do NF- κ B é regulada, diferencialmente, pela composição dos dímeros disponíveis numa dada célula, o que depende do estímulo e da própria célula (Lee e Burckart, 1998).

Na maioria das células, a actividade do NF- κ B é regulada por interacção com uma família de inibidores, designada por I κ B que inclui as proteínas I κ B- α (a mais estudada e considerada funcionalmente mais importante), I κ B- β , I κ B- ϵ , I κ B- γ e Bcl-3 e ainda as proteínas p105 e p100 da família NF- κ B. Em geral, estes inibidores ligam-se aos dímeros da família NF- κ B, mascarando a sua sequência de localização nuclear e impedindo, assim, a sua translocação para o núcleo e a subsequente ligação a elementos κ B nos genes alvo (Karin, 1999).

Para que o NF- κ B retido no citoplasma pelas proteínas I κ B, possa activar a transcrição genética, é necessário que ocorra a dissociação do complexo NF- κ B:I κ B. A maioria dos estímulos que activam o NF- κ B, designadamente a IL-1, promovem a rápida dissociação daquele complexo através de uma cascata de reacções que culmina na degradação do I κ B, especialmente do I κ B- α (Figura 1.9) (Beg *et al.*, 1993).

A degradação do I κ B- α é efectuada pelo proteassoma e requer a fosforilação de dois resíduos de serina (S32 e S36 no I κ B- α humano) localizados no seu domínio regulador N-terminal (Chen *et al.*, 1995b). Essa fosforilação é realizada por um complexo

de elevado peso molecular, designado por “cinase do I κ B” (“I κ B kinase”, IKK) que fosforila especificamente resíduos de serina. O complexo IKK é formado por três polipéptidos fortemente ligados, dos quais, dois (IKK α e IKK β) constituem a subunidade catalítica (Zandi *et al.*, 1997) e o terceiro (IKK γ , “NF- κ B Essential Modulator” ou “IKK complex-Associated Protein”) é a subunidade reguladora (Cohen *et al.*, 1998; Rothwarf *et al.*, 1998). A activação do IKK depende da TRAF6 e da TAK-1 (Deng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001), definindo, assim, o elo de ligação entre a activação do receptor da IL-1 e a activação do NF- κ B (Figura 1.9).

Embora tenha sido sugerido que a IKK α pode não ser relevante para a activação do NF- κ B em resposta à IL-1 e ao TNF, funcionando antes como mediadora de funções celulares independentes do NF- κ B (Karin *et al.*, 1999), um estudo mais recente mostrou que os três membros do complexo IKK são igualmente importantes para a activação do NF- κ B e para a expressão dos seus genes alvo em resposta à IL-1 e ao TNF (Li *et al.*, 2002b).

Uma outra enzima da família das “cinases que activam as cinases das MAPK” (“MAPK kinase kinase”, MAPKKK, MAP3K ou MKKK), designada por “cinase indutora do NF- κ B” (“NF- κ B-inducing kinase”, NIK), foi implicada na activação deste factor de transcrição em resposta a vários estímulos, incluindo a IL-1 e o TNF (Malinin *et al.*, 1997). A NIK foi encontrada em associação com o complexo IKK activado em resposta à IL-1 (Cohen *et al.*, 1998), mas estudos posteriores questionaram o seu papel como mediador deste processo (Karin *et al.*, 1999).

Ao ser fosforilado, o I κ B fica acessível à acção enzimática de uma ligase específica, activa constitutivamente, que, de imediato, adiciona ao próprio I κ B várias unidades de ubiquitina. Na forma ubiquitinada, o I κ B, especialmente o I κ B- α , é então rapidamente degradado pelo proteassoma, libertando os dímeros NF- κ B e expondo as suas sequências de localização nuclear. Ocorre, assim, a translocação dos dímeros livres para o núcleo, onde interagem com os elementos κ B dos genes alvo, promovendo a sua transcrição (Karin, 1999).

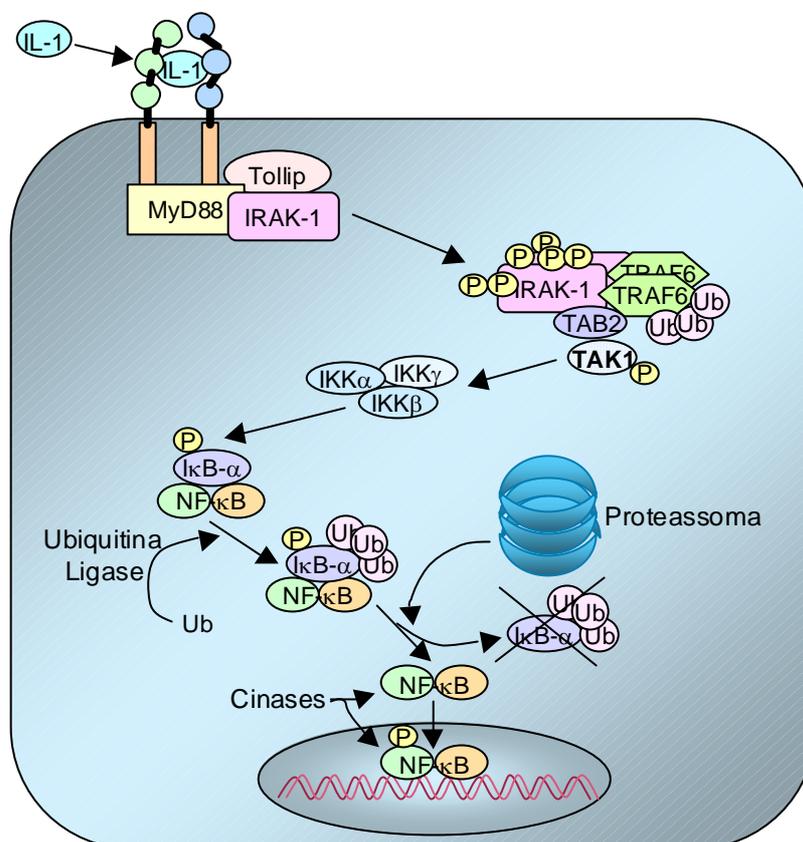


Figura 1.9. Activação do NF- κ B em resposta à ligação da IL-1 ao seu receptor. Em consequência da activação da TAK1, resultante da ligação da IL-1 ao receptor, ocorre a activação do complexo IKK, directamente ou através de outros mediadores, e a fosforilação subsequente das proteínas I κ B, particularmente do I κ B- α . Na forma fosforilada, o I κ B- α torna-se acessível à acção de uma “ubiquitina ligase” que lhe adiciona resíduos de ubiquitina, determinando, assim, a sua degradação pelo proteassoma. Ao ocorrer a degradação do I κ B- α , a sequência de localização nuclear dos dímeros NF- κ B é exposta, ocorrendo, então, a sua translocação para o núcleo, onde se ligam ao elemento κ B presente na região promotora dos genes alvo deste factor de transcrição. A transcrição desses genes pode envolver modificações adicionais das proteínas NF- κ B que aumentam a sua capacidade de activar a transcrição, independentemente da sua afinidade para o elemento κ B. Entre essas modificações, a fosforilação do RelA por diversas cinases citoplasmáticas e/ou nucleares, parece ser fundamental para a indução da sua actividade transcricional. IKK: cinase do I κ B; IL-1RI: receptor da IL-1 do tipo I; IL-1RAcP: proteína acessória do receptor da IL-1; IRAK-1: cinase 1 associada ao receptor da IL-1; NF- κ B: factor nuclear-kapaB; TAB: proteína que liga a cinase 1 activada pelo TGF- β ; TAK1: cinase-1 activada pelo TGF- β ; TRAF6: factor 6 associado ao receptor do TNF; Ub: ubiquitina. Adaptado de Martin e Wesche, 2002.

Alguns estímulos parecem ser capazes de activar o NF- κ B sem causarem a degradação do I κ B. O principal mecanismo envolvido parece ser a fosforilação do resíduo

de tirosina na posição 42 do I κ B- α , mas o processo responsável pela sua dissociação do complexo com o NF- κ B não é ainda conhecido, embora esse papel tenha sido atribuído à “cinase da posição 3 do fosfatidilinositol” (PI-3-K) (Béraud *et al.*, 1999).

O NF- κ B e o I κ B regulam-se mutuamente. A região promotora do gene que codifica a síntese do I κ B- α tem vários elementos κ B, de modo que a activação do NF- κ B promove a transcrição do gene e a síntese do I κ B- α (Ito *et al.*, 1994). Como o I κ B- α contém sequências de localização e de exportação nucleares, as moléculas recém-sintetizadas entram no núcleo, removem os complexos NF- κ B da sua ligação ao ADN e promovem o seu transporte de volta ao citoplasma, limitando, assim, a duração da resposta ao estímulo inicial (Chen e Ghosh, 1999). Por outro lado, entre os genes cuja expressão é regulada pelo NF- κ B, incluem-se o *nfkb1*, o *nfkb2* (que codificam a síntese do p105 e do p100, respectivamente) (Pahl, 1999) e o *relB* (Bren *et al.*, 2001). Assim, após um estímulo, os níveis citoplasmáticos de I κ B α e das próprias proteínas NF- κ B são restabelecidos, permitindo a subsequente activação do NF- κ B em resposta a um novo estímulo (Tzen *et al.*, 1994).

Por outro lado, muitos dos estímulos que activam o NF- κ B são reciprocamente regulados por este factor de transcrição. É o que acontece com a IL-1 e o TNF cujos genes são regulados pelo NF- κ B, de modo que ao activarem este factor de transcrição activam a sua própria síntese, desencadeando um ciclo que, na ausência de mecanismos compensatórios, se pode auto-perpetuar (Lee e Burckart, 1998). Um estudo recente identificou um mecanismo de auto-regulação que parece desempenhar um papel muito importante na regulação desse ciclo de activação (citocinas inflamatórias \leftrightarrow NF- κ B). Esse mecanismo consiste na expressão de uma família de proteínas designada por “Twist”, cuja transcrição é mediada pelo NF- κ B em resposta a citocinas inflamatórias como o TNF- α . Por sua vez, as proteínas “Twist” interagem com o RelA, funcionando como repressoras da sua actividade transcricional, impedindo, nomeadamente, a transcrição dos genes da IL-1 β e do TNF- α (Šošić *et al.*, 2003).

Apesar da interacção com o I κ B ser o principal mecanismo de regulação da actividade do NF- κ B, a fosforilação de vários resíduos de serina do RelA, por diversas cinases, parece desempenhar um papel especialmente importante na indução da actividade transcricional do NF- κ B. De facto, a activação da transcrição dos genes alvo

do NF- κ B, além de requerer a translocação para o núcleo e a afinidade dos dímeros para o elemento κ B na região promotora desses genes, parece depender igualmente de alterações das proteínas NF- κ B que lhes conferem a capacidade de activarem a transcrição (Ghosh e Karin, 2002; Vermeulen *et al.*, 2002). Por exemplo, a fosforilação do RelA no resíduo de serina 276, pela “cinase A de proteínas” (“cyclic AMP-dependent protein kinase”, PKA), permite a sua interacção com a proteína coactivadora CBP/300 e promove, assim, a actividade transcricional dos dímeros NF- κ B que contêm RelA (Zhong *et al.*, 1998).

Além da fosforilação do RelA e, provavelmente, também de outras proteínas desta família, outras modificações parecem contribuir para a actividade do NF- κ B, especialmente por modularem a translocação dos dímeros livres, a sua afinidade para o ADN e/ou a sua actividade transcricional. Esses mecanismos podem variar consoante a célula e o estímulo considerado, determinando, assim, a especificidade das respostas mediadas pelo NF- κ B, bem como a capacidade de diferentes estímulos para activarem este factor de transcrição em células diferentes (Chen e Ghosh, 1999; Lee e Burckart, 1998; Vermeulen *et al.*, 2002).

1.4.3.2. Funções fisiológicas e regulação do AP-1

O AP-1 foi primeiro identificado como sendo um factor de transcrição com afinidade para a região promotora do gene humano da metalotioneína IIa (Lee *et al.*, 1987). Esse local de ligação foi depois identificado como sendo o “elemento de resposta ao acetato de tetradecanoilforbol” (“tetradecanoylphorbol acetate-response element”, TRE) que se encontra na região promotora de muitos genes humanos. A comparação de vários TRE de genes diferentes permitiu identificar a sequência geral de nucleótidos especificamente reconhecida pelo AP-1, como sendo 5'-TGA G/C TCA-3' (TRE). A associação de vários destes elementos forma uma potente região activadora que é capaz de estimular a expressão de um dado gene, mesmo a grande distância da sua região de iniciação da transcrição (Angel e Karin, 1991).

A activação do AP-1 é induzida por muitos estímulos fisiológicos, incluindo factores de crescimento, como o TGF- β , o EGF e o PDGF, citocinas, especialmente a IL-1 e o TNF, neurotransmissores, hormonas, a interacção entre a célula e componentes

da matriz, e diversos tipos de stress físico e químico, nomeadamente agentes oxidantes e radiações ultra-violeta (Allen e Tresini, 2000; Angel e Karin, 1991; Shaulian e Karin, 2002).

O AP-1 regula muitos processos celulares importantes, como a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência ou a morte da célula, embora os genes envolvidos nestes processos não estejam ainda identificados na totalidade. O tipo de tecido e o estado de diferenciação da célula determinam o resultado final da activação do AP-1 que, em circunstâncias diferentes, pode mediar processos opostos, como a indução ou a inibição da apoptose e da proliferação celular (Shaulian e Karin, 2002). De modo análogo, o papel do AP-1 na expressão de um dado gene também parece depender do estímulo e do tipo de célula em causa. Não obstante, a activação do AP-1 parece ser um requisito geral imprescindível para ocorrer a transcrição dos genes das MMPs (Angel *et al.*, 1987), particularmente da colagenase-1 (Catterall *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002; Zafarullah *et al.*, 1992) e da colagenase-3 (Mengshol *et al.*, 2001; Tardif *et al.*, 2001) que são expressas em condrócitos articulares e em sinoviócitos. Paradoxalmente, o AP-1 foi também implicado na expressão do colagénio II, induzida pelo TGF- β em condrócitos articulares (Miyazaki *et al.*, 2000).

Por outro lado, alguns dos efeitos biológicos do AP-1 parecem resultar, não da activação, mas, pelo contrário, da inibição da expressão de alguns genes. Esse efeito pode depender da sua interacção com co-repressores da transcrição, bem como da natureza do local de ligação do AP-1 que pode apresentar variações estruturais em genes diferentes (Shaulian e Karin, 2002).

1.4.3.2.1. Estrutura, activação e regulação do AP-1

Designa-se por AP-1 uma família de factores de transcrição formada por homo e heterodímeros de proteínas das famílias Jun (c-Jun, JunB e JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra1 e Fra2) e “factor de transcrição activador” (“activating transcription factor”, ATF, que inclui as proteínas ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF, JDP1 e JDP2). As proteínas Jun formam heterodímeros muito estáveis com as proteínas das outras duas famílias (Fos e ATF) e são, também, capazes de formar homodímeros entre si. As proteínas Fos são as únicas que não formam homodímeros e, por isso, requerem a associação a uma proteína Jun para se ligarem ao ADN. Por outro lado, a associação das proteínas Fos e Jun origina

dímeros mais estáveis e portanto com maior actividade, do que os homodímeros das proteínas Jun (Angel e Karin, 1991). Os dímeros Jun:Jun e Jun:Fos têm afinidade preferencial para o TRE, enquanto os dímeros que contêm proteínas ATF (ATF:ATF e Jun:ATF) se ligam especialmente ao “elemento de resposta ao AMPc” (“cAMP-responsive element”, CRE).

Uma outra família de proteínas, designada por Maf (c-Maf, MafA, MafB, mafG/F/K e Nrl) foi recentemente acrescentada à família AP-1, por apresentar semelhanças na estrutura básica, na sequência de ADN para a qual têm afinidade e na capacidade de heterodimerização com proteínas Jun e Fos (Karin *et al.*, 1997; Shaulian e Karin, 2002).

Os diferentes dímeros AP-1 apresentam afinidades e capacidades de activação da transcrição distintas. O heterodímero c-Fos:c-Jun é o que apresenta maior afinidade para o elemento TRE e maior actividade transcricional. Os homodímeros de c-Jun são também muito eficazes como activadores da transcrição. Pelo contrário, os homodímeros de JunB e de JunD, apesar de terem afinidade para o TRE, são destituídos de actividade transcricional, só sendo eficazes quando associados a c-Fos. No entanto, os homodímeros de JunB activam eficazmente a transcrição quando interagem com promotores artificiais contendo múltiplos elementos TRE, o que sugere que este dímero pode participar na activação de um conjunto específico e limitado de genes cujas regiões promotoras contenham dois ou mais TRE adjacentes (Angel e Karin, 1991).

Por outro lado, os dímeros de JunB e JunD podem, antes, funcionar como inibidores da transcrição dependente do AP-1. Esse efeito inibitório pode resultar da competição com c-Jun pela ligação ao ADN, resultando na diminuição da transcrição do gene alvo, ou da formação de dímeros com c-Jun que, sendo menos eficazes como activadores da transcrição, levariam igualmente à redução da expressão do gene alvo. Este mecanismo pode ser importante na regulação da expressão do próprio *c-jun*, pois a expressão constitutiva de JunB e JunD pode reprimir a expressão do *c-jun*, mantendo-a num nível basal baixo, só revertido na presença de um estímulo adequado (Angel e Karin, 1991).

As funções das proteínas Fos são ainda menos conhecidas, embora alguns estudos sugiram que o c-Fos pode ser substituído por outros membros da sua família (Karin *et al.*, 1997).

Na célula em repouso, os níveis de AP-1 são, em geral, baixos e, dependendo do tipo de célula, apenas as proteínas c-Jun e JunD são habitualmente detectáveis. Consoante o estímulo, a transcrição dos genes da maior parte dos membros desta família é activada, embora com cinéticas diferentes. A consequência disso, é a formação de múltiplos complexos AP-1, cuja composição pode variar ao longo do tempo e também em função do estímulo e do tipo de célula (Woodgett *et al.*, 1995). Os vários dímeros podem regular de forma diferente a transcrição de genes específicos, desempenhando, assim, funções fisiológicas distintas (Karin *et al.*, 1997; Shaulian and Karin, 2002). Porém, não estão ainda esclarecidos os mecanismos que regulam a formação dos vários dímeros e as suas capacidades para interagirem com co-activadores ou com co-repressores e para activarem ou reprimirem a transcrição de um dado gene, em células diferentes e em resposta a estímulos distintos. A descoberta de novas proteínas incluídas na família dos factores de transcrição AP-1, aumentando o número de combinações possíveis entre todas elas, torna ainda mais complexa a compreensão desses mecanismos de regulação (Karin *et al.*, 1997).

A actividade do AP-1 é regulada através de modificações da quantidade e da actividade de cada uma das proteínas desta família. A quantidade de cada uma dessas proteínas é regulada por alterações da transcrição dos genes respectivos e da estabilidade dos seus ARNm e das próprias proteínas (Karin *et al.*, 1997; Shaulian e Karin, 2002). Por exemplo, a fosforilação, pelas MAPK, de resíduos de serina e treonina no terminal amínico do domínio de activação do c-Jun, reduz a sua ubiquitinação e, conseqüentemente, a sua degradação (Musti *et al.*, 1997).

A activação das proteínas da família AP-1, em resposta a numerosos estímulos, envolve a activação de várias cascatas de sinalização, incluindo as três subfamílias principais das MAPK que, por seu lado, fosforilam diversas proteínas que funcionam como factores de transcrição, aumentando a expressão e actividade das proteínas AP-1 (Figura 1.10). A importância relativa de cada uma dessas cascatas de activação depende do gene considerado e varia em função do estímulo e do tipo de célula (Chang e Karin, 2001).

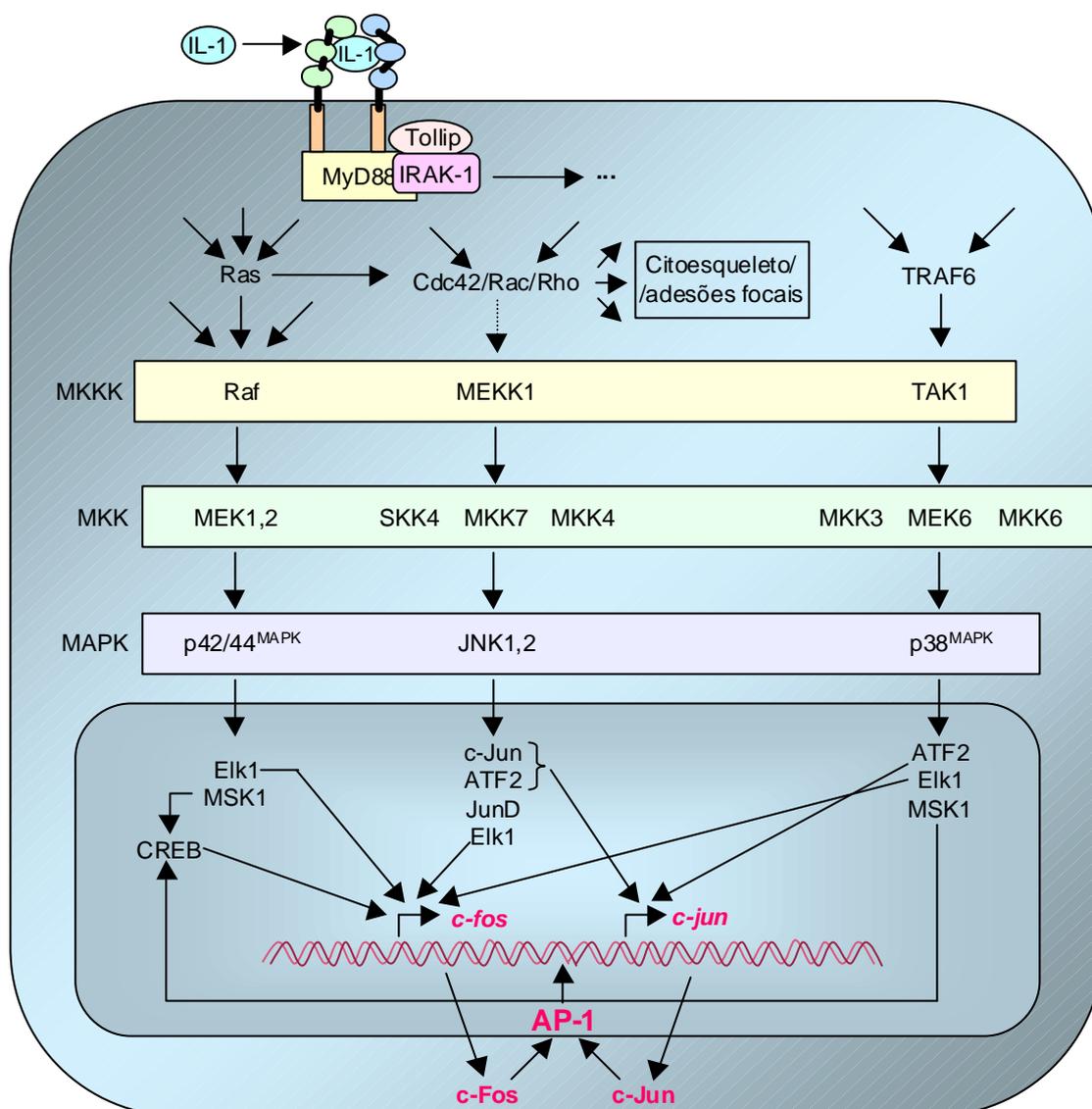


Figura 1.10. Mecanismos de ativação do AP-1 em resposta à IL-1. Ativação das três principais MAPK em resposta à IL-1. Embora os processos e moléculas que ligam o receptor da IL-1 ativado a estas cascatas de sinalização não estejam ainda esclarecidos, sabe-se que a ativação de pequenas proteínas G, como a Ras e a Rac/Rho, e a TRAF6 participam, em muitas células, na ativação das MKKK que, por seu turno, ativam as MKK que, então, ativam as MAPK. Estas, ao serem fosforiladas, deslocam-se para o núcleo onde fosforilam factores de transcrição que desencadeiam a transcrição dos genes que codificam a síntese das subunidades que constituem o AP-1. O AP-1 recém-sintetizado interage com o TRE presente na região promotora dos genes alvo promovendo a sua transcrição. AP-1: proteína activadora-1; IL-1RI: receptor da IL-1 do tipo I; IL-1RAcP: proteína acessória do receptor da IL-1; IRAK-1: cinase 1 associada ao receptor da IL-1; JNK: cinase do terminal amínico da proteína c-Jun; MAPK: cinases de proteínas activadas por mitogénios; MKK ou MEK: cinase das MAPK; MKKK: cinase da cinase das MAPK; MSK1: cinase de proteínas activada por mitogénios e stress; TAK1: cinase-1 activada pelo TGF- β ; TRAF6: factor 6 associado ao receptor do TNF. Adaptado de Herlaar e Brown, 1999.

Um dos principais mecanismos envolvidos na activação do AP-1 em resposta à IL-1 e a outras citocinas pró-inflamatórias, utiliza várias cascatas de sinalização que culminam na activação das MAPK, JNK e p38. A activação das JNKs promove a sua translocação para o núcleo, onde fosforilam quer o c-Jun preexistente, quer a proteína ATF2. Na forma fosforilada, o c-Jun adquire actividade transcricional e, sob a forma de homodímero ou de heterodímero com c-Fos ou com ATF2, promove a expressão do seu próprio gene. A p38^{MAPK} também activa o ATF2, contribuindo, assim, para a indução da expressão do *c-jun*. A JNK fosforila, ainda, o JunD, embora seja menos eficaz do que em relação ao c-Jun. O JunB não é fosforilado, mas ao associar-se ao JunD facilita a fosforilação deste último, o mesmo acontecendo com a interacção c-Jun:JunD (Karin *et al.*, 1997; Shaulian e Karin, 2002).

A transcrição do *c-fos* é induzida por activação de vários factores de transcrição, entre os quais é especialmente relevante o “factor de resposta ao soro” (“serum-response factor”, SRF) que recruta outros factores, designadamente “ternary complex factors” (TCFs), para então activar o “elemento de resposta ao soro” (“serum response element”, SRE) presente na região promotora daquele gene. Entre esses TCFs, o factor Elk-1 é importante para a expressão do *c-fos*, sendo activado pela p42/44^{MAPK}. A JNK e a p38^{MAPK} também promovem a activação do Elk-1, por fosforilarem um subconjunto dos resíduos de aminoácidos que lhe conferem actividade transcricional (Karin *et al.*, 1997).

Por outro lado, a p38^{MAPK} e a p42/44^{MAPK} activam uma outra cinase, a “cinase de proteínas activada por mitogénios e stress”-1 (“mitogen- and stress-activated protein kinase”-1, MSK1), que, por sua vez, activa o factor de transcrição CREB (Deak *et al.*, 1998). Como a transcrição do *c-fos* pode ser activada por ligação do CREB a um elemento CRE presente na sua região promotora (Karin *et al.*, 1997), a activação da MSK1, pela p38^{MAPK} e pela p42/44^{MAPK}, pode ser um mecanismo importante para a expressão do *c-fos* em resposta a estímulos que activam estas MAPK, como acontece, por exemplo, com a IL-1 em condrócitos articulares (Geng *et al.*, 1996; Scherle *et al.*, 1997).

A actividade das proteínas que constituem o AP-1 é modificada por interacção com outras proteínas. Dessas interacções pode resultar a diminuição ou o aumento da sua actividade transcricional. O receptor de glucocorticóides, ele próprio funcionando como factor de transcrição, é considerado o inibidor mais eficiente da actividade do AP-1,

embora o mecanismo envolvido ainda não esteja bem esclarecido (Karin *et al.*, 1997). Pelo contrário, a interacção do c-Jun e do JunD, mas não do JunB, com a “proteína que se liga ao domínio de activação das proteínas Jun” 1 (“Jun activation domain binding protein” 1, JAB1) aumenta a actividade transcricional daquelas proteínas por estabilizar a sua ligação ao TRE dos genes alvo (Claret *et al.*, 1996). Assim, a interacção selectiva das várias proteínas que constituem o AP-1 com proteínas co-activadoras ou co-repressoras parece ser um mecanismo fundamental que, juntamente com a expressão diferencial das várias proteínas desta família, determina a especificidade das respostas geradas por activação do AP-1 (Karin *et al.*, 1997; Shaulian e Karin, 2002).

1.4.4. Biossíntese e funções do NO como mediador das acções da IL-1 em condrócitos articulares

Em 1980, Furchgott e Zawadzki descreveram um factor produzido por células endoteliais que promovia o relaxamento das células musculares lisas vasculares. Alguns anos depois, esse factor, inicialmente denominado “factor relaxante derivado do endotélio” (“Endothelial-derived relaxing factor”, EDRF), foi identificado como sendo o NO (Ignarro *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987).

O NO é um pequeno radical livre (\bullet NO) que se difunde facilmente através das membranas biológicas, atingindo assim os seus alvos moleculares. Ao contrário dos mediadores intercelulares convencionais, o NO não actua por interacção com um receptor específico, mas antes modifica as moléculas alvo, através de uma grande variedade de reacções químicas. O tipo de reacção que ocorre num determinado momento e num tecido concreto, depende da concentração de NO nesse tecido, bem como de variações, por vezes subtis, na composição do meio intra e extracelular (Gross e Wolin, 1995; Janero, 2000). As reacções mais importantes através das quais o NO exerce as suas acções fisiopatológicas são a reacção com iões metálicos associados a proteínas e a reacção com ROS e radicais livres lipídicos. Os efeitos resultantes dessas reacções podem ser benéficos e desempenhar funções fisiológicas importantes, como acontece com a activação da guanilato ciclase que resulta da reacção do NO com o Fe(II) da enzima, ou com a supressão da peroxidação lipídica por titulação dos radicais livres lipídicos pelo NO. Porém, as mesmas reacções também podem ser prejudiciais. É o que

acontece com a inibição de enzimas antioxidantes, como a catalase e a “oxidase do citocromo c”, que ocorre através do mesmo mecanismo que promove a activação da guanilato ciclase, ou com a produção de peroxinitrito (um potente agente oxidante capaz de reagir com a maioria das biomoléculas) que resulta da reacção do NO com o radical anião superóxido (Janero *et al.*, 2000).

Esta multiplicidade de reacções permite ao NO, actuando como mediador autócrino ou parácrino, modular uma grande variedade de funções celulares que, nalguns casos, se traduzem em efeitos fisiológicos benéficos e, noutros, em respostas catabólicas que contribuem para o desenvolvimento e progressão de muitas doenças. Quando produzido em quantidades adequadas, por exemplo por células endoteliais, neurónios ou macrófagos, contribui para a regulação da tensão arterial, para a comunicação neuronal e para a defesa imunológica. Por isso, a produção insuficiente de NO está associada à hipertensão, a várias situações patológicas em que ocorre vasoconstrição pulmonar e à aterosclerose (Janero, 2000; Mizutani e Layon, 1996).

No extremo oposto, a produção excessiva e persistente de NO tem sido implicada como agente causal ou que, pelo menos, contribui significativamente para os mecanismos patogénicos envolvidos num grande número de doenças muito diferentes entre si e em que se incluem o choque vascular, o enfarte do miocárdio, a diabetes, síndromes de isquémia-reperfusão, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias agudas e crónicas, com especial destaque para as artrites (Gross e Wolin, 1995; Janero, 2000).

Entre os primeiros estudos que sugeriram a possibilidade de o NO contribuir para a fisiopatologia das doenças artríticas, contam-se diversos trabalhos em que inibidores da síntese de NO reduziram eficazmente os sinais inflamatórios e a degradação da cartilagem, em modelos animais de diversos tipos de artrite (Cuzzocrea *et al.*, 2002; McCartney-Francis *et al.*, 1993; Pelletier *et al.*, 1998a; Santos *et al.*, 1997; Stefanovic-Racic *et al.*, 1994b; Weinberg *et al.*, 1994). Outro estudo importante mostrou que as concentrações de nitrito (um produto da oxidação espontânea do NO), no líquido sinovial e no soro de doentes com artrite reumatóide e com osteoartrite, são mais elevadas do que em indivíduos saudáveis, comparados em função da idade e do sexo (Farrell *et al.*, 1992). Entretanto, outros estudos mostraram que os condrócitos são as células articulares que produzem maior quantidade de NO em resposta a estímulos

pró-inflamatórios como a IL-1, o TNF e o interferon- γ (Grabowski *et al.*, 1996; Palmer *et al.*, 1993; Stadler *et al.*, 1991). Além disso, enquanto a produção de NO, por sinoviócitos e osteoblastos, requer a acção conjunta de duas ou mais dessas citocinas, os condrócitos respondem com igual eficácia a uma só, quer seja a IL-1, quer o TNF (Grabowski *et al.*, 1996). Mais ainda, culturas de condrócitos ou de fragmentos de cartilagem provenientes de doentes com osteoartrite (Pelletier *et al.*, 1996) e com artrite reumatóide (Sakurai *et al.*, 1995) produzem NO espontaneamente.

A nível celular, o NO medeia muitas das respostas catabólicas induzidas pela IL-1 em condrócitos articulares, designadamente a inibição da proliferação celular (Blanco e Lotz, 1995), a inibição da síntese de proteoglicanos (Häuselmann *et al.*, 1994b; Taskiran *et al.*, 1994) e do IL-1Ra (Pelletier *et al.*, 1996), a indução da apoptose (Blanco *et al.*, 1995b) e a expressão da colagenase (Lo *et al.*, 1998). O NO também inibe a migração e a adesão dos condrócitos à fibronectina (Frenckel *et al.*, 1996) e a formação de adesões focais (Clancy *et al.*, 1997). A ruptura da interacção dos condrócitos com a matriz pode contribuir para os efeitos catabólicos do NO, nomeadamente por dificultar a reparação de zonas da cartilagem lesadas (Frenckel *et al.*, 1996) e por inibir a síntese de proteoglicanos (Clancy *et al.*, 1997). Outros efeitos do NO, em condrócitos articulares, são ainda controversos. Por exemplo, um estudo de Blanco e Lotz (1995) indica que a produção de prostaglandina E₂, induzida pela IL-1, depende da síntese de NO, enquanto Henrotin e colaboradores (1998) verificaram que o NO produzido em resposta à IL-1 reduz a síntese daquele autacóide, apesar de ambos os estudos utilizarem condrócitos humanos e condições de cultura aparentemente semelhantes.

Dada a multiplicidade de alvos moleculares, funções e efeitos potencialmente nocivos do NO, a sua produção requer mecanismos precisos de regulação. Três isoformas da sintase do NO (NOS, “L-arginina, NADPH:oxigénio oxidoreductases formadoras de NO”; EC 1.14.13.39) são actualmente reconhecidas como as enzimas fundamentais na regulação da produção de NO, em diferentes tipos de células e situações fisiopatológicas. Todas elas catalisam a oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO, utilizando como co-substratos o “fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenina” (NADPH) e o oxigénio e como co-factores o “dinucleótido de flavina e adenina” (FAD), o “mononucleótido de flavina” (FMN) e a tetrahydrobiopterina (BH₄) (Figura 1.11) (Knowles e Moncada, 1994; Mizutani e Layon, 1996).

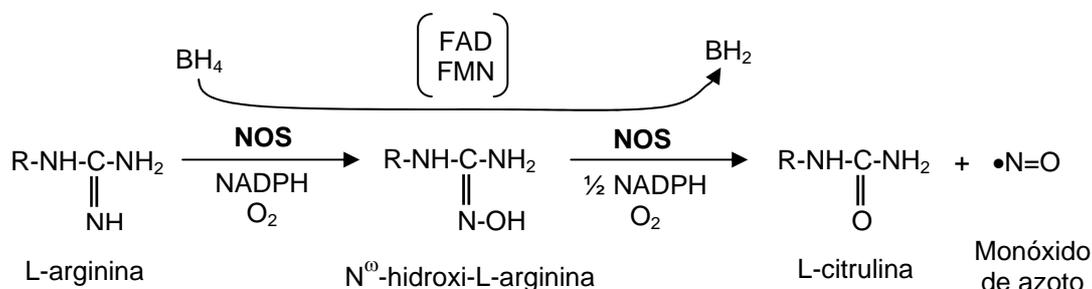


Figura 1.11. Reacção de oxidação da L-arginina a L-citrulina e NO por acção da NOS, utilizando como substratos o NADPH (fosfato do dinucleótido de nicotinamida e adenina) e o oxigénio e como co-factores a BH_4 (tetrahydrobiopterina), o FAD (dinucleótido de flavina e adenina) e o FMN (mononucleótido de flavina). Segundo Knowles e Moncada, 1994 e Mizutani e Layon, 1996.

A isoforma I (também designada por isoforma *neuronal*, nNOS, ou *neuronal e constitutiva*, ncNOS) e a isoforma III (isoforma *endotelial* ou *endotelial e constitutiva*, eNOS ou ecNOS) são expressas de forma constitutiva, especialmente em neurónios e em células endoteliais arteriais e venosas, respectivamente. As duas enzimas produzem pequenas quantidades de NO, sendo a sua actividade regulada pela concentração intracelular de Ca^{2+} e pela calmodulina (Förstermann e Kleinert, 1995; Förstermann *et al.*, 1998; Nathan e Xie, 1994). Embora a expressão destas duas isoformas seja constitutiva, estudos recentes indicam que vários estímulos a podem regular, positiva (López-Ongil *et al.*, 1998; Ritter *et al.*, 2003; Stallmeyer *et al.*, 2002) ou negativamente (Reiling *et al.*, 1994; Stallmeyer *et al.*, 2002; Yoshizumi *et al.*, 1993), com consequências fisiológicas e patológicas importantes.

A outra isoforma, designada por NOS II, isoforma *indutível* (iNOS) ou de *macrófagos* (mac-NOS), distingue-se das constitutivas por produzir grandes quantidades de NO, durante períodos de tempo prolongados e por a sua actividade ser essencialmente independente da concentração intracelular de Ca^{2+} . A NOS II é regulada sobretudo a nível da transcrição, embora a estabilidade do ARNm possa ser aumentada ou diminuída, alterando conseqüentemente a síntese da proteína que, por sua vez, também pode sofrer alterações que modificam a sua actividade (Förstermann e Kleinert, 1995; Knowles e Moncada, 1994; Nathan e Xie, 1994).

A expressão da NOS II é induzida em inúmeras células animais e humanas por muitos estímulos, especialmente de natureza imunológica e inflamatória, incluindo várias

citocinas e muitos outros agentes endógenos e exógenos, entre os quais, o lipopolissacarídeo da parede de bactérias Gram-negativas (LPS) é um dos estímulos mais potentes (Förstermann e Kleinert, 1995; Knowles e Moncada, 1994; Nathan e Xie, 1994).

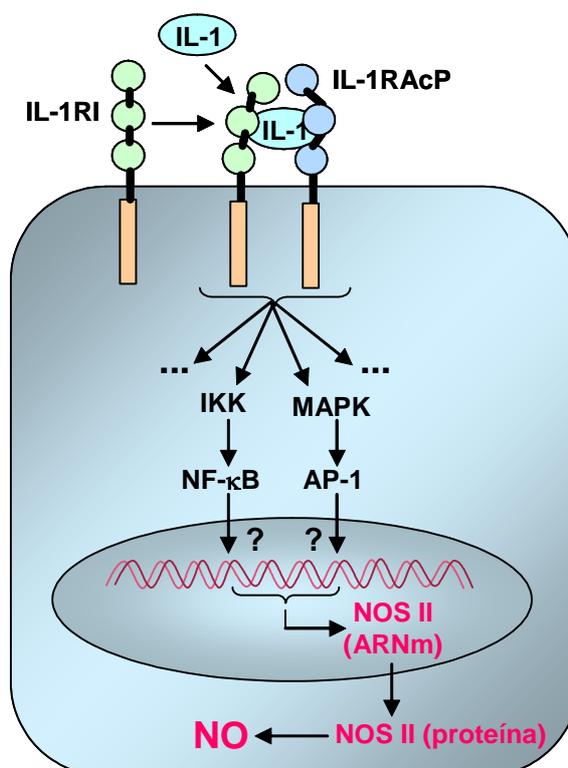


Figura 1.12. Regulação da transcrição do gene da NOS II em resposta à IL-1. A ligação da IL-1 ao seu receptor activa diversas cascatas de sinalização intracelulares que culminam na activação de vários factores de transcrição, nomeadamente o NF- κ B e o AP-1. A região promotora do gene da NOS II contém locais de ligação para diversos factores de transcrição, incluindo o NF- κ B e o AP-1, mas o papel de cada um deles na transcrição do gene da NOS II depende do tipo de célula considerado. AP-1, “proteína activadora-1”; IL-1RI, receptor da IL-1 do tipo I, IL-1RAcP, proteína acessória do receptor da IL-1; IKK, complexo da cinase do I κ B; MAPK, cinases de proteínas activadas por mitogénios; NF- κ B, factor nuclear- κ B, NOS II, isoforma II ou indutível da sintase do NO. Adaptado de Martin e Wesche, 2002.

A região promotora do gene da NOS II humano e de várias outras espécies contém locais de ligação para diversos factores de transcrição, incluindo o NF- κ B e o AP-1 (Chu *et al.*, 1998; Kinugawa *et al.*, 1997; Lowenstein *et al.*, 1993; Spitsin *et al.*, 1996; Xie *et al.*, 1993) (Figura 1.12). Entre esses, o NF- κ B parece ser essencial para

ocorrer a expressão da NOS II na maioria das células e em resposta à maioria dos estímulos (Eberhardt *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1994), embora não seja um requisito universal (Kleinert *et al.*, 1998a).

A regulação da expressão da NOS II parece ser bastante complexa e variar consoante o tipo de célula e o estímulo considerado. Células diferentes podem usar vias de sinalização distintas para induzirem a expressão da NOS II, em resposta a um dado estímulo, mas, na maior parte dos casos, essas vias de sinalização acabam por convergir na activação de alguns factores de transcrição essenciais, nomeadamente o NF- κ B (Förstermann e Kleinert, 1995; Pfeilschifter *et al.*, 1996). Porém, a expressão da NOS II é, provavelmente, o resultado de interacções complexas entre vários factores de transcrição (Hecker *et al.*, 1997; Kinugawa *et al.* 1997; Marks-Konczalik *et al.*, 1998), de modo que, em células distintas, podem ser necessários diferentes conjuntos de factores de transcrição para activarem a expressão da NOS II. A resposta a um dado estímulo dependerá, conseqüentemente, da sua capacidade para activar o conjunto de factores de transcrição adequado. Assim, as interacções entre factores de transcrição diferentes podem constituir um mecanismo importante, subjacente à variabilidade da regulação da expressão da NOS II, em células diferentes e em resposta a estímulos distintos (Marks-Konczalik *et al.*, 1998).

Provavelmente, é por esta razão que alguns estímulos são capazes de induzir a expressão da NOS II por si sós, enquanto muitos outros requerem associações sinérgicas. O interferon- γ , por exemplo, induz a expressão da NOS II, por si só, nalgumas células, mas noutras requer a associação com outras citocinas, como a IL-1 e o TNF. A IL-1, pelo contrário, é um dos estímulos que induz a expressão da NOS II de forma mais potente e por si só, numa grande variedade de células e tecidos (Zídek, 2001), nomeadamente em condrócitos articulares humanos e de várias outras espécies, promovendo a síntese de grandes quantidades de NO (Stadler *et al.*, 1991; Palmer *et al.*, 1993).

1.5. OBJECTIVOS E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Considerando as múltiplas funções do NO como mediador das respostas induzidas pela IL-1, especialmente no que respeita à fisiopatologia das doenças artríticas, o conhecimento dos mecanismos que regulam a sua síntese assume grande importância, quer do ponto de vista fisiopatológico, quer terapêutico (Pfeilschifter *et al.*, 1996; St. Clair, 1998).

O principal objectivo do presente trabalho foi, por isso, estudar o papel dos factores de transcrição NF- κ B e AP-1 na expressão da NOS II, induzida pela IL-1 em condrócitos articulares. Em segundo lugar, mas intimamente relacionado com o primeiro objectivo, procurámos identificar mecanismos celulares envolvidos na activação daqueles dois factores de transcrição e na expressão da NOS II em resposta à IL-1, designadamente estudando o papel das espécies reactivas de oxigénio, das “cinases de resíduos de tirosina” e das “cinases de proteínas activadas por mitogénios” como mediadores dessas respostas.

Outro objectivo deste trabalho prendeu-se com a identificação de possíveis mecanismos de regulação da expressão da NOS II, envolvendo processos de retroalimentação positiva ou negativa, gerados pelo próprio NO. Para isso, estudámos o papel do NO na activação do NF- κ B e do AP-1 e na expressão da própria NOS II.

A diacereína e o seu metabolito activo, a réina, são dois fármacos utilizados na terapêutica da osteoartrite (Taccoen e Berdah, 1993; Nguyen *et al.*, 1994), mas cujo mecanismo de acção está ainda mal caracterizado. Assim, foi também objectivo deste trabalho contribuir para um melhor conhecimento do mecanismo de acção destes dois fármacos, concretamente estudando a sua capacidade para inibirem a activação do NF- κ B e a expressão da NOS II, induzidas pela IL-1, em condrócitos articulares.

O trabalho experimental correspondente a estes objectivos foi realizado em culturas primárias de condrócitos articulares bovinos, em monocamada confluenta. Nestas condições, os condrócitos não proliferam, mantendo o seu fenótipo diferenciado, característico de condrócitos articulares, e constituindo, por isso, um modelo adequado para o estudo do seu metabolismo (Demignot *et al.*, 1995; Galéra *et al.*, 1992). Na maior parte dos estudos realizados e depois de um período inicial de recuperação após o isolamento, os condrócitos foram cultivados na ausência de soro, de modo a eliminar

efeitos metabólicos exercidos por factores séricos que poderiam mascarar os induzidos pela IL-1. Desde que a densidade celular na cultura seja elevada, os condrócitos cultivados em meio isento de soro, mantêm-se viáveis durante várias semanas (Ishizaki *et al.*, 1994).

Para estes estudos, utilizámos a citocina IL-1 β (que passaremos a designar apenas por IL-1) por ser a isoforma da IL-1 habitualmente segregada e mais importante como mediador intercelular (Dinarello, 1996).

Nos capítulos seguintes e depois de uma breve descrição dos métodos e materiais utilizados na realização do trabalho (capítulo 2), começaremos por caracterizar a expressão e actividade da NOS II em função do tempo de incubação e da concentração de IL-1, seguindo-se a detecção das formas activadas do NF- κ B e do AP-1 e a identificação das subunidades proteicas constituintes dos dímeros respectivos, activados pela IL-1 (capítulo 3).

O capítulo 4, dividido em quatro partes, é dedicado ao estudo de mecanismos celulares envolvidos na activação do NF- κ B em resposta à IL-1 e ao papel deste factor de transcrição na expressão da NOS II. Ainda neste capítulo, incluiu-se o estudo relativo à capacidade da diacereína e da reína para impedirem a activação do NF- κ B e a expressão da NOS II.

Na primeira parte do capítulo 5, é estudado o papel das ROS e do NO na activação do AP-1 induzida pela IL-1, enquanto na segunda parte do mesmo capítulo, é avaliado o papel deste factor de transcrição na expressão da NOS II.

Para concluir, o capítulo 6 procura fazer a súmula do trabalho apresentado e unificar as conclusões parcelares, enunciadas nos capítulos precedentes.