

**ANGÉLICA ROSSI SARTORI**

***PARTICIPAÇÃO DO HIF-1 $\alpha$  NA EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO II  
E AGRECANO NA CARTILAGEM ARTICULAR MEDIADA  
PELA IL-1 $\beta$  E TNF $\alpha$ .***

**CAMPINAS**

**2009**

**ANGÉLICA ROSSI SARTORI**

***PARTICIPAÇÃO DO HIF-1 $\alpha$  NA EXPRESSÃO DE COLÁGENO TIPO II  
E AGRECANO NA CARTILAGEM ARTICULAR MEDIADA  
PELA IL-1 $\beta$  E TNF $\alpha$ .***

Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutora em Clínica Médica, na área de Ciências Básicas.

***Orientador: Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra***

**CAMPINAS**

**2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa77p Sartori, Angélica Rossi  
Participação do HIF-1  $\alpha$  na expressão de colágeno tipo II e  
agrecano na cartilagem articular mediada pela IL-1 $\beta$  e TNF  $\alpha$  /  
Angélica Rossi Sartori. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Ibsen Bellini Coimbra  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Osteoartrite. 2. Cartilagem articular. 3. Interleucina - 1 beta.  
4. Fator de necrose tumoral. I. Coimbra, Ibsen Bellini. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.  
III. Título.

**Título em inglês: The participation of HIF-1  $\alpha$  in collagen type II and  
aggrecan expression on articular cartilage mediated by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$   
cytokines**

**Keywords:** • Osteoarthritis  
• Articular cartilage  
• IL-1 beta  
• TNF - alpha

**Titulação: Doutor em Clínica Médica**  
**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra**  
**Prof. Dr. Natalino Yoshinari**  
**Profa. Dra. Márcia de Rezende Uchoa**  
**Prof. Dr. Lício Augusto Velloso**  
**Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**

**Data da defesa: 20-02-2009**

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

**[BANCA EXAMINADORA]**

---

# Banca examinadora da tese de Doutorado

Angélica Rossi Sartori

---

---

Orientador: Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

---

---

## Membros:

---

1. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Uchoa de Rezende

2. Prof. Dr. Natalino Yoshinari

3. Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Cecilia Botelho Costa

4. Prof. Dr. Licio Augusto Velloso

5. Prof. Dr. Ibsen Bellini Coimbra

---

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 20/02/2009

---

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [DEDICATÓRIA]

À minha amada família!

À minha mãe Gessi, que apesar da partida precoce para a convivência com os anjos, deixou em mim o conhecimento de que não basta “ter” uma família, é preciso “ser” uma família. E para isso deve-se compreender exatamente o significado das palavras respeito, tolerância e perdão, mas principalmente, e também talvez o mais difícil, quando aprendemos a aplicá-las em nossas vidas.

Ao meu pai Luiz “Sartori”, meu porto seguro, meu exemplo de vida, meu eterno mestre para as dúvidas sobre ciência, religião e principalmente as dúvidas e incertezas sobre a vida. Sua história me impressiona e me dá forças para continuar a escrever a minha, me incentivando a sempre lutar e jamais abandonar a guerra, mesmo após uma ou algumas derrotas. Você nunca deixou o pilar dessa família se abalar, nem nos momentos dos mais intensos terremotos! Muito Obrigada!

Albert Einstein já disse: “A ciência sem a religião é manca; a religião sem a ciência é cega”. Quanto mais conheço os detalhes biológicos do ser humano, mais me aproximo de Deus! Você me guia pelos caminhos certos e nunca deixou de se manifestar em minha vida! Obrigada!

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [AGRADECIMENTOS ESPECIAIS]



Ao Professor Ibsen, que tão bem me recebeu e me orientou em todos esses anos de convivência. Seus ensinamentos ultrapassaram os limites do laboratório! Um exemplo de amor e luta pela vida! Parabéns Professor! Com certeza a vida ainda lhe surpreenderá com muitas alegrias!

Aos meus queridos avôs, Antônio e Sebastiana, os coadjuvantes mais principais de toda essa história. Suas histórias de vida e batalhas também me impressionam e me orgulham muito. Vocês são os verdadeiros doutores das Ciências da Vida! Vô Antônio, seu gosto pela leitura me influenciou desde que me conheço por gente, quando ficava ao pé de sua máquina de costura trocando idéias sobre as histórias de Machado de Assis! E agora, em sua memória dedico esse trabalho! Vó, a senhora é a pessoa mais pura que já conheci, não vê maldade em absolutamente ninguém e apesar da pouca familiaridade com os estudos, sempre demonstra boa vontade pra entender todas as nossas conversas e muitas vezes é bem sucedida!

Ao meu irmão Lucas, parceiro e cúmplice das alegrias e tristezas desde sempre. Fico orgulhosa de seguiremos os meus passos. Ainda formaremos uma dupla de cientistas imbatíveis!

Ao Denny, meu marido e companheiro nos diversos momentos desde o início dessa jornada, inclusive me ajudando no laboratório! Exemplo de amor e dedicação à ciência. Você me transmitiu esse sentimento e foi, sem dúvida, a peça fundamental no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada!

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [AGRADECIMENTOS]

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, que forneceu toda a estrutura necessária e me acolheu! Tenho muito orgulho de ter feito parte dessa comunidade!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, que também acreditou nesse trabalho e me ofereceu uma vida digna para que eu pudesse concluí-lo!

Aos médicos, em especial ao André Andrade e Márcio Pedro, e pacientes que concordaram em participar do estudo doando as cartilagens!

Ao professor Lício Velloso, que sempre se preocupou com nosso bem estar, meu e da minha família, desde nossa chegada à UNICAMP! Como bem diz a minha sábia avó: “O mundo só não acabou ainda, graças a pessoas como você”! Muito Obrigada!

À Cristiane Sampaio, companheira e cúmplice dos problemas e conquistas no laboratório. Que nunca mediu esforços para me ajudar e ficava feliz com os meus resultados positivos e compartilhava a tristeza quando, após uma semana de luta na bancada, não saía uma bandinha sequer no filme... Obrigada Cris!

À Jussara Redher, com quem aprendi praticamente tudo sobre bancada, e principalmente, como salvar um experimento quase perdido. Com você entendi exatamente o significado da frase: “Só não se dá jeito para a morte!”. Basta ter calma e saber exatamente o que se está fazendo! Mais que conhecimentos técnicos, você me transmitiu conhecimentos para a vida e me acolheu em sua

casa, com sua família! Jamais esquecerei tudo de bom passamos juntas! Obrigada!

À Roseneide Conde, Rose, que também me ensinou muito sobre técnicas de bancada e com quem também dividi muitos problemas e alegrias profissionais e familiares! Obrigada Rose!

Aos alunos do laboratório do professor Antonio Condino Neto, que compartilharam comigo os primeiros passos na biologia molecular e que não se importaram em dividir os espaços na bancada e os equipamentos do laboratório. Depois de alguns cafés na copinha, acabaram se tornando grandes amigos. Obrigada Carolina Almeida (Caru), Edgar, Juliana, Patrícia, Daniela.

À Carolina Cardoso Prando (Cacá) que não mediu esforços para me ajudar a entender o que era esse bendito “primer”, a que todos na UNICAMP se referiam com tanta familiaridade e que me tirava o sono. Acabou também se tornando uma amiga, confidente e companheira em todos os momentos. Muito obrigada querida!

Ao professor Antônio Condino Neto que disponibilizou seu laboratório para o início dos experimentos, quando ainda não existia fisicamente o nosso laboratório de Biologia Molecular de Cartilagem.

À Profa. Iscia Lopes Cendes e seus alunos do Departamento de Genética, por cederem o equipamento e os ensinamentos para a realização das análises em tempo real e à Profa Heloisa Blotta e seus alunos do Departamento de Patologia Clínica por ceder os equipamentos do seu laboratório.

Aos companheiros de laboratório, o estagiário Luciano que me ensinou a trabalhar a cartilagem e à bióloga Carolina Zuliani pela disposição em ajudar sempre. Acabaram também se tornando amigos queridos. Muito obrigada!

À Juliana Contin Moraes companheira desde nossa chegada à Campinas. Sua ajuda foi essencial na aquisição das melhores imagens desse trabalho. Muito Obrigada!

Ao meu filho Pedro, que ainda no meu ventre, ficava feliz comigo quando um experimento tinha resultado positivo e que com apenas dois meses de vida, dormia sob a bancada e na sua grande tranquilidade me permitia trabalhar feliz, por ter aquele anjo juntinho de mim!

Ao Centro de Convivência Infantil (CECI), que acolheu o Pedro com apenas três meses de vida e me passou tanta confiança e tranquilidade! Vocês me ensinaram muito a ser mãe e são o exemplo de que profissionalismo e amor são suficientes para o desenvolvimento desse trabalho tão maravilhoso que exercem! Eu, Dennys e Pedro tivemos essa oportunidade única e somos muito gratos por isso!

À equipe de limpeza dos laboratórios, seus serviços são fundamentais sempre, em especial à Vilma, Cida, Branca e Elaine!

À minha tia Geni, que amo de paixão e que participou ativamente no momento mais feliz e ao mesmo tempo mais difícil da minha vida, o nascimento do Pedro. Não deixou a peteca cair, mesmo nas longas horas de choro de mãe e filho! Muito Obrigada Tia!

Às minhas tias Jacira, Julieta, Júlia, Maria, obrigada pelas palavras de carinho, pelos colos e pelos cafés e pães de queijo maravilhosos!

À minha prima-irmã Isaura, Isa, mais irmã que prima, mais amiga que irmã! Que sempre acreditou na minha capacidade e sempre me fez sentir orgulho do que faço. Impossível sair triste depois de alguns minutos com você. Sempre digo e repito, se você não existisse teríamos que te inventar! Deus em sua imensa sabedoria, sabia que ficaria difícil nos mandar para esse mundo pela mesma mãe, então nos mandou para mães irmãs e nos fez entender rapidamente o quão ligadas nós somos! Abraço especial ao Gustavo por te fazer tão feliz. Muito Obrigada!

Ao meu primo querido Carlos Eduardo (Cadu) que me deu o primeiro abraço de parabéns quando lhe contei minha intenção de ir para a UNICAMP! Foi em sua memória meu amigo, que vivi todos esses anos para a realização desse trabalho. Jamais esqueci aquele abraço!

À minha BOAdrasta Dedé, presente em todos os momentos e principalmente agora, para finalização desse trabalho, pelos serviços mais que perfeitos de babá! Obrigada!

À prima Julieta (Jú ou Juletinha), não adianta, não vou esquecer o apelido de infância! Obrigada pela confiança e parceria sempre!

Às minhas cunhadas Tita, Jack e Cris, obrigada pelo apoio sempre!

Aos queridos Josi e Rubão que nos acolheram em Campinas, ajudaram a achar apartamento e se preocuparam e preocupam muito com nosso bem estar! Muito obrigada.

Aos amigos da graduação e mestrado, longe fisicamente, mas muito perto do coração! Estela, Vanessa, Graciana, Renne, Marden, Gustavo, Andreza, Walquíria, Juliana. O sucesso de vocês, também é meu sucesso.

À amiga Cláudia Lacerda, sempre com um sorriso no rosto e o coração aberto! Você é linda em todos os aspectos. Entendo sua presença em nossas vidas como uma manifestação amorosa de Deus!

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [SUMÁRIO]



|                                                                                                                                                 |              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Resumo.....</b>                                                                                                                              | <b>xxvii</b> |
| <b>Abstract.....</b>                                                                                                                            | <b>xxix</b>  |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                        | <b>32</b>    |
| <b>2 HIPÓTESE.....</b>                                                                                                                          | <b>47</b>    |
| <b>3 OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                         | <b>49</b>    |
| <b>4 MATERIAS E MÉTODOS.....</b>                                                                                                                | <b>51</b>    |
|                                                                                                                                                 | <b>52</b>    |
| 4.1. Isolamento e cultura de condrócitos humanos .....                                                                                          |              |
| 4.2. Cultura dos condrócitos para realização dos experimentos...                                                                                | <b>54</b>    |
| 4.3 Desenho Experimental.....                                                                                                                   | <b>56</b>    |
| 4.4 Experimentos com cultura em suspensão.....                                                                                                  | <b>59</b>    |
| 4.5 Obtenção dos extratos nucleares .....                                                                                                       | <b>60</b>    |
| 4.6 Precipitação de Proteínas do Meio de Cultura.....                                                                                           | <b>61</b>    |
| 4.7 Análise das proteínas nucleares por Western Blotting .....                                                                                  | <b>61</b>    |
| 4.8 Análise das proteínas precipitadas por Western Blotting.....                                                                                | <b>62</b>    |
| 4.9 Interferência na expressão do RNA através de siRNA.....                                                                                     | <b>63</b>    |
| 4.9.1 Padronização da Concentração de Oligos e do período<br>necessário pós-transfecção para o silenciamento do gene do<br>HIF-1 $\alpha$ ..... | <b>66</b>    |
| 4.10 Obtenção do RNA total e cDNA.....                                                                                                          | <b>67</b>    |
| 4.11 Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qRT-<br>PCR).....                                                                            | <b>68</b>    |

|               |                                                                             |            |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.11.1</b> | <b>Padronização das concentrações de primers e cDNA para o qRT-PCR.....</b> | <b>71</b>  |
| <b>4.12</b>   | <b>Análise Estatística.....</b>                                             | <b>72</b>  |
| <b>5</b>      | <b>RESULTADOS.....</b>                                                      | <b>73</b>  |
| <b>5.1</b>    | <b>1ª Fase.....</b>                                                         | <b>74</b>  |
| <b>5.2</b>    | <b>2ª Fase.....</b>                                                         | <b>75</b>  |
| <b>5.3</b>    | <b>3ª Fase.....</b>                                                         | <b>79</b>  |
| <b>6.</b>     | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                       | <b>86</b>  |
| <b>7.</b>     | <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                      | <b>102</b> |
| <b>8.</b>     | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                      | <b>104</b> |

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [LISTA DE TABELAS]

|                                                                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela.1.</b> Genes transcripcionalmente regulados pelo HIF-1 $\alpha$ .....                                                                                       | <b>38</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Desenho Experimental.....                                                                                                                            | <b>57</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Seqüência dos oligos de <i>sRNA</i> utilizados na transfecção para interferência em RNAm para o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$ (HIF1A)..... | <b>64</b> |
| <b>Tabela 4.</b> Seqüência dos primers utilizados para a realização da PCR em tempo real para os genes HIF1A, COL2A, ACAN e ACTB.....                                 | <b>70</b> |

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [LISTA DE FIGURAS]

|                   |                                                                                                                                                                           |           |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1.</b>  | Proteína HIF-1 $\alpha$ .....                                                                                                                                             | <b>33</b> |
| <b>Figura 2.</b>  | Subunidade HIF-1 $\alpha$ .....                                                                                                                                           | <b>35</b> |
| <b>Figura 3.</b>  | Composição da Matriz Extracelular (MEC).....                                                                                                                              | <b>41</b> |
| <b>Figura 4.</b>  | Etapas de isolamento e cultura de condrócitos a partir de joelhos obtidos de pacientes com osteoartrite submetidos à cirurgia de prótese total – artroplastia....         | <b>53</b> |
| <b>Figura 5.</b>  | Etapas finais de isolamento e cultura de condrócitos a partir de joelhos obtidos de pacientes com osteoartrite submetidos à cirurgia de prótese total – artroplastia..... | <b>54</b> |
| <b>Figura 6.</b>  | Tipos de cultura.....                                                                                                                                                     | <b>55</b> |
| <b>Figura 7.</b>  | Cultivo dos condrócitos em placas de cultura para realização dos experimentos.....                                                                                        | <b>56</b> |
| <b>Figura 8.</b>  | Mecanismo de silenciamento do gene pela interferência no RNAm.....                                                                                                        | <b>58</b> |
| <b>Figura 9.</b>  | Câmara de hipóxia.....                                                                                                                                                    | <b>59</b> |
| <b>Figura 10.</b> | Imagens de condrócitos humanos em OA cultivados em monocamada ( <i>monolayer</i> ) e submetidos à transfecção com oligos fluorescentes.....                               | <b>65</b> |
| <b>Figura 11.</b> | Expressão do RNA mensageiro do HIF- $\alpha$ em condrócitos submetidos ao RNAi para silenciamento do gene, com concentrações de oligos de 50,100 e 150nM.....             | <b>66</b> |

|                   |                                                                                                                                                          |           |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 12.</b> | Expressão do RNA mensageiro do HIF-1 $\alpha$ em condrócitos submetidos à técnica de RNAi para silenciamento do gene, 48 e 72 horas pós transfecção..... | <b>67</b> |
| <b>Figura 13.</b> | Condições de ciclagem da reação de PCR em tempo real.....                                                                                                | <b>70</b> |
| <b>Figura 14.</b> | Treshold representa a linha base de detecção da fluorescência e Ct indica o ciclo em que o nível de fluorescência da amostra começou a ser detectada.... | <b>71</b> |
| <b>Figura 15.</b> | Curva de dissociação demonstrado a especificidade do produto amplificado, sem contaminações.....                                                         | <b>72</b> |
| <b>Figura 16.</b> | Expressão de RNAm do gene do HIF-1 $\alpha$ em condrócitos humanos em OA sob condições normais de oxigênio.....                                          | <b>74</b> |
| <b>Figura 17.</b> | Expressão da Proteína Nuclear do HIF-1 $\alpha$ em condrócitos humanos em OA.....                                                                        | <b>75</b> |
| <b>Figura 18.</b> | Expressão da Proteína do Colágeno tipo II nos meios de cultura de condrócitos humanos em OA.....                                                         | <b>75</b> |
| <b>Figura 19.</b> | Expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$ em condrócitos humanos OA cultivados em suspensão.....                                                               | <b>76</b> |
| <b>Figura 20.</b> | Expressão do RNAm do Colágeno tipo II em condrócitos humanos OA cultivados em suspensão...                                                               | <b>77</b> |
| <b>Figura 21.</b> | Expressão do RNAm do Agrecano em condrócitos humanos OA cultivados em suspensão.....                                                                     | <b>78</b> |

|                   |                                                                                                                                            |           |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 22.</b> | Expressão da Proteína do Colágeno tipo II nos meios de cultura de condrócitos humanos em OA.....                                           | <b>79</b> |
| <b>Figura 23.</b> | Expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$ em condrócitos humanos OA cultivados em <i>monolayer</i> tratados com IL-1 $\beta$ . .....             | <b>80</b> |
| <b>Figura 24.</b> | Expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$ em condrócitos humanos OA cultivados em <i>monolayer</i> tratados com TNF $\alpha$ .....               | <b>81</b> |
| <b>Figura 25.</b> | Expressão do RNAm do Colágeno tipo II em condrócitos humanos OA cultivados em <i>monolayer</i> tratados com IL-1 $\beta$ .....             | <b>82</b> |
| <b>Figura 26.</b> | Expressão do RNAm do Colágeno tipo II em condrócitos humanos OA cultivados em <i>monolayer</i> tratados com TNF $\alpha$ .....             | <b>83</b> |
| <b>Figura 27.</b> | Expressão do RNAm do Agrecano em condrócitos humanos OA cultivados em <i>monolayer</i> tratados com IL-1 $\beta$ .....                     | <b>84</b> |
| <b>Figura 28.</b> | Expressão do RNAm do Agrecano em condrócitos humanos OA cultivados em <i>monolayer</i> tratados com TNF $\alpha$ .....                     | <b>84</b> |
| <b>Figura 29.</b> | Expressão da Proteína do Colágeno tipo II nos meios de cultura de condrócitos humanos em OA cultivados em <i>monolayer</i> .....           | <b>85</b> |
| <b>Figura 30.</b> | Representação esquemática das vias de sinalização utilizadas pelas citocinas inflamatórias na ativação não hipóxia do HIF-1 $\alpha$ ..... | <b>88</b> |



2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

**[LISTA DE ABREVIATURAS]**

|                                |                                            |                      |                                                   |
|--------------------------------|--------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------|
| <b>HIF-1</b>                   | Fator Induzido por Hipóxia-1               | <b>UV</b>            | Ultra-violeta                                     |
| <b>bHLH</b>                    | <i>"basic helix-loop-helix"</i>            | <b>RNAi</b>          | Interferência por RNA                             |
| <b>CTAD</b>                    | Domínio C-terminal                         | <b>siRNA</b>         | <i>"Small Interference RNA"</i>                   |
| <b>ODD</b>                     | Domínio de degradação oxigênio-dependente  | <b>RISC</b>          | <i>RNAi-Induced Silencing Complex</i>             |
| <b>DNA</b>                     | Ácido desoxirribonucleico                  | <b>O<sub>2</sub></b> | Oxigênio                                          |
| <b>pVHL</b>                    | Proteína de von Hippel Lindau              | <b>MgCl</b>          | Colreto de magnésio                               |
| <b>NTAD</b>                    | Domínio N-terminal                         | <b>KCl</b>           | Cloreto de potássio                               |
| <b>FIH</b>                     | Fator inibidor do HIF-1 $\alpha$           | <b>DTT</b>           | Dithiothreitol                                    |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | Interleucina-1 $\beta$                     | <b>NaCl</b>          | Cloreto de sódio                                  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator de necrose tumoral- $\alpha$         | <b>HEPES</b>         | N-2-Hidroetilpiperazina-N-2-Etano Ácido Sulfônico |
| <b>IGF</b>                     | Fator de crescimento insulina-like         | <b>EDTA</b>          | Ácido etilenodiamino tetra-acético                |
| <b>Fe</b>                      | Ferro                                      | <b>PBS</b>           | Tampão Fosfato Salino                             |
| <b>NO</b>                      | Óxido nítrico                              | <b>TBS</b>           | Tampão Tris Salino                                |
| <b>ROS</b>                     | Espécies reativas ao oxigênio              | <b>MEM</b>           | Meio essencial mínimo                             |
| <b>PI-3K</b>                   | Fosfatidil-Inositol-3-kinase               | <b>TA</b>            | Temperatura Ambiente                              |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | Fator nuclear kappa B                      | <b>qRT-PCR</b>       | Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real      |
| <b>COX2</b>                    | Ciclooxigenase-2                           | <b>DEPC</b>          | Água livre de RNase                               |
| <b>RNA<sub>m</sub></b>         | Ácido ribonucleico mensageiro              | <b>cDNA</b>          | Ácido Desoxirribonucleico complementar            |
| <b>DPOC</b>                    | Doença pulmonar obstrutiva crônica         | <b>HIF1A</b>         | Gene do HIF-1 $\alpha$                            |
| <b>VEGF</b>                    | Fator de Crescimento Vascular e Endotelial | <b>COL2A1</b>        | Gene do Colágeno tipo II                          |
| <b>MEC</b>                     | Matriz extracelular                        | <b>ACAN</b>          | Gene do Agrecano                                  |
| <b>GAG</b>                     | Glicosaminoglicanos                        | <b>ACTB</b>          | Gene da $\beta$ -Actina                           |
| <b>OA</b>                      | Osteoartrite                               | <b>LY294002</b>      | Inibidor da via da Fosfatidil-Inositol-3-Kinase   |
| <b>MMPs</b>                    | Metoloproteinasas                          | <b>2ME2</b>          | 2-Metoxiestradiol                                 |
| <b>ADAMTS</b>                  | Agrecanase                                 | <b>DMOG</b>          | Dimetiloxaloliglicina                             |
| <b>CO<sub>2</sub></b>          | Dióxido de carbono                         |                      |                                                   |
| <b>FBS</b>                     | Soro bovino fetal                          |                      |                                                   |
| <b>DMEM</b>                    | Meio Dulbecco modificado                   |                      |                                                   |
| <b>DMSO</b>                    | Dimetil-sulfóxido                          |                      |                                                   |

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [RESUMO]

**Introdução:** O Fator Induzido por Hipóxia-1 (Hypoxia Inducible Factor-1 - HIF-1) é um fator de transcrição responsável por transcrever genes relacionados às alterações nas concentrações de oxigênio e sobrevivência celular. A cartilagem articular é um tecido avascular e o ambiente dos condrócitos é caracterizado por condições de hipóxia dentro da matriz. Nestas condições a proteína HIF-1 $\alpha$  do Fator de transcrição Induzido por Hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) é necessário para controlar o metabolismo e a integridade funcional da cartilagem. Além da hipóxia algumas citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  são também capazes de estabilizar HIF-1 $\alpha$ , além de serem consideradas as principais mediadoras da osteoartrite (OA). **Objetivo:** Verificar a participação da IL-1 $\beta$  na regulação do HIF-1 $\alpha$  em condições normais de oxigênio; Verificar a utilização da via da Fosfatidil-Inositol-3-Kinase (PI-3K) pelo HIF-1 $\alpha$  e analisar a participação HIF-1 $\alpha$  na expressão de colágeno tipo II e agrecano e a sua regulação pelas citocinas TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ . **Material e Métodos:** Condrócitos humanos provenientes de pacientes em OA, submetidos à artroplastia de joelho, foram cultivados em suspensão e em monocamada, submetidos ou não ao silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  pela técnica de Interferência por RNA e estimulados com IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e LY294002, o inibidor da via da PI-3K em condições normais de oxigênio e em hipóxia e foram submetidos à extração de proteína nuclear, extração de RNA e precipitação das proteínas do meio de cultura das células. A análise das proteínas foi feita por meio da técnica de Western Blotting para a detecção da proteína nuclear HIF-1 $\alpha$  e do colágeno tipo II no meio de cultura das células. O RNA foi analisado pela técnica de PCR em Tempo Real para a quantificações dos genes do HIF-1 $\alpha$ , Colágeno tipo II e

Agrecano. **Resultados:** IL-1 $\beta$  aumentou a expressão da proteína nuclear HIF-1 $\alpha$ , mas não alterou a expressão do RNAm. Essa modulação utilizou a via da PI-3K. A hipóxia aumentou as concentrações do RNAm do HIF-1 $\alpha$  em comparação com as condições normais de oxigênio, mas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  não alteraram o RNAm do HIF-1 $\alpha$  em condições normais de oxigênio e em associação com a hipóxia, inibiram o efeito regulatório positivo desta sobre o HIF-1 $\alpha$ . A hipóxia isoladamente também aumentou RNAm de colágeno tipo II, o que foi anulado pelo estímulo associado com a IL-1 $\beta$ . Nos grupos de condrócitos com deficiência do HIF-1 $\alpha$  (silenciados), em quaisquer condições de oxigênio, IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  não alteraram significativamente a expressão de HIF-1 $\alpha$ , mas em hipóxia, a expressão de colágeno tipo II foi regulada negativamente nesses grupos. A associação entre a falta do HIF-1 $\alpha$  e as citocinas diminuiu ainda mais a expressão do colágeno tipo II em condições de hipóxia. Em todas as análises não foram observadas diferenças significativas nas expressões do RNAm do agrecano e na análise do colágeno tipo II das proteínas precipitadas dos meios de cultura das células. **Conclusão:** IL-1 $\beta$  aumentou a expressão da proteína nuclear HIF-1 $\alpha$  pós-transcrição. A regulação do HIF-1 $\alpha$  pela IL-1 $\beta$  em situação normal de oxigênio ocorreu, ao menos em parte, pela PI-3K. O HIF-1 $\alpha$  se relacionou positivamente com a expressão do gene do colágeno tipo II, principalmente em hipóxia, mas não com os níveis da proteína. Não houve associação com a expressão do gene do agrecano.

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

**[ABSTRACT]**

**Introduction:** Hypoxia Inducible Factor -1 (HIF-1) is a transcription factor that regulates the expression of genes related with oxygen concentration e cellular survive. Articular cartilage is a non-vascular tissue and the chondrocytes microenvironment are characterized by hypoxic conditions inside the extracellular matrix. In this condition, the protein HIF-1 $\alpha$ , from HIF-1 is necessary to the metabolism control and cartilage functional integrity. Some cytokines like IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ , as well as hypoxia, are capable to stabilize HIF-1 $\alpha$  and are essential in osteoarthritis (OA) progression disease. **Objective:** To verify the participation of IL-1 $\beta$  in the HIF-1 $\alpha$  regulation under normal conditions of oxygen; To verify if the pathway of phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) is used in this modulation; To analyse HIF-1 $\alpha$  participation in the collagen type II and aggrecan gene expression and your regulation by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . **Material and Methods:** Human OA chondrocytes were obtained from patients with OA that underwent total knee joint replacement surgery, were cultured either in suspension or monolayer. They were submitted to HIF-1 $\alpha$  gene silencing by RNA Interference and lately stimulated with IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and LY294002, a specific inhibitor to Phosphatidylinositol – 3- Kinase (PI-3K) pathway in normal conditions of oxygen and in hypoxia. The chondrocytes were submitted to protein nuclear extraction, RNA extraction and protein precipitation of culture media from the experiments. The proteins were analyzed by Western Blotting to HIF-1 $\alpha$  detection in nuclear extraction and collagen type II detection in precipitated media. The RNA were analyzed by Real Time PCR to HIF-1 $\alpha$ , collagen type II and aggrecan gene quantification. **Results:** HIF-1 $\alpha$  expression is *up*-regulated by IL-1 $\beta$  at the protein level but not in the mRNA expression. This

modulation used, at least in part, the PI-3K pathway. Hypoxia enhanced the mRNA concentrations of HIF-1 $\alpha$  when compared with normal conditions of oxygen, but in this cases IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  did not change mRNA expression of HIF-1 $\alpha$ . In association with hypoxia, these cytokines inhibited the positive regulatory effect under HIF-1 $\alpha$  mRNA expression. Hypoxia up-regulated collagen type II gene expression and that was inhibited by the association with IL-1 $\beta$ . In the groups with lack of HIF-1 $\alpha$  (silenced), in both oxygen conditions, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  did not cause any significant change of the HIF-1 $\alpha$  mRNA expression, but in hypoxia, collagen type II was up-regulated in those groups. The association between the lack of HIF-1 $\alpha$  and cytokines down-regulated more strongly collagen type II in hypoxia. In all analyzes it was not observed significant differences in the aggrecan mRNA expression and collagen type II protein from cultured media of the cells

**Conclusion:** IL-1 $\beta$  post-transcriptionally up-regulated the HIF-1 $\alpha$  protein level. HIF-1 $\alpha$  regulation by IL-1 $\beta$  in normal conditions of oxygen used, at least in part, the PI-3K pathway. HIF-1 $\alpha$  positively related with gene expression, but not with the protein levels, of collagen type II, mainly in hypoxia. There was no relation in the HIF-1 $\alpha$  and aggrecan gene expression.



# 2009

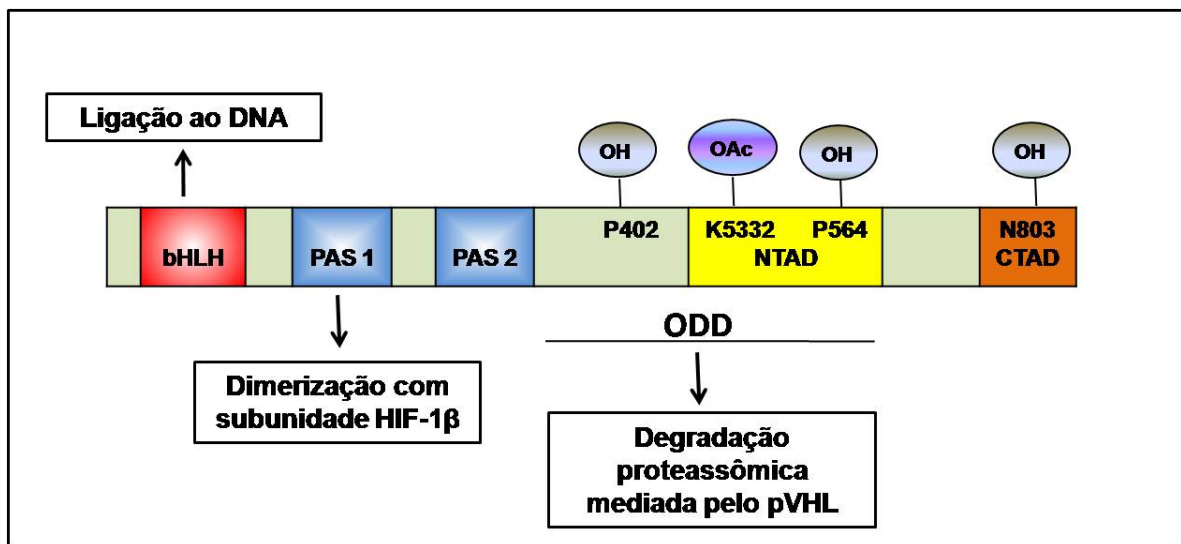
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [INTRODUÇÃO]

## HIF-1 $\alpha$

O Fator Induzido por Hipóxia-1 (Hypoxia Inducible Factor-1 - HIF-1) é um fator de transcrição heterodimérico, composto por duas proteínas *basic helix-loop-helix* (bHLH) - HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ , ambos membros da superfamília contendo o domínio PAS. As duas subunidades são constitutivamente expressas, no entanto, em condições normais de oxigênio a subunidade HIF-1 $\beta$  é estável, enquanto a subunidade HIF-1 $\alpha$  é rapidamente degradada (Wang et al., 1995; Maxwell et al. 1999, Semenza, 2000). O domínio PAS (Per ARNT Sim) da molécula é responsável pela dimerização nuclear com a subunidade HIF-1 $\beta$ , o domínio bHLH pela ligação ao DNA e o domínio C-terminal da subunidade HIF- $\alpha$  (CTAD) interage com os coativadores gerais de transcrição gênica, como a proteína de ligação p300/CREB e p160/SCR1. O domínio de degradação oxigênio-dependente (ODD) é essencial para a degradação proteolítica do HIF-1 $\alpha$  (Gaber et al. 2005; Schipani 2005) (Fig. 1).

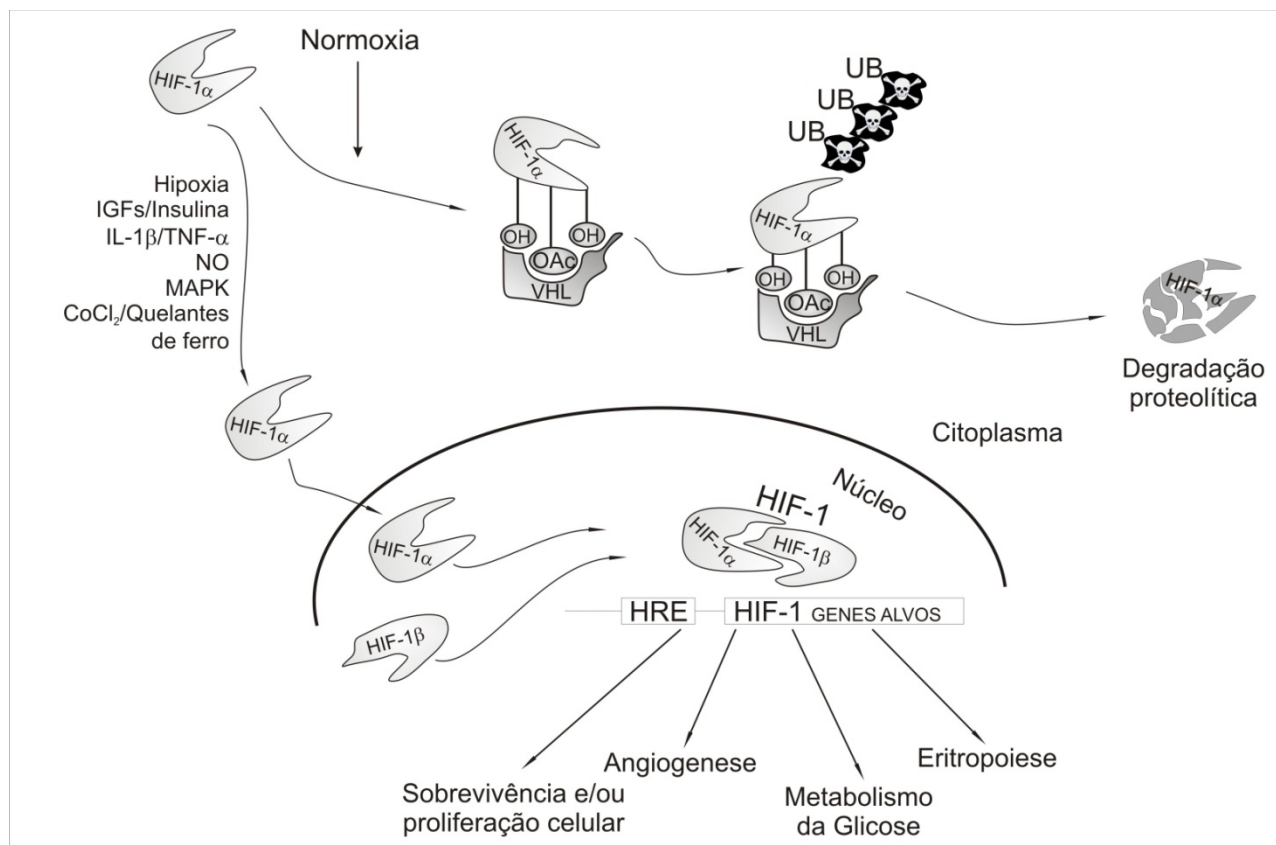


**Figura 1. Proteína HIF-1 $\alpha$ .** Desenho esquemático da proteína HIF-1 $\alpha$ , com suas regiões e respectivas funções: bHLH (*basic helix-loop-helix*) – ligação no DNA, PAS ( Per ARNT Sim) –

dimerização com HIF-1 $\beta$ , ODD (domínio de degradação dependente do oxigênio) – degradação pela pVHL (proteína de von Hippel Lindau), NTAD (porção N terminal) e CTAD (porção C terminal) – domínios de transativação transcripcional e ligação do FIH ( Fator inibidor do HIF).

Em condições normais de oxigênio, enzimas prolil-hidroxilases, promovem a hidroxilação de resíduos de prolina (Pro402 e Pro564) localizados no domínio ODD e a acetilação de uma lisina (Lys532). Esses resíduos hidroxilados são reconhecidos pelo fator de supressão tumoral Von Hippel-Lindau (pVHL), que marca a subunidade HIF-1 $\alpha$  para a degradação via ubiquitina-proteasoma. O fator inibidor do HIF-1 $\alpha$  (FIH) também é capaz de inibir a estabilidade dessa subunidade e consequente formação do fator de transcrição HIF-1. O FIH é uma oxigenase dependente dos co-substratos: ferro, oxigênio molecular e 2-oxigluterato. Ele pode recrutar deacetilases, que reprimem o remodelamento da cromatina e/ou promover a hidroxilação de um resíduo de asparagina (Asn 803), localizado no domínio CATD, impedindo a ligação dos coativadores gerais p300/CREB e p160/SCR1. Na ausência destes co-substratos a reação de hidroxilação é inibida e o HIF $\alpha$  torna-se estável (Gaber et al. 2005; Schipani 2005).

Sob hipóxia, isto é, na ausência de oxigênio necessário para que ocorram as hidroxilações e acetilações da subunidade do HIF-1 $\alpha$ , a degradação do mesmo é reduzida e a proteína se estabiliza no citoplasma. Posteriormente se transloca para o núcleo onde dimeriza-se à subunidade  $\beta$ , formando o fator de transcrição HIF-1. Este, por sua vez, se liga ao DNA transcrevendo genes relacionados às alterações nas concentrações de oxigênio (Wang et al., 1995; Gaber et al, 2005; Semenza, 2001) (Fig. 2).



**Figura 2. Subunidade HIF-1α.** Representação esquemática da atividade do HIF-1α. Em condições normais de oxigênio, a subunidade HIF-1α é marcada para degradação via ubiquitina-proteassoma, enquanto em condições de hipóxia ou sob ação de outros fatores como hormônios, citocinas, fatores de crescimento entre outros, o HIF-1α estabiliza-se no citoplasma, transloca-se para o núcleo dimerizando-se com a subunidade HIF-1β formando o Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia -1 (HIF-1).

Além da hipóxia, outros fatores, como a ação de hormônios, citocinas (IL-1β, TNFα), fatores de crescimento insulina-like (IGF), ferro (Fe), óxido nítrico (NO) entre outros, são também capazes de estabilizar HIF-1α. A estabilização, translocação nuclear e ativação do HIF-1α requer um mecanismo que envolve as espécies reativas ao oxigênio (ROS), indicando que a via não hipóxica é

dependente de citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  (Haddad, 2002). Stiehl et al (2002) relataram que a IL-1 $\beta$  e a insulina estabilizam o HIF-1 $\alpha$  em condições de condições normais de oxigênio e que esse mecanismo ocorre pela via da Fosfatidil-Inositol-3-kinase (PI-3K). Outros autores, por outro lado, relataram que a hiperregulação do HIF-1 $\alpha$  pela IL-1 $\beta$  utiliza a via NF- $\kappa$ B/COX2 demonstrando a relação entre a regulação do HIF-1 $\alpha$  e a inflamação, uma vez que o fator de transcrição NF- $\kappa$ B é reconhecido como o maior regulador da transcrição de citocinas (Jung et al, 2003; Coimbra, 2004; Qian, 2004). Conclui-se desta forma que a estabilização não-hipóxica do HIF-1 $\alpha$  é feita por diferentes vias de sinalização. Em resumo, os estímulos das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  ativam vias de sinalização intracelular, estimulando a liberação pelas mitocôndrias de espécies reativas ao oxigênio (ROS), que diminuem a hidroxilação do HIF-1 $\alpha$  e consequentemente inibem sua degradação. Além disso, o estímulo final comum das vias de sinalização, é o de ativar fatores de transcrição responsáveis por transcrever o RNAm do próprio HIF-1 $\alpha$ . Além dessa função, a via da PI-3K também libera o NF- $\kappa$ B que transcreve os genes das principais citocinas inflamatórias, entre elas a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$ . A diminuição da degradação do HIF-1 $\alpha$ , associado ao aumento da expressão de seu RNAm, garantem sua estabilização celular não relacionada com a hipóxia (Haddad 2002; Stiehl et al, 2002; Jung et al, 2003; Qian, 2004).

### **Importância Clínica do HIF-1 $\alpha$**

O oxigênio é um nutriente essencial para o metabolismo celular pela sua participação na respiração mitocondrial. Quando as células são expostas à condições de hipóxia, podem morrer por necrose ou apoptose. A hipóxia ocorre em algumas condições patológicas como infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, e também como consequência da deficiente perfusão em membros inferiores, que pode ser decorrente do diabetes ou em articulações com osteoartrite, conforme estabelecido pelo nosso grupo (Coimbra et al, 2004). O HIF-1 tem participação na homeostase do oxigênio, regulando os processos celulares adaptativos à hipóxia e à outros fatores físicos e bioquímicos, atuando direta ou indiretamente em todas as células eucariontes, ordenando centenas de genes com padrões de resposta à hipóxia e com funções fisiológicas (Gaber et al, 2005; Ratcliffe, 2007). Os mecanismos de adaptação à hipóxia regulados pelo HIF-1 incluem a ativação de genes envolvidos na angiogênese, transporte de oxigênio, metabolismo de ferro, glicólise, captação rápida de glicose, sinalização de fatores de crescimento, apoptose, invasão e metástases (Tabela 1) (Bárdos e Ashcroft, 2005; Weidemann e Johnson, 2008). A fisiopatogenia de algumas doenças que podem levar à morte, como doenças cardíacas, acidente vascular cerebral, câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), hipertensão pulmonar e outras têm a participação da hipóxia (Agani et al, 2000). Além disso, estudos *in vivo* têm revelado um papel específico do HIF-1 durante a isquemia, inflamação e vários tipos de tumores malignos (Berchner-Pfannschmidt, 2008; Krohn et al, 2008).

**Tabela.1. Genes regulados pelo HIF-1 $\alpha$ .**

| <b>Gene</b>                                          | <b>Função</b>                         |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Adrenomodulina                                       | Tônus vascular, sobrevivência celular |
| Aldolase A e C                                       | Metabolismo da Glicose                |
| Endotelina 1                                         | Tônus vascular                        |
| Enolase 1                                            | Metabolismo da Glicose                |
| Eritropoietina                                       | Eritropoiese, sobrevivência celular   |
| Fator de Crescimento Vascular<br>e Endotelial (VEGF) | Angiogênese, sobrevivência celular    |
| Fator de Crescimento Insulina-like 2                 | Proliferação celular e sobrevivência  |
| Heme-oxigenase-1                                     | Tônus vascular, sobrevivência celular |
| Lactato desidrogenase                                | Metabolismo da Glicose                |
| NIP3                                                 | Apoptose                              |
| Óxido nítrico sintetase                              | Tônus vascular, sobrevivência celular |
| Proli-4-hidroxilase ( $\alpha$ ) I                   | Metabolismo do Colágeno               |
| Transportador de Glicose 1 e 3                       | Metabolismo da Glicose                |

Adaptado de Semenza, 2001.

A baixa tensão de oxigênio também tem importante papel no desenvolvimento e diferenciação celular fetal normal, principalmente com relação à diferenciação da cartilagem e desenvolvimento ósseo endocondral. A subunidade HIF-1 $\alpha$  e o fator Von-Hippel Lindau (VHL) têm importante papel na biologia do condrócito. Condrócitos deficientes em HIF-1 $\alpha$  sofrem morte celular na região central da cartilagem (Schipani, 2005). O ambiente dos condrócitos é caracterizado por condições de hipóxia dentro da matriz, variando entre 10% de

oxigênio na superfície do tecido até menos de 1% nas zonas mais profundas e o Fator Induzido por Hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) é necessário para prover adaptações dos mesmos à essas condições, controlando o metabolismo e a integridade funcional da cartilagem articular (Cramer , 2004; Goldring, 2006). Durante o processo etiopatogênico da osteoartrite sugere-se que o HIF-1 possa exercer um papel protetor da cartilagem articular (Gelse et al, 2008).

### **Cartilagem Articular Normal**

A cartilagem articular normal é composta por fluido intersticial, elementos celulares e moléculas que compõem a matriz extracelular (MEC). Cerca de 70% da cartilagem é constituída por água e esta porcentagem aumenta com a progressão da osteoartrite. Caracteriza-se por ser avascular, sendo a difusão de nutrientes e metabólitos feita pela MEC e pelo líquido sinovial, estimulado pelos movimentos articulares (Lee et al, 1997). Os elementos celulares presentes na cartilagem são “residentes”, representados pelos condrócitos, que respondem por apenas 2% da cartilagem, ou circulatórios, representados por linfócitos e outras células mononucleares. As moléculas que compõem a MEC são sintetizadas pelos condrócitos e entre as proteínas presentes, destacam-se os diferentes tipos de fibras colágenas, particularmente o colágeno do tipo II, que é o mais abundante (10-30% do peso da cartilagem), além de ser específico da cartilagem. Também as fibras colágenas dos tipos IX, XI e outros presentes em menor quantidade como os colágenos IV e X (na cartilagem com osteoartrite), além de elastina e

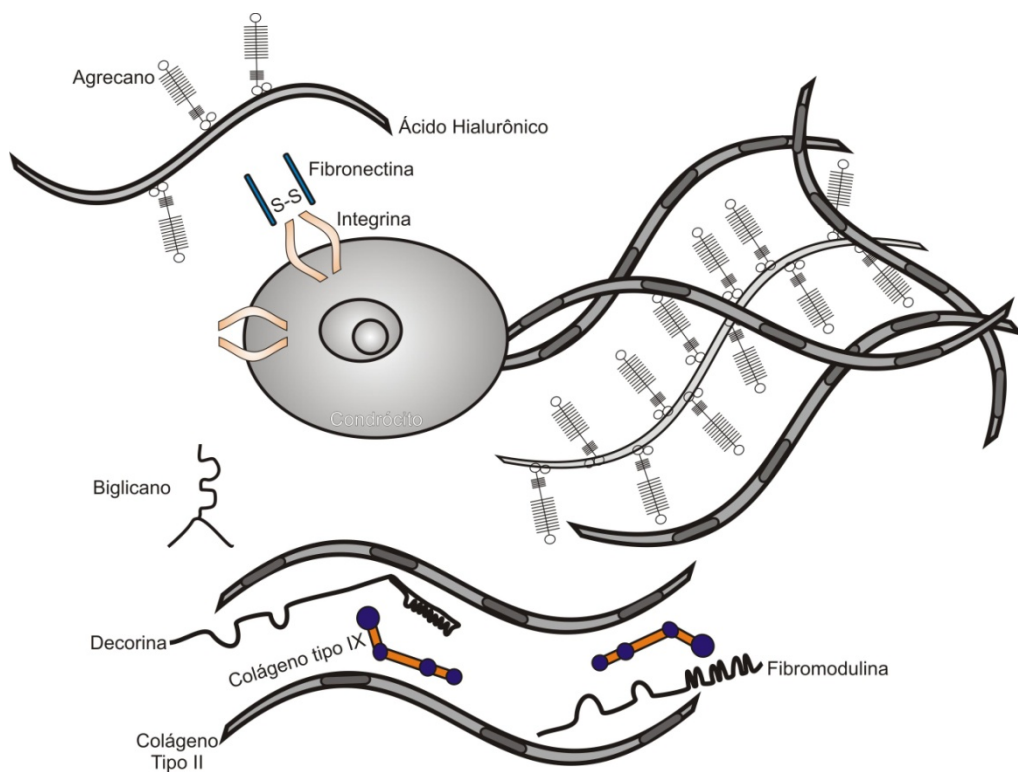


fibronectina que são proteínas sintetizadas pelos condrócitos (Martel-Pelletier et al, 2008).

O fator estrutural comum das moléculas de colágeno é a tripla hélice, que é o resultado do enrolamento de três cadeias polipeptídicas, conhecidas como cadeias  $\alpha$  que possuem conformação tridimensional. Cada tipo de colágeno tem uma única sequência de aminoácidos e os diferentes tipos de colágeno podem ser classificados de acordo com sua habilidade de agregar-se em fibras altamente estruturadas ou associar-se com fibras de outros colágenos. As fibras de colágeno estruturadas são responsáveis pela construção de tecidos conectivos e compreendem os colágenos tipos I, II, III, V e XI. A classe das fibras de colágeno associadas compreende as que formam as estruturas especializadas como as membranas basais, fibras de apoio da derme ou colágenos que realizam funções especializadas como na cartilagem da placa de crescimento e incluem os colágenos tipos IX, XII, XIV entre outros (Jiménez, 2000).

O colágeno tipo II é sintetizado como uma molécula pré-colágena pelos condrócitos e é composto por três cadeias polipeptídicas idênticas ( $\alpha I$ ,  $\alpha II$  e  $\alpha III$ ). A molécula trimérica do colágeno não existe isoladamente no interior da MEC e sim em forma de fibras, formadas pelas associações das moléculas (Martel-Pelletier et al, 2008). A estrutura da cartilagem hialina constitui-se de grandes fibras de colágeno tipo II imersas em proteoglicanos, glicoproteínas, água e íons solúveis (Mayne, 1989) (Fig.3). O colágeno tipo XI assim como o colágeno tipo II é um constituinte específico de tecidos cartilaginosos e têm sido sugerido que a molécula de colágeno tipo IX pode exercer regulação sobre a espessura das fibras

de colágeno tipo II na cartilagem. O colágeno tipo IX é encontrado quase exclusivamente nos tecidos cartilagosos e apesar de sua abundância na cartilagem, sua função ainda não foi determinada. A cadeia  $\alpha 2$  do colágeno tipo IX contém uma ligação covalente com um glicosaminoglicano e pode ser considerada como *core* protéico proteoglicano sugerindo que este tipo de colágeno possa estar envolvido na mediação da interação colágenos-proteoglicanos na MEC (Jiménez, 2000).



**Figura 3. Composição da Matriz Extracelular (MEC).** Aproximadamente 70% da cartilagem é constituída por água. Os condrócitos respondem por 2% do peso seco da cartilagem e são responsáveis pela síntese das principais proteínas da MEC, entre elas as fibras de colágeno tipo II (10-30% do peso da cartilagem) e os proteoglicanos (5-10%) formados por um *core* protéico central ligados à cadeias de GAGs (Glicosaminoglicanos).

Dentre os complexos polissacarídeos, estão os proteoglicanos (5-10%) que são uma família de glicoconjugados, formados por um *core* protéico central no qual uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAG) são covalentemente ligadas. Destaca-se o agrecano, em cuja estrutura complexa são encontrados os derivados do glicosaminoglicano (keratan sulfato e sulfatos de condroitina) formando ângulos de 90° e o ácido hialurônico (Kiani et al, 2002). Além deste, outros proteoglicanos menores são encontrados, como o biglicano, a decorina, a ancorina e a fibromodulina (Skare,1999). Esta composição é que confere à cartilagem suas propriedades de reversibilidade às deformidades e elasticidade. Sua função é de absorção de impactos sobre a articulação e permitir um deslizamento suave entre as duas extremidades ósseas justapostas (Poole et al. 2001). Na cartilagem já formada do adulto, os condrócitos mantêm um baixo *turnover* de reposição das proteínas da matriz extracelular. A vida média do colágeno pode ser de mais de 100 anos e das subfrações do *core* protéico do agrecano variando entre 3 e 24 anos. Glicosaminoglicanos e outros constituintes da matriz, incluindo biglicano, decorina, tenascina e matrilinas também podem ser sintetizadas pelos condrócitos sob baixas condições de *turnover*. No entanto, há diferenças regionais nas atividades de remodelação dos condrócitos e o *turnover* da matriz pode ser mais rápido nas zonas pericelulares intermediárias (Goldring, 2006).

Além da produção dos componentes da matriz extracelular, os condrócitos também são responsáveis pela produção das enzimas responsáveis pela sua degradação, como as collagenases e as proteinases. Estímulos mecânicos e a

ação de algumas citocinas e fatores de crescimento podem regular as funções de síntese e proliferação da cartilagem articular. A manutenção da matriz extracelular é feita por meio de um equilíbrio controlado entre anabolismo e catabolismo dessas proteínas, com renovação constante do tecido (Rosenberg, 2000; Sledge, 2001).

### **Osteoartrite (OA)**

Osteoartrite (OA) é a doença reumática mais prevalente do sistema esquelético, sendo a principal causa de incapacidade física e diminuição da qualidade de vida nas nações industrializadas. Aproximadamente de 65% a população acima de 65 anos apresentam evidências clínicas e/ou radiográficas da doença. As regiões mais frequentemente afetadas são mãos, joelhos, quadris e coluna. Os sintomas são geralmente associados com significativo prejuízo funcional bem como sinais e sintomas de inflamação, incluindo dor, rigidez e diminuição da mobilidade. Atualmente não há tratamento comprovado para restauração da cartilagem ou para diminuir a progressão da doença. Dessa maneira, a osteoartrite resulta em dor crônica, incapacidade física, depressão e até isolamento social (Krasnokutsky, 2007). Dentre os fatores de risco, como idade, sexo, trauma, obesidade, fatores biomecânicos da articulação entre outros, encontram-se também as predisposições genéticas, como mutações nos genes que transcrevem as proteínas específicas da cartilagem hialina (Goldring, 2006).

Os elementos da matriz são constantemente degradados por enzimas proteolíticas e repostos através da produção de novas moléculas pelos condrócitos. Na osteoartrite este processo é alterado e, em consequência disto há

um desequilíbrio entre a formação e a destruição das moléculas, levando a um predomínio desta última, a despeito de um aumento no processo de reparação. As moléculas que são sintetizadas são mecanicamente inferiores às moléculas originais e, portanto, são mais suscetíveis às injúrias e a conseqüente lesão. O processo pode ser iniciado por uma série de eventos que levam à alteração da função dos condrócitos, com fortes evidências que os estímulos à eles seriam ocasionados por citocinas pró-inflamatórias, especialmente a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (Van der Kraan e Van der Berg, 2000; Martel-Pelletier, 1999, 2004). Em condrócitos humanos em OA foi demonstrado que essas citocinas, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são fortemente expressas (Honorati et al, 2004). Os condrócitos liberam enzimas proteolíticas (proteínases neutras, catepsina e metaloproteinases -MMPs-1, 3, 8 e 13 e agrecanases -ADAMTS-4 e -5), as quais degradam as moléculas que compõem a matriz cartilaginosa, incluindo os proteoglicanos maiores, produzindo outras moléculas não agregadas. Isto leva a um adelgaçamento da cartilagem e a uma deterioração da sua qualidade mecânica. A velocidade de liberação destas enzimas e a conseqüente destruição das moléculas da matriz são significativamente maiores na cartilagem em osteoartrite do que na cartilagem normal (Bland e Cooper, 1984; Malesud, 2004; Goldring, 2006).

A perda da força de tensão para suportar cargas leva à transmissão de uma força maior aos condrócitos e osso subcondral. Os condrócitos sob ação destas forças liberam mais enzimas proteolíticas. O osso subcondral desenvolve microfraturas, causando endurecimento e perda da reversibilidade à compressão. Alguns produtos resultantes da quebra da cartilagem e os proteoglicanos podem

estimular a resposta inflamatória, perpetuando o ciclo destrutivo. Embora a degeneração da cartilagem caracterize a OA, há evidências cada vez maiores que sugerem que as alterações na OA também envolvem a participação da membrana sinovial, principal fonte de citocinas pró-inflamatórias, e do osso subcondral. A esclerose do osso subcondral parece ser mais intimamente relacionada ao início ou progressão da OA do que meramente uma consequência da doença. Evidências clínicas e laboratoriais mostram que o metabolismo do osso subcondral está alterado na OA, provavelmente decorrente do comportamento anormal dos osteoblastos nesta região. Esta anormalidade aliada ao estresse químico e mecânico leva ao aumento da formação óssea nesta área, elevando a pressão mecânica na cartilagem de articulações de carga, promovendo uma maior deterioração e surgimento de erosões. Além disto, o papel de mediadores locais produzidos pelos osteoblastos (como o sistema do IGF- fator de crescimento insulina-*like* – e o ativador de plasminogênio/plasmina) vem se tornando mais importante (Bland e Cooper, 1984).

### **HIF-1 $\alpha$ e Osteoartrite (OA)**

A IL-1 $\beta$  é o mais importante fator catabólico na OA, sua ação é local e pode mudar o metabolismo da cartilagem em articulações durante a doença, inibindo a síntese de colágeno tipo II, dos proteoglicanos e aumentando a síntese de MMPs (Chevalier, 1997; Van der Kraan e Van der Berg, 2000; Malesud, 2004). Além disso, a IL-1 $\beta$  estimula a atividade de ligação do HIF-1 com o DNA (Hellwig-Burgel et al, 1999), demonstrando que o HIF-1 pode estar envolvido na modulação da

expressão gênica durante a inflamação (Haddad e Harb, 2005). O  $\text{TNF}\alpha$  tem um efeito estimulatório sobre a ligação HIF-1 ao DNA semelhante ao da  $\text{IL-1}\beta$ . Mas é considerado menos potente como agente destrutivo da cartilagem. Os condrócitos são a fonte mais provável de  $\text{TNF}\alpha$  na osteoartrite, pois condrócitos osteoartríticos apresentam elevados níveis de RNAm de  $\text{TNF}\alpha$  quando comparados a condrócitos normais (Van der Kraan e Van der Berg, 2000; Haddad e Harb, 2005).

Em um estudo com condrócitos humanos normais e em osteoartrite (OA), Coimbra et al (2004), detectaram a expressão de RNAm e proteína do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos normais e em OA em condições normais de oxigênio, bem como estabilização ou aumento dessas expressões em hipóxia. O tratamento dos condrócitos com  $\text{TNF}\alpha$  resultou num aumento da estabilização do HIF-1 $\alpha$  em condições normais de oxigênio e esse resultado foi parcialmente bloqueado pelo pré-tratamento dos condrócitos com inibidores das vias do NF- $\kappa$ B e da P38 kinase. Concluíram que o HIF-1 $\alpha$  é expresso em condrócitos humanos normais e em OA em condições normais de oxigênio. Em hipóxia ou com tratamento com  $\text{TNF}\alpha$ , pode-se estabilizar ou aumentar os níveis de HIF-1 $\alpha$ .

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [HIPÓTESE]



O HIF-1 $\alpha$  modula a expressão do colágeno tipo II e do agrecano, principais constituintes da matriz extracelular da cartilagem articular, e esta modulação seria mediada por IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ .

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [OBJETIVOS]

## **OBJETIVO GERAL**

Estabelecer a associação entre mecanismos regulatórios do HIF-1 $\alpha$  e a expressão de colágeno tipo II e agreganos na cartilagem articular.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para alcançar o objetivo geral, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- 1) Verificar a participação da IL-1 $\beta$  na regulação do HIF-1 $\alpha$  em condições normais de oxigênio.
- 2) Verificar a utilização da via da Fosfatidil-Inositol-3-Kinase (PI-3K) pelo HIF-1 $\alpha$ .
- 3) Analisar a participação HIF-1 $\alpha$  na expressão de colágeno tipo II e agregano e a sua regulação pelas citocinas TNF- $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ .

# 2009

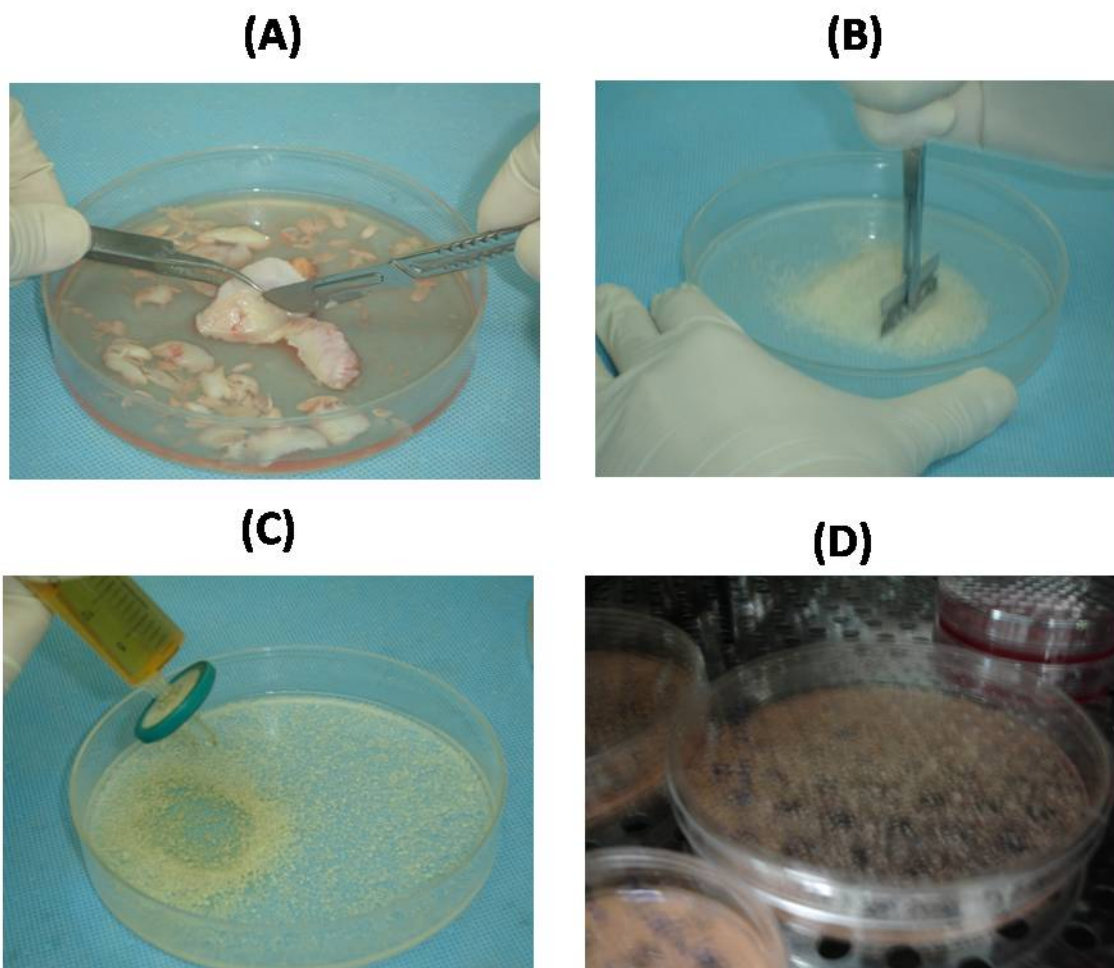
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

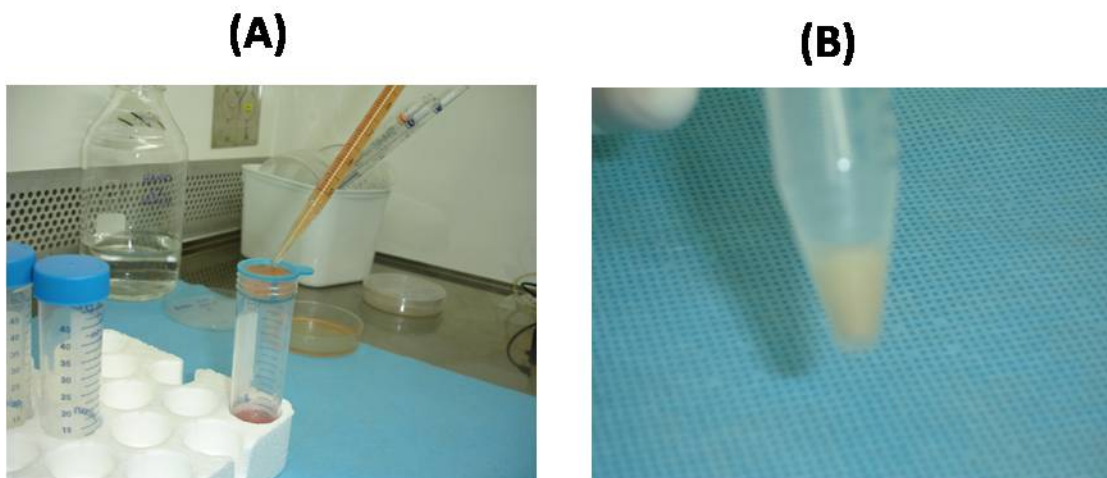
## [MATERIAL E MÉTODOS]

#### 4.1. Isolamento e cultura de condrócitos humanos

As cartilagens articulares trabalhadas foram obtidas em pelo menos três hospitais da cidade de Campinas, provenientes de pacientes portadores de osteoartrite (OA) de joelho, em estágios diversos de evolução, porém na sua maioria do grau III da escala de Kellgren e Lawrence (K&L) (1957), submetidos à cirurgia de prótese total de joelho. Após a lavagem das peças com solução de Hank's, a cartilagem foi bem fragmentada (Fig.4. A e B) e incubada em Hank's com tripsina e collagenase tipo II (2mg/ml de cada uma) por 1h e 30min a 37 °C em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% (Fig.4. C e D). Após esse período FBS foi acrescentado para interromper a ação da tripsina e a solução foi centrifugada a 250g por 10 minutos e então o sobrenadante foi descartado. O pellet formado foi ressuspensionado em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's minimum essential medium*) suplementado com 4,5 g/l de glicose, 10% de soro bovino fetal (FBS) e 0,5mg/ml de collagenase bacteriana, e adicionado ao restante dos fragmentos de cartilagem, permanecendo em digestão *overnight* em incubadora de CO<sub>2</sub> a 5% a 37°C, com agitação. Após essa incubação, o meio de cultura foi então diluído em solução de Hank's e passado em filtro de nylon de 70µm (Fig.5. A), para separação das células, submetido à centrifugação a 250g por 10min (Fig.5. B). Finalmente as células foram contadas em câmara de Neubauer com azul de tripan para verificar sua viabilidade e, foram então congeladas em nitrogênio líquido, devidamente identificadas, com 90% de FBS e 10% de DMSO até a utilização nos experimentos.



**Figura 4.** Etapas de isolamento e cultura de condrócitos a partir de joelhos obtidos de pacientes com osteoartrite submetidos à cirurgia de prótese total – artroplastia. (A) Retirada da cartilagem das partes ósseas. (B) Fragmentação. (C) Solução de tripsina e collagenase. (D) Manutenção em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C.

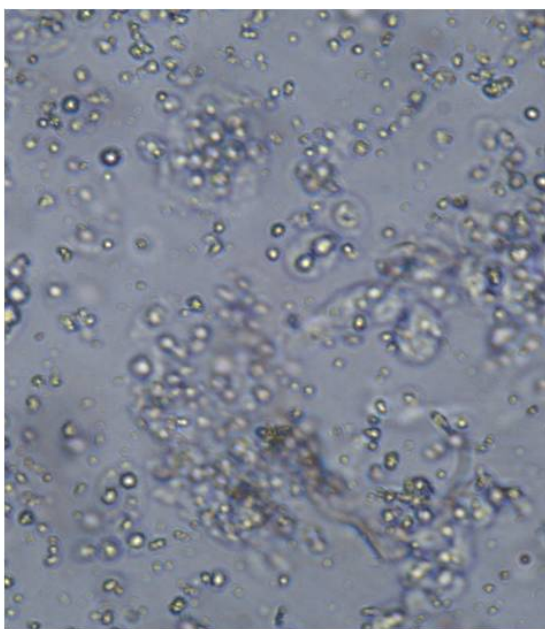


**Figura 5.** Etapas finais de isolamento e cultura de condrócitos a partir de joelhos obtidos de pacientes com osteoartrite submetidos à cirurgia de prótese total – artroplastia. (A) Passagem da solução de digestão em filtro de nylon 70µm. (B) Pellet de células obtido após centrifugação da solução de digestão.

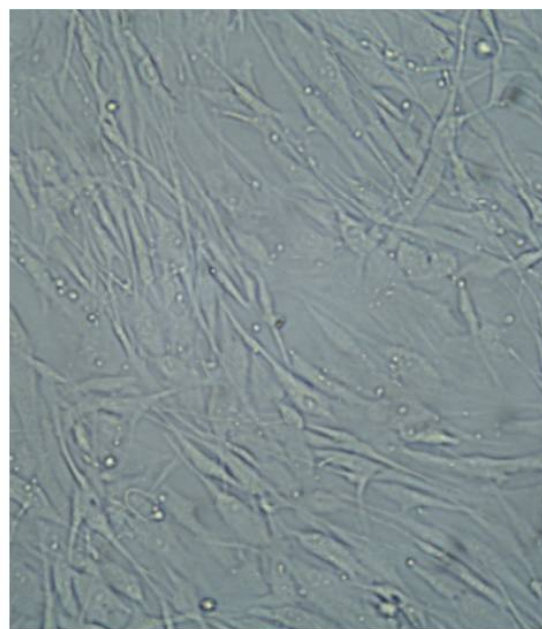
#### 4.2. Cultura dos condrócitos para realização dos experimentos

Os condrócitos foram cultivadas em monocamada (*monolayer*) e/ou suspensão (Fig.6), em placas preparadas com hidrogel poli-(2-hidroxietil metacrilato) no nosso laboratório, para evitar a adesão das mesmas em sua superfície (Fig.7), de acordo com o tipo de experimento realizado. Antes do descongelamento as placas, devidamente revestidas, foram expostas à radiação UV (ultra-violeta) por, no mínimo, 15 minutos. As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e centrifugadas a 250g, 2x de 10 minutos, antes de serem colocadas nas placas com DMEM contendo 10% FBS, 2mM de glutamina, 1% de suplemento vitamínico, 100 unidades/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e sem a adição de anfotericina B e ácido ascórbico, uma vez que eles podem interferir com a expressão do HIF-1 $\alpha$ . Nos experimentos em

suspensão, as células isoladas foram cultivadas em cada placa, numa concentração máxima de  $5 \times 10^6$  condrócitos e para os experimentos em monocamada (*monolayer*) foram cultivadas no máximo  $3 \times 10^5$  células, sendo utilizadas sempre a mesma amostra, isto é, células provenientes de um único paciente eram submetidas a um determinado experimento.



**Cultivo células em Suspensão**



**Cultivo células em  
Monocamada (*Monolayer*)**

**Figura 6. Tipos de cultura.** Condrócitos cultivados em Suspensão (à esquerda) em placas revestidas com hidrogel e cultivo em placas sem revestimento (à direita), no sistema de monocamada (*monolayer*).





**Figura 7.** Cultivo dos condrócitos em placas de cultura para realização dos experimentos.

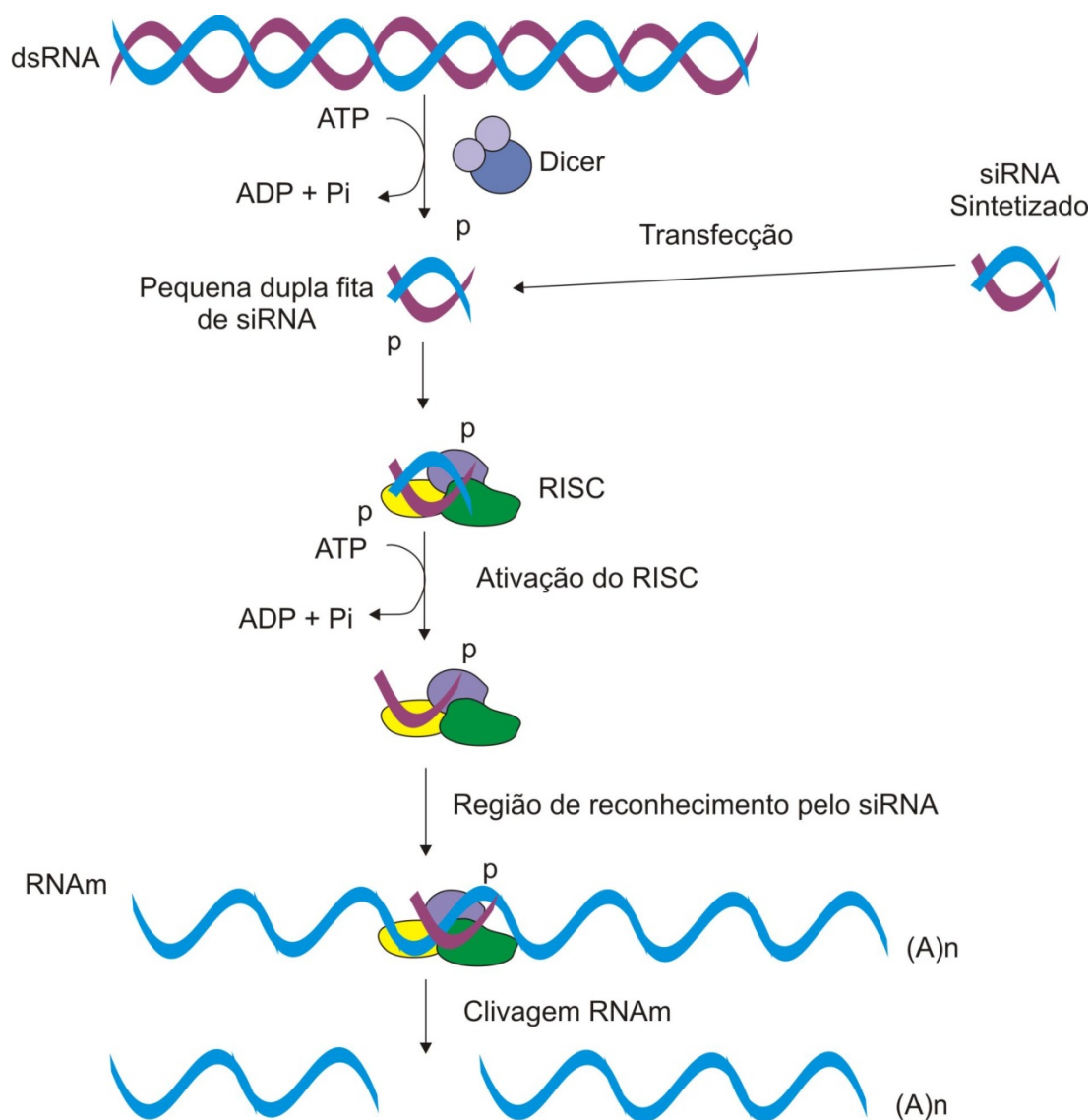
### 4.3. Desenho Experimental

Esse trabalho foi realizado em três fases, sendo a primeira fase destinada a detectar a presença da proteína nuclear HIF-1 $\alpha$ , em condições normais de oxigênio, induzida pela IL-1 $\beta$ , bem como a proteína colágeno tipo II no meio de cultura das células. Na segunda fase, o objetivo foi detectar a expressão gênica relativa (RNAm) dos genes do HIF-1 $\alpha$ , Colágeno tipo II e Agrecano, bem como os níveis do colágeno tipo II no meio de cultura das células, em condições normais de oxigênio e em hipóxia, mediados pelas citocinas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . Na terceira e última fase dos experimentos, o objetivo foi verificar a participação do HIF-1 $\alpha$  na regulação da expressão de Colágeno tipo II (RNAm e proteína) e expressão gênica de Agrecano (Tabela 2), para isso utilizamos a técnica de interferência do RNAm para o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$ .

**Tabela 2.** Desenho Experimental.

| Fase | Tipo de Cultura                    | Tratamento                  | O <sub>2</sub>                                | Análise                                                                                              |
|------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1ª   | Suspensão                          | IL-1 $\beta$<br>LY294002    | Condições normais<br>de oxigênio              | Extrato protéico nuclear- HIF-1 $\alpha$<br>Precipitado Meio de Cultura- Colágeno Tipo II            |
| 2ª   | Suspensão                          | IL-1 $\beta$ e TNF $\alpha$ | Condições normais<br>de oxigênio<br>e Hipóxia | Expressão mRNA – HIF-1 $\alpha$ , Col II e<br>Agregano<br>Precipitado Meio Cultura- Colágeno Tipo II |
| 3ª   | Monocamada<br>( <i>Monolayer</i> ) | IL-1 $\beta$ e TNF $\alpha$ | Condições normais<br>de oxigênio<br>e Hipóxia | Expressão mRNA – HIF-1 $\alpha$ , Col II e<br>Agregano<br>Precipitado Meio Cultura- Colágeno Tipo II |

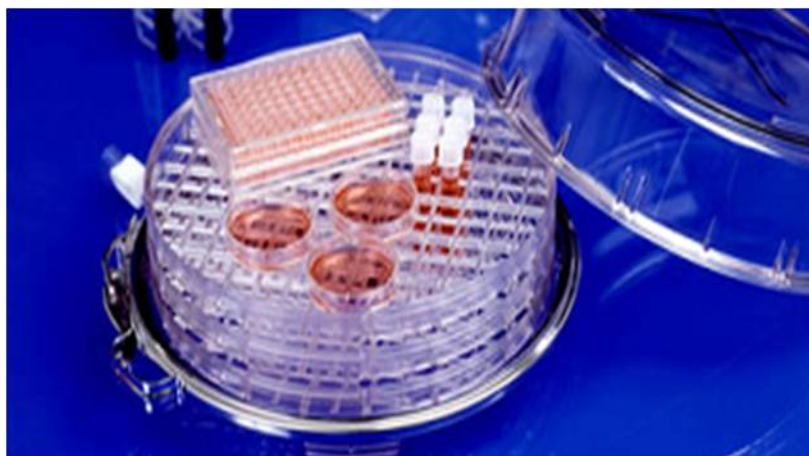
Em 1998, Fire et al descreveram o fenômeno intracelular no qual uma dupla-fita de RNA pode reduzir ou até mesmo abolir a atividade genética pela destruição do RNAm, num mecanismo denominado Interferência por RNA (RNAi). Este mecanismo de controle de atividade genética é importante para o desenvolvimento dos organismos e para as funções fisiológicas de células e tecidos. Nele, longas fitas duplas de RNA são alvo de uma endonuclease (*Dicer*) que cliva o RNAm em pequenas duplas fitas de, no máximo, 25 nucleotídeos (*Small Interference RNA – siRNA*). Essas pequenas duplas fitas de RNA, por sua vez, formam o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA ou RNAi-*Induced Silencing Complex* (RISC), capaz de degradar o RNAm. Esse processo degrada apenas RNAm específicos, uma vez que o complexo RISC utiliza a pequena dupla fita de RNA como um modelo de reconhecimento do RNAm alvo (Dykxhoorn et al, 2003) (Fig.8).



**Figura 8. Mecanismo de silenciamento do gene pela interferência no RNAm.** Pequenas duplas fitas de RNAm introduzidas nas células são reconhecidas por proteínas que formam o RNAi-*Induced Silencing Complex* (RISC), capaz de degradar o RNAm de maneira específica, pois utiliza a dupla fita como molde para o gene alvo.

#### 4.4. Experimentos com cultura em suspensão

Os experimentos foram feitos em condições de condições normais de oxigênio, isto é a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar (O<sub>2</sub> 21%) e em condições de hipóxia. Para isso as células foram colocadas dentro de uma câmara modular (Billups-Rothenburg, Del Mar, CA) que foi submetida a uma mistura de 1% de O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> e 94% N<sub>2</sub> e a 37°C (Fig.9).



**Figura 9.** Câmara de hipóxia

Para todos os experimentos, as células foram lançadas em cultura com DMEN e 10% de FBS e só depois de 48 horas, no mínimo, é que os estímulos foram feitos. Os períodos e as doses dos tratamentos foram pré-definidos em curvas de padronizações realizadas em experimentos anteriores no nosso laboratório. Para os experimentos com IL-1 $\beta$  foi utilizada a dose de 10ng/ml em 6 horas de tratamento. O LY294002, inibidor da via da Fosfatidil-Inositol-3-kinase (PI-3K) foi utilizado na dose 10 $\mu$ M/ml. Para o TNF $\alpha$  em 4 horas de tratamento, também foi utilizada a dose de 10ng/ml, no entanto, no caso específico desse tratamento as células foram previamente serodeprimidas a 0,1 de FBS 12h antes

do estímulo, pois se sabe que o FBS pode anular o efeito do  $\text{TNF}\alpha$ , uma vez que já foi observado que a albumina sérica bovina pode aumentar a produção de  $\text{TNF}\alpha$  (Zheng, 1995), o que poderia introduzir um viés em nossos resultados.

#### **4.5. Obtenção dos extratos nucleares**

Os extratos protéicos nucleares foram obtidos de acordo com o método de Dignam et al (1983) usando-se o kit para extração CellLytic NuCLEAR (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Todo o procedimento foi realizado a 4°C para evitar a denaturação das proteínas nucleares e, quando da realização do experimento em hipóxia, 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  de calpaína foi adicionado às células imediatamente após a retirada da incubadora modular. Esse procedimento visa estabilizar os níveis de HIF-1 $\alpha$  no citoplasma, que tendem a diminuir em ambiente com tensão normal de oxigênio. Resumidamente, as células foram adicionadas a um tampão hipotônico (10mM HEPES, pH7.9), 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM KCl e 0.5mM dithiothreitol- DTT) e incubadas por 15 minutos em gelo. Foi então adicionado um detergente, Igepal CA-630, em concentração final de 0.6% e misturados vigorosamente no vórtex por 10 segundos. Os núcleos foram recuperados por centrifugação a 3,300g por 30 segundos, e extraídos em um tampão contendo 20mM HEPES pH 7,9, 0.42M NaCl, 25% de glicerol, 1.5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2mM de EDTA e 0.5 mM DTT por 30 minutos a 4°C com agitação constante. O extrato foi centrifugado por 15 minutos a 25,000xg, e o sobrenadante contendo as proteínas foi armazenado a -80°C. Em todos os tampões foi adicionado um coquetel de inibidores de proteinases (2mM 4-(2-aminoetil) benzenosulfonilfluoreto, 1.4 pM trans-epoxysuccinil-L-leucilamida

[4-guanidinobutano], 130 pM bestatina, 1 $\mu$ M lepeptina e 0.3 pM aprotinina (Sigma-Aldrich) e 26 mM de inibidor proteossomal Calpaina inibidor I (Calbiochem, San Diego CA). A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm.

#### **4.6. Precipitação de Proteínas do Meio de Cultura**

Os meios de cultura dos diferentes experimentos foram utilizados para a análise das quantidades de colágeno do tipo II produzidas pelas células. Foram acrescentados 2mg/ml de Pepsina (Sigma-Aldrich®) e 30 $\mu$ l/ml de Ácido Acético Glacial PA. As amostras foram mantidas a 30°C por 30 minutos, a fim de diluir toda a pepsina e depois colocadas a 4°C, sob agitação, *over-nighth*. Após este período, os meios foram centrifugados a 2000g por 1:30h a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram lavados 1x com PBS gelado. As proteínas foram então quantificadas em espectrofotômetro pelo método de Bradford, como descrito anteriormente.

#### **4.7. Análise das proteínas nucleares por Western Blotting**

Para a análise das proteínas por Western Blotting, 30 a 40  $\mu$ g de extrato nuclear, 2x SDS buffer e água destilada, num volume final de 30 $\mu$ l, foram denaturados a 95°C por 1:30minuto, separados em gel de poliacrilamida-SDS (PAGE) e transferidos para membrana de nitrocelulose Hybond-P (Amersham) em tampão contendo 20mM Tris, 150 mM glicina e 20% de metanol, a uma voltagem contínua 100mA *over-night* a 4°C. As membranas foram bloqueadas com uma

solução de TBS com 5% de leite desnatado e 0,1% de Tween 20, pH 7,6, por 2 horas e então imunoblottadas com anticorpo primário monoclonal anti-HIF-1 $\alpha$  produzido em camundongo, na diluição de 1/150 (Transduction Laboratories, Lexington, KY) *over-night* a 4°C sob agitação contínua. O anticorpo secundário foi uma IgG anti-camundongo conjugada com *horseradish*- peroxidase, em diluição de 1:2000 (Amersham). As membranas foram lavadas 3 vezes (1x 15min e 2x 10min) entre as incubações com os anticorpos com solução de TBS+Tween 0,1% pH 7,6. As bandas protéicas na membrana de nitrocelulose foram então reveladas usando-se o kit de detecção ECL (Amersham) e então realizada a autoradiografia. Posteriormente as membranas foram submetidas ao procedimento de *stripping* para retirada dos anticorpos e novamente bloqueadas em solução de leite 5% e imunoblottadas com anticorpo monoclonal primário anti- $\beta$ -actina, que é uma proteína celular estrutural. Esse procedimento visou normalizar a quantidade de proteínas presentes em cada amostra, evitando-se falsos positivos, pois desta maneira é possível descartar eventuais erros de pipetagem.

#### **4.8. Análise das proteínas precipitadas por Western Blotting**

O princípio de separação em gel e transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose utilizado foi o mesmo do descrito acima. Para a detecção do colágeno tipo II foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-colágeno II (gentilmente cedido pelo Prof Natalino Yoshinari-USP-SP). Sendo assim, o tampão utilizado para lavagem das membranas e diluições dos anticorpos foi o PBS e não o TBS. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-coelho policlonal

(Amersham®). As autoradiografias das bandas também foram feitas como descrito anteriormente para os extratos nucleares.

#### 4.9. Interferência na expressão do RNA através de siRNA.

Para a técnica de interferência na expressão do RNA pelo uso de siRNA, condrócitos foram submetidos à cultura em monolayer diretamente após a digestão com colagenase tipo 2, antes de serem congelados. Aproximadamente  $3 \times 10^5$  células foram colocadas em placas de 60 x 15 mm com meio de cultura (DMEN + 10%FBS+ 1% de MEM +1% de penicilina e estreptomicina) como já descrito anteriormente. Os meios foram trocados a cada 48 horas e as células permaneceram em cultura por no máximo 7 dias até atingirem 50 a 70% de confluência. Nessa fase o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas 1 vez e mantidas apenas em DMEM por 24h. Após esse período as células foram incubadas com a solução de transfecção contendo os oligos de siRNA (100nM) e a lipofectamina (2µl/ml). Os oligos de siRNA foram desenhados utilizando-se o *software* Vector NTI Advance 10® e manufaturados pela Invitrogen (Tabela 3). Os oligos empregados foram: Controle Negativo (**Cnt-**), que não tem como foco o silenciamento do HIF-1 $\alpha$  e Controle Positivo para silenciamento do HIF-1 $\alpha$ (**HIF-**).



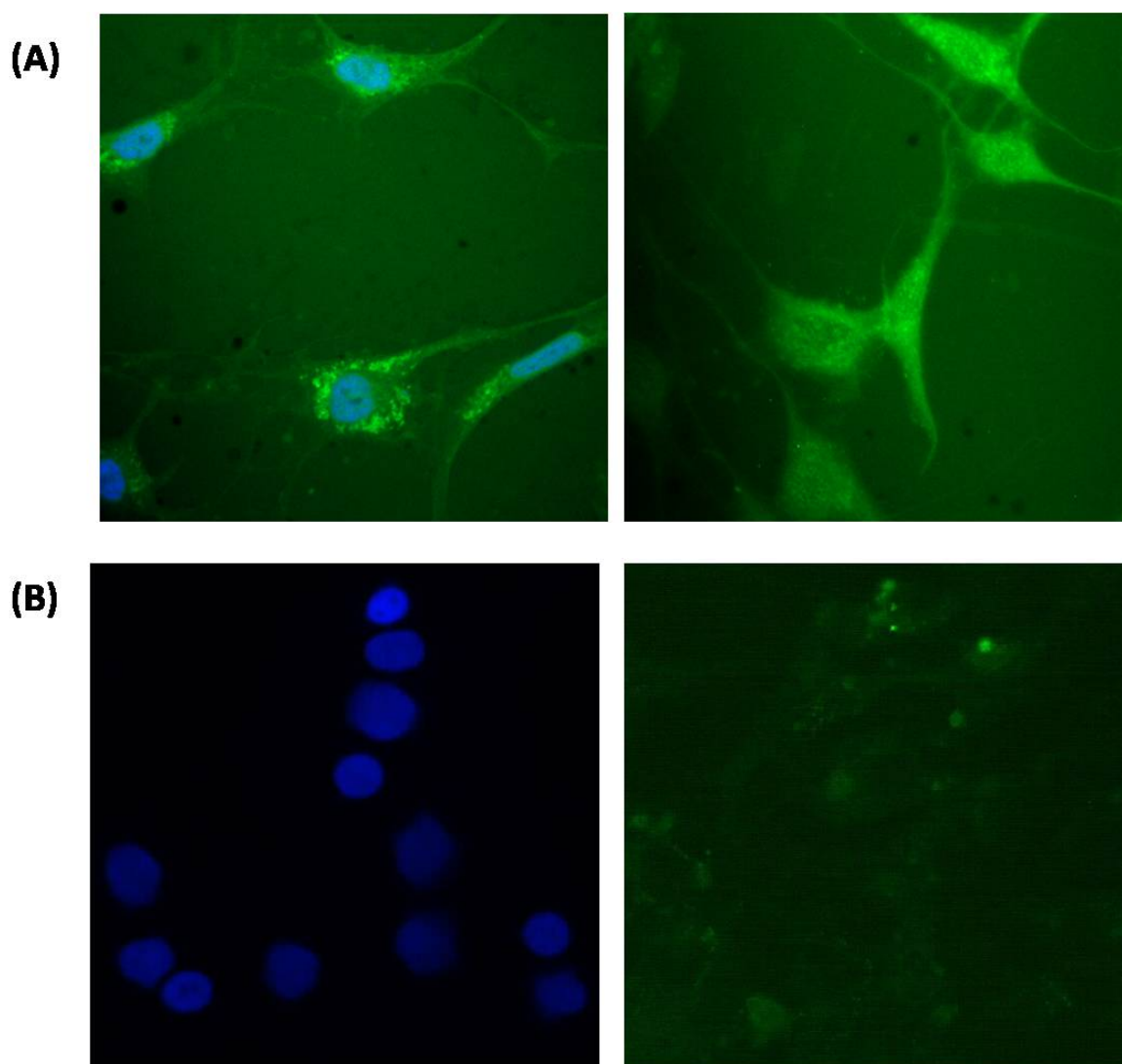
**Tabela 3. Seqüência dos oligos de siRNA utilizados na transfecção para interferência em RNAm para o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  (HIF1A).**

| Gene         | siRNA- Senso               | siRNA- Antisenso          |
|--------------|----------------------------|---------------------------|
| <b>CNT -</b> | GGAGGUCUAGUGGUUUUAUAUGUGAA | UUCCAUAUAAACCACUAGACCUC   |
| <b>HIF1A</b> | GGAUGCUGGUGAUUUUGGAUAUUGAA | UUCAAUAUCCAAAUCACCAGCAUCC |

Para a preparação da solução de transfecção, inicialmente foi feita a diluição dos oligos (Cnt- e HIF-) em Opti-mem (OM), em seguida foi feita a diluição do Opti-mem com a lipofectamina e esta solução foi então incubada em temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Depois as duas soluções: Opti-mem + oligos e Opti-mem + lipofectamina foram misturadas e incubadas por mais 20 minutos em TA antes de serem colocados num volume final de 2ml. As células foram mantidas nessa solução de transfecção por 24h em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, a solução de transfecção foi retirada e as células foram mantidas em meio de cultura normal (DMEN + 10%FBS+ 1% de MEM +1% de penicilina e estreptomicina). Nos períodos especificados foram realizados os tratamentos com as citocinas em condições normais de oxigênio e hipóxia, sendo respeitado o tempo máximo de 72h, para extração do RNA total com Trizol®, como descrito abaixo (item 4.9.1).

Para garantir a eficiência da transfecção, condrócitos também foram transfectados com oligos fluorescentes como controle positivo da técnica de transfecção com lipofectamina. Para isso, as células foram cultivadas em monocamada (*monolayer*) sobre lamínulas e foi utilizado o mesmo protocolo de

transfecção citado anteriormente, utilizando-se oligos fluorescentes (100nM). Para a análise das imagens, as lamínulas foram previamente lavadas com PBS e colocadas sobre lâminas histológicas com uma gota de Vecta-Shield® (Sigma-Aldrich®), para a marcação em azul dos núcleos celulares. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico Leica FW 4500 B (Fig.10).

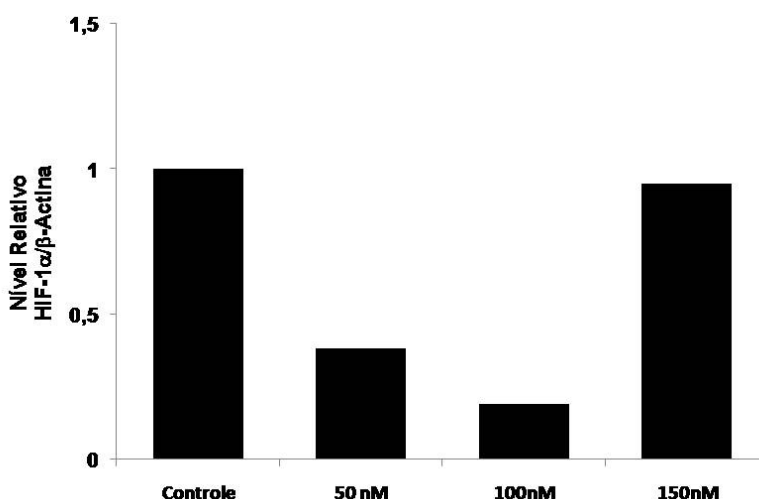


**Figura 10.** Imagens de condrócitos humanos em OA cultivados em monocamada (*monolayer*) e submetidos à tranfecção com oligos fluorescentes: (A) A cor azul representa os núcleos celulares e a cor verde demonstra os oligos fluorescentes no interior da célula; (B) Condrócitos submetidos a

técnica de transfecção apenas com lipofectamina, com ausência de oligo fluorescente, os pontos azuis representam os núcleos celulares, demonstrando a viabilidade celular.

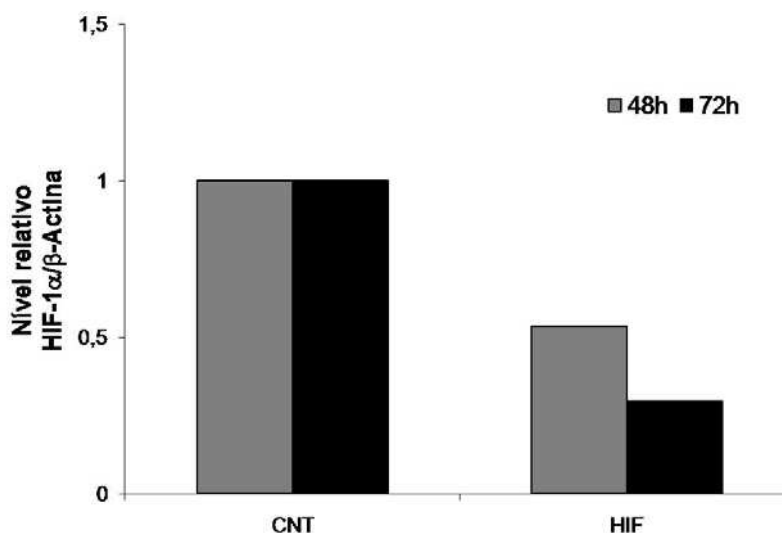
#### 4.9.1. Padronização da Concentração de Oligos e do período necessário pós-transfecção para o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$

Para a padronização da concentração de oligos de siRNA visando o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$ , condrócitos foram submetidos à transfecção com 3 concentrações diferentes de siRNA 50, 100 e 150nM, tanto para os grupos controle negativo (CNT-) quanto para os grupos de silenciamento do HIF (HIF- 50, 100 e 150) (Fig. 11). O RNA total foi extraído 72 horas após a transfecção. Para checar o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  foi realizada a análise por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR). A concentração de 100nM foi considerada ótima para silenciamento do HIF-1 $\alpha$ , com eficiência em torno de 60%.



**Figura 11:** Expressão do RNA mensageiro do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos submetidos ao RNAi para silenciamento do gene, com concentrações de oligos de 50,100 e 150nM.

Para a padronização do período pós-transfecção com melhor resposta ao silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$ , o mesmo procedimento foi realizado, na concentração de 100nM de oligo, porém a extração do RNA total foi feita 48 e 72 horas após o período de transfecção. Observou-se que a resposta de silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  foi mais eficaz no período de 72h pós-transfecção (70%) em relação às 48h (50%) (Fig. 12).



**Figura 12:** Expressão do RNA mensageiro do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos submetidos à técnica de RNAi para silenciamento do gene, 48 e 72 horas pós transfecção.

#### 4.10. Obtenção do RNA total e cDNA

O RNA total foi obtido dos condrócitos através do reagente comercial TRIzol® (Invitrogen). Resumidamente, 1ml de Trizol foi adicionado às células, incubando-se por 5 minutos TA para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos e adicionou-se em seguida 0,2 ml de clorofórmio. A solução obtida foi agitada manualmente por 15 segundos e incubada por 3 minutos em TA. As

amostras foram centrifugadas a 12000x g por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação a solução dividiu-se em duas fases, sendo transferida para outro tubo a fase aquosa que contém o RNA. Foi adicionado 0,5 ml de álcool isopropílico e as amostras foram mantidas em TA por 10 minutos e então centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado uma vez com 1 ml de álcool etílico a 75% em água livre de RNase (DEPC). A amostra foi misturada no vórtex e centrifugada a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi dissolvido em água livre de RNase (DEPC) e incubado por 10 minutos a 55°C.

O RNA extraído foi quantificado em cuveta de quartzo sob luz ultravioleta (UV) em espectrofotômetro (260/280 nm) e a qualidade dos mesmos foi avaliada em gel de agarose 2%. As amostras de cDNA foram sintetizadas a partir de 2µg de RNA total usando o sistema de Transcrição Reversa com primers hexâmeros randômicos (5µM) (Invitrogen) em uma mistura de 20 µl contendo: tampão RT (Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM), dNTP's 250 µM cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Invitrogen); 5mM DTT (Invitrogen) e 200 U da enzima transcriptase reversa (M-MLV -*Moloney Murine Leukemia Vírus*- RT; kit Superscript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen). As amostras de cDNA foram armazenadas a -20°C até o uso.

#### **4.11. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)**

A reação de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o kit SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o equipamento 7500 Real-Time

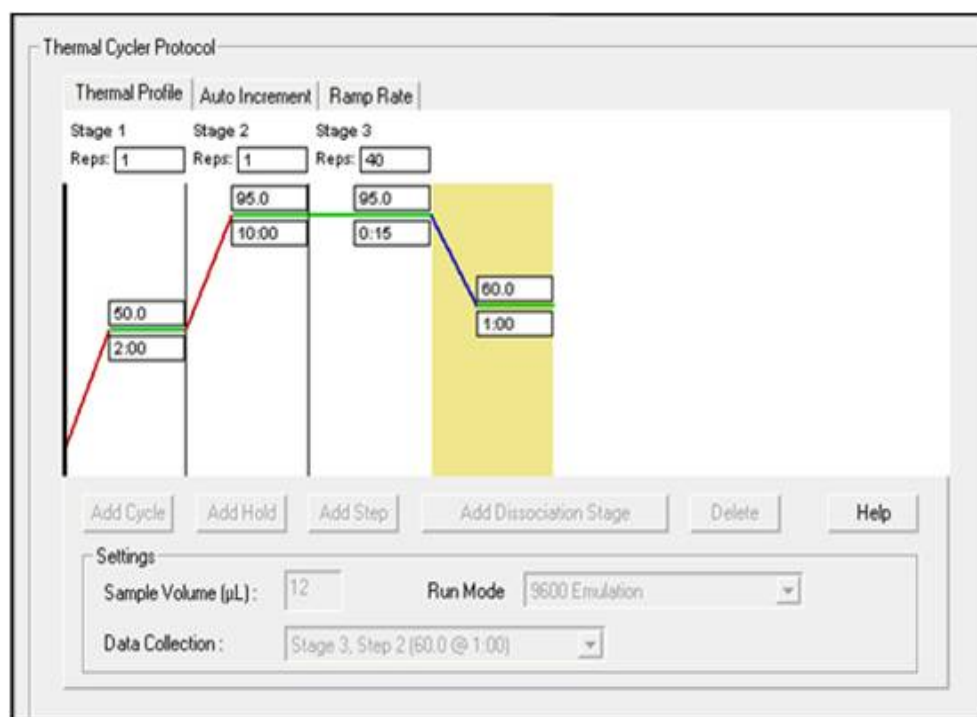
PCR System (Applied Biosystem). As condições de ciclagem seguiram as especificações do equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem) (Fig. 13). Como os dados fluorescentes da amplificação são obtidos no terceiro estágio a 60°C e não há o estágio de extensão a 72°C, o desenho dos primers deve ser feito respeitando um limite máximo de 150 pares de base como produto.

Foram desenhados primers (Vector NTI Advance 10®), com um produto máximo de 150 pares de base, *sense* e *antisense* para os genes HIF1A (NM\_001530), COL2A1 (NM\_001844), ACAN (NM\_001135) e ACTB (NM\_001101), que codificam as proteínas HIF-1 $\alpha$ , colágeno 2, agrecano e  $\beta$ -actina, respectivamente (Tabela 4). O gene da  $\beta$ -actina é um “*house keeping gene*” ou gene doméstico e é constitutivamente expresso no meio celular, por isso é utilizado para normalizar as expressões dos genes alvo. Os primers foram manufaturados pela Invitrogen. Para a amplificação dos genes, a concentração final dos primers senso e antisenso e de cDNA necessária à reação de PCR em tempo real foram obtidas após a padronização.

**Tabela 4. Seqüência dos primers utilizados para a realização da PCR em tempo real para os genes HIF1A, COL2A, ACAN e ACTB.**

| Gene          | Senso                       | Antisenso                         |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| <b>HIF1A</b>  | CTGACCCTGCACTCAATCAA        | CTTTGCTTCTGTGTCTTCAGCAGCA         |
| <b>COL2A1</b> | CCCAGTTGGGAGTAATGCAA        | TTGCCTTGAAATCCTTGAGG              |
| <b>ACAN</b>   | CAACAGTGCCTATCAGGACAA       | TAGACCCCAGAGTCATTGGA              |
| <b>ACTB</b>   | GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC | CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C |

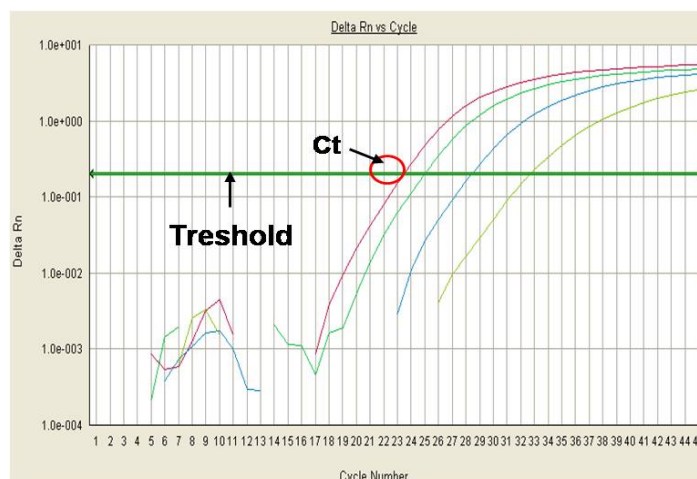
HIF1A – Gene do HIF-1 $\alpha$ ; COL2A1 – Gene do Colágeno 2; ACAN – Gene do Agrecano e ACTB – Gene da  $\beta$ -actina.



**Figura 13. Condições de ciclagem da reação de PCR em tempo real.** O terceiro estágio (*Stage 3*) compreende a repetição de 40 ciclos e os dados de fluorescência são coletados durante no período que a reação permanece em 60°C, em cada ciclo (destacado em amarelo).

#### 4.11.1. Padronização das concentrações de primers e cDNA para o qRT-PCR

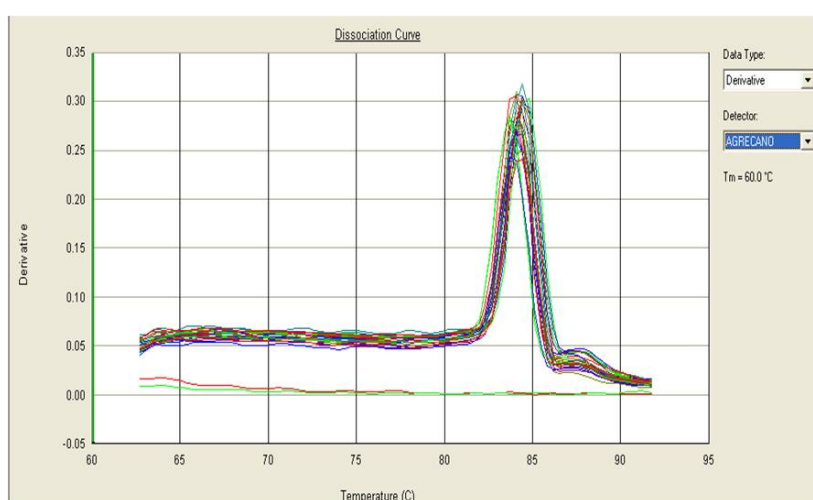
A solução de qRT-PCR tem um volume final de 10 $\mu$ l, dos quais: 5  $\mu$ l de Sybr Green, 3 $\mu$ l de cDNA já diluído e 2 $\mu$ l de solução de primers. Na padronização da concentração de primers, foram utilizados 4 valores diferentes: 150, 300, 600 e 900nM de senso e antisenso na solução final qRT-PCR. As reações foram feitas em triplicata. Foi realizada quantificação absoluta das amplificações dos genes e na análise da concentração ótima, procurou-se o valor que obtivesse o menor Ct e o maior  $\Delta$ Rn. Ct corresponde ao ciclo em que a reação cruza o *Threshold*, que é a linha base do nível de fluorescência em que a reação é detectada, na fase exponencial.  $\Delta$ Rn refere-se à quantificação do produto amplificado ao final dos 40 ciclos, onde Rn corresponde à intensidade de sinal a cada ciclo, comparando-o com a referência passiva, no caso do Sybr Green, essa referência é o ROX (Fig. 14). As concentrações ótimas obtidas foram 150nM para o primer do HIF-1 $\alpha$ , 300 nM para os primer de  $\beta$ -actina e agrecano e 900nM para colágeno tipo II.



**Figura 14:** Threshold representa a linha base de detecção da fluorescência e Ct indica o ciclo em que o nível de fluorescência da amostra começou a ser detectada.



Na padronização da concentração de cDNA, foram utilizadas 6 diluições diferentes de cDNA em água DEPC: 1:2/ 1:4/ 1:6/ 1:8/ 1:10 e 1:12 $\mu$ l. A concentração ótima também é a que obteve menor Ct em maior  $\Delta R_n$ , e nesse caso, a concentração de 1 $\mu$ l de cDNA em 6 $\mu$ l de água DEPC foi considerada ótima para a realização dos experimentos com todos os primers, exceto para o do HIF-1 $\alpha$  que foi de 1:12. Em todos os experimentos foram realizadas as curvas de dissociação para verificar a especificidade do produto formado (Fig. 15).



**Figura 15:** Curva de dissociação demonstrado a especificidade do produto amplificado, sem contaminações.

#### 4.12. Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos em médias e desvios padrões. Os dados foram submetidos à análise estatística não-paramétrica. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, e o pós-teste realizado para a discriminação das diferenças foi o teste de Duncan. Para todas as análises foi considerado o valor de  $P < 0.05$ .

# 2009

73

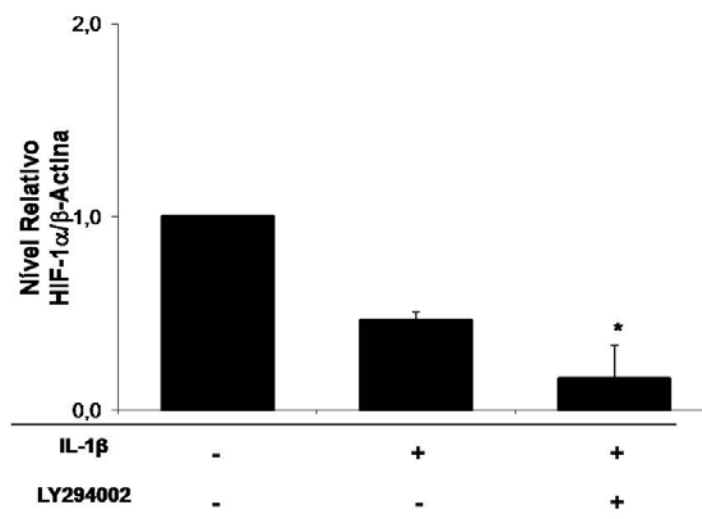
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [RESULTADOS]

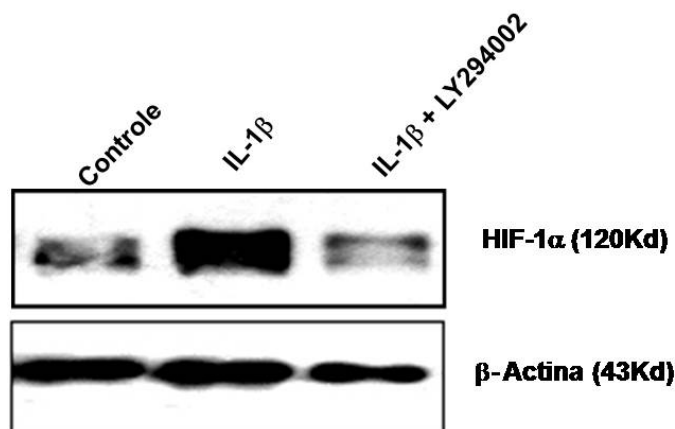
### 5.1. 1ª Fase

A citocina inflamatória IL-1 $\beta$  regulou negativamente a expressão gênica do HIF-1 $\alpha$ , no entanto, sem significância estatística. O tratamento associado de IL-1 $\beta$  e LY294002, o inibidor da via da PI-3K, potencializou o efeito na expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  em comparação com o grupo controle, sem nenhum tratamento ( $P < 0,05$ ) (Fig.16).



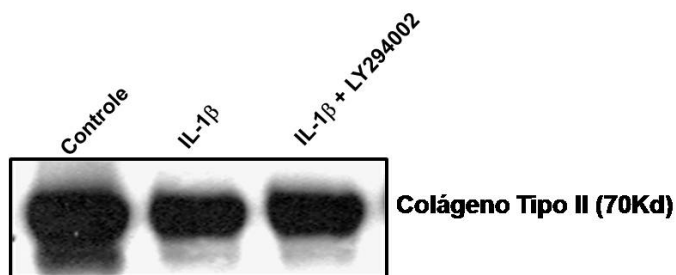
**Figura 16.** Expressão de RNAm do gene do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos humanos em OA sob condições normais de oxigênio. A primeira barra representa o grupo controle, sem nenhum tratamento. A segunda barra representa a regulação negativa, porém não estatisticamente significativa da IL-1 $\beta$  sobre o HIF-1 $\alpha$  e a terceira o grupo demonstra que associação entre IL-1 $\beta$  e LY294002 regula negativamente o RNAm do HIF-1 $\alpha$  com mais intensidade (\* $P < 0,05$ ) ( $n=3$ ).

A expressão protéica nuclear do HIF-1 $\alpha$  foi regulada positivamente pela IL-1 $\beta$ , porém o bloqueio da via da PI-3K anulou esse efeito hiperregulatório da IL-1 $\beta$  sobre HIF-1 $\alpha$  (Fig.17).



**Figura 17. Expressão da Proteína Nuclear do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos humanos em OA.** A primeira banda demonstra a expressão do HIF-1 $\alpha$  no grupo controle, na segunda banda observamos a regulação positiva da IL-1 $\beta$  sobre a expressão do HIF-1 $\alpha$  e a terceira banda demonstra que o bloqueio da via da PI-3K anula o efeito regulatório da IL-1 $\beta$ . Os resultados foram normalizados com a  $\beta$ -Actina.

Com relação à expressão protéica de colágeno tipo II no meio de cultura dos condrócitos, não foram observadas alterações significantes entre os grupos (Fig.18).

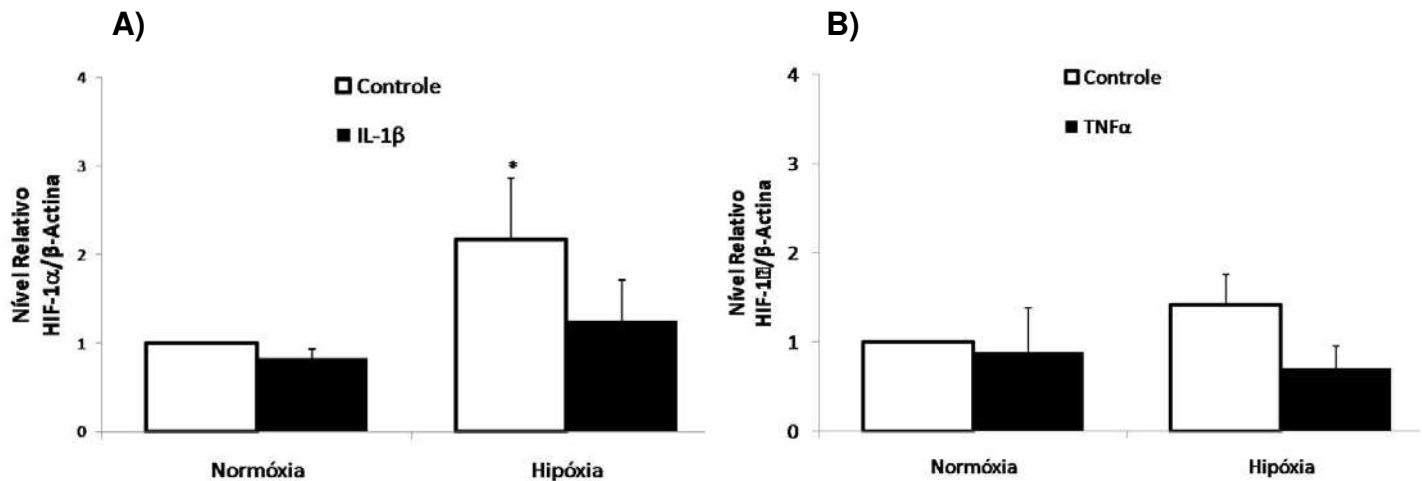


**Figura 18. Expressão da Proteína do Colágeno tipo II nos meios de cultura de condrócitos humanos em OA.** Não houve alterações significantes entre os grupos.

## 5.2. 2ª Fase

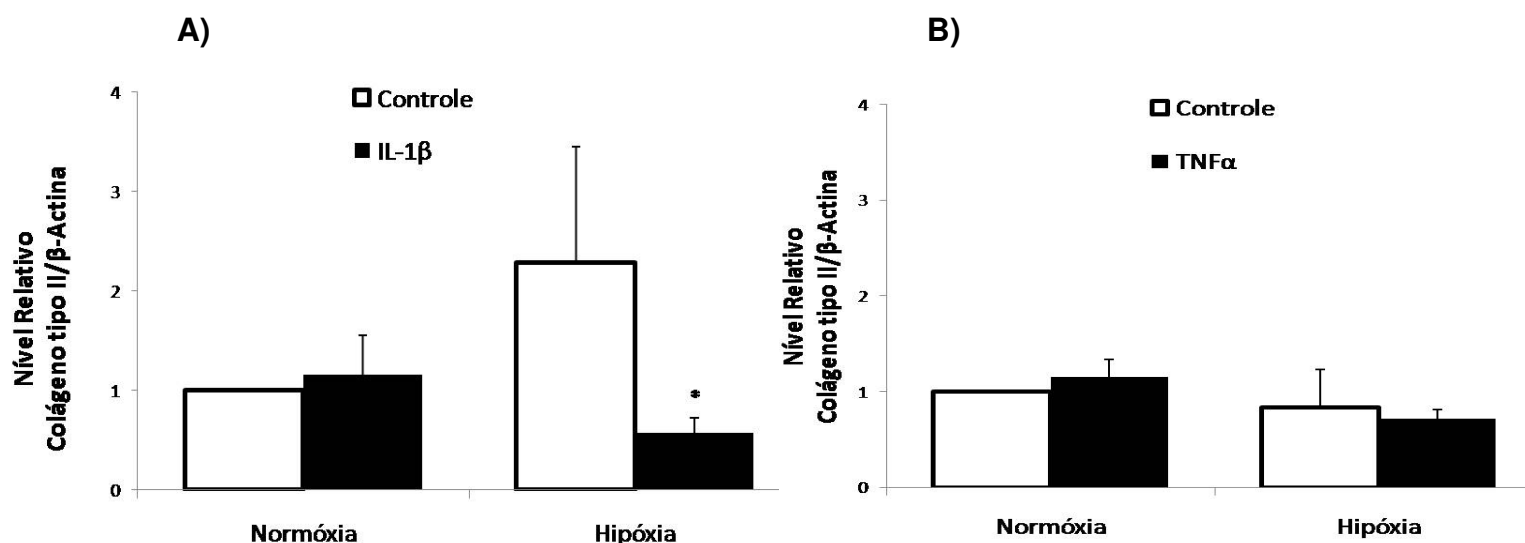
Na segunda fase do trabalho, analisamos a expressão gênica do HIF-1 $\alpha$ , colágeno tipo II e agrecano de condrócitos cultivados em suspensão. Observamos que em hipóxia, a expressão do HIF-1 $\alpha$  aumentou em relação ao grupo controle

em condições normais de oxigênio, como esperado, principalmente nos experimentos com IL-1 $\beta$  ( $P<0,05$ ) (Fig.19A). As citocinas inflamatórias não exerceram efeito sobre o HIF-1 $\alpha$  em condições normais de oxigênio ( $P>0,05$ ). Em associação com a hipóxia, IL-1 $\beta$  (Fig.19A) e TNF $\alpha$  (Fig.19B) anularam o efeito regulatório positivo dessa condição de oxigênio na expressão do HIF-1 $\alpha$ , mantendo os níveis relativos de expressão próximos aos valores basais (grupo controle) ( $P>0,05$ ).



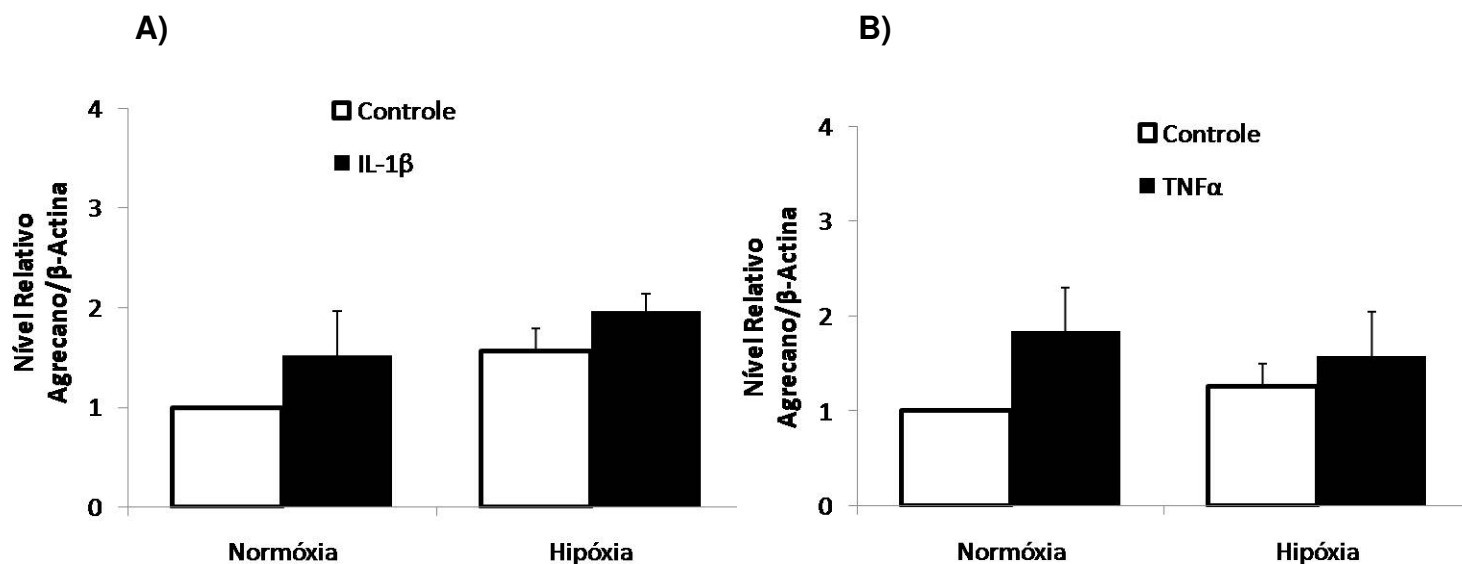
**Figura 19. Expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos humanos OA cultivados em suspensão.** Em condições normais de oxigênio, as citocinas IL-1 $\beta$  (A) e TNF $\alpha$  (B) não exerceram nenhum efeito sobre o HIF-1 $\alpha$ . A) A hipóxia aumentou a expressão do HIF-1 $\alpha$  (\* $P<0,05$ ) em relação ao grupo controle em condições normais de oxigênio. Mas esse efeito regulatório positivo da hipóxia sobre o HIF-1 $\alpha$  foi anulado quando em associação com os estímulos da IL-1 $\beta$  (A) e TNF $\alpha$  (B) que retornaram aos valores relativos de expressão do HIF-1 $\alpha$  observados nos grupos controle ( $P>0,05$ ) (n=3).

Nos experimentos com IL-1 $\beta$ , a expressão gênica do colágeno tipo II aumentou em hipóxia, assim como observado com o HIF-1 $\alpha$ , apesar de não apresentar significância estatística ( $P > 0,05$ ). Mas a hipóxia em associação com a IL-1 $\beta$ , regulou negativamente os níveis de expressão de colágeno tipo II ( $*P < 0,05$ ) em comparação com o grupo controle também nessa condição de oxigênio (Fig.20A). Nos experimentos com TNF $\alpha$ , não foi observado nenhuma alteração significativa nos níveis de colágeno tipo II (Fig.20B).



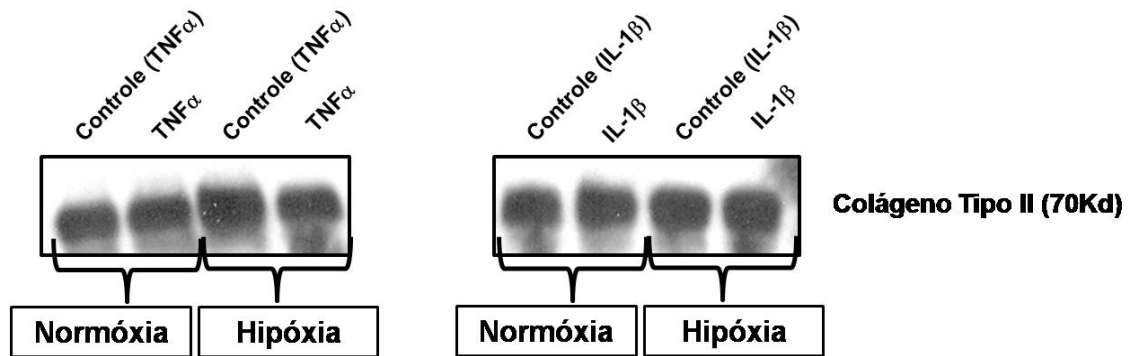
**Figura 20. Expressão do RNAm do Colágeno tipo II em condrócitos humanos OA cultivados em suspensão.** A) A hipóxia aumentou a expressão do Colágeno tipo II nos experimentos com IL-1 $\beta$  ( $P > 0,05$ ), mas em associação com essa citocina regulou negativamente os níveis de Colágeno tipo II ( $*P < 0,05$ ). B) Nos experimentos com TNF $\alpha$ , não foi observado nenhuma alteração significativa nos níveis de colágeno tipo II ( $P > 0,05$ ) ( $n=3$ ).

Na análise da expressão gênica do agrecano, a IL-1 $\beta$  (Fig.21A) e o TNF $\alpha$ , (Fig.219B) demonstraram tendência à regulação positiva desse gene em ambas as condições de oxigênio, ao contrário do observado na expressão de colágeno tipo II, no entanto, não foram observadas alterações estatísticas ( $P > 0,05$ ).



**Figura 21. Expressão do RNAm do Agrecano em condrócitos humanos OA cultivados em suspensão.** A) IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  (B) demonstraram tendência à aumentar a expressão do agrecano tanto em condições normais de oxigênio quanto em hipóxia, porém, não foram observadas alterações estatísticas ( $P > 0,05$ ) ( $n=3$ ).

Com relação à expressão protéica de colágeno tipo II no meio de cultura dos condrócitos, também não foram observadas alterações significantes entre os grupos (Fig.22).



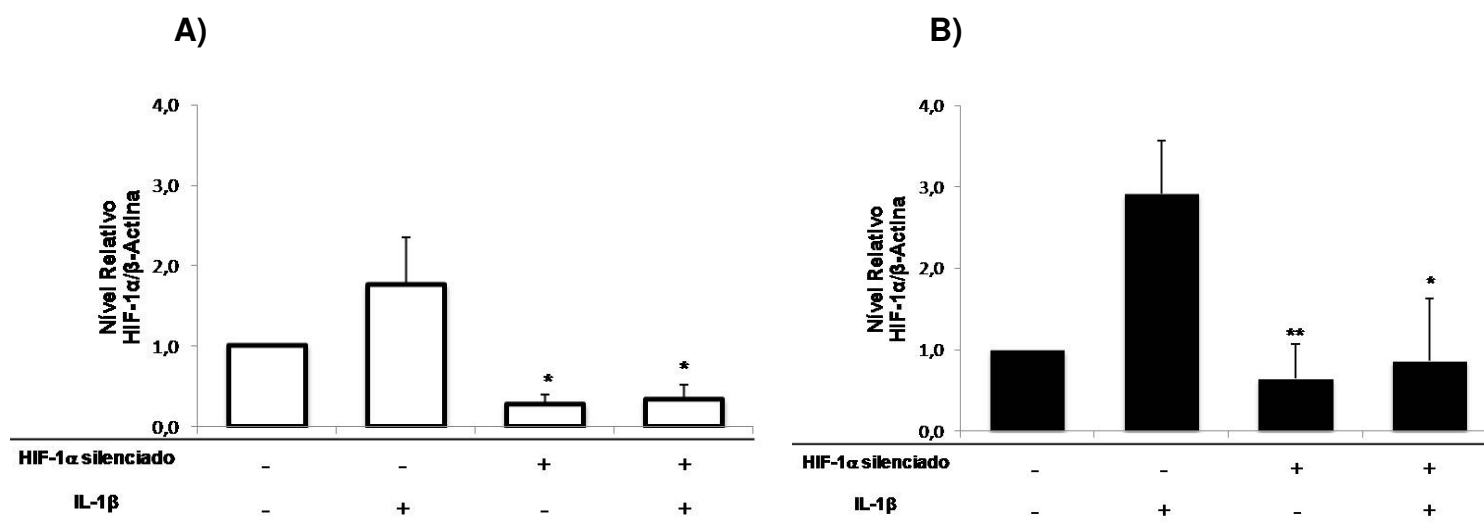
**Figura 22. Expressão da Proteína do Colágeno tipo II nos meios de cultura de condrócitos humanos em OA.** Não houve alterações significantes entre os grupos.

### 5.3. 3ª Fase

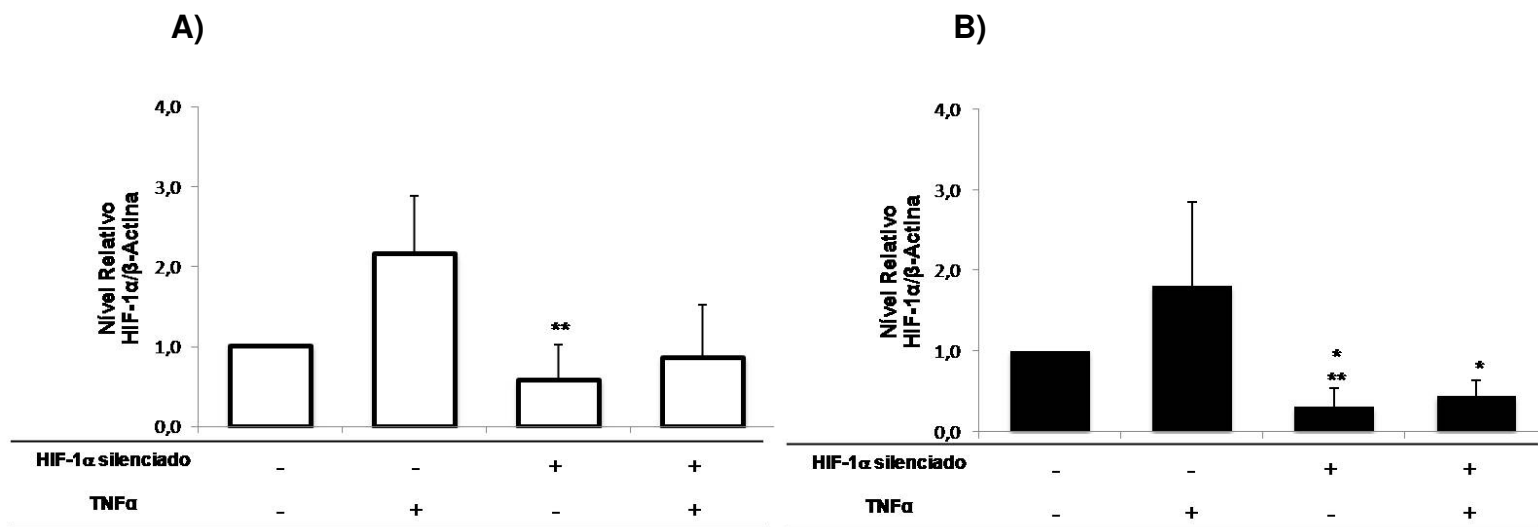
Nessa fase foram feitos experimentos para o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  por interferência do RNAm e analisamos a expressão gênica do próprio HIF-1 $\alpha$ , para verificar a eficiência da técnica, além dos genes do colágeno tipo II e agregcano. Nesses experimentos em que foi utilizada a cultura em monocamada (*monolayer*), o comportamento dos condrócitos em relação ao padrão de expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  foi diferente do observado nas culturas em suspensão (Fase 2). Aqui observamos que as citocinas  $IL-1\beta$  (Fig.23) e  $TNF\alpha$  (Fig.24) apresentaram tendência em aumentar HIF-1 $\alpha$  nos grupos não silenciados para esse gene, em ambas as condições de oxigênio, principalmente em associação com hipóxia, quando comparados aos grupos controle também não silenciados ( $P > 0,05$ ) e quando comparados aos grupos silenciados para o HIF-1 $\alpha$  (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ) (Fig.23B e 24B). A eficácia do silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  foi de aproximadamente 70% nos experimentos com  $IL-1\beta$  (Fig.21) e de 40%



nos experimentos com  $\text{TNF}\alpha$  (Fig.24). Mas em todos os grupos silenciados, em quaisquer condições de oxigênio,  $\text{IL-1}\beta$  (Fig.21 e B) e  $\text{TNF}\alpha$  (Fig.24A e B) não foram capazes de alterar significativamente a expressão de  $\text{HIF-1}\alpha$ .



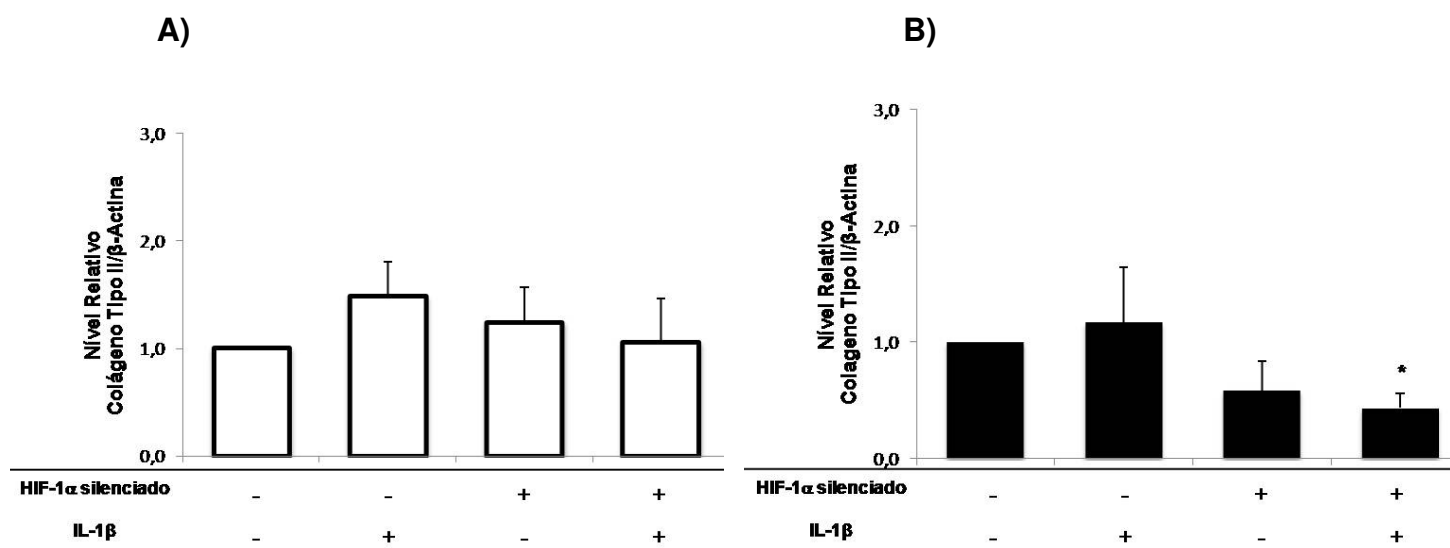
**Figura 23. Expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos humanos OA cultivados em *monolayer* tratados com IL-1 $\beta$ .** Nos grupos não silenciados para o gene do HIF-1 $\alpha$ , houve uma tendência ao aumento de sua expressão sob o tratamento da IL-1 $\beta$  em condições normais de oxigênio (A) e em hipóxia (B) quando comparados aos grupos controle ( $P > 0,05$ ) e quando comparados aos grupos silenciados para o HIF-1 $\alpha$  (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ) também em ambas as condições de oxigênio. Nos grupos silenciados para o gene do HIF-1 $\alpha$ , em quaisquer condições de oxigênio, condições normais de oxigênio (A) ou hipóxia (B), IL-1 $\beta$  não alterou significativamente a expressão de HIF-1 $\alpha$  ( $P > 0,05$ ) (n=6).



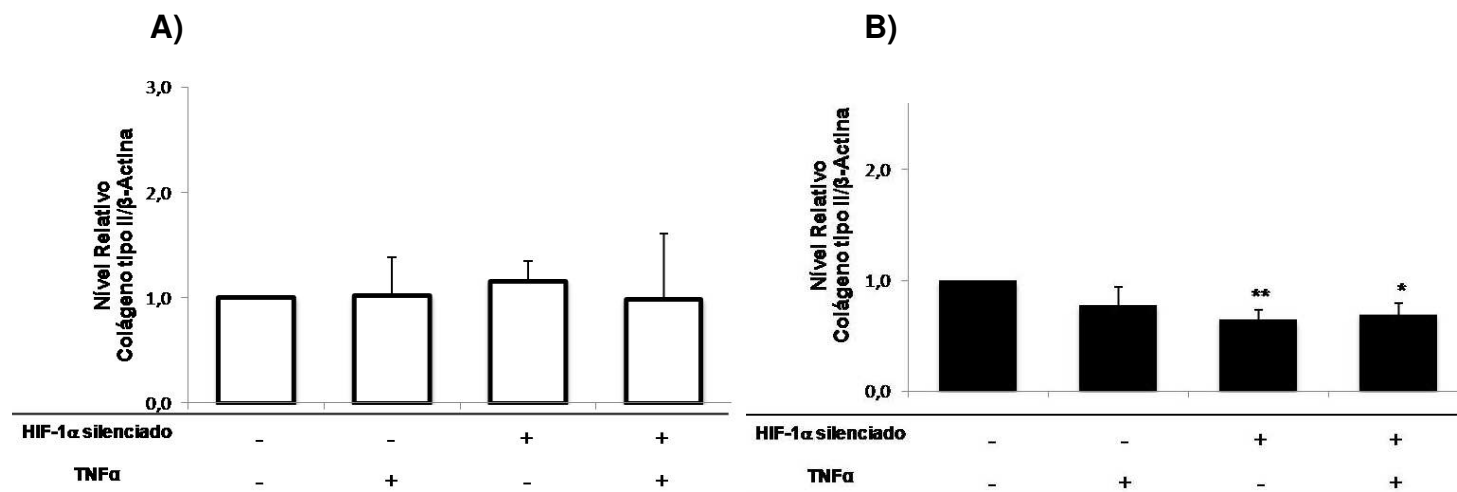
**Figura 24. Expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos humanos OA cultivados em *monolayer* tratados com TNF $\alpha$ .** TNF $\alpha$  também apresentou tendência a aumentar a expressão do HIF-1 em condições normais de oxigênio (A) e em hipóxia (B) quando comparados aos grupos controle ( $P > 0,05$ ) e essa hiperregulação foi significativa quando comparada à expressão dos grupos silenciados para o HIF-1 $\alpha$  (\* $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$ ) também em ambas as condições de oxigênio. Nos grupos silenciados para o gene do HIF-1 $\alpha$ , em quaisquer condições de oxigênio, condições normais de oxigênio (A) ou hipóxia (B), TNF $\alpha$  não alterou significativamente a expressão de HIF-1 $\alpha$  ( $P > 0,05$ ) (n=6).

Quando analisamos a expressão do Colágeno tipo II, observamos que em condições normais de oxigênio, IL-1 $\beta$  (Fig. 25A) e TNF $\alpha$  (Fig.26A) não exerceram nenhuma ação regulatória sobre a expressão desse gene, tanto nos grupos não silenciados quanto nos grupos silenciados para o HIF-1 $\alpha$ . No entanto em condições de hipóxia (Fig.25B e 26B), a expressão do colágeno tipo II foi regulada negativamente nos grupos silenciados quando comparados aos grupos controle, não silenciados, principalmente nos experimentos com TNF $\alpha$  (\* $P < 0,05$  e

\*\*  $P < 0,001$ ) (Fig.26B). A associação entre a falta do HIF-1 $\alpha$  e as citocinas IL-1 $\beta$  (Fig.25B) e TNF $\alpha$  (Fig.26B), diminuiu mais ainda a expressão do colágeno tipo II nos grupos silenciados em condições de hipóxia.

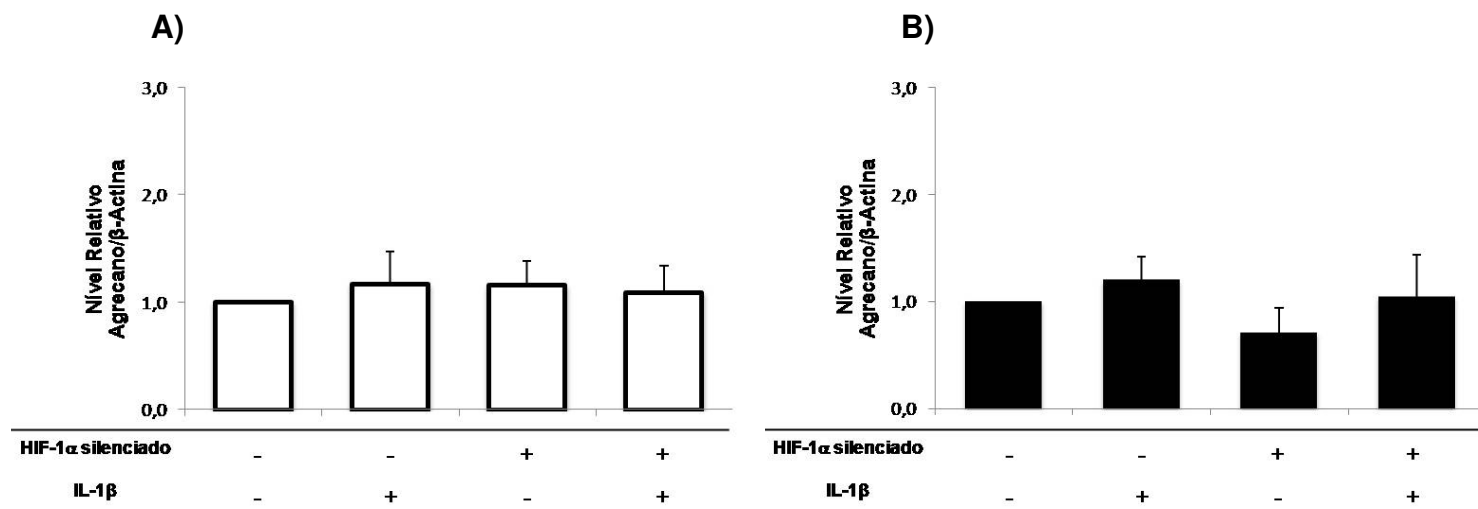


**Figura 25. Expressão do RNAm do Colágeno tipo II em condrócitos humanos OA cultivados em *monolayer* tratados com IL-1 $\beta$ .** A) Em condições normais de oxigênio IL-1 $\beta$  e o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  não exerceram nenhuma ação regulatória sobre a expressão de colágeno tipo II ( $P > 0,05$ ). B) Em hipóxia, a falta do HIF-1 $\alpha$  diminuiu a expressão de colágeno tipo II (\* $P < 0,05$ ), principalmente quando associada com a IL-1 $\beta$  (\* $P < 0,05$ ) (n=6).

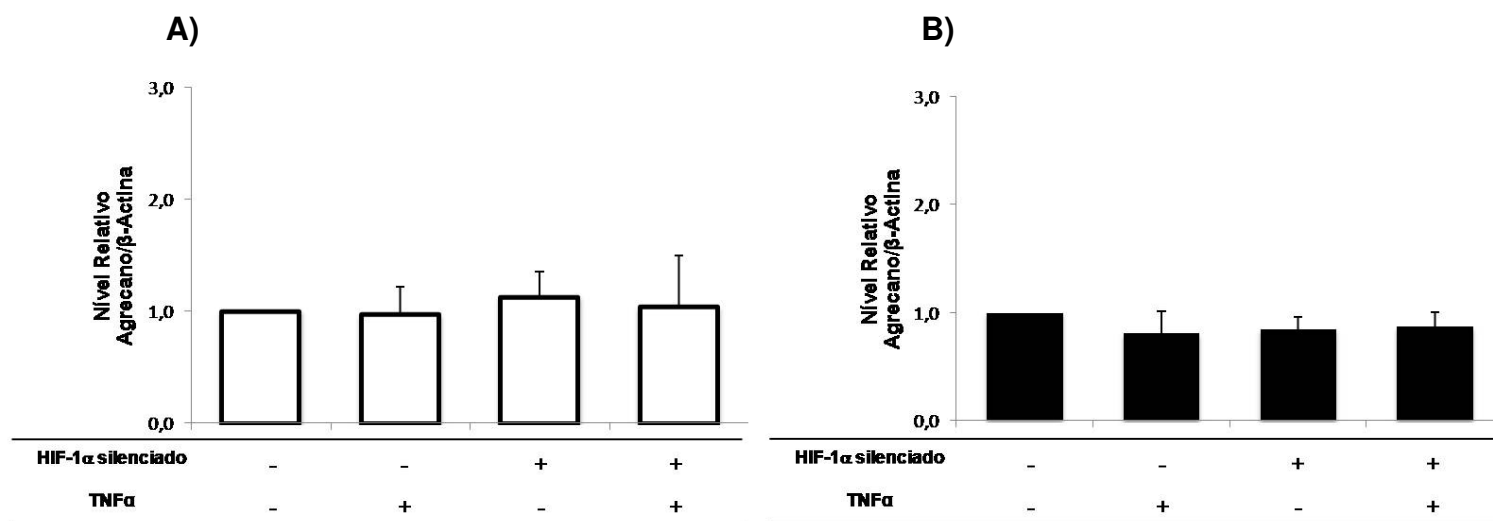


**Figura 26. Expressão do RNAm do Colágeno tipo II em condrócitos humanos OA cultivados em *monolayer* tratados com TNF $\alpha$ .** A) Em condições normais de oxigênio, nem o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  nem TNF $\alpha$  exerceram nenhuma ação regulatória sobre a expressão de colágeno tipo II ( $P > 0,05$ ). B) Em hipóxia, a falta do HIF-1 $\alpha$  diminuiu significativamente a expressão de colágeno tipo II (\*\* $P < 0,001$ ), e também quando associada com o TNF $\alpha$  (\* $P < 0,05$ ) (n=6).

Na análise do agrecano, observamos que em condições normais de oxigênio não houve diferença na expressão desse gene com ou sem o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  e os tratamentos com IL-1 $\beta$  (Fig.27A) e TNF $\alpha$  (Fig.27B) ( $P > 0,05$ ). Em hipóxia, nos experimentos com IL-1 $\beta$  observamos uma tendência à diminuição do agrecano no grupo silenciado para o HIF-1 $\alpha$  (Fig.27B), no entanto, essa diferença não foi significativa ( $P > 0,05$ ). Também nos experimentos com TNF $\alpha$  (Fig.28B), não foram observadas alterações na expressão do agrecano independente do silenciamento do HIF-1 $\alpha$  ( $P > 0,05$ ) (n=6).

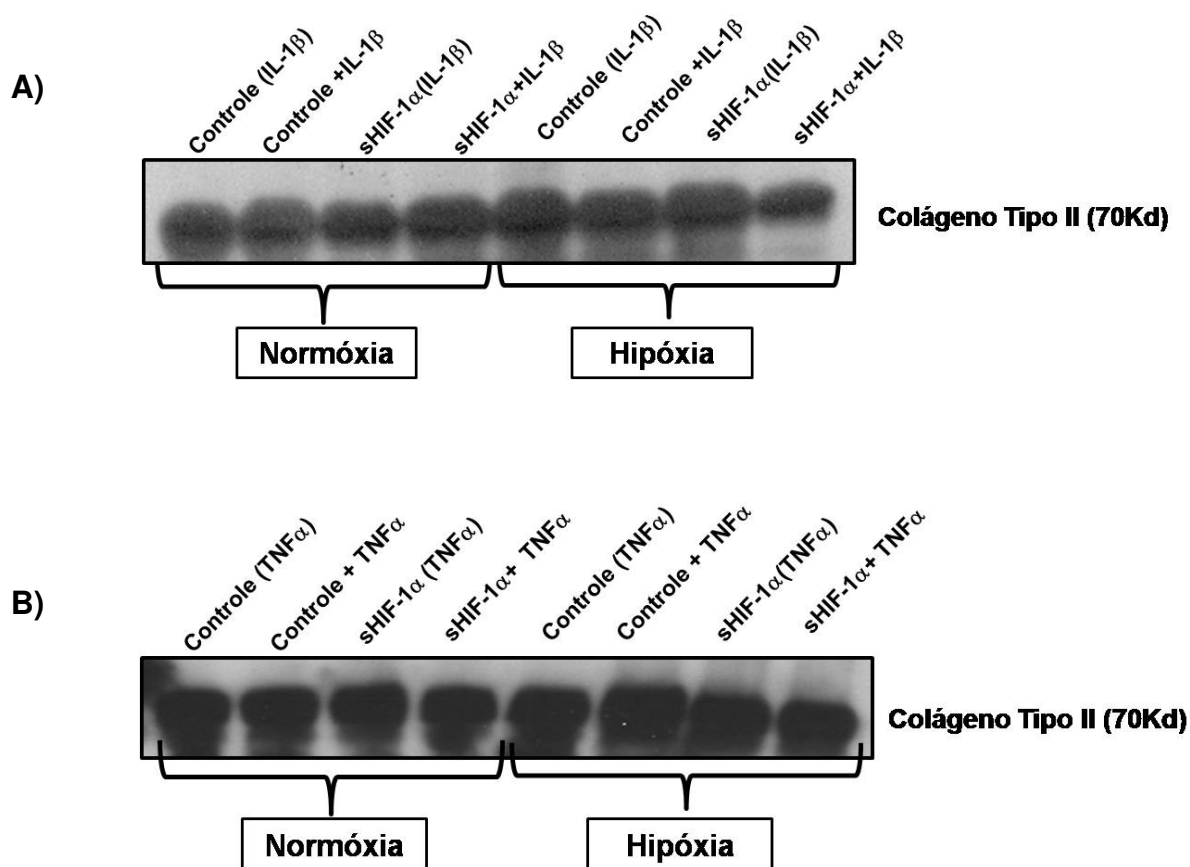


**Figura 27. Expressão do RNAm do Agrecano em condrócitos humanos OA cultivados em *monolayer* tratados com IL-1 $\beta$ .** A) Em condições normais de oxigênio não foram observadas alterações na expressão do agrecano, independente do silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  e do tratamento com IL-1 $\beta$  ( $P > 0,05$ ). B) Em hipóxia, apesar da tendência à diminuição da expressão do agrecano no grupo silenciado para o HIF-1 $\alpha$ , não foram encontradas diferenças estatisticamente significativa entre nenhum grupo analisado ( $P > 0,05$ ).



**Figura 28. Expressão do RNAm do Agrecano em condrócitos humanos OA cultivados em *monolayer* tratados com TNF $\alpha$ .** Tanto em condições normais de oxigênio (A) quanto em hipóxia (B) não foram observadas alterações na expressão do agrecano independente do silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  ( $P > 0,05$ ) (n=6).

Assim como observado em todas as análises das proteínas precipitadas dos meios de cultura, também nessa fase dos experimentos, não encontramos diferenças significantes na expressão da proteína do colágeno tipo II, mesmo nos grupos silenciados para o gene do HIF-1 $\alpha$  (sHIF-1 $\alpha$ ) e sobre os tratamentos com IL-1 $\beta$  (Fig.29A) e TNF $\alpha$  (Fig.29B)



**Figura 29.** Expressão da Proteína do Colágeno tipo II nos meios de cultura de condrócitos humanos em OA cultivados em *monolayer*. Não houve alterações significantes mesmo nos grupos silenciados para o gene do HIF-1 $\alpha$  (sHIF-1 $\alpha$ ) e sobre os tratamentos com IL-1 $\beta$  (A) e TNF $\alpha$  (B).

# 2009

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [DISCUSSÃO]

## 1ª Fase

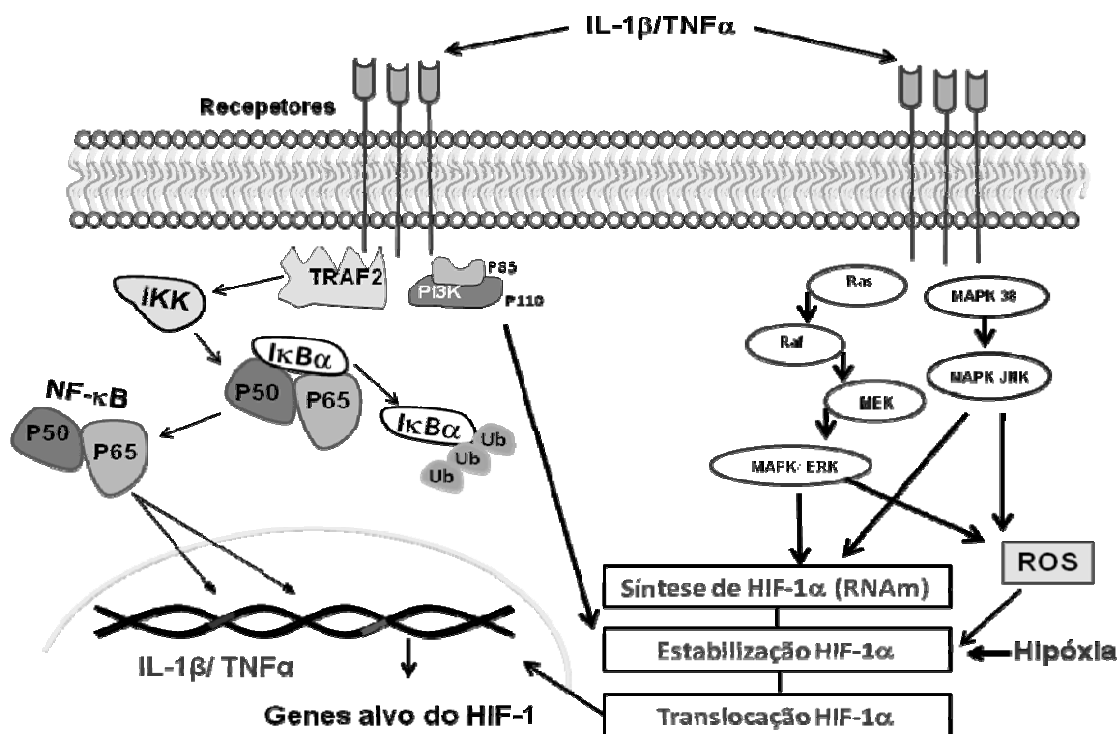
A ativação do Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia (HIF-1), responsável por transcrever genes relacionados às alterações nas concentrações de oxigênio e à sobrevivência celular, somente acontece após a dimerização entre as subunidades HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$  no núcleo. Em virtude da cartilagem articular ser um tecido avascular, todo o metabolismo dos condrócitos ocorre sob baixas tensões de oxigênio (Archer et al. 2003). Sabe-se, portanto da importância da presença e atuação da subunidade HIF-1 $\alpha$  na condrogênese, sobrevivência dos condrócitos e manutenção da homeostase na naturalmente hipóxica cartilagem articular (Coimbra et al. 2004; Pfander et al, 2004; Schipani, 2005; Yudoh et al. 2005), mas sua participação no processo de degeneração durante a osteoartrite permanece por ser melhor compreendido.

As fibrilações que ocorrem na cartilagem em decorrência do processo de degeneração na osteoartrite (OA) podem determinar o aparecimento de microfraturas no osso subcondral, o que provavelmente altera o gradiente de concentração de oxigênio da cartilagem, facilitando a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem alterar a modulação da expressão gênica dos condrócitos (Martin et al, 2004). Baseado nesses dados torna-se relevante o estudo de condrócitos humanos cultivados em condições normais de oxigênio.

Nessa fase do estudo, observou-se que em condições normais de oxigênio a IL-1 $\beta$  regulou negativamente a expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$ , no entanto, esta



regulação não foi estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle, sem o tratamento com IL-1 $\beta$ . Por outro lado, quando as células foram tratadas com IL-1 $\beta$  e a micromolécula LY294002, conhecida por ser inibidora da via da Fosfatidil-Inositol-3-Kinase (PI-3K), uma das vias não hipóxicas utilizada na ação do HIF-1 $\alpha$ , houve uma diminuição acentuada da expressão do gene do HIF-1 $\alpha$  em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ) (Fig. 30). Esses dados confirmam outros já encontrados num estudo previamente realizado pelo nosso grupo (dados ainda em fase de *peer review*) (Andrade, 2006).



**Figura 30.** Representação esquemática das vias de sinalização utilizadas pelas citocinas inflamatórias na ativação não hipóxica do HIF-1 $\alpha$ . Basicamente, atuam na síntese do RNAm do próprio HIF-1 $\alpha$  e, ou, no aumento da estabilização do HIF-1 $\alpha$  no citoplasma, consequentemente favorecendo sua translocação para o núcleo celular onde se liga à subunidade HIF-1 $\beta$  para exercer sua função.

Em relação à expressão protéica do HIF-1 $\alpha$ , diferentemente do observado em relação à expressão do seu gene, o estímulo pela IL-1 $\beta$  aumentou a concentração da proteína nuclear HIF-1 $\alpha$  e esta regulação também ocorreu, como esperado, por meio da via da PI-3K, uma vez que o bloqueio desta, anulou o efeito regulatório positivo da IL-1 $\beta$  sobre o acúmulo da proteína HIF-1 $\alpha$ .

Alguns autores observaram em células de hepatoma (HepG2) e citotrofoblásticas humanas que não houve alteração na expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  quando as mesmas foram tratadas com IL-1 $\beta$ , mas detectaram aumento da expressão protéica do HIF-1 $\alpha$  induzida pela IL-1 $\beta$ , assim como os dados observados no presente estudo. Esses autores também relataram que essa citocina causa a ativação da ligação do dímero HIF-1 com o DNA em condições normais de oxigênio (Hellwig-Burgel et al, 1999; Qian et al, 2004). Outros autores relataram ainda, em células epiteliais alveolares tipo II, esse mesmo efeito de aumento da estabilização do HIF-1 $\alpha$ , translocação nuclear e ativação da ligação HIF-1-DNA induzida pela IL-1 $\beta$  em condições normais de oxigênio. Em uma linhagem celular neoplásica, não somente observaram uma regulação positiva do HIF-1 $\alpha$  induzida pela IL-1 $\beta$ , mas também demonstraram que a via da PI-3K é utilizada por essa citocina nessa regulação (Jiang et al, 2001; Haddad, 2002, Stielh, 2002). Todos esses resultados, apesar de observados em outros tipos celulares são semelhantes aos observados nesse estudo com condrócitos OA humanos.

Em 2004, Coimbra et al, relataram aumento da expressão protéica nuclear do HIF-1 $\alpha$  induzida pelo TNF $\alpha$  em condrócitos normais e em osteoartrite sob

condições normais de oxigênio. O  $\text{TNF}\alpha$ , apesar de menos potente, é outra importante citocina envolvida na patogênese da osteoartrite e assim como a  $\text{IL-1}\beta$  aumenta a ativação da ligação HIF-1-DNA (Hellwig-Burgel et al, 1999).

Na análise da expressão gênica do  $\text{HIF-1}\alpha$  realizada em diferentes amostras de cartilagem articular, degeneradas e sadias, observou-se maior expressão desse gene nas amostras degeneradas, sugerindo que este fator pode estar relacionado com os mecanismos patogênicos da osteoartrite (Yudoh, 2005). Assim como os dados observados nessa fase do trabalho, esses autores também não encontraram efeito estatisticamente significativo do tratamento com  $\text{IL-1}\beta$  sobre a expressão do RNAm do  $\text{HIF-1}\alpha$ , mas diferentemente dos nossos resultados observados no presente estudo, os quais demonstraram ser o estímulo com a  $\text{IL-1}\beta$  suficiente para aumentar a expressão da proteína  $\text{HIF-1}\alpha$ , conforme demonstrado nos experimentos por western blotting e normalizados pela proteína celular estrutural  $\beta$ -actina, esses mesmos autores não encontraram diferenças na expressão dessa proteína em situações normais de oxigênio mas apenas em hipóxia (Yudoh et al, 2005), o que pode ser explicado pelo fato destes autores utilizarem um sistema de cultura diferente do empregado neste estudo. Enquanto aqui o sistema de cultura foi o de células em suspensão em placas com superfície revestidas por hidrogel, aqueles autores optaram pela cultura em monocamada. Em suspensão, os condrócitos permanecem com seu formato arredondado, unem-se em grupos e permanecem expressando elementos da matriz extracelular, inclusive formando nódulos de células com produção ativa de matriz extracelular. O fenótipo do condrócito, neste sistema, é preservado por mais de seis meses

(Reginato et al. 1994). O cultivo em suspensão de condrócitos, que são originados de um tecido relativamente hipóxico, pode tornar o ambiente, principalmente a parte central dos agrupamentos, hipóxico (Stokes et al. 2002).

Mais tarde, o mesmo grupo descreveu aumento dos níveis protéicos de HIF-1 $\alpha$  em condrócitos OA cultivados em condições normais de oxigênio e hipóxia, porém tratados com IL-1 $\beta$  por um período longo de tempo (24h) (Murata et al, 2006). Talvez essa diferença em relação aos resultados aqui observados possa ser explicada pelo fato de que no presente estudo analisou-se o extrato nuclear protéico, enquanto eles analisaram o lisado celular total, que pode acarretar problemas de concentração protéica em razão da grande diluição e da quantidade de proteínas que são observadas quando se analisa lisado celular total. Além do mais, HIF-1 $\alpha$  para exercer sua função tem que estar translocado para o interior do núcleo celular.

Esses resultados sugerem que em condrócitos, bem como em outros tipos celulares, a ação da IL-1 $\beta$  como regulador positivo do HIF-1 $\alpha$  deve ocorrer após a transcrição, em razão da ausência de efeito da IL-1 $\beta$  na expressão do gene do HIF-1 $\alpha$ . Também confirmamos que a regulação do HIF-1 $\alpha$  pela IL-1 $\beta$ , utiliza, ao menos em parte, a via da PI-3K. Os dados obtidos até aqui sugerem que o HIF-1 $\alpha$  pode estar envolvido no mecanismo patogênico da osteoartrite, uma vez que as principais citocinas inflamatórias dessa doença aumentam a concentração da proteína do HIF-1 $\alpha$  dentro do núcleo do condrócito.

## 2ª Fase

Na segunda fase do trabalho analisou-se a modulação do HIF-1 $\alpha$  pelas citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  e a participação das mesmas na modulação sobre a expressão dos genes do colágeno tipo II e do agrecano, os dois principais constituintes da matriz extracelular e, conseqüentemente, os mais danificados no processo de degeneração da cartilagem articular durante a osteoartrite. Observou-se que em condições normais de oxigênio não houve alteração na expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  quando as células foram estimuladas com ambas as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , dado que reforça o achado anteriormente na 1ª fase desse estudo. Esses resultados também foram observados por outros autores.

Em linhagem celular de hepatoma humano (HepG2), Hellwig-Burgel et al (1999) utilizando a técnica de Northern Blotting não observaram diferenças na expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  após os estímulos das células tanto com IL-1 $\beta$  quanto com TNF $\alpha$  indiferente à condição de tensão de oxigênio. Em células de infiltrado inflamatório de lesões cutâneas de ratos, o estímulo da hipóxia e o estímulo do TNF $\alpha$  também não foram suficientes para alterar a expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$ , neste estudo os autores também utilizaram a técnica de Northern Blotting para detecção do RNAm, bem como a técnica de análise semi-quantitativa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) para quantificar a expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  (Albina et al, 2001). Utilizando essa mesma técnica de análise semi-quantitativa da Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR), Zhou et al (2003), também observaram em células tubulares proximais renais (LLC-PK) que o estímulo do TNF $\alpha$  não alterou a expressão do RNAm do

HIF-1 $\alpha$ , apesar de aumentar a síntese da proteína HIF-1 $\alpha$ , da mesma forma Qian et al (2004) em células citotrofoblásticas humanas estimuladas com IL-1 $\beta$  observaram aumento da expressão da proteína HIF-1 $\alpha$ , porém sem alterações na expressão do RNAm desse gene.

A técnica de análise da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo Real (qRT-PCR), utilizada no presente estudo, destaca-se por ser mais sensível na detecção das alterações da expressão do RNAm, uma vez que é uma técnica quantitativa e não semi-quantitativa. Yudoh et al (2005), também utilizando essa técnica de qRT-PCR para verificar a modulação da expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$  em condrócitos humanos, também observaram que a IL-1 $\beta$  somente associada à condição de hipóxia e após 12h de estímulo, foi capaz de aumentar a expressão do RNAm do HIF-1 $\alpha$ , dado que não foi observado em condições normais de oxigênio.

Observou-se ainda que o estímulo isolado da hipóxia aumentou consideravelmente a expressão do HIF-1 $\alpha$  ( $P<0,05$ ) como esperado e nos experimentos com TNF $\alpha$  houve uma tendência a esse mesmo resultado, entretanto não foi possível demonstrar que este aumento foi estatisticamente significativo ( $P>0,05$ ), talvez em razão do tempo de tratamento com IL-1 $\beta$  ter sido de 6h enquanto que com TNF $\alpha$  foi de 4h, o que permitiu menor tempo de exposição dos condrócitos à essa condição de oxigênio. No entanto, mesmo nestas condições, ambas as citocinas anularam os efeitos positivos da hipóxia sobre a expressão do HIF-1 $\alpha$ . Yudoh et al (2005) também observaram que a hipóxia aumenta a expressão gênica do HIF-1 $\alpha$ , no entanto, demonstraram

também que esse aumento é acelerado pela IL-1 $\beta$ , diferentemente dos nossos dados onde observou-se tendência à anulação do efeito regulatório positivo da hipóxia pela IL-1 $\beta$  e pelo TNF $\alpha$ , mas esses dados não foram significantes ( $P>0,05$ ). Não se pode destacar ainda as diferentes fases de evolução da doença nas amostras de cartilagem utilizadas na obtenção dos condrócitos utilizados no presente estudo, uma vez que dada a dificuldade na obtenção dos espécimes, não foi possível utilizar cartilagens provenientes de fases mais iniciais da OA, sendo a maioria das amostras provenientes de paciente com classe três na classificação radiológica de K&L pré-cirúrgico, segundo informação fornecida pelos diferentes cirurgões.

Quando foi analisada a expressão do colágeno tipo II, no mesmo experimento, observou-se que assim como ocorreu com relação ao HIF-1 $\alpha$ , nos experimentos com IL-1 $\beta$ , a hipóxia isoladamente aumentou colágeno tipo II, mas em associação com a IL-1 $\beta$ , como esperado a expressão do colágeno II diminuiu consideravelmente ( $P<0,05$ ). Em condrócitos de cartilagem de coelhos, já foi demonstrado que a IL-1 $\beta$  diminuiu o RNAm de colágeno tipo II (Chadjichristos et al, 2003). Nos experimentos com TNF- $\alpha$  não foram observadas alterações significantes ( $P>0,05$ ). No entanto alguns estudos já demonstraram que em condrócitos de ratos, o TNF $\alpha$  diminui a expressão gênica de colágeno tipo II de maneira tempo-dependente, tanto em condições normais de oxigênio como em hipóxia, e que essa regulação ocorre por meio da via do NF- $\kappa$ B (Séguin et al, 2003; Klooster et al, 2005). Durante a condrogênese, a hipóxia aumenta as concentrações protéicas das prolil-hidroxilases pró-colágeno, que são

indispensáveis para a formação dessa fibra, via estabilização do HIF-1 $\alpha$ , aumentando assim, a expressão do colágeno tipo II (Schipani, 2005). No decurso da osteoartrite, verificou-se o aumento da concentração de RNAm de colágeno tipo II, pelo aumento dos níveis de prolil-4-hidroxilase (P4H-A1), co-localizados com o HIF-1 $\alpha$ . O estímulo da hipóxia aumenta a expressão de colágeno tipo II por uma via dependente do HIF-1 $\alpha$  (Pfander et al, 2004). Confirmou-se esses achados com os resultados aqui obtidos que demonstraram que a hipóxia aumentou os níveis de RNAm do HIF-1 $\alpha$  e do colágeno tipo II paralelamente, talvez a função regulatória do HIF-1 $\alpha$  para geração anaeróbica de energia pode estar indiretamente envolvida no controle da síntese de matriz, num esforço para repará-la durante a doença (Grimer et al, 2006).

A ação catabólica da IL-1 $\beta$  sobre a expressão do colágeno tipo II deve-se ao fato dessa citocina pró-inflamatória, fortemente presente na osteoartrite, estimular a produção de metaloproteinases, como a MMP-1, 3, 9 e 13, que são capazes de destruir as proteínas da matriz extracelular, exacerbando a função anabólica do processo de renovação do tecido cartilaginoso. A atividade das MMPs são controladas pelos seus inibidores específicos, os TIMPs (Tissue Inhibitor Metalloproteinases), e o balanço entre as quantidades de MMPs e TIMPs, determina se a cartilagem é degradada ou não. Antagonistas de receptores de IL-1 $\beta$  como a IL-4, IL-10 e IL-13 previnem a secreção de algumas MMPs e podem aumentar a síntese de TIMPs, determinando a ação catabólica da IL-1 $\beta$  sobre as proteínas da matriz extracelular pela diminuição da secreção dos TIMPs e conseqüente aumento das MMPs (Klippel, 2001; Ruhul Amin, 2003). A principal



proteína atingida por essa destruição é o colágeno do tipo II, por ser a mais abundante no tecido (Qian et al, 2004; Martin et al, 2004; Fan et al, 2006; Shakibaei et al, 2007). Liacini et al (2003) também observaram que condrócitos provenientes de cartilagem com OA expressam o RNAm da metaloproteinase MMP-13, ao contrário dos condrócitos normais que têm a expressão nula para esse gene. Esses resultados demonstram a intrínseca relação entre HIF-1 $\alpha$  e colágeno tipo II. Ambos foram estimulados positivamente pela hipóxia, que melhor representa a condição *in vivo* dos condrócitos, e foram regulados negativamente pela IL-1 $\beta$ , que sabidamente contribui para o processo de destruição da cartilagem na osteoartrite, atacando diretamente a proteína do colágeno tipo II.

A análise da expressão do agrecano não demonstrou nenhum resultado estatisticamente importante, porém, houve tendência à regulação positiva da expressão desse gene sob os estímulos das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , indiferentemente da condição de oxigênio. Nesse caso, podemos também atribuir esse fato à evidência de tentativa imediata dos condrócitos, em reparar a matriz extracelular em resposta aos efeitos destrutivos das citocinas. No entanto, sob o estímulo da IL-1 $\beta$  por período prolongado de tempo, há diminuição de glicosaminoglicanos (GAG) em condrócitos deficientes para o HIF-1 $\alpha$  sob condições de hipóxia conforme já demonstrado (Yudoh, 2005), sugerindo também relação entre a expressão do agrecano e o HIF-1 $\alpha$ . Também já foi demonstrado que sob o estímulo do TNF $\alpha$  durante 24h, condrócitos de ratos apresentaram diminuição da expressão de RNAm de agrecano (Klooster et al, 2005).

### 3ª Fase

Visando estabelecer a real relação entre HIF-1 $\alpha$  e as expressões dos genes do colágeno tipo II e agrecano, na terceira fase desse estudo, foi realizado o silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$  por meio da realização da técnica de interferência por RNA e para isso utilizou-se o sistema de cultura dos condrócitos em monocamada (*monolayer*), visto ser este o tipo de cultura solicitado, embora os condrócitos humanos quando cultivados neste sistema diminuam a expressão do RNAm do HIF-1  $\alpha$  *per se* após onze dias quando comparado com o sistema de cultura em suspensão (Stockes et al 2002). Esta foi a razão pela qual no presente estudo optou-se pelo uso do kit comercial Stealth (Invitrogen®), que permite obter resultados de silenciamento em até 96h, o que possibilitou manter-se as culturas em monocamada no máximo por 10 dias, não havendo portanto, a introdução do viés que poderia ocorrer neste sistema.

Nessa fase do estudo, encontrou-se um comportamento diferente dos condrócitos em relação à expressão do gene do HIF-1 $\alpha$ . Aqui, as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  aumentaram HIF-1 $\alpha$  nos grupos não silenciados, no entanto, não de maneira significativa em relação ao grupo controle ( $P>0,05$ ) em ambas as condições de tensão de oxigênio. Não é possível descartar que esta diferença de comportamento observada durante os experimentos nesta fase esteja relacionada às diferentes amostras de cartilagem estudadas, provenientes de pacientes com diferentes fases evolutivas da doença, entretanto esta afirmativa somente poderá ser confirmada quando se tornar possível a padronização da coleta de material proveniente dos diferentes centros cirúrgicos, utilizando-se espécimes de

cartilagem provenientes de pacientes na mesma fase de evolução de doença, o que será, baseado na experiência deste estudo, muito difícil de ser realizado. Com a técnica de interferência do RNA mensageiro (RNAi) conseguiu-se silenciar a expressão do gene do HIF-1 $\alpha$ , entre 50% e 70% nos diferentes experimentos, resultado que também já foi alcançado em outro tipo celular como a linhagem de células epiteliais pulmonares humanas (A549) (Hänze et al, 2003). Nesses grupos de condrócitos silenciados para o HIF-1 $\alpha$ , tanto IL-1 $\beta$  quanto TNF $\alpha$  não conseguiram alterar a expressão desse gene também em ambas as condições de oxigênio em relação aos grupos não silenciados e estimulados ( $P<0,05$ ).

Em relação à expressão do colágeno tipo II, observou-se que em condições normais de oxigênio não houve alterações significantes na expressão desse gene tanto nos grupos silenciados quanto nos não-silenciados para o HIF-1 $\alpha$ , indiferente à presença das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . No entanto, em hipóxia, a falta do HIF-1 $\alpha$  diminuiu consideravelmente a expressão do colágeno tipo II nos experimentos com IL-1 $\beta$  ( $P<0,05$ ). Esta diminuição também foi observada de maneira mais contundente nos experimentos com TNF $\alpha$  ( $P<0,001$ ). Essa deficiência do HIF-1 $\alpha$  associada principalmente ao tratamento com TNF $\alpha$  também demonstrou regulação negativa importante na expressão do colágeno tipo II ( $P<0,05$ ). Esses dados reforçam aqueles observados na segunda fase desse trabalho, sobre o efeito regulatório negativo da IL-1 $\beta$  e a tendência de regulação também negativa do TNF $\alpha$  sobre o colágeno tipo II. Com estes achados, torna-se mais robusta a hipótese da função regulatória positiva do HIF-1 $\alpha$  sobre a expressão do gene do colágeno tipo II, especialmente em hipóxia, uma vez que é

o ambiente que mais se assemelha à real condição em que vivem os condrócitos *in vivo* (Pfander et al, 2003).

Na análise da expressão do gene do agrecano, também nessa terceira fase do estudo, assim como na anterior, não foi verificada nenhuma diferença estatística. Porém em condições de hipóxia, foi observada uma tendência à diminuição do agrecano nos grupos deficientes para o HIF-1 $\alpha$ , especialmente nos experimentos com IL-1 $\beta$ , em que o tempo de exposição à hipóxia foi maior que nos experimentos com TNF $\alpha$ . Já nesses mesmos grupos deficientes para o HIF-1 $\alpha$ , o estímulo com a IL-1 associado com a hipóxia não alterou a expressão do gene do agrecano. Esse resultado, assim como os obtidos na segunda fase, onde as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  tenderam a aumentar a expressão de agrecano, indiferente da condição de oxigênio, pode sugerir que haja uma eventual relação entre HIF-1 $\alpha$  e agrecano. Talvez a técnica utilizada neste trabalho utilizada (quantificação da expressão de RNAm) não tenha sido suficientemente sensível para a detecção dessa relação. Sabe-se que o agrecano é constituído de um *core* protéico associado à cadeias laterais de açúcares, os glicosaminoglicanos, sulfatos de condroitina, bem como ácido hialurônico entre outros componentes, que conferem à proteína agrecano um caráter ímpar, como por exemplo, o fato de ser uma proteína de grande peso molecular (Martel-Pelletier et al, 2008). A simples presença do RNAm do *core* protéico do agrecano, que é o que foi avaliado aqui pode ter sido insuficiente em fornecer elementos para melhor entender a ação do HIF-1 $\alpha$  na sua modulação. Por meio da análise das concentrações dos glicosaminoglicanos (GAGs), que é na literatura o método de

análise de agrecanos mais freqüente, foi observado diminuição dos GAGs em hipóxia em condrócitos deficientes para o HIF-1 $\alpha$  (Yudoh, 2005). Entretanto, mais estudos são necessários para a melhor elucidação desse ponto.

Em todas as fases desse trabalho, avaliou-se a expressão da proteína do colágeno tipo II precipitada dos meios de cultura das células submetidas aos diferentes experimentos. Em todas as análises não foram observadas alterações importantes na expressão do colágeno tipo II, indiferente aos estímulos aplicados: citocinas, hipóxia e silenciamento do gene do HIF-1 $\alpha$ . Os resultados do corrente estudo descrevem uma ação catabólica da IL-1 $\beta$  e do TNF $\alpha$  sobre a expressão do colágeno tipo II, e estão de acordo com outros achados descritos na literatura (Qian et al, 2004; Martin et al, 2004; Fan et al, 2006; Shakibaei et al, 2007). No entanto, a análise das proteínas dos meios de cultura realizada aqui também pode não ter sido sensível suficiente às alterações dessa proteína, provavelmente relacionada aos períodos experimentais aqui utilizados, que foram relativamente curtos, levando-se em conta que o *turnover* do colágeno tipo II pode ser extremamente lento e a produção da proteína foi analisada neste trabalho usando o total produzido pelos condrócitos obtidos das amostras de cartilagem e, não somente dos perinucleares, que parecem apresentar um *turnover* mais acelerado (Goldring, 2006), sugerindo que uma conclusão melhor somente seria possível num outro desenho experimental.

Durante a condrogênese, a participação do HIF-1 $\alpha$  é essencial para o desenvolvimento da cartilagem articular, por promover condições de sobrevivência e funcionalidade para os condrócitos num ambiente hipóxico (Schipani, 2005;

Gelse et al, 2008). No presente estudo observamos que as citocinas inflamatórias presentes durante o processo da OA são capazes de aumentar a expressão do HIF-1 $\alpha$ , bem como diminuir o colágeno tipo II. Verificou-se ainda que quando o HIF-1 $\alpha$  é silenciado nos condrócitos, causando, conseqüentemente, deficiência deste gene houve diminuição considerável da expressão do colágeno tipo II, demonstrando que esta possa ser, pelo menos em parte, regulada por ele. Além disto pode ser que durante a OA, o HIF-1 $\alpha$  atue na tentativa de diminuir os danos causados pela ação das citocinas, estimulando principalmente a produção de colágeno tipo II (Grimmer, 2006). No entanto mais estudos neste sentido são necessários. Por outro lado, num estudo recente, a inibição do HIF-1 $\alpha$  por meio químico realizado em modelo *in vivo*, utilizando-se injeção intra-articular em camundongos com 2-Metoxiestradiol (2ME2), substância conhecida por suas propriedades anti-carcinogênicas e também aceita como inibidora do HIF-1 $\alpha$ , notou-se incapacidade das células de se adaptar ao meio hipóxico acarretando prejuízo às funções celulares e até mesmo morte celular, presumivelmente o mecanismo fisiopatológico primário da degeneração da cartilagem articular. Entretanto, quando a injeção intra-articular foi realizada utilizando-se a dimetiloxalóilglicina (DMOG) que estabiliza HIF-1 $\alpha$  não se observou prevenção na progressão da OA (Gelse et al, 2008), indicando que o HIF-1 $\alpha$  é importante na integridade da cartilagem articular, mas tem ação limitada na prevenção da degeneração da cartilagem.

# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [CONCLUSÃO]

- 1) IL-1 $\beta$  regulou positivamente a expressão da proteína nuclear HIF-1 $\alpha$  pós-transcricionalmente.
- 2) A regulação do HIF-1 $\alpha$  pela IL-1 $\beta$  em situação normal de oxigênio ocorreu, ao menos em parte, por meio da via PI-3K.
- 3) O HIF-1 $\alpha$  se relacionou positivamente com a expressão do gene do colágeno tipo II, principalmente em hipóxia, mas não com os níveis da proteína. Não houve associação com a expressão do gene do agregano.



# 2009

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Angélica Rossi Sartori

## [REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS]

Agani F, Semenza GL, Feldser D, Iyer N, Kotch L, Laughner E, Yu A. Hypoxia, HIF-1 and the pathophysiology of common human diseases. *Adv Exp Med Biol* 2000; 475:123-130.

Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, Louis CA, Henry Jr W, Reichner JS. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1 $\alpha$  induction in primary inflammatory cells by TNF $\alpha$ . *Am J Physiol Cell* 2001; 281: C1971-C1977.

Andrade, ALL. Expressão do Fator de Transcrição HIF-1 $\alpha$  em Condrócitos Humanos Cultivados em Condições Normais de Oxigênio [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.

Archer CW, Francis-West P. The chondrocyte. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35 (4):401-4.

Bárdos JI, Ashcroft M. Negative and positive regulation os HIF-1: A complex network. *Bioch Bioph Acta* 2005; 1755:107-120.

Berchner-Pfannschmidt U, Frede S, Wotzlaw C, Fandrey J. Imaging of the hypoxia-inducible factor pathway: insights into oxygen sensing. *Eur Respir J* 2008; 32: 210–217.

Bland JH, Cooper SM: Osteoarthritis: a review of the cell biology involved and evidence for reversibility: management rationally related to known genesis and pathophysiology, *Semin Arthritis Rheum* 14:106, 1984.

Chadjichristos C, Ghayor C, Kypriout M, Martin G, Renard E, Ala-Kokko L, Suske G, Crombrughe B, Pujol JP, Galéra P. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate Interleukin-1 $\beta$  down-regulation of Human type II collagen expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 2003; 278(41): 39762-39772.

Chevalier X. Upregulation of enzymatic activity by interleukin-1 in osteoarthritis. *Biomed Pharmacother* 1997; 51: 58-62.

Coimbra IB, Jimenez SA, Hawkins DF, Piera-Velazquez S, Stokes DG. Hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004; 12:336-345.

Cramer T, Schipani E, Johnson RS, Swoboda B, Pfander D. Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 $\alpha$  dependent. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004; 12: 433-439.

Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG Accurate transcription by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nuc Acids Res* 1983; 11: 1475-89.

Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Mol Cell Bio* 2003; 4: 457-467.

Fan Z, Yang H, Bau B, Söder S, Aigner T. Role of mitogen-activated protein kinases NFkB on IL-1 $\beta$ -induced effects on collagen type II, MMP-1 and MMP-13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheum Intern* 2006; 26: 900-903.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.

Gaber T, Dziurla R, Tripmacher R, Burmester GR, Buttgereit F. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O<sub>2</sub>! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 971-980.

Gelse K, Pfander D, Obier S, Kanup KX, Wiesener M, Henning FF, Swoboda B. Role of hypoxia-inducible factor 1 alpha in the integrity of articular cartilage in murine knee joints. *Arthritis Res & Ther* 2008 (<http://arthritis-research.com/content/10/5/R111>).

Goldring MB. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract Res Clinl Rheumat* 2006; (20)5: 1003-1025.

Grimmer C, Balbus N, Lang U, Aigner T, Cramer T, Müller L, Swoboda B, Pfander D. Regulation of type II collagen synthesis during osteoarthritis by prolyl-4-hidroxilases. *American Journal of Pathology* 2006; 169: 491-502.

Haddad JJ. Recombinant human interleukin (IL)-1 $\beta$ -mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism. *Eur Cytokine Netw* 2002;13: 250–60).

Haddad JJ, Harb HL. Cytokines and the regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . *Internacional Immunopharmacology* 2005; 5: 461-483.

Hänze J, Eul BG, Savai R, Krick S, Goyal P, Grimminger F, Seeger W, Rose F. RNA interference for HIF-1 $\alpha$  inhibits its downstream signaling and affects cellular proliferation. *Bioch Biophl Res Com* 2003; 312: 571-577.

Helwing-Bürgel T, Tutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1 $\beta$  an tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor -1. *Blood* 1999; 94(5): 1561-1567.

Honorati MC, Cattini L, Facchini A. IL-17, IL-1beta and TNF-alpha stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 683-691.

Kellgren JH e Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16(4): 494-502.

Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee A, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 2002; 12(1): 19-32.

Klippel JH, Crofford LJ, Stone JH, Weyand CM. *Primer on the Rheumatic Diseases* 2001; ed. 12: 287.

Klooster AR, Bernier S. Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor act additively to inhibit matrix gene expression by chondrocyte. *Arthritis Research Therapy* 2005; 7: R127-R138.

Krasnokutsky S, Samuels J e Abramson SB. Osteoarthritis in 2007. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 2007; 65(3):222-228.

Krohn KA, Link JM, Mason RP. Molecular Imaging of Hypoxia. *J Nucl Med* 2008; 49(6):129S-148S.

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ* 2001; 12: 363-369.

Jiménez SA. Collagens. In: Tsokos GC. *Principles of Molecular Rheumatology*. Totowa-NJ, EUA: Humana Press; 2000.p 175-196.

Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. IL-1hmediated up-regulation of HIF-1a via an NF-nB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 2003;17:2115–7.

Lee PJ, Jiang BH, Chin BY et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* 1997; 272 (9):5375-81.

Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by  $\text{TNF}\alpha$  is mediated by MAP kinases AP-1, and NF-kB transcription factors in articular chondrocytes. *Exper Cell Res* 2003; 288: 208-217.

Malemud CJ. Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis. *BioDrugs* 2004; 18: 23-35.

Martel-Pelletier J, Alaaeddine N, Pelletier JP. Cytokines and their role in the pathophysiology of osteoarthritis. *Frontiers in Bioscience* 1999; 15(4): 694-703.

Martel-Pelletier J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage* 2004; 12, S31-S33.

Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ. Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract & Res Clin Rheum* 2008;22(2): 351-384.

Martin G, Andriamanalijaona S, Grässel S, Dreier R, Mathy-Hartet M, Bogdanowicz P, Boumédiene K, Henrotin Y, Bruckner P, Pujol JP. Effect of hypoxia and reoxygenation on gene expression and response to interleukin-1 in cultured articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50(11): 3549-3560.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999; 399 (6733):271-5.

Mayne R. Cartilage collagens: what is their function, and are they involved in cartilage disease? *Arthritis Rheum* 1989; 32:241–246.

Murata M, Yudoh K, Nakamura H, Kato T, Inoue K, Chiba J, et al. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia- and IL-1-induced VEGF expression in human articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2006; 24: 1544-1554.



Pfander, D.; Cramer, T.; Schipani, E. & Johnson, R.S. HIF-1 $\alpha$  controls extracellular matrix synthesis by epiphyseal chondrocytes. *J. Cell Scien* 2003; 116: 1819-1826.

Pfander D, Kobayashi T, Knight M. Deletion of Vhlh in chondrocytes reduces cell proliferation and increases matrix deposition during growth plate development. *Development and disease* 2004; 131(10): 2457-2508.

Poole AR, Kojima T, Yasuda T et al. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001; (391 Suppl):S26-33.

Qian D, Lin HY, Wang HM, Zhang X, Liu DL, Li QL, et al. Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 $\alpha$  by interleukin-1 $\beta$  involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod* 2004; 70: 1822–7).

Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2: working alone or together in hypoxia? *The Journal of Clinical Investigation* 2007; (117)4: 862-865.

Reginato AM, Iozzo RV, Jimenez SA. Formation of nodular structures resembling mature articular cartilage in long-term primary cultures of human fetal epiphyseal chondrocytes on a hydrogel substrate. *Arthritis Rheum* 1994; 37 (9):1338-49.

Rosenberg A. Ossos, articulações e tumores de partes moles. In Cotran, R.S.; Kumar, V. & Collins, T. Robbins - Patologia estrutural e funcional. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Ruhul Amin ARM, Senga T, Oo ML, Thant AA, Hamaguchi M. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1 $\beta$ : A role for the dual signaling pathways, Akt and Erk. *Genes to cells* 2003; 8: 515-523.

Schipani E. Hypoxia and HIF-1 $\alpha$  in chondrogenesis. *Seminars in cell & Developmental Biology* 2005; 16: 539-546.

Séguin C, Bernier S. TNF $\alpha$  suppresses link protein and type II collagen expression in chondrocytes: role of MEK 1/2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology* 2003; 197: 357-369.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: Control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediat Res* 2001; (49)5:614-617.

Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 47-53.

Shakibaei M, John T, Schulze-Tanzil G, Lehmann I, Mobasheri A. Suppression of NK- $\kappa$ B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-

2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(9):1434-45.

Skare TL. *Reumatologia - Princípios e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Sledge CBR, Walsh, DA, Blake, DR. *Biology of the Normal Joint*. In: SHJ Ruddy, DE.; Sledge, CB, editor, translator and editor *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 6th ed. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier Science; 2001; p. 1-26.

Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Burgel T. Normoxic induction of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  by insulin and interleukin-1 $\beta$  involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett* 2002; 512:157– 162.

Stokes DG, Liu G, Coimbra IB et al. Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis Rheum* 2002; 46 (2):404-19.

Van der Kraan PM & Van der Berg WB. Anabolic and destructive mediators in osteoarthritis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 205-211.

Zheng ZM, Specter SC, Lancz G. Bovine serum albumin preparations enhance in vitro production of tumor necrosis factor alpha by murine macrophages. *Immunol Invest* 1995; 24(5): 737-56.

Zhou J, Schmid T, Brüne B. Tumor necrosis factor- $\alpha$  causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  through a nuclear factor-kB-dependent pathway. *Molec Biol Cell* 2003;14: 2216-2225.

Yudoh K, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K. Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R904-914.

Wang GL, Jiang BH, Rue EA & Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 5510-14.

Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1alpha. *Cell Death and Differentiation* 2008; 15, 621–627.