

Capítulo 2

Métodos e materiais

2.1. Modelo biológico utilizado: linha celular de células dendríticas da pele de feto de murganho (FSDC)

2.1.1. Características gerais das FSDC

Todo o trabalho experimental descrito nesta dissertação foi realizado numa linha celular de células dendríticas da pele de feto de murganho (FSDC), gentilmente cedida pelo Dr. G. Girolomoni (Girolomoni *et al.*, 1995) (Laboratório de Imunologia, Instituto Dermopatico dell'Immacolata, IRCCS, Roma, Itália). Esta linha celular foi obtida após infecção de uma suspensão de células da epiderme, isolada da pele de feto de murganho com dezassete dias de gestação, com um factor retroviral transportador do gene de fusão *env^{AKR}-myc^{MH2}*.

As células FSDC possuem uma morfologia dendrítica (figura 1) e apresentam um fenótipo de superfície consistente com um progenitor de células de *Langerhans* (LC) (MHCII⁺, MHCI⁺, CD11c⁺, CD11b⁺, CD54⁺, B7.2⁺, B220⁺, CD3⁺) (Girolomoni *et al.*, 1995). Sendo um progenitor imaturo das LC, as FSDC necessitam de activação prévia com citocinas (GM-CSF, IL-4, IFN- γ) para estimularem a proliferação de linfócitos T virgens e para apresentarem alérgenos de contacto a linfócitos T sensibilizados, *in vitro*. *In vivo*, as FSDC são capazes de induzir uma resposta imunológica primária mediada por linfócitos T quando injectadas em murganhos. Em resumo, a linha celular

FSDC possui as características fenotípicas e funcionais de um progenitor das LC (Girolomoni *et al.*, 1995).

Figura 1. **Linha celular FSDC corada por *May-Grünwald* e *Giemsa*.** As células aderentes foram coradas com *May-Grünwald*, durante 3 minutos, e com *Giemsa*, durante 15 minutos (ampliação de 400 x).

2.1.2. Condições de cultura das FSDC

As FSDC foram mantidas a 37°C, sob uma atmosfera humidificada com 5% de CO₂ e 95% de ar, e diluídas 1:3 de 3 em 3 dias. As células foram cultivadas em meio de cultura de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM), suplementado com soro fetal bovino a 10% (v/v), L-glutamina a 1% (m/v), penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml), e tamponizado com bicarbonato de sódio 36 mM e HEPES 25 mM, pH 7,4. O soro foi previamente submetido a 56°C, durante 30 minutos, com o objectivo de tornar inactivo o complemento e diminuir a citotoxicidade devida a imunoglobulinas.

Para a realização das experiências, as células aderentes foram tratadas com uma solução de tripsina a 0,05% (m/v) e EDTA 0,02% (m/v) em tampão fosfato salino¹

¹ Tampão fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 9,1 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4.

(PBS), durante aproximadamente 3 minutos, e centrifugadas a $180 \times g$ numa centrífuga Sorvall RT 6000 D, durante 5 minutos. O sedimento foi solubilizado em IMDM suplementado e procedeu-se de seguida à determinação da viabilidade e densidade celular. Para o efeito diluiu-se um pequeno volume de suspensão celular na proporção de 4:1 (v/v) com uma solução de azul de tripano a 0,4%, e aguardou-se 1 a 2 minutos. Após este período, necessário para o corante penetrar nas células com membrana fragilizada, colocou-se uma gota da suspensão celular na câmara dum hemocítmetro e procedeu-se à contagem, num microscópio óptico, do número de células coradas (células com a membrana citoplasmática danificada) e do número total de células nos quatro quadrantes. Calculou-se a percentagem de viabilidade celular, normalmente superior a 96%, bem como a densidade da suspensão inicial, tendo em atenção as diluições efectuadas e as características do hemocítmetro.

As células utilizadas para os ensaios de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] e quantificação de nitritos foram cultivadas a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células/cm² em placas de cultura com 48 compartimentos. Para os ensaios de imunocitoquímica as células foram cultivadas em lamelas de vidro, previamente colocadas em placas de cultura com 48 compartimentos, a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células/cm². Nas experiências de EMSA (ensaio do desvio da mobilidade electroforética) e *Western blot* as células foram cultivadas a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células/cm² em placas de cultura com 6 compartimentos. Para o ensaio de *Northern blot* cultivaram-se as células a uma densidade de $0,2 \times 10^6$ células/cm² em caixas de *Petri* com 60 mm de diâmetro.

2.2. Ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT

A redução do MTT é um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (Mosman, 1983). Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal resulta na formação de cristais de *formazan* de cor azul que se acumulam em

compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas (Liu *et al.*, 1997 c), o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente como ensaio de viabilidade celular.

Nas experiências de MTT, os sobrenadantes das culturas celulares, contendo ou não os agentes testados, foram removidos e as células foram cultivadas com uma solução de MTT (5 mg/ml) em PBS, durante 1 hora a 37°C. Após esta incubação, os cristais de *formazan*, resultantes da redução do MTT, foram dissolvidos numa solução de HCL 0,04 N em isopropanol e a absorvência foi medida num leitor automático de placas de cultura (SLT Spectra) a um comprimento de onda de 570 nm, com um filtro de referência de 620 nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em percentagem relativamente à absorvência determinada nas células controlo.

2.3. Quantificação da concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares (ensaio de Griess)

A formação do monóxido de azoto (NO) pela isoforma indutível da sintase do NO pode ser determinada indirectamente através da reacção de *Griess* (Green *et al.*, 1982), que quantifica os nitritos acumulados nos sobrenadantes de culturas celulares, uma vez que o NO origina nitritos em solução aquosa. A reacção de *Griess* envolve a formação de um cromóforo durante a reacção dos nitritos com sulfanilamida e aminas heterocíclicas, como a N-(1-naftil)etilenodiamina, em condições de baixo pH. Durante esta reacção a pH ácido, os nitritos sofrem diazotação com a sulfanilamida e formam um sal de diazónio. O sal de diazónio liga a N-(1-naftil)etilenodiamina, formando-se um composto rosa que possui um espectro de absorção característico e que pode ser quantificado por espectrofotometria.

As células foram cultivadas, durante 48 h, na ausência ou na presença dos vários estímulos, e os sobrenadantes das culturas celulares foram recolhidos e centrifugados a 1000 x g numa centrífuga Sigma 3k30, durante 15 minutos. Procedeu-

se, de seguida, à diluição dos sobrenadantes com igual volume do reagente de *Griess*², durante 10 minutos, e o valor da absorvência foi medido a um comprimento de onda de 550 nm (SLT Spectra). A concentração de nitritos nos sobrenadantes das culturas celulares foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio.

2.4. Detecção de proteínas por *Western blot*

As proteínas dos extractos celulares totais, extractos citoplasmáticos e extractos nucleares foram separadas por electroforese e electrotransferidas para uma membrana de difluoreto de polivinildieno (PVDF). As proteínas em estudo foram detectadas por incubação das membranas com anticorpos primários, seguindo-se uma incubação com anticorpos secundários (dirigidos contra as imunoglobulinas da espécie animal em que foram produzidos os anticorpos primários) conjugados com a peroxidase de rábano. Os imunocomplexos foram visualizados por quimioluminescência, utilizando o reagente ECL (quimioluminescência melhorada).

Para a preparação dos extractos celulares totais as células foram lavadas duas vezes com PBS e homogeneizadas por sonicação (VibraCell da Sonics & Materials, Inc) em 150 µl de tampão de lise³, em gelo, quatro vezes, durante 4 segundos, a média intensidade. Os extractos celulares totais foram armazenados a -70°C até à aplicação no gel. Para a obtenção dos extractos nucleares e citoplasmáticos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e lisadas com o tampão 1⁴, em gelo, durante 15 minutos. Os lisados celulares foram, de seguida, centrifugados a 2300 x g (centrífuga Sigma 3k30) à temperatura de 4°C, durante 10 minutos. O sobrenadante, correspondente ao extracto citoplasmático, foi armazenado a -70°C até à aplicação no

² Reagente de *Griess*: N-(1-naftil)etilenodiamina a 0,1% (m/v), sulfanilamida a 1% (m/v) em H₃PO₄ a 5% (v/v).

³ Tampão de lise: Sacarose 0,32 M, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, mistura de inibidores de proteases, pH 7,5.

⁴ Tampão 1: Tris 10 mM, NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, nonidet P-40 0,5% (v/v), DTT 1 mM, mistura de inibidores de proteases, pH 7,5.

gel. O sedimento foi solubilizado em tampão 2⁵, em gelo, durante 1 hora, e posteriormente centrifugado a 12000 x g, à temperatura de 4°C, durante 20 minutos. O sobrenadante, correspondente ao extracto nuclear, foi armazenado a -70°C até à aplicação no gel. A quantificação da proteína nos extractos celulares totais, nucleares e citoplasmáticos foi efectuada pelo método do ácido bicinonínico (BCA).

As proteínas dos extractos obtidos foram desnaturadas por fervura a seco (Stuart Scientific) em solução desnaturante⁶ e separadas por electroforese⁷ em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de SDS (SDS-PAGE), em geles de separação com 7,5% ou com 15% de acrilamida, conforme o peso molecular das proteínas em estudo e de acordo com o procedimento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). As proteínas no gel foram transferidas para membranas de PVDF, previamente activadas em metanol, usando um sistema TransBlot da BioRad. A electrotransferência⁸ realizou-se durante a noite, à voltagem constante de 40 V e à temperatura de 10°C. A eficiência da transferência foi sempre avaliada por coloração das membranas com uma solução aquosa de *Ponceau S* a 0,2% (m/v).

As membranas foram bloqueadas, durante 1 hora, com 5% (m/v) de leite magro em tampão Tris salino⁹ (TBS) e com Tween-20 0,1% (v/v) (TBST), com o objectivo de bloquear as ligações não específicas dos anticorpos. As membranas foram, de seguida, incubadas, durante 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo primário, diluído em 1% (m/v) de leite magro em TBST. Os anticorpos que não ligaram foram removidos por lavagem das membranas, durante 30 minutos, em

⁵ Tampão 2: HEPES 20 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 300 mM, glicerol 20% (v/v), DTT 1 mM, mistura de inibidores de proteases, pH 7,5.

⁶ Solução desnaturante de proteínas: Tris 100 mM, bicina 100 mM, ureia 4 M, SDS 2% (m/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v).

⁷ Tampão de electroforese: Tris 100 mM, bicina 100 mM, SDS 0,1% (m/v).

⁸ Tampão de electrotransferência: Glicina 96 mM, metanol 20% (v/v), Tris 12,5 mM.

⁹ TBS: Tris 200 mM, NaCl 1,37 M, pH 7,6.

1% (m/v) de leite magro em TBST. A incubação dos anticorpos secundários decorreu à temperatura ambiente, durante 1 hora, com o anticorpo marcado com a peroxidase de rábano, diluído em 1% (m/v) de leite magro em TBST. Depois de novamente lavados com TBST, os imunocomplexos foram visualizados por quimioluminescência, utilizando o reagente ECL. Para demonstrar a presença de igual quantidade de proteína nas diferentes amostras da membrana, procedeu-se ao *stripping* da membrana¹⁰, durante 30 minutos, a 55°C e com agitação ocasional. Após lavagem das membranas com TBST procedeu-se de novo à técnica de *Western blot*, acima descrita, com o anticorpo contra a proteína actina. A expressão das proteínas em cada situação foi analisada utilizando o programa de computador Adobe Photoshop 7.0.

2.5. Imunofluorescência e microscopia confocal

A expressão e distribuição das proteínas nas células FSDC foram avaliadas por imunocitoquímica. Neste processo, as preparações fixadas e permeabilizadas foram incubadas com anticorpos específicos para as proteínas em estudo. A localização dos anticorpos primários foi visualizada com anticorpos secundários conjugados com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC). As preparações foram observadas por microscopia de fluorescência.

Depois de uma breve lavagem com PBS, as células foram fixadas e permeabilizadas com metanol:acetona (1:1), durante 10 minutos. Procedeu-se, de seguida, ao bloqueio dos locais de ligação não específicos dos anticorpos secundários, durante uma hora, por incubação das células com 5% de soro não imune¹¹ da espécie animal em que foi produzido o anticorpo secundário utilizado. Procedeu-se, de seguida, à incubação com os anticorpos primários, diluídos em PBS

¹⁰ Solução de *stripping*: β -mercaptoetanol 100mM, SDS 2% (m/v), Tris 62,5 mM, pH 6,7.

¹¹ Solução de bloqueio: 5% (v/v) de soro não imune em PBS contendo albumina de soro bovino (BSA) 0,5%.

contendo albumina de soro bovino (BSA) a 0,5%, durante 2 horas e à temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens de 5 minutos com PBS contendo BSA 0,5%. Paralelamente foram feitos controlos em que se omitiu o anticorpo primário, não se observando nestas preparações marcação significativa. A incubação com os anticorpos secundários, ligados ao fluoróforo FITC e diluídos em PBS contendo BSA 0,5%, foi feita durante 1 hora, à temperatura ambiente e no escuro. Repetiu-se a lavagem (três lavagens de 5 minutos com PBS contendo BSA 0,5%) e procedeu-se à montagem das lamelas sobre lâminas, utilizando os meios de montagem *Prolong Antifade* ou *Vectashield*, que reduzem o fotodecaimento da fluorescência.

A observação da fluorescência nas preparações foi feita num microscópio de fluorescência Zeiss Axioskop com um filtro 450-490, FT 510, LP520 (Zeiss), ou num sistema de imagiologia confocal MRC 600 (BioRad Laboratories) acoplado a um microscópio de fluorescência (Nikon Optiphot-2). Foi usado um *laser* misto de cripton/árgon, em combinação com filtros de excitação a 488 nm e de emissão a 515 nm. O processamento da imagem foi feito com o programa Adobe Photoshop 7.0.

2.6. Ensaio do desvio da mobilidade electroforética (EMSA)

A técnica do EMSA permite identificar a ligação de proteínas (factores de transcrição) a sequências específicas de ADN, recorrendo para o efeito a uma electroforese em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. As proteínas que se ligam especificamente a um fragmento de ADN, marcado numa extremidade com o radioisótopo ^{32}P , atrasam a mobilidade do fragmento de ADN livre durante a electroforese, o que resulta no aparecimento de bandas discretas correspondentes aos complexos de ADN com a proteína específica. Uma vez que muitos factores de transcrição, nomeadamente o NF- κ B, são homo- ou heterodímeros, a adição de anticorpos específicos contra as várias proteínas constituintes do factor de transcrição em estudo permite identificar quais as proteínas que estão presentes no complexo ADN-proteína (ensaio de *supershift*). No ensaio de *supershift* podem obter-se diversos

resultados: (i) se a proteína reconhecida pelo anticorpo não está envolvida em complexos ADN/proteína, a adição do anticorpo é desprovida de qualquer efeito; (ii) se a proteína que forma o complexo é reconhecida pelo anticorpo, então o anticorpo pode bloquear a formação do complexo ADN/proteína; (iii) o anticorpo pode ainda formar um complexo ternário, constituído pelo ADN/proteína/anticorpo, que resulta num atraso adicional da mobilidade do complexo ADN/proteína durante a electroforese.

As experiências do EMSA foram realizadas de acordo com o método descrito por Heitmeier (Heitmeier *et al.*, 1998), tendo sido utilizados os extractos nucleares das FSDC, obtidos como descrito em 2.4. O oligonucleótido de dupla cadeia, contendo a região de consenso para ligação do factor de transcrição NF- κ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3') (40 ng), foi incubado com 50 μ Ci de [γ - 32 P]ATP, na presença de 9,8 U da cinase de polinucleótidos T4 e de tampão de ligação da cinase¹², durante 1 hora, a 37°C. O 32 P não incorporado foi removido por centrifugação em colunas Sephadex G-50 a 710 x g numa centrífuga Jouan M14.11, e o oligonucleótido marcado foi armazenado a -20°C até ser utilizado. A radioactividade presente no oligonucleótido foi determinada num contador de cintilações Packard 2500 TR.

As reacções de ligação proteína/ADN foram realizadas em tampão de ligação¹³ na presença de 20 μ g de proteína nuclear e 100000 cpm (cintilações por minuto) de [32 P]oligonucleótido, durante 45 minutos e à temperatura ambiente. Os complexos proteína/ADN foram resolvidos por electroforese¹⁴ em gel de poliacrilamida a 7%, em condições não desnaturantes, durante 2 horas e 30 minutos e a 150 V. O gel foi seco, por acção de calor (80°C) e de vácuo, num secador de geles BioRad 583, e as bandas proteína/ADN foram examinadas por autoradiografia. Para confirmar a especificidade

¹² Tampão de ligação da cinase: Tris 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, espermidina-HCl 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7.5.

¹³ Tampão de ligação proteína/ADN: HEPES 20 mM, MgCl₂ 1 mM, DTT 0,5 mM, KCl 50 mM, 100 μ g/ml de poly(dI-dC). poly(dI-dC), Ficol 400 4% (m/v), BSA 1 mg/ml, pH 7,9.

¹⁴ Tampão de electroforese: Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

da banda proteína/ADN, foram realizados ensaios de competição, que consistiram na adição prévia de um excesso (100 x) de oligonucleótido não marcado às proteínas nucleares, durante 1 hora e à temperatura ambiente, o que resultou sempre no desaparecimento ou diminuição dos complexos específicos. Os ensaios de *supershift* que visam identificar as proteínas constituintes do factor de transcrição activado, consistiram na adição, ao extracto nuclear, de anticorpos específicos (2 µg) contra as diferentes proteínas do NF-κB, durante 1 hora e à temperatura ambiente, sendo o processo técnico posterior idêntico ao descrito acima. A análise das bandas correspondentes aos complexos de ADN com a proteína específica foi feito com o programa Adobe Photoshop 7.0.

2.7. Detecção de ARN mensageiro (ARNm) por *Northern blot*

A técnica do *Northern blot* consiste na separação do ARN, de acordo com o tamanho, por electroforese em gel de agarose em condições desnaturantes. O ARN é posteriormente transferido do gel de agarose para uma membrana de náilon, sendo o ARN de interesse localizado por hibridação com o ADN complementar, marcado com o radioisótopo ³²P, e visualizado por autoradiografia.

Todo o material utilizado nas experiências de *Northern Blot* foi previamente lavado com água tratada com dietilpirocarbonato a 0,1% (v/v) (DEPC), um composto que inibe a actividade das ribonucleases. Todas as soluções foram preparadas com água estéril desionizada e tratada com DEPC, e posteriormente autoclavadas. Após incubação das células com os diversos estímulos procedeu-se ao isolamento do ARN. Depois de uma breve lavagem das células com PBS, procedeu-se à lise das mesmas com o reagente Trizol, uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Este reagente lisa as células e dissolve os componentes celulares, sem alterar a integridade do ARN. Procedeu-se, de seguida, à adição de clorofórmio com homogeneização vigorosa e centrifugação a 18000 x g (centrífuga Sigma 3k30), durante 10 minutos e à temperatura de 4°C. Após centrifugação obtiveram-se as fases

aquosa e orgânica, permanecendo o ARN exclusivamente na fase aquosa. A fase aquosa foi recolhida e o ARN foi precipitado com isopropanol. As amostras foram então centrifugadas a 18000 x g, durante 10 minutos e à temperatura de 4°C. O ARN precipitado foi lavado com etanol a 75% e de novo centrifugado a 18000 x g, durante 5 minutos e à temperatura de 4°C. O sedimento contendo o ARN foi dissolvido em água com DEPC e as amostras foram de novo sujeitas ao processo de isolamento acima descrito com o objectivo de purificar o ARN. A quantificação do ARN foi feita a um comprimento de onda de 260 nm num espectrofotómetro CECIL CE 2040, sendo apenas utilizadas as amostras de ARN com um quociente de absorvência 260/280 igual ou superior a 1,5. As amostras de ARN foram desnaturadas, à temperatura de 65°C (em banho seco da Stuart Scientific), durante 5 minutos, em solução desnaturante¹⁵, e o ARN foi fraccionado por electroforese em gel de agarose-formaldeído¹⁶ em condições desnaturantes e em tampão MOPS [ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfónico]¹⁷, de acordo com o procedimento descrito anteriormente (Geller *et al.*, 1993). As amostras de ARN no gel foram transferidas para uma membrana de náilon, por transferência capilar ascendente¹⁸, durante a noite, tendo sido posteriormente imobilizadas numa membrana de náilon, à temperaturas de 120°C, durante 30 minutos. Após imobilização das amostras de ARN procedeu-se a uma pré-hibridação¹⁹, que decorreu a 55°C, durante 3 horas, e com rotação numa incubadora para hibridação (Robbins Scientific, Model 1000).

O fragmento de ADN complementar do ARN mensageiro (100 ng) foi desnaturado a 100°C, durante 5 minutos, e marcado por acção do fragmento de *Klenow*, a 37°C, durante 1 hora, na presença de 50 µCi de [α -³²P]dCTP, usando o

¹⁵ Solução desnaturante de ARN: EDTA 0,25 mM, glicerol 12,5% (v/v), azul de bromofenol 0,0625% (m/v), brometo de etídio 25 µg/ml, formaldeído 3,7% (v/v), em tampão MOPS, pH 7.

¹⁶ Gel de agarose-formaldeído: Agarose 1% (m/v), formaldeído 3,7% (v/v), em tampão MOPS, pH 7.

¹⁷ Tampão MOPS: MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 7.

¹⁸ Tampão de transferência: Cloreto de sódio 150 mM, citrato de sódio 14,7 mM, pH 7.

¹⁹ Solução de hibridação: BSA 1% (m/v), Na₂HPO₄ 175 mM em H₃PO₄ a 0,12%, SDS 7% (m/v), formamida desionizada 30% (v/v).

sistema de marcação de ADN *Random Primed DNA Labeling Kit*. O ^{32}P não incorporado foi removido por centrifugação em colunas Sephadex G-50, a 710 x g, numa centrífuga Jouan M14.11. A hibridação, entre as amostras de ARN imobilizadas na membrana e o fragmento complementar de ADN marcado com o radioisótopo ^{32}P , foi promovida a 55°C em solução de hibridação, durante a noite e com rotação. A membrana foi posteriormente lavada²⁰ e as bandas de ARN foram examinadas por autoradiografia. Para demonstrar a presença de igual quantidade de ARN nas diferentes amostras da membrana, procedeu-se ao *stripping* da membrana, por lavagem da mesma com água destilada a ferver, e em seguida efectuou-se a hibridação com um fragmento de ADN complementar do ARNm da desidrogenase do gliceraldeído. Este fragmento de ADN foi previamente marcado com o radioisótopo ^{32}P , durante 1 hora, a 55°C, tendo as bandas de ARN sido visualizadas por autoradiografia.

2.8. Análise estatística dos resultados

Neste trabalho todos os resultados são apresentados como médias \pm erro padrão da média (SEM) do número de experiências (n) indicado nas figuras ou nas suas legendas. A significância das diferenças entre dois grupos de valores foi calculada pelo teste *t* de *Student* não emparelhado. Quando um grupo de valores foi comparado com dois ou mais grupos, a significância das diferenças foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de *Bonferroni*. Os valores de *p* inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como representando diferenças significativas.

²⁰ Solução de lavagem: SDS 0,5% (m/v), NaCl 75 mM, citrato de sódio 7,5 mM, pH 7.

2.9. Materiais

- Anticorpo monoclonal contra actina produzido em murgancho, membrana de náilon, membrana de PVDF, mistura de inibidores de proteases e *Random Primed DNA Labeling Kit* - Roche (Carnaxide, Portugal)
- Anticorpo policlonal contra iNOS produzido em coelho - Transduction Laboratories (Lexington, KY, EUA)
- Anticorpo policlonal contra I κ B- α produzido em coelho e anticorpo monoclonal contra pI κ B- α produzido em murgancho - Cell signalling Technology (Beverly, MA, EUA)
- Anticorpo policlonal contra p65 produzido em coelho - Serotec (Oxford, UK)
- Anticorpo policlonal contra c-Rel, produzido em cabra, anticorpos policlonais contra p50, p52 e RelB, produzidos em coelho e oligonucleótidos contendo as regiões de consenso para o factor de transcrição NF- κ B - Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA)
- GM-CSF murino recombinante - R&D systems (Minneapolis, MN, EUA)
- Imunoglobulina de cabra anti-murgancho conjugada com a +peroxidase de rábano - Pierce (Illinois, EUA)
- Imunoglobulina de porco anti-coelho conjugada com FITC e soro de porco - DAKO (Copenhagen, Denmark)
- Imunoglobulina de macaco anti-coelho conjugada com a peroxidase de rábano, [γ - 32 P]ATP, [α - 32 P]dCTP, colunas Sephadex G-50, cinase de polinucleótidos T4, oligonucleótido poly(dI-dC).poly(dI-dC), sistema de análise ECL para *western blot* e filmes de raios-X - Amersham Biosciences (Carnaxide, Portugal)
- DNFB, lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (serotipo 026:B6), meio de cultura IMDM, genistina, genisteína e sulfato de níquel - Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain)
- Meio de montagem *Prolong Antifade* - Molecular Probes Europe (Leiden, Holanda)
- Meio de montagem *Vectashield* - Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, EUA)
- SB 203580 - gentilmente cedido pelo Dr. J.L. Adams da SmithKline Beecham Pharmaceuticals (King of Prussia, PA, EUA)
- Soro fetal bovino - Biochrom KG (Berlin, Germany)
- Tripsina - Invitrogen (Paisley, UK)
- Triton[®]X 100, corantes *May-Grünwald* e *Giemsa*, *Trizol* e paraformaldeído - VWR International/Merck Eurolab (Lisboa, Portugal)

Métodos e materiais

Tween-20, SDS, acrilamida - BioRad (Milão, Itália)

Tyrphostin B42 e PD 098059 - RBI (Natick, MA, EUA)

Todos os outros reagentes - Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain)