

MÉTODOS E MATERIAIS

2.1. PREPARAÇÃO DE CULTURAS PRIMÁRIAS DE CONDRÓCITOS ARTICULARES

2.1.1. Isolamento dos condrócitos articulares bovinos

Os condrócitos foram isoladas por digestão enzimática de fragmentos de cartilagem removidos da superfície articular distal dos ossos metacárpicos ou metatársicos, isto é, a nível da articulação entre o metacarpo ou o metatarso e as falanges proximais dos membros anteriores ou posteriores de animais bovinos que se obtiveram em matadouros da região. Para o isolamento, seguiu-se o método de Green modificado por Benya, conforme descrito por Cruz e colaboradores (1990).

Resumidamente, a articulação foi exposta em condições assépticas e a cartilagem foi removida em pequenos fragmentos, mas alcançando toda a sua espessura. Os fragmentos de cartilagem foram imediatamente colocados em caixa de Petri contendo meio de cultura¹, suplementado com 3% (v/v) de Solução Antibiótica-Antimicótica² e, depois de lavados 3 vezes, foram digeridos enzimaticamente. Para isso, foram primeiro incubados em meio de pronase³ durante 1h30min e, depois de lavados três vezes, foram incubados durante uma noite (aproximadamente 18 horas) em meio de colagenase⁴. As duas incubações que compõem o processo de digestão foram efectuadas à temperatura de 37° C, em atmosfera humedecida, com 95% de ar e 5% de CO₂. Após a digestão com colagenase, as células foram lavadas três vezes, em meio de cultura, para eliminar completamente a enzima e, assim, impedir que a digestão prosseguisse. A suspensão de

¹ Meio de Cultura: Mistura de Nutrientes F-12 de Ham, modificada com HEPES.

² Solução Antibiótica-Antimicótica: 10000 U/ml de penicilina G sódica, 10000 µg/ml de sulfato de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B.

³ Meio de Pronase: Meio de cultura suplementado com 0,5% de protease K (p/v).

⁴ Meio de Colagenase: meio de cultura suplementado com 0,2 U/ml de colagenase A, 5% (v/v) de FBS e 3% (v/v) de Solução Antibiótica-Antimicótica.

células foi recolhida para tubo de Falcon de 50 ml e o volume completado por adição de meio de cultura. Após 5 minutos de repouso para que pequenos fragmentos de osso, eventualmente removidos com os pedaços de cartilagem, sedimentassem e pudessem ser separados das células, aspirou-se a suspensão celular e transferiu-se para novo tubo de Falcon. A suspensão celular foi, então, centrifugada a 1200 rpm (cerca de 200 g) durante 5 minutos. Após a terceira lavagem, as células foram suspensas em meio de cultura suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (FBS). A densidade celular da suspensão obtida foi determinada por contagem das células em hemocítmetro de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada, simultaneamente, usando o teste de exclusão do Azul de Tripán. Em regra, obtiveram-se mais de 98% de células viáveis em cada isolamento.

2.1.2. Condições de Cultura

Os condrócitos foram cultivados em placas de Petri de 60 mm de diâmetro ou em caixas de cultura de 6 ou de 24 poços, em condições de confluência, com uma densidade de $0,5 \times 10^6$ células/cm². Nas primeiras 24 horas, os condrócitos foram cultivados em meio de cultura com 5% (v/v) de FBS e 3% (v/v) de solução antibiótica-antimicótica, em atmosfera humedecida, com 95% de ar e 5% de CO₂. No fim desse período inicial de cultura, as células aderentes foram lavadas três vezes e, antes de qualquer tratamento, foram incubadas durante uma noite, em meio de cultura sem soro e com 1% (v/v) de solução antibiótica-antimicótica. Nas experiências subsequentes, as células foram sempre mantidas em meio de cultura sem soro e com 1% de solução antibiótica-antimicótica. Nalgumas das experiências em que se utilizaram os fármacos diacereína e reína, as células foram sempre cultivadas, desde o isolamento até final dos ensaios, em meio de cultura com 5% de FBS e 1% de solução antibiótica-antimicótica.

2.2. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS USADOS

Para avaliar a toxicidade dos compostos usados, utilizou-se o teste de redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazólio (MTT) descrito por Mosmann (1983). Este

teste baseia-se na capacidade das células vivas para reduzirem o MTT. Ao ser reduzido, este sal origina cristais de formazano de cor azul escura. A absorvência da solução resultante da dissolução desses cristais é directamente proporcional à quantidade de MTT reduzido que, por sua vez, reflecte a capacidade redutora das mitocôndrias e, conseqüentemente, a viabilidade das células.

Os condrócitos, cultivados em placas de 24 poços, foram incubados com 0,5 mg/ml de MTT em tampão fosfato salino (PBS)⁵, durante 30 min, a 37° C, em atmosfera humedecida com 95% de ar e 5% de CO₂. Depois de removido o sobrenadante, os cristais de formazano formados foram dissolvidos em isopropanol ácido⁶ e a absorvência foi lida a 570 nm, com um comprimento de onda de referência de 620 nm. A viabilidade das células foi avaliada por comparação das absorvências correspondentes às células tratadas com os compostos usados, com a absorvência das células Controlo (isto é, células manipuladas em simultâneo, mas não tratadas com qualquer composto) e com a absorvência das células tratadas com IL-1.

2.3. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REACTIVAS DE OXIGÉNIO

A produção intracelular de ROS foi avaliada utilizando o diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂-DA) de acordo com o método descrito anteriormente (Bass *et al.*, 1983; LeBel *et al.*, 1990), com algumas modificações.

O DCFH₂-DA é uma sonda não fluorescente que atravessa facilmente a membrana celular, sendo hidrolisada por esterases intracelulares a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂) que é incapaz de atravessar a membrana celular, acumulando-se assim no interior das células. Na presença de ROS, particularmente peróxidos, a DCFH₂ é oxidada a 2',7'-diclorofluoresceína que apresenta fluorescência intensa (Bass *et al.*, 1983).

Após remoção do meio de cultura e lavagem com meio de Na⁺⁷, as células foram incubadas com 5 µM DCFH₂-DA em meio de Na⁺, durante 20 minutos, a 37° C. Depois de

⁵ PBS: 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4.

⁶ Isopropanol ácido: HCl 0,04 N em isopropanol.

⁷ Meio de Na⁺: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaH₂PO₄, 5,6 mM glicose, 20 mM HEPES, pH 7,4.

lavadas para retirar a sonda não incorporada, as células, em meio de Na⁺, foram tratadas com cloreto de difenilenoiodônio (DPI), catalase⁸ ou superóxido dismutase (SOD)⁸ durante 30 minutos. Após adição de IL-1, as células foram incubadas mais 30 minutos. A intensidade de fluorescência foi medida imediatamente, em espectrofluorímetro SPEX Fluorolog, equipado com banho-maria termostatizado a 37° C. As células foram excitadas a 502 nm e a fluorescência emitida foi registrada a 550 nm.

2.4. EXTRACÇÃO DO ARN TOTAL E ANÁLISE DE *NORTHERN BLOT*

Para a extracção do ARN total, usou-se uma técnica que se baseia numa simplificação do método de Chomczynski e Sacchi (1987) e que consiste na utilização do reagente TRIzol — uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina.

As culturas de condrócitos foram lavadas três vezes com PBS tratado com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (v/v), e solubilizadas com TRIzol. Após adição de clorofórmio e centrifugação, o ARN total foi recuperado da fase aquosa por precipitação com isopropanol, lavado com etanol 75% e dissolvido em água com 0,1% DEPC. A quantidade de ARN obtida foi calculada por leitura da absorvência a 260 nm (1 unidade de A_{260nm} = 40 µg/ml). As amostras de ARN total (20 µg) — diluídas na proporção de 1:1 com uma solução contendo 2 x MOPS⁹, 20% formaldeído (v/v), 25% glicerol (v/v), 0,5 mM EDTA, 1,25 mg/ml azul de bromofenol e 50 µg/ml brometo de etídio — foram desnaturadas por aquecimento a 65°C durante 5 minutos e analisadas por electroforese¹⁰ em gele de agarose a 1%¹¹ em condições desnaturantes. Após a electroforese, observaram-se as bandas de ARN no gele sob luz ultra-violeta para verificar a integridade do ARN obtido. As bandas de ARN foram transferidas para membrana de nylon por *Northern blot* em tampão 20x SSC¹². Para estabilizar a ligação do ARN à membrana, esta foi aquecida a 80° C durante 30 minutos. Para bloquear locais de ligação não específicos,

⁸ Antes da adição de catalase e SOD, as células foram permeabilizadas por adição de digitonina 0,00002%, ao meio de Na⁺.

⁹ 2xMOPS (ácido 4-morfolinopropanossulfónico): 40 mM MOPS, 6 mM acetato de sódio, 2 mM EDTA, pH 7,0, em água com 0,1% DEPC.

¹⁰ Tampão de electroforese: 1x MOPS.

¹¹ Gele de Agarose: 1% agarose, 10% formaldeído (v/v) em 1x MOPS.

¹² 20x SSC: 3M NaCl, 300mM citrato de sódio, pH 7,0.

a membrana foi incubada em forno de hibridização a 55° C com rotação, durante pelo menos 4 horas, em tampão de hibridização¹³. Entretanto, procedeu-se à marcação com [α -³²P]desoxicitosina trifosfato ([α -³²P]dCTP) da sonda de ADN complementar (cADN) do ARN mensageiro (mARN) a detectar. Para isso, utilizou-se o “Random Primed DNA Labeling kit” (Boehringer Mannheim GmbH) que utiliza o fragmento de Klenow para copiar a sequência de ADN que serve de molde, mas introduzindo-lhe [α -³²P]dCTP em vez de dCTP. Depois de substituído o tampão de hibridização, a sonda de cADN marcada com ³²P foi directamente adicionada ao frasco contendo a membrana com o ARN. O processo de hibridização entre o cADN marcado com ³²P e o ARNm respectivo eventualmente presente na membrana, decorreu em forno de hibridização a 55° C, com rotação, durante uma noite (aproximadamente 16 horas). Após duas lavagens¹⁴ a 55° C durante 30 minutos cada uma, a membrana foi exposta a película radiográfica para detecção dos complexos cADN–ARNm eventualmente formados, por autorradiografia. Após revelação da película, a membrana foi lavada duas vezes em água fervente para remoção do cADN e sujeita a novo processo de hibridização com o cADN da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O resultado desta segunda hibridização foi usado como padrão interno para avaliar eventuais diferenças na quantidade de ARN aplicada no gele de agarose. Para isso e para se proceder à análise estatística dos resultados, calculou-se, para cada amostra e em cada experiência, a razão entre a intensidade da banda relativa ao ARNm da NOSII e a da banda relativa à GAPDH. A intensidade de cada banda foi avaliada utilizando o histograma obtido com o programa informático “Adobe Photoshop 6.0”.

2.5. PREPARAÇÃO DE EXTRACTOS CITOPLASMÁTICOS E NUCLEARES

Após remoção do meio sobrenadante e lavagem com PBS, as células foram lisadas por incubação com tampão 1¹⁵ durante 15 minutos, em gelo. Os lisados foram

¹³ Tampão de hibridização: 35% (v/v) solução de fosfato de sódio (Na₂HPO₄ 7,05% (p/v), ácido fosfórico 0,4% (v/v) em água com 0,1% DEPC), 7% Dodecilsulfato de sódio (SDS, p/v), 30% formamida desionizada (v/v), 1% albumina sérica bovina (BSA, p/v).

¹⁴ Solução de lavagem: 20x SSC 2,5% (v/v), SDS 0,5% (p/v).

¹⁵ Tampão 1: 10 mM Tris-HCL, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,5% Nonidet P-40, cocktail de inibidores de proteases diluído a 1:7, pH 7,5.

centrifugados a 2300g/5 minutos/4^o C. Os sobrenadantes (extractos citoplasmáticos) foram separados e guardados a -70^o C até posterior utilização. Os sedimentos correspondentes foram suspensos em tampão 2¹⁶ e, após 20 minutos de incubação em gelo, foram centrifugados a 18000 g/20 minutos/4^o C. Os sobrenadantes assim obtidos (extractos nucleares) foram recolhidos e guardados a -70^o C até posterior utilização. A concentração de proteínas nos extractos foi determinada usando o método do ácido bicinconínico.

2.6. ENSAIO DE DESVIO DA MOBILIDADE ELECTROFORÉTICA

Para detectar a presença de factores de transcrição activados — isto é, proteínas capazes de se ligarem a pequenos oligonucleótidos correspondentes à sequência de nucleótidos específica de um dado factor de transcrição — utilizou-se o ensaio de desvio da mobilidade electroforética que tira partido da menor mobilidade electroforética de complexos oligonucleótido–proteína, relativamente à mobilidade electroforética do mesmo oligonucleótido livre. Assim, a ligação de proteínas a um oligonucleótido marcado terminalmente com um radioisótopo, retarda a mobilidade desse fragmento, durante uma electroforese em condições não desnaturantes, resultando na formação de bandas discretas, detectáveis por autorradiografia.

As sondas compostas por oligonucleótidos correspondentes às sequências específicas para cada um dos factores de transcrição AP-1, NF-κB e octâmero-1 (Oct-1), foram marcadas por fosforilação com [γ -³²P]ATP por acção da enzima “cinase T4 de polinucleótidos” (“T4 polinucleotide kinase”) e purificadas por centrifugação em colunas de resina Sephadex G-50. Os extractos nucleares (10 μg de proteína) foram incubados, durante 40 minutos/4^o C, num volume final de 20 μl, em tampão de reacção de ligação¹⁷ com 150 000-200 000 cpm/reacção de oligonucleótido marcado com [γ -³²P]. A mistura de reacção foi submetida a electroforese em gele de poliacrilamida a 4% ou a 7%, em

¹⁶ Tampão 2: 20 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 20% (v/v) glicerol, cocktail de inibidores de proteases diluído a 1:7, pH 7,5.

¹⁷ Tampão de reacção de ligação: 20 mM HEPES, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 4% (p/v) Ficoll 400, 2μg poly(dIdC), 20 μg BSA, pH 7,9

condições não desnaturantes, em tampão TBE 0,5x¹⁸, durante 3 horas a 150V. Os complexos oligonucleótido–proteína separados no gele foram visualizados por autoradiografia, após secagem do gele.

Para os ensaios de “supershift” — isto é, redução adicional da mobilidade electroforética ou inibição da formação dos complexos oligonucleótido–proteína devido à ligação de um anticorpo específico para a proteína — os extractos nucleares foram incubados, durante 2 horas em gelo, com 2 µg de anticorpo por reacção, antes da adição do oligonucleótido marcado com o isótopo radioactivo. Os ensaios de competição foram realizados por incubação simultânea dos extractos nucleares com o oligonucleótido marcado e com uma quantidade 100 vezes maior do mesmo oligonucleótido, ou de outro não relacionado (Oct-1), não marcados com o isótopo radioactivo.

2.7. ANÁLISE DE *WESTERN BLOT* OU *IMUNOBLOT*

Para detectar e avaliar os níveis de expressão de proteínas utilizou-se o método de *western blot* ou *imunoblot*, após separação das proteínas presentes nos extractos citoplasmáticos ou nucleares por electroforese em gele de poliacrilamida (PAGE) em condições desnaturantes, na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS).

As proteínas presentes nos extractos citoplasmáticos ou nucleares (25 µg de proteína) foram desnaturadas por fervura, durante 3 minutos, em tampão desnaturante¹⁹ e separadas por electroforese²⁰ em geles de separação com 10% de acrilamida. Para a imunodeteccção, as proteínas no gele foram transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno activadas em metanol, por electrotransferência²¹ à voltagem constante de 40 V, a 4º C, durante uma noite (aproximadamente 18 horas) ou, alternativamente, a 150 mA, a 4º C, durante 3 horas. Após bloqueio dos locais não específicos de ligação dos anticorpos por incubação das membranas com 5% de leite magro (p/v) em tampão Tris salino (TBS)²² com 0,5% (v/v) de Tween 20 (TBS-T), durante 2 horas, com agitação, à

¹⁸ TBE 0,5x: 44,6 mM Tris, 44,5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA

¹⁹ Tampão desnaturante: 2,5% SDS, 0,0625 M Tris-HCl, 10% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol, pH 6,8.

²⁰ Tampão de electroforese: 100 mM Tris, 100 mM Bicina, 0,1 % (p/v) SDS.

²¹ Tampão de electrotransferência: 96 mM glicina, 12,5 mM Tris, 20% (v/v) metanol.

²² TBS: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6.

temperatura ambiente, ou durante uma noite, sem agitação, a 4° C, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em TBS-T com 0,5% de leite magro (p/v), durante 1 hora, com agitação, à temperatura ambiente. Depois de 5 lavagens de 5 minutos cada, em TBS-T com 0,5% de leite magro, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano, diluído em TBS-T com 0,5% de leite magro (p/v), durante 1 hora, com agitação, à temperatura ambiente. A proteína em estudo, especificamente ligada ao anticorpo primário, por sua vez, ligado ao anticorpo secundário conjugado com a peroxidase de rábano, foi detectada por autoradiografia da luz emitida como resultado da oxidação do luminol pela enzima, usando o H₂O₂ como substrato. Para a reacção de quimioluminescência, utilizou-se o conjunto de reagentes ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech). Após revelação da película, a membrana foi lavada durante 30 minutos, a 55° C, sob agitação, com uma solução contendo 100 mM 2-mercaptoetanol, 62,5 mM Tris-HCl e 2% (p/v) SDS, a pH 6,8, para remoção dos anticorpos. Depois de extensa lavagem em TBS-T, procedeu-se à detecção da proteína actina segundo o protocolo já descrito. Este procedimento permitiu verificar a presença na membrana de iguais quantidades de proteína para cada amostra e, assim, controlar a eficiência dos vários processos envolvidos na análise de *western blot*. Para isso e para se proceder à análise estatística dos resultados, calculou-se, para cada amostra e em cada experiência, a razão entre a intensidade da banda relativa à proteína em análise e a da banda relativa à actina. A intensidade de cada banda foi avaliada utilizando o histograma obtido com o programa informático “Adobe Photoshop 6.0”.

2.8. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE DA NOS

Para avaliar a actividade da NOS utilizaram-se dois métodos, cada um dos quais avalia um dos dois produtos formados em consequência da oxidação enzimática da L-arginina. O primeiro desses métodos avalia a produção de NO através do doseamento dos nitritos que se formam por oxidação espontânea do NO. O outro detecta a L-citrulina que, por ser produzida em quantidades iguais às do NO, é também uma medida da síntese deste e da actividade da NOS.

2.8.1. Doseamento de nitritos

Utilizou-se a reacção de Griess (Green *et al.*, 1982) para determinar a concentração de nitritos, no sobrenadante, livre de células, das culturas de condrócitos sujeitos a diversos tratamentos. Após centrifugação para eliminação das células eventualmente recolhidas juntamente com o meio de cultura, 150 µl de cada amostra foram incubados, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, com igual volume de reagente de Griess²³. As absorvências foram lidas a 540 nm e a concentração de nitritos foi calculada por interpolação em curva padrão preparada com padrões de nitrato de sódio.

2.8.2. Doseamento de L-[³H]citrulina

Nas experiências em que se utilizou H₂O₂ e o dador de NO, S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), a actividade da NOS, nos extractos celulares totais, foi avaliada por determinação da quantidade de L-[³H]citrulina produzida a partir de L-[³H]arginina, segundo o método de Bredt e Schmidt (1996).

Após lavagem, as células foram recolhidas em PBS e lisadas por sonicação. Os lisados foram centrifugados a 12000 rpm/5min/4^o C para remoção dos restos celulares e a concentração de proteínas foi determinada pelo método do vermelho de pirogalhol. Os extractos celulares totais (200 µl) foram incubados num volume final de 300 µl, durante 45 min, a 37^o C, num meio contendo 50 mM Tris-HCl, 0,2 mM CaCl₂, 0,1 mM EGTA, 5 µM FAD, 0,5 mM NADPH, 10 µM BH₄ e 10 nM L-[³H]arginina (60 Ci/mmol). A reacção foi terminada por adição de 1,7 ml de solução Stop²⁴ fria e colocação imediata dos tubos de reacção em gelo. A L-[³H]citrulina formada foi separada da L-[³H]arginina não consumida na reacção enzimática utilizando uma resina de troca iónica, Dowex AG 50 W-X8, na forma sódica e previamente equilibrada com a solução Stop. Esta resina retém a L-[³H]arginina, enquanto a L-[³H]citrulina é facilmente eluída com água. A L-[³H]citrulina foi eluída por lavagem da coluna com 2 ml de água. A 3,5 ml do eluato total juntaram-se

²³ Reagente de Griess: mistura, em partes iguais, de uma solução contendo 1% sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% com outra contendo 0,1% N-1-naftiletlenodiamina.

²⁴ Solução Stop: 50 mM HEPES, 5 mM EDTA, pH 5,5.

5 ml de líquido de cintilação e a radioactividade foi determinada num contador de cintilações, com correcção para desintegrações por minuto (dpm). As contagens obtidas para cada amostra foram depois corrigidas em função da respectiva concentração proteica e os resultados foram expressos em dpm/mg proteína.

2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quando aplicável, calculou-se a média e o desvio-padrão da média (SD) dos resultados obtidos experimentalmente. O significado estatístico das diferenças obtidas em condições distintas foi avaliado pelo teste *t* de Student, não emparelhado.

2.10. MATERIAIS

- [α -³²P]dCTP Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EUA
- [γ -³²P]ATP Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EUA
- Anticorpo monoclonal de murganho anti-actina Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha
- Anticorpo anti-imunoglobulinas de coelho conjugado com peroxidase de rábano Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EUA
- Anticorpo anti-imunoglobulinas de murganho conjugado com peroxidase de rábano Pierce, Rockford, IL, EUA
- Anticorpo policlonal de coelho anti-I κ B- α New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EUA
- Anticorpo policlonal de coelho anti-p65 Serotec Ltd, Oxford, Reino Unido

- Anticorpos policlonais de coelho anti-NOS I e anti-NOS II
Transduction Laboratories, Lexington, KY, EUA
- Anticorpos policlonais de coelho dirigidos contra as proteínas p50, p52, RelB, cRel, c-Fos, FosB, Fra1, Fra2, c-Jun, JunB e JunD
Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA
- Catalase
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA
- Cinase T4 de polinucleótidos
Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EUA
- Cloreto de Difenilenoiodónio
Calbiochem, San Diego, CA, EUA
- Cocktail de Inibidores de Proteases "Complete Mini"
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha
- Colagenase A
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha
- DCFH₂-DA
Molecular Probes, Eugene, OR, EUA
- Diacereína
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA
- Digitonina
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA
- Kit para determinação da concentração de proteínas (Método do vermelho de pirogalhol)
Spinreact, Girona, Espanha
- L-[³H]arginina
Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EUA
- Mistura de Nutrientes F-12 de Ham modificada com HEPES
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA
- N-acetilpenicilamina
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA
- PD 98059
RBI, Natick, MA, EUA
- Peróxido de Hidrogénio
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA

Métodos e Materiais

- Poli-dIdC Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EUA
- Proteinase K Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA
- “Random Primed DNA-labeling Kit” Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemanha
- Reína Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA
- Resina Dowex AG 50W-X8 Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, EUA
- SB 203580 Gentileza do Dr. J. L. Adams, Smith Kline & Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, PA, EUA
- S-nitroso-N-acetilpenicilamina RBI, Natick, MA, EUA
- Solução Antibiótica-Antimicótica Gibco Brl Life Technologies, Grand Island, NY, EUA
- Sondas de cADN para a NOS II e GAPDH Gentileza do Prof. Dr. Tony Cruz, Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, Canadá
- Soro Fetal Bovino Gibco Brl Life Technologies, Grand Island, NY, EUA
- Superóxido dismutase Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA
- Tirfostin B42 (AG 490) RBI, Natick, MA, EUA
- Trizol Gibco Brl Life Technologies, Grand Island, NY, EUA