

## Otimização de ensaios biológicos para a detecção de espécies reativas de oxigênio em mastócitos da linhagem RBL-2H3.

Marcela B. Motta (IC)<sup>1\*</sup>, Maria Perpétua F. M. Del Lama (TC)<sup>1,2</sup> Rose M. Z. Georgetto Naal (PQ)<sup>1,2</sup>.  
marcela.motta@usp.br

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo;

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioanalítica.

Palavras Chave: EROS, mastócitos, fluorescência, alergia.

### Introdução

As espécies reativas de oxigênio (EROS), como o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>) e o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), são liberadas no citoplasma celular quando os mastócitos são estimulados por antígenos. Tais espécies aumentam o stress oxidativo intracelular, gerando moléculas inflamatórias que acentuam a cascata de reações bioquímicas da célula e exacerbam os sintomas alérgicos. Recentemente, tem sido sugerido que as funções antioxidantes estão associadas às propriedades anti-inflamatórias e/ou imunossupressoras<sup>1</sup>. Assim, como a injúria em tecidos celulares e a inflamação causada por reações alérgicas levam ao aumento do stress oxidativo, parece lógico que bons antioxidantes podem reduzir os sintomas causados por doenças alérgicas. Espera-se, portanto, que substâncias conhecidas por sua atividade antioxidante sejam efetivas na inibição de processos alérgicos. Essa expectativa nos levou ao estudo da otimização do ensaio biológico para detecção de EROs em mastócitos da linhagem RBL-2H3, para fins de aplicação futura em estudos de atividade antioxidante/antialérgica.

### Resultados e Discussão

Os níveis de EROS intracelular foram monitorados usando o método clássico, para macrófagos e neutrófilos, baseado na oxidação da sonda não-fluorescente, 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H<sub>2</sub>DCF-DA)<sup>2</sup>, a qual é oxidada para 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) tornando-se fluorescente. Inicialmente, as células foram sensibilizadas com o anticorpo anti-DNP-IgE e incubadas durante a noite. A placa foi, então, centrifugada (1000 rpm, 5 min) seguida da adição de 100 µL da sonda fluorescente, incubação por 20 min e nova centrifugação para eliminação do excesso da sonda. As células foram estimuladas pela adição de antígeno (DNP-BSA), ou ionóforo de cálcio (A23187), incubadas por 60 min, centrifugadas, e lisadas com Triton-X-100 0,1%, ou DMSO, para liberação do conteúdo intracelular. Por fim, a fluorescência, foi monitorada no leitor de fluorescência para microplacas (Biotek) nos comprimentos de onda de excitação e emissão

iguais a 485 e 520 nm, respectivamente. Os valores de fluorescência foram normalizados para facilitar a comparação dos resultados. Inicialmente, foi investigada a melhor substância para lisar as células e, para isso, foram comparados Triton-X-100 e DMSO. No primeiro caso, a resposta aumentou de 1 para 1,50±0,08 para células sem estímulo e estimuladas, respectivamente. Para o DMSO, não houve mudança significativa, uma vez que o aumento foi de 1 para 1,008±0,004. Posteriormente, foram estudadas as condições adequadas de estímulo celular utilizando o antígeno (DNP-BSA – 0,01 e 0,1 µg/mL) e o ionóforo de cálcio (A23187 – 0,5 e 5 µM). O melhor estímulo foi observado para o antígeno na concentração de 0,01 µg/mL sendo que a resposta aumentou de 1 (sem estímulo) para 1,25±0,11 (com estímulo). Para o ionóforo de cálcio a melhor concentração foi de 5 µM com um aumento de 1 para 1,070±0,007. Foi investigada, também, a melhor suspensão celular entre os valores de 1,5x10<sup>5</sup>, 2,5x10<sup>5</sup> e 5x10<sup>5</sup> céls/mL. A melhor resposta, independente do estímulo, foi obtida para a suspensão de 5x10<sup>5</sup> céls/mL cujo aumento de fluorescência, com estímulo antigênico, foi de 1 para 1,230±0,009. Finalmente, determinou-se a concentração ideal da sonda fluorescente entre os valores de 1, 10, 50, 100 e 200 µM, com estímulo antigênico e ionóforo de cálcio, e observou-se que a concentração com a melhor resposta foi a de 200 µM, com variação de 1 para 1,39±0,06 e estímulo antigênico.

### Conclusões

Os resultados descritos acima sugerem que as melhores condições para o ensaio biológico de detecção de EROS em mastócito são: Triton-X-100 0,1% para lisar as células, estímulo antigênico na concentração de 0,01 µg/mL, suspensão celular igual a 5x10<sup>5</sup> céls/mL e concentração de H<sub>2</sub>DCF-DA igual a 200 µM.

### Agradecimentos

FCFRP-USP, Fapesp, CNPq, INCT-Bioanalítica

<sup>1</sup> Dewaart et al., *British J. Nutrition* 1997, Vol. 78, No. 5, 761-774.

<sup>2</sup> Ito et al., *Food Chem* 2011, Vol. 126, No. 1, 289-294.