

**BÁRBARA ANDRÉA FORTES DOS SANTOS**

**ENSAIO DO LINFONODO LOCAL MURINO: AVALIAÇÃO COM O  
MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR BROMODEOXIURIDINA E DE  
SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS PARA ANÁLISE DO POTENCIAL  
IRRITANTE E/OU ALERGÊNICO DE SUBSTÂNCIAS**

**PPGVS/INCQS**

**FIOCRUZ**

**2010**

**ENSAIO DO LINFONODO LOCAL MURINO: AVALIAÇÃO COM O  
MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR BROMODEOXIURIDINA E DE**

**SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS PARA ANÁLISE DO POTENCIAL  
IRRITANTE E/OU ALERGÊNICO DE SUBSTÂNCIAS**

**Bárbara Andréa Fortes dos Santos**

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadores: Dr<sup>a</sup> Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira  
Dr. Fábio Coelho Amendoeira

Rio de Janeiro

2010

Ensaio do linfonodo local murino: avaliação com o marcador de proliferação celular bromodeoxiuridina e de subpopulações de linfócitos para análise do potencial irritante e/ou alergênico de substâncias

Bárbara Andréa Fortes dos Santos

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em 18 de maio de 2010

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Simões Villas Boas (INCQS/FIOCRUZ)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dea Maria Serra Villa Verde (IOC/FIOCRUZ)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jurandy Susana Patrícia Ocampo Lyra (UNIRIO)

Orientadores

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

---

Prof.Dr Fábio Coelho Amendoeira

Rio de Janeiro

2010

Santos, Bárbara Andréa Fortes

Ensaio do linfonodo local murino: Avaliação com o marcador de proliferação celular bromodeoxiuridina e de subpopulações de linfócitos para análise do potencial irritante e/ou alergênico de substâncias. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ,2010.

xviii, 91 f., il.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007.

Orientadores: Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira, Fábio coelho Amendoeira.

1. LLNA 2. BrdU 3. Métodos Alternativos 4. Dermatite de contato. I. Título

Local lymph node assay (LLNA): Evaluation of proliferation marker bromodeoxyuridine and lymphocyte subpopulations for potential irritant and / or allergenic substances analysis.

Dedico este trabalho aos pais Hélio e Maria,  
ao meu marido Pedro, a minha sogra Janete  
e minha orientadora Tininha, meus maiores  
incentivadores.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que fez e faz pela minha vida

A minha querida amiga e orientadora Tininha, obrigada por acreditar em mim em uma época que nem todos acreditavam, pelo carinho e paciência. Você é muito especial!

Ao meu orientador Fábio agradeço pela grande ajuda nessa fase final. Sua ajuda foi essencial!

Aos meus pais agradeço a oportunidade de poder chegar até aqui, a dedicação, o amor incondicional e o carinho. AMO VOCÊS!

A minha irmã Vanessa e meu cunhado Jorge, obrigada por tudo.

Meu marido Pedro, meu amor muito obrigada pela paciência, dedicação, ajuda, carinho, força e muito amor. Me desculpa a ausência e obrigada pela presença constante. Amo você!

Aos meus sogros Janete e José Luiz, é bom demais ter vocês por perto, ao meu cunhado Leonardo agradeço pelas dicas e conversas.

Querida Cida, obrigada pelas orações para que tudo desse certo.

As minhas grandes amigas Manuela e Jussara, mesmo de longe sei que torcem por mim.

Ao Edson e a Ana Beatriz, meus companheiros de todas as horas e todos os dias, não sei se conseguiria sem vocês. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos e padrinhos, Deborah e Luiz, foi muito bom conhecer vocês. Luiz obrigada por me ouvir e me agüentar, Deborah obrigada por fazer parte de um momento muito especial da minha vida.

A todos do laboratório do Timo, Savino pela oportunidade de começar, Désio meu professor querido, você tem lugar especial em meu coração, obrigada por tudo. Déa e Juliana obrigada pela ajuda e por me fazer aprender tanto. Carla obrigada pelo incentivo e carinho. Eugênia, Leandra e Klaysa vocês são

especiais, muito obrigada pelo carinho e incentivo. Marco, Marcele, Ana Flávia Cecília, Francisco, Pedro, Dani, Flávia Madeira, Flávia Garcia, Flávia Calmon, Diego, Sandra, Wallace, amigos de todas as horas. Galera do Timo obrigada por tudo!

Isabella, obrigada pela ajuda e o incentivo, sua participação foi essencial.

Laboratório de Virologia, pela ajuda com a metodologia HE. Marciano, muito obrigada.

Laboratório de Farmacologia, pela ajuda com o ELISA. Rachel, muito obrigada.

A Cláudia, Sinéia e Diego do Departamento de Química, agradeço pela ajuda com os reagentes, equipamentos e principalmente pelo carinho.

A todos do Laboratório, Michele, obrigada pela ajuda com os materiais, nossa, não sei o que seria se você não estivesse por perto. Patrícia, Bruna, Ana, Vlamir, Ivani, Jarbas, Lúcia, Deuse e Alexandre, obrigada por me receberem com tanto carinho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

**Cora Coralina**

## RESUMO

O Ensaio do linfonodo local murino (LLNA) foi desenvolvido como uma alternativa aos testes de Buhler e Maximização. Esse teste é utilizado com o objetivo de discriminar substâncias capazes de induzir dermatite de contato e tem como desfecho a quantificação celular nos linfonodos auriculares de camundongos. Esse ensaio embora recomendado por agências internacionais envolvidas no desenvolvimento de metodologias alternativas (ICCVAM e ECVAM), ainda necessita de aprimoramento, isso porque o desfecho de proliferação se mostrou falho principalmente quando substâncias de ação sensibilizante fraca ou moderada foram o alvo da investigação. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo a padronização do método LLNA alternativo, através da quantificação de proliferação celular utilizando um reagente não radioativo (BrdU). Além disso, possíveis diferenças nos padrões de subpopulações linfocitárias entre camundongos tratados com substâncias irritantes e sensibilizantes foram também investigadas, com o objetivo de buscar um aprimoramento do teste. Para tal fim, os animais foram tratados com os sensibilizantes dinitroclorobenzeno (DNCB) e parafenilenidiamina (PPD) e os irritantes lauril sulfato de sódio (LSS) e tritonX-100 (TX-100), por 3 dias consecutivos no dorso de ambas as orelhas. As subpopulações foram analisadas por citometria de fluxo e por imunofluorescência. A citocina TNF- $\alpha$  no soro desses animais e possíveis alterações patológicas nas orelhas dos animais foram também analisadas. Os resultados obtidos demonstraram um aumento no número de células nos linfonodos de animais tratados com sensibilizantes e irritantes, quando comparados com os controles, porém um aumento da proliferação celular medida por BrdU foi observado apenas para os grupos tratados com as substâncias sensibilizantes. Além disso, o número absoluto das subpopulações de células CD4+, CD8+ e B B220+ foi maior para os grupos tratados com os sensibilizantes. Um aumento nas subpopulações CD4+CD25+ e CD4+CD69+ foi observado principalmente para substâncias sensibilizantes. Uma quantidade de TNF- $\alpha$  4 vezes maior foi encontrada no soro dos animais tratados com os sensibilizantes, quando comparados aos grupos tratados com o controle. Nenhuma diferença foi vista nos estudos histopatológicos das orelhas dos animais. Com os resultados obtidos foi possível concluir que: a padronização do LLNA foi possível; o CD25 foi o mais promissor dentre os estudados na tentativa de avaliar uma alternativa ao desfecho de proliferação; a subpopulação de células CD8+ parece ter uma função prioritária na DCA; a citocina TNF- $\alpha$  poderia ser uma forte candidata para identificação de substâncias sensibilizantes e a histopatologia de animais não parecer uma boa alternativa.

## ABSTRACT

The Local Lymph Node Assay (LLNA) was developed as an alternative to Buhler and Maximization tests. This test is commonly used to discriminate some substances that are able to induce contact dermatitis and endpoint is the cell quantification in mice auricular lymph nodes. Although this assay is recommended by international agencies involved in the development of alternative methods (ICCVAM and ECVAM), it still needs to be improved because cell quantification and proliferation did not work as expected, especially when weak or moderate sensitizer substances were the target of investigation. In this context, this study aimed to standardize the LLNA alternative method, by measuring cellular proliferation using a nonradioactive reagent (BrdU). Furthermore, possible differences in lymphocyte subsets standards in mice that were treated with irritant and sensitizer substances were also investigated with the objective of test improvement. As methodology, animals were treated with sensitizers substances as dinitrochlorobenzene (DNCB) and paraphenylenediamine (PPD) and irritant substances as sodium lauryl sulfate (SLS) and tritonX-100 (TX-100) for 3 days, using dorsum area of both ears. The subpopulations cells were analyzed by flow cytometry and immunofluorescence. The cytokine TNF- $\alpha$  in the serum of these animals and possible pathological changes in the ears of the animals were also analyzed. The results showed an increase in lymph node cell number of animals treated with sensitizers and irritants, compared to controls, but an increase in cell proliferation by BrdU analysis was only observed in groups treated with sensitizers. Moreover, the absolute number of CD4+, CD8+ and B B220+ subpopulations was higher in groups treated with sensitizers. An increase in CD4+CD25+ and CD4+CD69+ expression was observed mainly in sensitizer treating group; TNF- $\alpha$  was found four times higher in serum from animals treated with sensitizers, when compared to controls. No difference was found in histopathological studies in mice ears. These results suggest that LLNA standardization is possible and CD25 was the most promising expression molecule among those studied in an attempt to evaluate an alternative to the endpoint of proliferation; the CD8+ subpopulation seems to have an essential function in DCA and TNF- $\alpha$  could be a strong candidate for identification of sensitizers, so that mice histopathology studies were not a better alternative.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Fotografias com os sintomas da dermatite de contato. ....	3
<b>FIGURA 2.</b> fisiopatologia da dermatite de contato alérgica.....	6
<b>FIGURA 3.</b> Representação de um linfonodo e a interação de uma célula TCD8 expressando o TCR (receptor de células T) com uma célula dendrítica expressando MHC de classe I.....	8
<b>FIGURA 4.</b> Representação dos linfonodos auriculares.....	20
<b>FIGURA 5.</b> Estrutura da Bromodeoxiuridina .....	21
<b>FIGURA 6.</b> Microscopia confocal .....	34
<b>FIGURA 7.</b> Aumento da celularidade nos linfonodos de drenagem .....	40
<b>FIGURA 8.</b> Aumento de células CD4+ CD8+ e B220+ linfonodos de drenagem.....	42
<b>FIGURA 9.</b> Expressão de marcadores de ativação e adesão .....	44
<b>FIGURA 10.</b> Expressão de marcadores de ativação e adesão.....	45
<b>FIGURA 11.</b> Expressão de marcadores de ativação e adesão .....	46
<b>FIGURA 12.</b> Número de células BrdU+ nos linfonodos de drenagem.....	48
<b>FIGURA 13.</b> Expressão de BrdU em subpopulações de linfócitos.....	50
<b>FIGURA 14.</b> Aumento proliferativo de subpopulações.....	52
<b>FIGURA 15.</b> Expressão de BrdU, CD4 e CD8 nos linfonodos .....	54
<b>FIGURA 16.</b> Expressão de BrdU, CD4 e CD8 nos linfonodos .....	55
<b>FIGURA 17.</b> Mudança nas orelhas dos animais .....	57
<b>FIGURA 18.</b> Mudança nas orelhas dos animais .....	58
<b>FIGURA 19.</b> Aumento da citocina TNF- $\alpha$ .....	60

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 1.</b> Princípio da citometria de fluxo .....	27
<b>ESQUEMA 2.</b> Esquema da metodologia do ELISA.....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Aumento de citocinas na resposta cutânea a dermatite de contato alérgica e irritante.....	13
<b>TABELA 2.</b> Porcentagem de animais utilizados na Grã-Bretanha, em procedimentos científicos, no ano de 2008.....	16
<b>TABELA 3.</b> Substâncias que foram utilizadas no presente estudo, suas doses e referências bibliográficas.....	26
<b>TABELA 4.</b> Anticorpos monoclonais, distribuição do receptor e o fluorocromo que foram utilizados para identificação das subpopulações celulares .....	29
<b>TABELA 5.</b> Peso dos animais.....	37
<b>TABELA 6.</b> Número absoluto de células BrdU+ .....	38
<b>TABELA 7.</b> Número de células de pool de linfonodos e dos linfonodos individuais de animais .....	39
<b>TABELA 8.</b> Análise do percentual de células TCD4, TCD8 e B (B220) nos linfonodos de drenagem.....	41
<b>TABELA 9.</b> Expressão de BrdU em subpopulações de linfócitos ativados.....	51

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA

ABIHPEC - Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

BrdU - Bromodeoxiuridina

BSA - Albumina sérica bovina

CL - *Célula de langerhans*

CLA - Antígeno Linfocitário cutâneo

CRO óleo de cróton

CD - Células dendríticas

DC - Dermatite de contato

DCA - Dermatite de contato alérgica

DCF - Dermatite de contato fotoalérgica

DCI - Dermatite de contato irritante

DNCB - Dinitroclorobenzeno

DNFB - Dinitrofluorbenzeno

DNP - Dinitrofenol

ECVAM - *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

GM-CSF - fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos

HC - Hipersensibilidade de contato

HCA - Cinamaldeído Hexyl- $\alpha$

HE - Hematoxilina e eosina

ICAM - Molécula de adesão intrer-celular (do inglês, Inter-Cellular Adhesion Molecule)

ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee for Validation of Alternative Methods*

IFN- $\gamma$  - Interferon-gama

IL - interleucina

INCQS - Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde

INF-g - Interferon gama

LFA - antígeno 1 associado à função leucocitária

LLNA - Ensaio do Linfonodo local Murino, do inglês *local lymph node assay*

LSS - Lauril Sulfato de sódio

MHCI - Molécula de histocompatibilidade de classe I

MHCII - Molécula de histocompatibilidade de classe II

NK - "*Natural Killer*"

OECD - Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica (do inglês, *Organization for Economic Co-operation and Development*)

OPD - o-Phenylenediamine

OXA - Oxazolina

PBS - tampão fosfato salino

PPD - Paranenilenodiamina

RDS - *Research Defence Society*

SNVS - Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária

TCR - Receptor de células T

TDI - Diisocianato de tolueno)

TNCB - Trinitroclorobenzeno

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa

TNP - Trinitrofenol

TX-100 - TritonX-100

UV - Ultra violeta

VCAM - Molécula de adesão vascular 1 (do Inglês, *vascular cell adhesion molecule 1*)

VLA - Antígeno de aparecimento tardio, (do Inglês, *Very Late Antigen*)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 Dermatite de Contato</b> .....	2
1.1.1 Dermatite de Contato Alérgica .....	4
1.1.2 Papel das Células T Cd4 E T Cd8 Na Dca .....	7
<b>1.2 Dermatite de Contato Irritante</b> .....	9
1.2.1 Mecanismo Fisiopatológico da Dci .....	11
<b>1.3 Dermatite de contato fotoalérgica</b> .....	13
<b>1.4 Ensaios para Avaliação do Potencial Sensibilizante de Xenobióticos</b>	13
<b>1.5 Métodos Alternativos</b> .....	15
1.5.1 Princípio dos 3Rs .....	17
<b>1.6 Ensaio do Linfonodo Local Murino (LLNA)</b> .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3. MATERIAIS &amp; MÉTODOS</b> .....	25
3.1 ANIMAIS .....	25
3.2 TRATAMENTO DOS ANIMAIS PARA O ENSAIO DO LLNA UTILIZANDO O BRDU... 25	
3.2.1 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS PARA O TRATAMENTO .....	26
3.3 CITOMETRIA DE FLUXO .....	27
3.3.1 CITÔMETRO DE FLUXO.....	27
3.3.2 ANTICORPOS .....	28
3.3.3 MARCAÇÃO DOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE MEMBRANAR E BRDU .....	30
3.4 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO POR LIGAÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA).....	31
3.4.1 CITOCINAS MENSURADAS ATRAVÉS DO MÉTODO DE ELISA.....	33
3.5 MICROSCOPIA CONFOCAL .....	34
3.5.1ANÁLISE DOS LINFONODOS AURICULARES .....	35
3.5.2 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS DAS ORELHAS.....	35
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>4. RESULTADOS</b> .....	37
4.1 PESO DOS ANIMAIS.....	37
4.2 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DO LINFONODO LOCAL MURINO .....	37
4.3 ANÁLISE DA CELULARIDADE DOS LINFONODOS DE DRENAGEM.....	39

<b>4.4 ANÁLISE DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5 EXPRESSÃO DE MARCADORES DE ATIVAÇÃO CELULAR E ADESÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>4.6 PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS LINFONODOS DE DRENAGEM .....</b>	<b>47</b>
4.6.1 PROLIFERAÇÃO NO TOTAL DE CELULAS.....	47
4.6.2 PROLIFERAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES .....	48
4.6.3 PROLIFERAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES ATIVADAS NOS LINFONODOS DE DRENAGEM	51
<b>4.7 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS LINFONODOS DE DRENAGEM POR MICROSCOPIA CONFOCAL .....</b>	<b>53</b>
<b>4.8 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS DAS ORELHAS DE CAMUNDONGOS</b>	<b>56</b>
<b>4.9 ANÁLISE DE CITOCINAS NO SORO DE ANIMAIS TRATADOS COM SENSIBILIZANTES E IRRITANTES .....</b>	<b>59</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O avanço da indústria química, que introduz milhares de novas substâncias a cada ano no mercado, principalmente aquelas utilizadas na produção de cosméticos e de produtos de higiene pessoal, cresce a quantidade de produtos que se tornam parte do meio ambiente, aumentando assim, os agentes causadores de algumas doenças (DUARTE *et al.*, 2000). Segundo a Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), a indústria brasileira de cosméticos foi que apresentou o maior crescimento nos últimos 13 anos, crescimento esse de 10,6% (ABIHPEC, 2010), sendo o Brasil o terceiro maior consumidor do mundo (CASEMIRO, 2008). O aumento do uso desses produtos pode levar a uma série de doenças, pelo fato de haver substâncias tóxicas em sua composição.

Doenças relacionadas ao sistema imune, tais como: quadros de hipersensibilidade, reações do tipo auto-imune, maior vulnerabilidade a tumores e infecções, entre outras; tornaram-se mais freqüentes com o aumento da exposição humana a produtos industrializados (BIGAZZI, 1997; DESCOTES, 1999) aumentando a necessidade do desenvolvimento de ensaios preditivos nesta área do conhecimento e colocando a imunotoxicologia como uma ciência fortemente relacionada à saúde pública. O desenvolvimento de metodologias visando à predição e o controle de possíveis efeitos adversos de xenobióticos sobre o sistema imunológico é questão pertinente e um desafio importante para a Vigilância Sanitária.

Dentre os efeitos adversos provocados por xenobióticos, as reações de hipersensibilidade são as mais prevalentes, não só relacionado ao local de trabalho, mas também configurando um problema de saúde geral da população, sobretudo as reações de dermatite de contato e as alergias respiratórias (KIMBER *et al.*, 2002; ANDERSEN, 2003; DIEPGEN, 2003; BARDANA, 2003; GOUTET *et al.*, 2005).

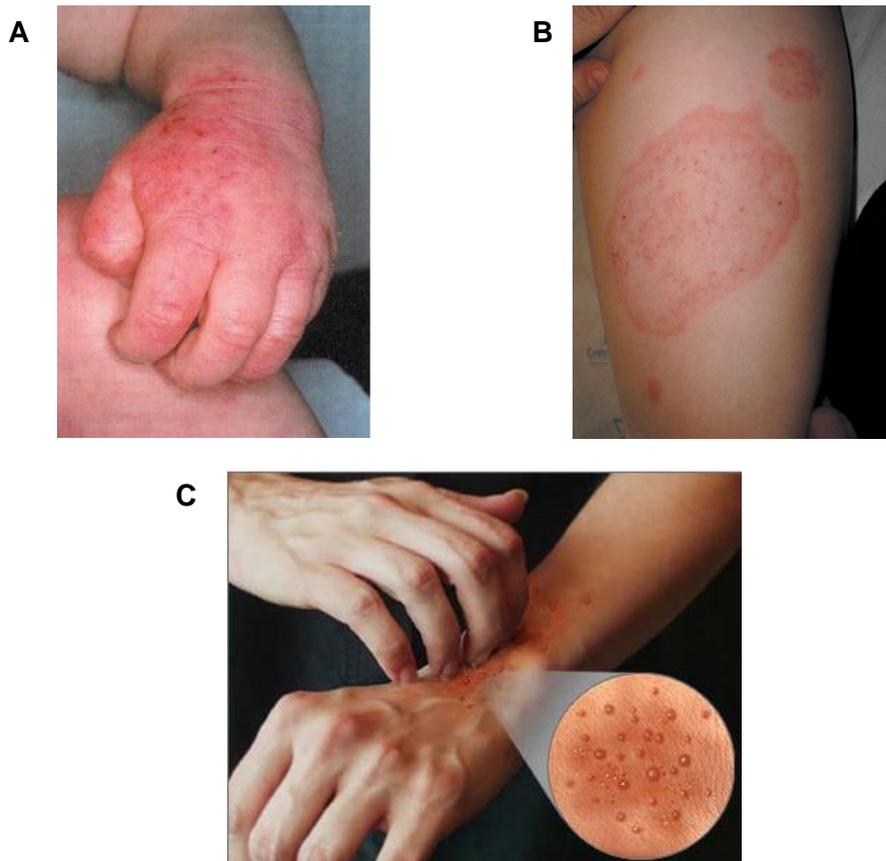
Segundo De Groot e colaboradores (1996), existem cerca de 3500 substâncias catalogadas como prováveis agentes causadores da dermatite de contato. Em razão de sua grande incidência, como doença tanto ocupacional quanto não ocupacional, a dermatite de contato tem destaque como uma das dermatoses mais freqüentes na prática diária dos dermatologistas.

Podemos citar substâncias que quando em contato com a pele podem causar dermatite de contato e são amplamente utilizadas, como por exemplo, o Lauril sulfato de sódio (LSS) que é um produto químico utilizado em diversos cosméticos e produtos de higiene pessoal como xampus, removedores de maquiagem, géis, sais de banho, banhos de espuma, pasta de dentes. Esta substância possui propriedades emulsificantes, por isso, é eficiente na remoção de gorduras de superfície, incluindo cabelos e pele (INCA, 2010). Outro produto também muito usado como detergente é o Trition X-100 (TX-100) que é muito usado em laboratórios de bioquímica e biomédicos para permeabilizar membranas plasmáticas e nucleares de células, é usado também em produtos de limpeza como detergentes e produtos de higiene pessoal como o xampu (DELAUNAY, 2008). Outro exemplo muito importante de substância que pode levar a uma dermatite é o Dinitroclorobenzeno (DNCB), um sensibilizante severo que pode ser usado como medicamento para verruga, alopecia areata (doença no qual a pessoa tem queda de cabelo em regiões específicas) e como tratamento para pessoas portadoras do vírus HIV, pois estimula a imunidade celular quando aplicado à pele (REY & BONAMIGO, 2006). A substância Parafenilenodiamina (PPD) também é muito usada, principalmente em produtos cosméticos como o rímel, por exemplo, e em tintas capilares. Além disso, esta substância pode também fazer parte de alguns outros produtos, tais como, tintas de vestuário e calçado, sendo também uma substância relacionada ao desenvolvimento de dermatites (VILAPLANA & ROMAGUERRA, 2006).

### **1.1 Dermatite de contato**

A dermatite de contato (DC) também conhecida como hipersensibilidade de contato (HC) é uma dermatose inflamatória induzida por químicos de baixo peso

molecular (haptenos), com grande impacto sócioeconômico, sendo uma das doenças ocupacionais (doenças provocadas por fatores relacionados com o ambiente de trabalho) mais comuns. Isto porque, a pele é a primeira a entrar em contato com fatores químicos e físicos provenientes do meio ambiente (BONNEVILLE *et al.*, 2007; BASKETTER *et al.*, 2008). Esta reação inflamatória é muito freqüente nos países industrializados e pode ser causada por vários metais, como por exemplo, o níquel e o cromo, além de plantas, detergentes e outros. A dermatite de contato é dividida em três tipos: dermatite de contato alérgica (DCA), dermatite de contato irritante (DCI) e dermatite de contato fotoalérgica (DCF). Os sintomas da dermatite de contato incluem (Figura 1): pápulas eritematosas, vesículas, queimação (DCI), eritema, edema e prurido (HOGAN *et al.*, 2009).



**Figura 1:** Fotografias com os sintomas da dermatite de contato. (A) Edema, eritema e prurido. (B) Pápulas eritematosas. (C) Vesículas (pequenas bolhas) e prurido.

Fonte: <http://www.ami20.com/tag/hand-dermatitis> (acesso em 04/Maio/2010), <http://blogdalergia.blogspot.com/2007/02/dermatite-atpica-acoceira-que-d-eczema.html> (acesso em 04/Maio/2010).

### 1.1.1 Dermatite de contato alérgica

A dermatite de contato alérgica (DCA) é um tipo de DC causada por contatos repetidos na pele com químicos de baixo peso molecular (haptenos) (NEVES *et al.*, 2007; BASKETTER *et al.*, 2008). Diferente da dermatite de contato irritante, capaz de ativar a imunidade inata da pele, a DCA requer a ativação da imunidade adaptativa e, segundo diversos autores é provavelmente mediada principalmente por células T (HENINO *et al.*, 2005; LARSEN *et al.*, 2007). A iniciação da dermatite de contato é gerada pela aplicação tópica de haptenos sensibilizantes na epiderme como níquel, cromo, dinitrofluorbenzeno (DNFB) e oxazolina (OXA) (HENINO *et al.*, 2005). Os haptenos são moléculas pequenas e alguns, como por exemplo, o DNCB possuem resíduos lipofílicos e com isso conseguem atravessar a pele. Essas moléculas não são consideradas imunogênicas e por isso precisam se ligar a macromoléculas (proteínas carreadoras). Quando os haptenos se ligam a essas proteínas formam um complexo imunogênico que é chamado de hapteno-proteína e, é esse complexo que é reconhecido pelas células T (PEASE *et al.*, 2003; SAINT - MEZARD *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009; TOEBAK *et al.*, 2009). Dependendo da habilidade com que esses haptenos induzem a sensibilização, eles são caracterizados como sensibilizantes fortes, moderados ou fracos (VOCANSON *et al.*, 2009). A grande maioria dos dados disponíveis na literatura sobre a dermatite de contato foi obtida com sensibilizantes fortes, tais como dinitrofluorbenzeno (DNFB), dinitroclorobenzeno (DNCB), parafenilenodiamina (PPD) e oxazolina (BONNEVILLE *et al.*, 2007; CORSINI *et al.*, 2009; YAMANO & SHIMIZU, 2009; DE JONG *et al.*, 2009). Esses sensibilizantes são dotados de propriedades pró-inflamatórias, devido a toxicidade da substância química. Em contraste, os haptenos fracos não possuem propriedades pró-inflamatórias e com isso, não emitem sinais para a ativação, diferenciação e migração das Células de Langerhans (CL) para linfonodos de drenagem. Os haptenos fracos quando utilizados em altas concentrações podem gerar uma leve irritação na pele. Na literatura encontramos poucos trabalhos com haptenos fracos e moderados, Henino e colaboradores associaram este fato às dificuldades encontradas para

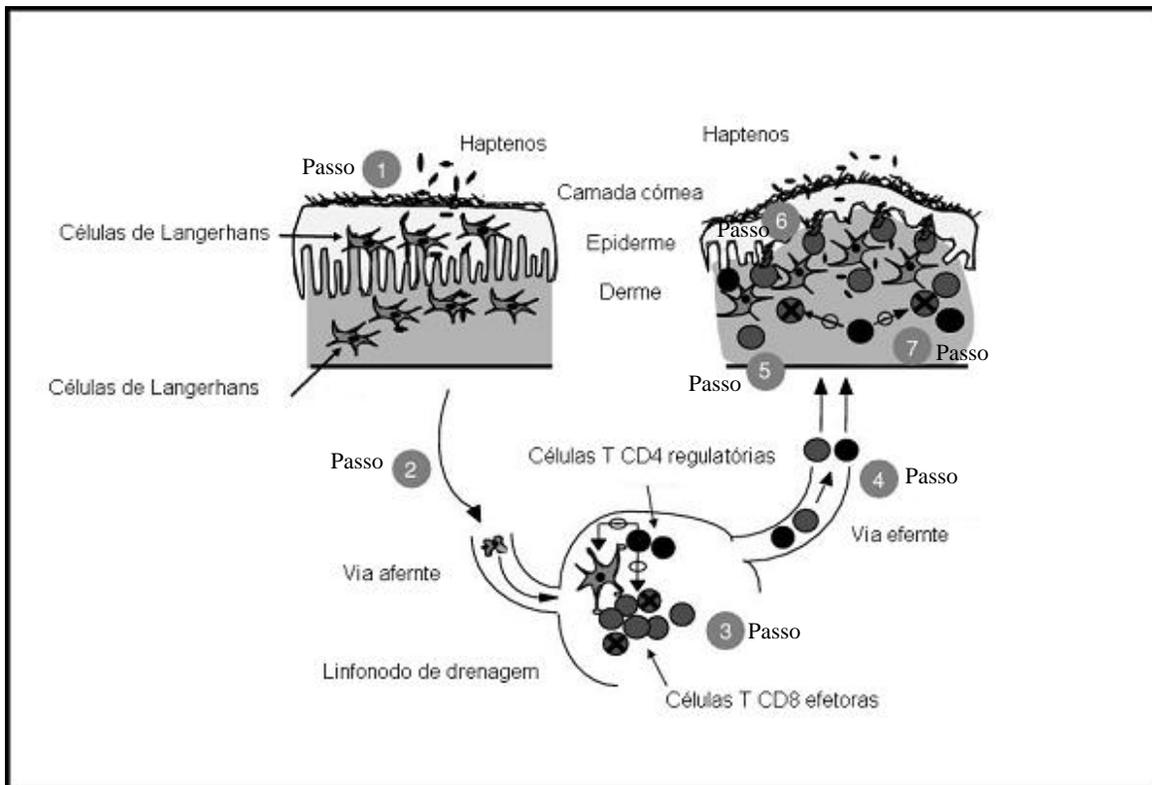
obter uma reação de DCA quando camundongos foram expostos a haptenos fracos ou moderados (HENNINO *et al.*, 2005).

A fisiopatologia da DCA envolve três fases, a fase da sensibilização também chamada de fase aferente, a fase da indução também chamada de fase eferente ou fase do desafio (Figura 2) (SAINT-MEZARD *et al.*, 2003; VOCANSON *et al.*, 2009) e a fase de resolução (DUARTE *et al.*, 2000).

A fase aferente ou de sensibilização ocorre no primeiro contato da pele com o hapteno, o complexo hapteno proteína é reconhecido e capturado pelas células dendríticas cutâneas (células de Langherans) que migram da epiderme para região paracortical dos linfonodos de drenagem. De acordo com a literatura, a maturação e migração das células de Langherans é dependente de três citocinas: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), pelas interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-18 (KIMBER *et al.*, 2002, 2003; DOS SANTOS *et al.*, 2009) e pelas quimiocinas CXCL12, CCL19 e CCL21 (Santos *et al.*, 2009). A apresentação desses peptídeos conjugados a haptenos resulta na ativação de linfócitos T CD8 e T CD4 específicos (SAINT - MEZARD *et al.*, 2003; HENNINO *et al.*, 2005; BONNEVILLE *et al.*, 2007). A fase da sensibilização dura de 10 a 15 dias no homem, e de 5 a 7 dias em camundongos. Essa primeira fase não apresenta conseqüências clínicas, na maioria dos casos, mas se o sensibilizante for caracterizado forte pode induzir uma DCA primária, ou seja, uma reação imune hapteno-específica após um único contato cutâneo, que tem a mesma fisiopatologia da DCA clássica obtida com duas exposições cutâneas ao hapteno (VOCANSON *et al.*, 2009b).

A fase eferente conhecida também como fase do desafio (Figura 2) ocorre algumas horas após um contato subsequente da pele com o mesmo hapteno. Essa re-exposição do mesmo hapteno resulta na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células da epiderme, recrutamento de linfócitos T efetores, ativação de células endoteliais e mastócios, e a infiltração de neutrófilos, todos necessários para o processo inflamatório (SAINT-MEZARD *et al.*, 2003; HENNINO *et al.*, 2005; VOCANSON *et al.*, 2009; TOEBAK *et al.*, 2009). Essa fase dura 72 horas em humanos e 24 a 48 horas em camundongos. A

reação inflamatória persiste durante vários dias e diminui progressivamente (VOCANSON *et al.*, 2009b).



**Figura 2:** Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica. Fase de sensibilização: Os haptenos penetram na epiderme (passo 1) e são capturados pelas células epidérmicas incluindo as células de Langerhans (CL) que migram para os linfonodos de drenagem (passo 2), onde apresentam peptídeos conjugados a haptenos às células T CD8 e às T CD4 (passo 3). As células T específicas proliferam nos linfonodos de drenagem, recirculam pelo sangue e migram aos tecidos, inclusive a pele (passo 4). Fase de indução: Quando o mesmo hapteno é aplicado sobre a pele, ele é capturado pelas células epidérmicas, inclusive as CD e os queratinócitos (passo 5), que apresentam peptídeos conjugados a haptenos a células T específicas. A ativação de LTCs CD8+ induz a apoptose dos queratinócitos e a produção de citocinas e quimiocinas pelas células cutâneas (passo 6), o que leva ao recrutamento de leucócitos do sangue para a pele. As células T CD4+ podem bloquear a ativação/expansão dos efetores CD8 nos linfonodos durante a sensibilização, e na pele durante a fase de indução da DCA (SAINT-MEZARD *et al.*, 2003).

A etapa final do mecanismo imunológico da DCA corresponde ao término da reação inflamatória. Nessa fase, também são liberadas citocinas que, ao contrário das que são liberadas nas fases anteriores, inibem a reação imunológica. A IL-10 ou fator inibidor da síntese de citocinas inibe a secreção de tais

substâncias pelas células Th1 e regula os queratinócitos na fase tardia da DCA, deprimindo a resposta imune (DUARTE *et al.*, 2000).

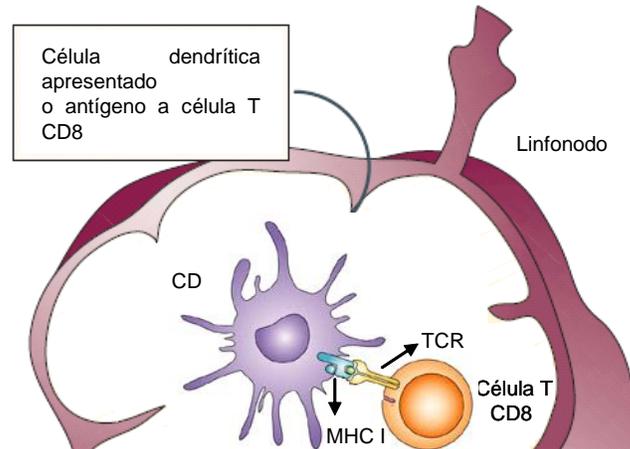
Além da ação da IL-10, mastócitos e basófilos podem influenciar na resolução da DCA. Cerca de 48 horas após o estímulo antigênico ocorre degranulação de mastócitos, que coincide com o início do declínio da resposta imune. Isso sugere que a histamina liberada, tendo sua ação sobre as células T CD8 (células supressoras), esteja envolvida na fase de resolução da DCA. Os basófilos podem exercer a mesma função dos mastócitos. Em humanos, de 5% a 15% das células do infiltrado de algumas DCA são basófilos, o que constitui uma grande proporção quando a reação inflamatória está na fase de resolução.

Outro mecanismo importante é que, sob estímulo do INF- $\gamma$ , os macrófagos produzem prostaglandinas do tipo E. Sabe-se que prostaglandina E1 e E2 inibem a produção de IL-2, que como já foi relatado, tem importante papel na fase de elicitação de DCA. Assim, várias células que liberam elementos responsáveis pelo início da reação imunológica podem, também a partir de uma etapa subsequente, iniciar a produção de outros fatores responsáveis pela resolução da resposta alérgica (MINTERN *et al.*, 2002).

#### 1.1.2 Papel das células T CD4 e T CD8 na DCA

O desenvolvimento de uma célula T virgem (célula que não entrou em contato com antígeno), em uma célula T efetora (célula que durante a resposta imune, realiza funções necessárias para eliminação do antígeno), envolve algumas etapas, tais como, reconhecimento do antígeno, expansão clonal e diferenciação. O que ocorre na DCA, segundo o consenso atual, é que as células dendríticas capturam os antígenos e transportam esses antígenos para os linfonodos de drenagem. Nos linfonodos as células dendríticas associadas a moléculas de histocompatibilidade de classe II (MHC II) apresentam peptídeos às células T CD4, e as células dendríticas associadas a moléculas de histocompatibilidade de classe I (MHCI) apresentam peptídeos às células T CD8 (Figura 3). Essa apresentação resulta na ativação dessas células, na expansão de

uma população antígeno-específica e diferenciação em células efetoras e de memória (OBAR & LEFRANÇOIS, 2009; LANDSVERK, 2009).



**Figura 3:** Representação de um linfonodo e a interação de uma célula TCD8 expressando o TCR (receptor de células T) com uma célula dendrítica expressando MHC de classe I. Os linfócitos T através do TCR reconhecem resíduos de antígeno peptídicos expostos pelas moléculas de MHC (Modificado de Bevan, 2004 e Kupper *et al.*, 2004).

A contribuição das células T CD4 e T CD8 na dermatite de contato tem sido analisada principalmente em função das moléculas de histocompatibilidade de classe I e II. Bour e colaboradores usaram camundongos nocautes para MHC de classe I e MHC de classe II, que são deficientes em células T CD8 e T CD4, respectivamente. Os camundongos nocautes para MHC I, ou seja, deficientes para células T CD8 não desenvolveram nenhuma resposta ao sensibilizante DNFB, indicando que essas células eram essenciais para o desenvolvimento da patologia. Em camundongos nocautes para MHC de classe II uma reação exacerbada foi observada com inflamação cutânea crônica. Esses achados indicaram que as células T CD4 se comportam como células reguladoras e as células T CD8 como efetoras na dermatite de contato (BOUR *et al.*, 1995; SAINT-MEZARD *et al.*, 2003; HENNINO *et al.*, 2005). Além das células T, existem outros

tipos celulares essenciais para a resposta a hipersensibilidade de contato, como por exemplo, as células B.

Podemos encontrar vários trabalhos na literatura com células B em relação a DCA. Vários autores descrevem que camundongos, quando tratados com substâncias sensibilizantes têm o percentual dessas células nos linfonodos de drenagem aumentado, diferente das substâncias irritantes (SIKORSKI *et al.*, 1996; GEBERICK *et al.*, 1999a; GEBERICK *et al.*, 1999b; GEBERICK *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003; BETTS *et al.*, 2007). Outro exemplo são as células B-1 (um subtipo de células B), essas células são ativadas nos órgãos linfóides e produzem anticorpos IgM logo após a sensibilização cutânea. Esses anticorpos se ligam ao haptenos imediatamente após o contato (CAMPOS *et al.*, 2003).

Os neutrófilos também parecem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da DCA, sendo estes, uma das primeiras células a serem recrutadas depois da sensibilização com haptenos em camundongos. Além disso, segundo Hennino e colaboradores (2005), os neutrófilos aparecem antes da infiltração de células T CD8 efectoras.

O' Leary e colaboradores investigaram o papel das células "*Natural Killer*" (NK) na hipersensibilidade de contato. Usando camundongos desprovidos de células T e B, eles mostraram que as células NK podem mediar, a longo prazo, uma resposta adaptativa antígeno-específica contra dinitrofluorbenzeno e oxazolina independente de células T e B (O' LEARY *et al.*, 2006).

## 1.2 Dermatite de contato irritante

Assim como a dermatite de contato alérgica, a dermatite de contato irritante é uma inflamação da pele, ocorre após contato freqüente ou a exposição prolongada com irritantes, porém sendo capaz de ativar a imunidade inata da pele. Essa inflamação resulta do aumento de citocinas pró-inflamatórias de células da pele, como por exemplo, queratinócitos que secretam diversas citocinas como, TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa), GM-CSF (fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos), IL-1 (WATANABE *et al.*, 2002; BONNEVILLE *et al.*,

2007; HOGAN *et al.*, 2009; NOSBAUM *et al.*, 2009). No entanto, há controvérsias quanto a participação ou não do sistema imunológico adaptativo na questão de substâncias irritantes. De fato, algumas substâncias classificadas como irritantes, podem induzir proliferação de células (GERBERICK *et al.*, 1992; MONTELIUS *et al.*, 1994; BASKETTER *et al.*, 1998).

O início do desenvolvimento da DCI, assim com da DCA, é dependente de fatores endógenos e fatores exógenos, sendo a identificação desses fatores importante para predição e a avaliação. Os fatores exógenos incluem: a natureza intrínseca e a exposição das substâncias irritantes, e os fatores endógenos incluem: idade, sexo e história de doenças pré-existente (LEVIN *et al.*, 2002; SLODOWNNIK *et al.*, 2008).

Os fatores exógenos incluem muitos químicos que apresentam um potencial para causar DCI. A DCI é muito comum em pessoas que trabalham com luvas por mais de 2 horas, que precisam lavar as mãos com muita frequência e que estão em contato direto com detergentes, solventes, óleos e outros, ou seja, profissionais da área de saúde (médicos, enfermeiros), cabeleireiros, cozinheiros e outros. O potencial irritante de uma substância é determinado por suas propriedades físicas e químicas. Fatores como, tamanho molecular e lipossolubilidade também podem interferir, pois são eles que irão determinar a penetração na pele, e assim contribuir para a irritação. A penetração de um irritante na pele depende da concentração, volume, tempo da aplicação e duração da exposição da substância irritante na pele. Outros fatores que contribuem para a DCI são os fatores ambientais, tais como, calor, frio, baixa umidade relativa e radiação UV. A temperatura quente é geralmente mais nociva do que as temperaturas frias. Com isso, a exposição ao calor leva muitas vezes à transpiração, o que pode precipitar a DCI. A retenção do suor pode também contribuir para irritação da pele, já que o suor pode facilitar a penetração dos alérgenos, como os de níquel em jóias (SLODOWNNIK *et al.*, 2008).

Como fatores endógenos, podemos citar estudos que mostram que crianças menores de oito anos e idosos teriam maior predisposição, sendo, no

idoso, o início do quadro mais lento do que no jovem (SLODOWNNIK *et al.*, 2008). Segundo Denning e colaboradores, a cor da pele também pode influenciar, parece que a pele negra é menos susceptível à irritação. Alguns trabalhos demonstram que as células da camada epidérmica, na pele negra, estariam mais compactadas, diminuindo assim os espaços intercelulares (DENNING *et al.*, 1998). A DCI é mais comum em mulheres, mas ainda não está claro se isto se deve a suscetibilidade das mulheres à DCI ou a uma maior exposição das mulheres a substâncias irritantes, relacionadas ao trabalho (SLODOWNNIK *et al.*, 2008). Outro fator importante são os locais propensos à irritação. A penetração através da epiderme varia com a região anatômica, por exemplo, o rosto é um local de fácil penetração de substâncias irritantes. No entanto, ainda existem poucos dados para os locais mais propensos a DCI (MARAKCHI *et al.*, 2006). Pacientes com doenças de pele pré-existentes, com alguma alteração na barreira epitelial estão mais suscetíveis a desenvolverem DCI.

### 1.2.1 Mecanismo fisiopatológico da DCI

Por muito tempo a dermatite de contato irritante foi definida como uma reação não específica e não imunológica da pele na presença de uma substância irritante. No entanto, hoje, é aceito que o sistema imune desempenha um papel fundamental na iniciação da DCI. Na presença de irritantes podem acontecer alterações fisiopatológicas, como por exemplo, destruição da barreira epitelial, danos celulares, e aumento de mediadores pró-inflamatórios (LEVIN *et al.*, 2002; SLODOWNNIK *et al.*, 2008).

Um tipo celular muito importante na resposta imunológica contra substâncias irritantes são os queratinócitos, eles liberam citocinas na destruição da barreira epitelial, expressam moléculas de histocompatibilidade de classe II, moléculas de adesão (CD54) e também moléculas coestimulatórias, como por exemplo, CD80 e CD40 (TÜZÜN *et al.*, 2007). A liberação de citocinas pelos queratinócitos estimula outros queratinócitos e outras células, como por exemplo,

as células de langerhans e promovem a atração de células inflamatórias, ampliando desse modo o processo inflamatório (WATANABE *et al.*, 2002).

As citocinas pro-inflamatórias, como por exemplo, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (EFFENDY *et al.*, 2000), IL-6, IL-2 (WATANABE *et al.*, 2002) e a quimiocina CCL21 produzidas por células endoteliais linfáticas foram encontradas aumentadas na DCI (Eberhard *et al.*, 2004). O aumento dessas quimiocinas é importante para a migração de linfócitos T, e assim, resultando na resposta inflamatória da pele. Muitos linfócitos T que chegam a área da reação inflamatória na DCI muitas vezes expressam o antígeno CLA. Este antígeno participa diretamente da migração transendotelial de linfócitos T para o local da inflamação, pois ele se liga a molécula de adesão E-selectina (CD62E) e P-selectina (CD62P). Os mesmos autores descreveram que outros receptores e seus ligantes parecem também estar envolvidos nesse processo, tais como, LFA-1(CD11a/CD18)/ICAM1(CD54) e VLA-4(CD49d/CD29)/VCAM1(CD106) (KUPPER & FUHLBRIGGE, 2004; SLODOWNNIK *et al.*, 2008).

Outro fator muito importante é que muitas substâncias irritantes podem induzir a produção TNF- $\alpha$  pelos queratinócitos. O TNF- $\alpha$  é encontrado aumentado na DCI, desse modo, acredita-se que esse seja o mediador inflamatório mais importante (SAINT – MEZARD *et al.*, 2004).

É de senso comum que a dermatite de contato alérgica e a dermatite de contato irritante resultem em vasodilatação, aumento de moléculas de adesão, produção de citocinas e quimiocinas pelos queratinócitos, influxo de leucócitos e migração de células de Langerhans para a derme. Porém, apresentam diferenças no mecanismo imunológico e na expressão de algumas citocinas e quimiocinas, como por exemplo, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CXCL10, e CXCL2/CXCL3 (MIP-2) que são reguladas positivamente depois da exposição a um alérgeno. Em humanos foi demonstrado uma maior expressão das quimiocinas CXCL19, CXCL10 e CXCL11 na DCA e não na DCI (TOEBACK *et al.*, 2009). Na tabela 1 podemos citar citocinas que são reguladas positivamente quando, comparadas à resposta de uma

substância que pode causar dermatite de contato alérgica e uma substância que pode causar dermatite de contato irritante.

**Tabela 1:** Aumento de citocinas na resposta cutânea a dermatite de contato alérgica e irritante (estudos *in vivo* em camundongos e *in vitro*)

Substâncias	Citocinas reguladas positivamente
LSS, Triton X-100 e Tween 20 ( <i>in vitro</i> )	IL-1 $\alpha$
LSS (20%) ( <i>in vivo</i> )	TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e GM-CSF
DNCB ( <i>in vivo</i> )	IL-2, IL-4, IL-12 e IFN- $\gamma$
Oxazalona ( <i>in vivo</i> )	TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ (fase do desafio) e IL-4 (exposição crônica)

Fonte: (EFFENDY et al., 2000).

### 1.3 Dermatite de contato Fotoalérgica

O mecanismo é o mesmo da dermatite de contato alérgica. A formação da reação imunológica do tipo IV necessita da presença da radiação e do fotoalérgeno. Após a absorção da energia da luz, a substância é convertida em molécula em estado ativado. Nesse processo, a molécula se une a uma proteína carreadora para formar um antígeno completo. Uma vez formado o antígeno, o mecanismo que se segue é o mesmo da DCA. Um exemplo comum no Brasil é a dermatite de contato desencadeada por anti-histamínicos de uso tópico. Outras substâncias fotoalérgicas de uso tópico são perfumes, antiinflamatórios não esteróides, antimicóticos tópicos (DUARTE, 2000).

#### 1.4 Ensaios para avaliação do potencial sensibilizante de xenobióticos

Embora Asherson e Barnes (1973) tenham utilizado o camundongo como modelo para a reação de hipersensibilidade, uma diversidade de outros estudos foram realizados em cobaias e conseqüentemente os primeiros testes preditivos para reações de hipersensibilidade induzidas por xenobióticos foram desenvolvidos utilizando este animal de laboratório. No entanto, no decorrer dos anos, novos ensaios foram propostos e suas aplicabilidades e limitações vêm sendo discutidas (MAURER, 1983; OLIVER *et al.*, 1986; MAURER, 2007).

Dentre os métodos aceitos para fins regulatórios destacam-se os testes de Buehler e de Maximização (MAURER, 2007; BASKETTER *et al.*, 2008). Esses dois testes foram os mais usados nos EUA e Europa respectivamente, e como conseqüência a OECD (Organização para Desenvolvimento e Cooperação Econômica) recomendou e adaptou aos *guidelines* de 1992 (KREILING *et al.*, 2008).

O teste de Bühler (Büehler, 1965) e o teste Maximização (Magnusson e Kligman, 1969) são testes para identificar o potencial químico de uma substância de causar DCA. Todos os dois testes são realizados em duas etapas, na primeira etapa, a fase da sensibilização, os animais (cobaias) são expostos à substância de interesse através de uma ou mais vias de administração (aplicação tópica ou injeção intradérmica), em geral a aplicação é nas costas ou na região da nuca. Após algumas semanas, os animais são desafiados e expostos às mesmas substâncias da fase de sensibilização. A reação de hipersensibilidade de contato é medida em função do edema e/ou eritema observado (VAN OCH *et al.*, 2001; MAURER *et al.*, 2007).

O teste de Bühler e o teste Maximização apresentam em comum sérias limitações, como por exemplo, a interpretação dos resultados, na grande maioria das vezes, se dá de forma subjetiva (e.g. avaliação da amplitude do edema local); outra importante limitação comum destes ensaios é a longa duração dos testes (todos realizados em duas fases, com duração total de 25 a 30 dias), o que reflete

em um custo e uma demanda de mão de obra considerável; substâncias com cor (e.g. corantes) não podem ser avaliadas nestes ensaios por mascararem alterações nos parâmetros finais analisados, tais como: eritema e edema; ulcerações e mortes durante o teste ocorrem com certa frequência. Desta forma, o número de animais utilizados por substância-teste deve ser elevado, para que se assegure a análise; os animais nestes ensaios são submetidos a um grau de estresse considerável, capaz de alterar o estado normal de saúde e o bem-estar dos mesmos.

O aumento do número do uso desses animais em pesquisa e em análises de controle de qualidade tem motivado a busca de métodos alternativos. Os principais objetivos dos métodos alternativos são diminuir o número de animais em experimentos, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para substituição dos testes *in vivo* (LILIENTHUM *et al.*, 2008).

Entre o conjunto de ações de Vigilância Sanitária está a realização de análises laboratoriais. O INCQS realiza essas análises somente para o poder público, seja por denúncia ou por programas em parceria com instituições da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS). Entre os produtos submetidos ao controle e fiscalização sanitária podemos destacar: medicamentos de uso humano, suas substâncias ativas e demais insumos, processos e tecnologias; imunobiológicos e suas substâncias ativas, sangue, hemoderivados; saneantes destinados à higienização, desinfecção ou desinfestação em ambientes domiciliares, hospitalares e coletivos; cosméticos e produtos de higiene e perfumes (INCQS, 2004).

O INCQS realiza também ensaios que visam a avaliação do potencial irritante de várias substâncias, utilizando métodos aceitos para fins regulatórios (como por exemplo, os ensaios de irritação ocular, irritação cutânea primária, irritação de mucosa oral, peniana etc). Porém, devido às dificuldades de implantação de alguns métodos oficiais (Testes de Buehler, Maximização e LLNA), o potencial sensibilizante de produtos não é atualmente analisado pelo INCQS, mesmo quando a amostra ingressa a partir de uma denúncia específica.

## 1.5 Métodos Alternativos

A Experimentação animal data de muitos anos atrás, os anatomistas Alcmaeon (500 a.C), Herophilus (330-250 a.C) e Erasistratus (305-240 a.C) realizavam vivisseções animais com o objetivo de observar estruturas e formular hipóteses sobre o funcionamento associado às mesmas. Posteriormente, Galeno (129-210 d.C), em Roma, foi talvez o primeiro a realizar vivisseção com objetivos experimentais, ou seja, de testar variáveis através de alterações provocadas nos animais (SÉRGIO GREIF & THALES TRÉZ, 2000; GOLDIM & RAYMUNDO, 2002). Desde então, muitos animais são usados em procedimentos científicos.

Uma investigação realizada pela *Research Defence Society* (RDS) demonstrou que no ano de 2008 mais de 3 ½ milhões de animais foram utilizados em procedimentos científicos na Grã-Bretanha, sendo os roedores as espécies de maior relevância (Tabela 2) (*Research Defence Society*, 2010).

**Tabela 2:** Porcentagem de animais utilizados na Grã-Bretanha, em procedimentos científicos, no ano de 2008.

Espécies	(%)
Ratos e camundongos	77
Peixes, anfíbios, répteis e pássaros	21
Ovelhas, vacas, porcos e outros animais de grande porte	1,5
Pequenos mamíferos e outros roedores (coelho e furão)	0,5
Cães e gatos (espécies de laboratório)	0,2
Macacos	0,1

Fonte: *Research Defence Society* (RDS)

A preocupação com o uso de animais na pesquisa científica não é recente, embora, somente nos últimos anos este tema tenha sido discutido mais

intensamente (PRESGRAVE, 2008). Em 1824 surge na Inglaterra, a Society for the Preservation of Cruelty to Animals, essa sociedade pode ser considerada a primeira sociedade protetora dos animais estabelecida no mundo (GOLDIM & RAYMUNDO, 2002).

Hoje, existem dois grupos distintos em relação a defesa dos animais: os defensores dos direitos dos animais, que são totalmente contra o uso de animais na pesquisa, alguns se opõem à utilização de animais na alimentação e em outras atividades, como por exemplo, circo e zoológicos; e os defensores do bem estar animal, eles não se opõem a pesquisa, porém desejam que os animais sejam bem tratados (PRESGRAVE, 2008).

O termo "bem-estar animal" é amplamente utilizado para se referir à qualidade de vida de um animal. Abrange as seguintes características: animais devem ser saudáveis, bem alimentados, alojados em local apropriado, devem ser relativamente livres de estados negativos (tais como dor, medo e angústia) e capazes de realizar atividades características de sua natureza (FENWICK et al., 2009).

O uso de animais de laboratório tem sido motivo para muitas discussões, principalmente de caráter ético, em função do grande número de animais utilizados e do sofrimento causado durante alguns tipos de experimento. Por esta razão, a reavaliação da utilização de animais nos experimentos é tendência mundial, concretizada a partir da criação de diversas agências internacionais (e.g. European Centre for the Validation of Alternative Methods - ECVAM), que tem como objetivo desenvolver e validar novos métodos, e da implementação regulatória de testes alternativos em diversos países. Todas essas ações tiveram início a partir do surgimento do conceito denominado 3Rs (CAZARIN, 2004).

### **1.5.1 Princípio dos 3RS**

O conceito dos 3Rs surgiu em 1954, num projeto da Federação das Universidades para o bem estar animal (*The Universities Federation for Animal Welfare*), que resultou na publicação dos Princípios das Técnicas Experimentais

Humanizadas (*The Principles of Humane Experimental Technique*) em 1959, por Willian Russel e Rex Burch (SCHIFFELERS, 2007). O programa dos 3Rs é assim denominado em função das iniciais em inglês, *Reduction* (redução), *Refinement* (refinamento) e *Replacement* (substituição), onde:

A redução é a diminuição do número de animais utilizados em um único teste para avaliação de um determinado desfecho, por exemplo, quando se deixou de usar o teste clássico DL50% (dose letal média capaz de matar 50% de uma determinada população), que utilizava mais de 50 animais por teste, e se passou a utilizar métodos alternativos, envolvendo um número máximo de 10 animais por teste (e.g. método de classes, método de doses fixas, ou ainda o método up-and-down). Há também outras formas de redução, quando, por exemplo, deixamos de usar os animais em determinadas fases de uma investigação, seguindo um procedimento de *screening* de metodologias através de modelos computacionais (PRESGRAVE, 2008).

No refinamento o principal objetivo é minimizar a dor e sofrimento dos animais. Isto pode ser alcançado, por exemplo, através do uso de anestésicos ou analgésicos, sempre que estes não interfiram nos experimentos (estudos que envolvem dor), na manutenção dos animais em grupos, quando o desenho experimental não exige isolamento (estudos de toxicidade reprodutiva), entre outras possibilidades (PRESGRAVE, 2008).

A substituição significa deixar de usar os animais. As principais alternativas de substituição são a utilização de sistemas *in vitro*, como, por exemplo, cultivo celular ou *in silico*, os modelos computacionais (PRESGRAVE, 2008).

O conceito dos 3RS foi muito importante para o início das pesquisas alternativas, porém poucos avanços foram conseguidos, embora muito tenha se iniciado. Em 1975 é lançado o livro *Animal Liberation* por Peter Singer, esse livro causou polêmica mundial, principalmente devido aos relatos das condições que os animais eram submetidos pela indústria de cosméticos. Dentre as denúncias realizadas por Peter Singer estavam os testes de toxicidade de substâncias

realizadas em coelhos, o chamado Teste de Draize (GOLDIM & RAYMUNDO, 2002)

Neste teste os coelhos são colocados em uma estrutura que mantém suas cabeças imobilizadas e as substâncias em teste são colocadas em seus olhos. Depois de algumas horas até alguns dias é avaliada a irritabilidade das substâncias testadas e analisada a aparência dos olhos dos coelhos.

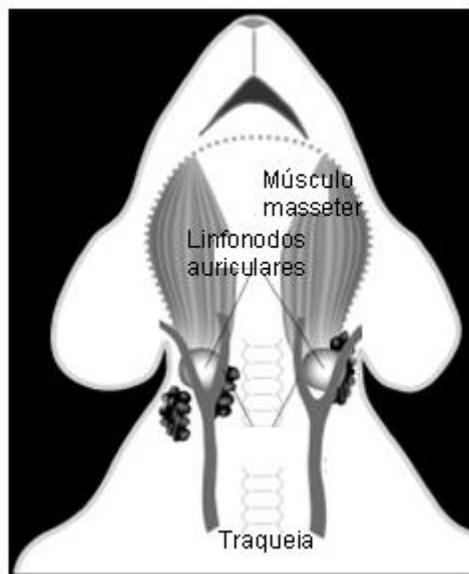
Naturalmente esse teste gerou muitos protestos, e após uma forte campanha direcionada contra a indústria de cosméticos REVLON, lia-se em jornais de forte circulação, como por exemplo, o jornal americano The New York Times: *Quantos coelhos a REVLON cega por causa da beleza?* Após estes protestos a REVLON investiu no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais de laboratórios (GOLDIM & RAYMUNDO, 2002). Desde então, observa-se uma enorme evolução da aplicação deste conceito em diversas áreas da biomedicina, sobretudo, nas áreas relacionadas ao controle da qualidade de produtos. No final da década de 80 surge o ensaio do Linfonodo Local Murino (LLNA da sigla em inglês *local lymph node assay*), como uma alternativa promissora aos testes convencionais (Buehler e Maximização).

## **1.6 Ensaio do Linfonodo local Murino (LLNA)**

O LLNA foi primeiramente descrito por Kimber e Weisenberger (1989), como uma alternativa aos testes de Buehler e de Maximização (testes em cobaias), sendo este utilizado para detecção do potencial químico de sensibilizantes (Kreiling, 2008; Idehara, 2008; Omari, 2008). O LLNA foi recentemente aceito pela OECD e validado pelo ECVAM e pela ICCVAM (*Interagency Coordinating Committee for Validation of Alternative Methods*).

O LLNA é realizado em camundongos e se baseia na resposta imune celular (*i.e.* na ativação e proliferação específica de linfócitos) que é característica da fase de sensibilização (1ª fase) do processo de hipersensibilidade de contato.

Alguns sensibilizantes, como por exemplo, dinitroclobenzeno e parafenilenodiamina podem induzir proliferação de linfócitos no linfonodo mais próximo do local de aplicação. No LLNA o sítio de aplicação dos sensibilizantes são as orelhas, e o linfonodo mais próximo é o linfonodo auricular (Figura 4). A proliferação celular é medida em função da incorporação de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ -timidina) ao DNA de células extraídas dos linfonodos auriculares.



(Modificado de ICCVAM, 2001)

**Figura 4:** Representação dos linfonodos auriculares (ICCVAM, 2001).

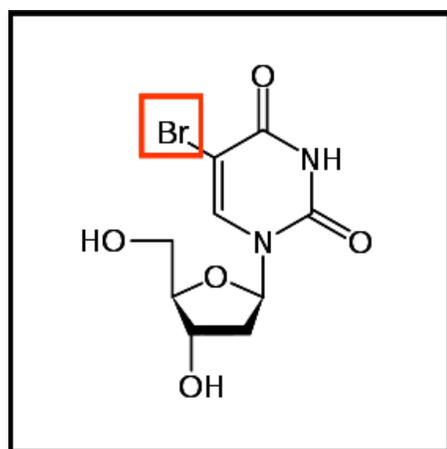
Das vantagens deste teste em relação aos seus precursores, Buehler e Maximização listam-se: o parâmetro final analisado é quantitativo (incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina), o teste se passa na fase de sensibilização, e por isso tem uma curta duração (5 dias), características referentes a natureza da substância, tais como cor, não interferem com desfecho do teste, o número de animais utilizados por substância-teste é cerca de 50% menor e, por fim, os animais são poupados da dor e do sofrimento decorrentes das reações de fase 2 (inflamatória).

No entanto, o atual protocolo deste ensaio também apresenta limitações importantes. A utilização de material radioativo para avaliação da proliferação de linfócitos requer instalações específicas e condições especiais de manuseio e

descarte. Outra limitação importante é o fato de que embora a grande maioria das substâncias irritantes não serem sensibilizantes e por isso negativas no testes de LLNA, há também relatos de substâncias irritantes que induzem a proliferação celular gerando com isso resultados falso positivos (GERBERICK *et al.*, 1992; MONTELIUES *et al.*, 1994; BASKETTER *et al.*, 1998; WERNER, 2005).

Frente a essas limitações, há atualmente por parte da comunidade científica um forte empenho em desenvolver dentro deste ensaio, alternativas que o tornem mais seguro, de mais fácil aplicação e com maior poder preditivo.

Na literatura é possível encontrar adaptações no teste de proliferação de linfócitos que envolvem, por um lado, marcadores não radioativos, como e.g. bromodeoxiuridina (Figura 5) ou ester carboxifluoreseina succimidil (LEE *et al.*, 2002; HUMPHREYS *et al.*, 2003) e por outro lado, estudos das subpopulações de linfócitos ativadas ou não por diversas classes de químicos (DE SILVA *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 2004; GOUTET *et al.*, 2005; BETTS *et al.*, 2007).



**Figura 5:** Estrutura da Bromodeoxiuridina. A BrdU é um análogo da timidina sendo incorporado no DNA de células que estão se dividindo durante a fase S do ciclo celular. A BrdU pode ser detectada por citometria de fluxo e imunohistoquímica através de anticorpos específicos.

Dentre os estudos de subpopulações de linfócitos, há, no entanto, várias diretrizes propostas e poucas similaridades, o que dificulta a construção de um protocolo comum. Alguns autores demonstraram um aumento de células B,

constatado via receptor B220, em camundongos expostos a alergênicos (SIKORSKI *et al.* 1996; MANETZ & MEADE, 1999; GERBERICK *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrada uma modulação seletiva de determinados marcadores de ativação de células B (CD40 e CD86) com o tratamento com alergênico, mas não com substâncias irritantes (GERBERICK *et al.*, 1999ab). Lee e colaboradores (2004) confirmaram apenas parcialmente os resultados dos estudos anteriores, tendo estes autores observado um aumento seletivo no percentual de células B que apresentavam CD86 apenas na exposição a alergênicos, mas não obtendo resultados conclusivos sobre CD40. Neves e colaboradores (2007) demonstraram um aumento do receptor de quimiocina CXCR4 e da molécula CD40 *in vitro* em células dendríticas quando tratadas com substâncias sensibilizantes, porém quando as mesmas eram tratadas com substâncias irritantes a expressão dessas moléculas era regulada negativamente.

Há também inúmeras controvérsias no que concerne o estudo da subpopulação de linfócitos T. Embora a hipersensibilidade de contato envolva a resposta imune mediada por célula e as células T tenham papel fundamental neste tipo de resposta, os dados obtidos com esta população de linfócitos são imprecisos. Apesar dos estudos apontarem para uma diminuição na percentagem de células T em favor de células B (DE SILVA *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 2004; GOUTET *et al.*, 2005) quando estudadas as subpopulações de células T CD4 (célula T auxiliar) e ou T CD8 (célula T citotóxica), não há consenso. Enquanto Goutet e colaboradores (2005) analisaram e observaram diferenças na expressão da citocina IL-4 e seu receptor em células T CD4, Lee e colaboradores (2004) analisaram apenas a percentagem de células T CD4 e CD8. Já de Silva e colaboradores (1993) analisaram a população de células T totais, utilizando para este fim CD3 e o receptor da citocina IL-2, o CD25 (que junto com CD4 também é o marcador de células T reguladoras). Desta forma, é evidente que estudos deste tipo ainda são necessários para que os dados já publicados possam ser, não somente reproduzidos, mas também para adicionar conhecimentos fundamentais para que um consenso seja alcançado.

Além disso, os centros internacionais de estudos e validação de métodos alternativos recomendam à comunidade científica a busca contínua por novas metodologias, aprofundamento de conhecimentos sobre metodologias existentes e estabelecimento de protocolos sensíveis e reprodutíveis, sempre que possível. O presente estudo se enquadra, em primeira linha, na questão do aprofundamento de conhecimentos sobre metodologias existentes visando à melhoria do LLNA. Outra questão relevante que sublinha de forma categórica a importância da realização deste estudo é o fato de que o INCQS recebe amostras com potencial sensibilizante, mas avalia tais amostras unicamente através do teste de Draize para irritação dérmica. Esta avaliação não é plena, uma vez que o teste de Draize se presta à avaliação do potencial irritante, mas não é adequado à identificação de substâncias sensibilizantes.

Resta claro, que o aprofundamento no estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na execução do teste de LLNA alternativo e a implantação do mesmo são imprescindíveis para a realização mais eficiente do controle da qualidade de produtos disponíveis comercialmente.

## II. OBJETIVOS

### Objetivo Geral:

O presente estudo teve como objetivo a padronização do método LLNA alternativo, através da quantificação de proliferação celular utilizando um reagente não radioativo (BrdU). Além disso, possíveis diferenças nos padrões de subpopulações linfocitárias entre animais tratados com substâncias irritantes e sensibilizantes foram também investigadas, com o objetivo de buscar um aprimoramento do teste. Sendo assim, os objetivos específicos desta dissertação foram:

- Padronização do teste LLNA utilizando o marcador de proliferação não-radioativo bromodeoxiuridina – BrdU, através de Kit comercial ou reagentes preparados no laboratório.
- Padronização do teste LLNA utilizando *pool* de linfonodos de animais ou utilizando cada animal individualmente.
- Avaliação da resposta das subpopulações de linfócitos T e B, de alguns marcadores de ativação e de receptores de citocinas ao tratamento com as substâncias-teste, através da utilização de anticorpos monoclonais e citometria de fluxo.
- Avaliação comparativa das respostas obtidas nos desfechos não-radioativos (BrdU e subpopulações de linfócitos) com substâncias sabidamente irritantes (Lauril Sulfato de Sódio e Triton X-100) com aquelas sabidamente dermo-sensibilizantes (Dinitroclorobenzeno e Parafenilenodiamina).
- Avaliação da expressão *in situ* das moléculas CD4, CD8 e B220 e do marcador de proliferação BrdU.
- Avaliação por HE dos cortes das orelhas dos camundongos tratados com substâncias sensibilizantes e irritantes.
- Determinação dos padrões de algumas citocinas nos soros de camundongos tratados com substâncias sensibilizantes e irritantes.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da cepa CBA com idade entre 8 e 10 semanas, obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz e também do CEMIB - Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório, localizado na UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas). Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais-CEUA-Fiocruz (Licença P-0415/07).

#### 3.2 Tratamento dos animais para o ensaio do LLNA utilizando o BrdU

Os grupos de tratamento foram constituídos por 4 animais para cada substância testada e mais 4 animais controle tratados somente com o veículo. Diariamente o peso das fêmeas foi registrado e a substância de interesse (ou o veículo) foi aplicada, conforme o protocolo preconizado do LLNA (ICCVAM, 2009). Isto é, cada substância foi aplicada no dorso de ambas as orelhas do animal no volume de 25µl durante três dias consecutivos. Cinco dias após o início do tratamento todos os animais foram eutanasiados por inalação de CO<sub>2</sub>.

Duas horas antes da eutanásia foi injetado 100mg/Kg de BrdU em 200 µl por via intraperitoneal em cada animal (LEE *et al.*, 2003). Após a eutanásia os linfonodos auriculares dos animais foram isolados e macerados com auxílio de um homogenizador de tecidos (*potter*) para a obtenção de uma suspensão celular. As células foram então analisadas por citometria de fluxo. No que diz respeito às análises de imunofluorescência, os linfonodos de todos os grupos foram colocados em Tissue-Tek (LEICA Instruments, Alemanha) e subseqüentemente congelados a -70°C. Para a análise histológica, as orelhas dos camundongos tratados foram retiradas e colocadas em tubos falcon (15ml BD) contendo o fixador Millonig por no mínimo 24h.

### **3.2.1 Substâncias utilizadas para o tratamento**

As substâncias utilizadas como sensibilizantes foram: Parafenilenodiamina - sensibilizante severo (Concentração 1%), Dinitroclorobenzeno - sensibilizante severo (1%); irritantes: Lauril sulfato de Sódio (Sigma, USA) - irritante moderado (25%) e Triton<sup>®</sup> X-100 (Sigma, USA) - irritante moderado (25%). Todas as substâncias foram classificadas como sensibilizantes e irritantes de acordo com Santos e colaboradores (2009). As substâncias foram diluídas em etanol 30% ou acetona/óleo de oliva (4:1) de acordo com a literatura (Tabela 3).

**Tabela 3:** Substâncias que foram utilizadas no presente estudo, suas doses e referências bibliográficas. + = substância e dose investigada no artigo.

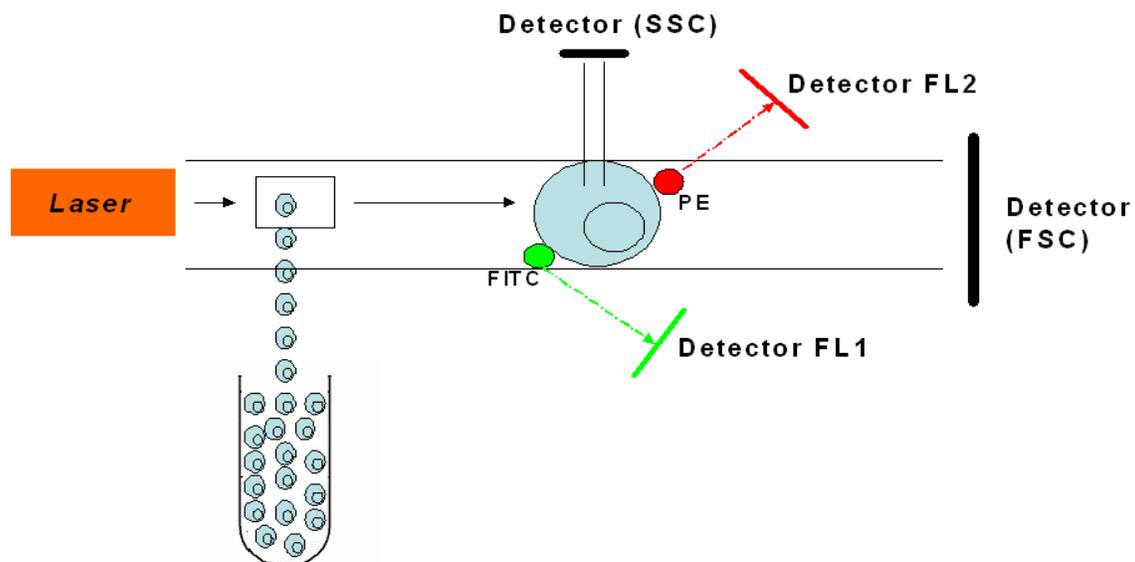
Substância	Dinitroclorobenzeno	Lauril sulfato de sódio	Parafenilenodiamina	Triton X-100
Dose/Referência	1%	25%	1%	25%
Goutet et al. 2004	+			
Lee et al. 2002	+	+		
Lee et al. 2003	+			
Lee et al. 2004	+	+		
Montelius J. et al. 1998				+
Ku et al. 2008	+			
Idehara et al. 2008	+		+	

Dinitroclobenzeno, Pafenilenodiamina: Diluídos 4:1 em acetona/ óleo de oliva e Lauril sulfato de sódio e Triton - X em etanol 30%.

### 3.3 Citometria de fluxo

#### 3.3.1 Citômetro de fluxo

O citômetro de fluxo (Esquema 1) é um aparelho capaz de detectar a emissão de fluorescência de células em suspensão. As células são incubadas com anticorpos ligados a fluorocromos (ex: Isotiacianato de fluoresceína FITC e Ficoeritrina, PE), passam pelo aparelho onde são expostas individualmente a um feixe de luz focalizada, em geral um laser. Cada célula é avaliada com relação ao tamanho e granulosidade, a avaliação do tamanho relativo da célula ('Forward Scatter – FSC') e da granulosidade ('Sider Scatter – SSC') permite distinguir vários tipos celulares, como por exemplo, linfócitos, neutrófilos e monócitos.



**Esquema 1:** Princípio da citometria de fluxo. A suspensão celular é aspirada pelo aparelho e apenas uma célula de cada vez é analisada. O raio laser incidente gera um comprimento de onda específico, a luz que emerge da amostra é analisada quanto à difusão frontal (detector FSC) e lateral (detector SSC), da mesma forma que a luz fluorescente dos marcadores FITC (detector FL1) e PE (detector FL2) acoplados aos anticorpos. As informações são passadas para o computador e as análises dos dados são feitas em softwares específicos.

### **3.3.2 Anticorpos**

Para a análise quantitativa de subpopulações linfocitárias utilizamos anticorpos monoclonais (obtidos da eBioscience) disponíveis comercialmente e conjugados com fluorocromos diferentes, conforme descrito na tabela 4. A fim de anular a contagem de marcação inespecífica do anticorpo foi realizado em todos os experimentos o controle do isotipo IgG2b de rato APC, FITC, PE-Cy5 e PerCP-Cy-5.5 todos obtidos da eBioscience. O marcador de proliferação Bromodeoxiuridina BrdU (Sigma, USA) foi identificado através da marcação com anti-BrdU FITC (BD Pharmingen, USA).

**Tabela 4:** Anticorpos monoclonais, distribuição do receptor e o fluorocromo que foram utilizados para identificação das subpopulações celulares.

Anticorpos Monoclonais	Principal expressão celular	Fluorocromo
Anti-CD4	Linfócitos T restritos ao MHC de classe II, co-receptor para células T auxiliaadoras.	APC
Anti-CD8	Linfócitos T restritos ao MHC de classe I, co-receptor de células T citotóxicas.	PerCP-Cy5.5 ou PE Cy.5 PerCP
Anti-CD11a	Leucócitos e principalmente linfócitos	PE
Anti-CD19	Maioria dos linfócitos B	PE
Anti-CD25	Linfócitos T e B ativados. T-regulatórias.	FITC e PE
Anti-CD69	Leucócitos ativados, Linfócitos T e B, Células NK, Neutrófilo, Basófilos, Eosinófilos e Células de Langerhans.	PE
Anti-B220	Linfócitos B	PE

APC= Alocianina, PerCP= Proteína Clorofila Peridina, PE= Ficoeritrina, FITC= Isotiocianato de Fluoresceína. (Mochimaru et al., 2008, Hayashi et al., 2005)

### 3.3.3 Marcação dos receptores de superfície membranar e BrdU

A suspensão celular foi colocada com PBS 0,01M (solução contendo NaCl, NaHPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e água deionizada), centrifugada por 5 minutos a 300g e ressuspensa em solução de PBS/BSA 1% (para bloqueio de possíveis marcações inespecíficas) e contada em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada com azul de tripan (Sigma-USA). As células foram então incubadas durante 30 minutos com os anticorpos descritos (Tabela 4 em 3.3.2) e seus controles negativos (IGs). Após a incubação as células foram ressuspensas em PBS, centrifugadas por 5 minutos a 300g. Após a marcação dos receptores as células foram fixadas em solução de PBS contendo 2% de paraformaldeído (Merck GER), a 4°C por 40 minutos. Para a marcação intracelular do BrdU as células, já marcadas para os receptores de superfície foram lavadas com PBS, centrifugadas por 5 minutos a 300g e 200µl de etanol 70% gelado foi acrescentado lentamente e sob agitação. Após este procedimento, as células foram incubadas por 30 minutos a -20°C. As células foram lavadas duas vezes com PBS para retirar o etanol e ressuspensas em uma solução tamponada de DNase (contendo 0,15M de NaCl, 4,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10µM de HCl e 100 U/ml de DNase I DN25-10mg), por 40 minutos a 25°C em banho maria. As células foram lavadas duas vezes com PBS para retirar o HCl, centrifugadas por 10 minutos a 300g e incubadas com o anti-BrdU por 20 minutos. Após a incubação as células foram lavadas com PBS e centrifugação por 10 minutos a 300g.

Para a avaliação do BrdU um kit da BD Pharmingen (FITC Brdu Flow Kit) foi utilizado para possibilitar a avaliação comparativa da marcação do BrdU com reagentes preparados no laboratório. Após o procedimento de eutanásia dos animais, os linfonodos auriculares foram isolados e homogeneizados para a obtenção da suspensão celular. As células obtidas foram colocadas em placas de 96 poços em uma concentração de 10<sup>6</sup>/50µl células por poço, foi feito a marcação dos receptores de superfície conforme descrito anteriormente. Para a fase da fixação e permeabilização essas células foram ressuspensas em 50 µl do tampão cytofix/Cytoperm™ e incubadas por 30 minutos no gelo. Em seguida, as células

foram lavadas com o tampão de lavagem (Perm/Wash™) e centrifugadas por 5 minutos a 300g. Depois da centrifugação, as células foram ressuspensas em 50µl do tampão Cytoperm Plus™, lavadas com o tampão Perm/Wash™ e centrifugadas por 5 minutos a 300g. O passo da fixação e permeabilização foi repetido, as células foram novamente ressuspensas em 50µl do tampão cytofix/Cytoperm™ e incubadas por 30 minutos no gelo. Em seguida, as células foram lavadas com o tampão Perm/Wash™ e centrifugadas por 5 minutos a 300g.

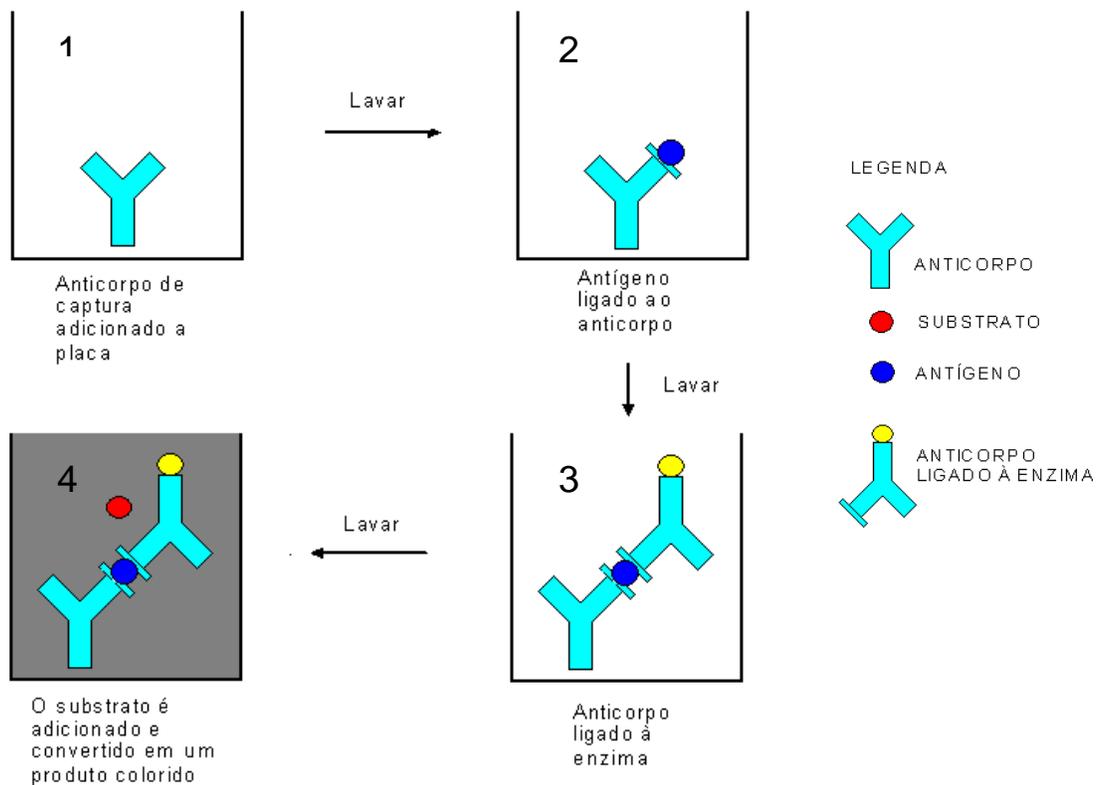
Para o tratamento com a DNase, as células foram ressuspensas em 20 µl da DNase (30µg de DNase por poço), incubadas por 1 hora a 37°C, lavadas com o tampão Perm/Wash™ e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. As células foram marcadas com o anti-BrdU diluído no tampão Perm/Wash™, incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente, lavadas com o tampão Perm/Wash™ e centrifugadas por 5 minutos a 300g.

Todas as amostras foram lidas no mesmo dia do experimento em um citômetro de fluxo (FACSCalibur BD) e depois analisadas nos softwares WinMDI 2.9 e Summit 4.3.

### **3.4 Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA)**

Para realização desse ensaio foi necessário adicionar o primeiro anticorpo à placa (anticorpo necessário para captura do antígeno), soluções testes contendo o antígeno e as soluções padrões (soluções com concentrações conhecidas do antígeno), foram também adicionadas à placa para que ocorra essa ligação. Os antígenos que não ligaram foram removidos por lavagem, e o segundo anticorpo, ligado a uma enzima foi adicionado, essa enzima reage com um substrato incolor. O substrato foi então ativado pela porção enzimática do ligante, produzindo um produto final colorido (Esquema 2) (Abbas, 2008). A mudança de cor foi então lida diretamente em aparelho apropriado.

As placas foram então lidas em um leitor de ELISA que mede a absorvância, ou seja, mede a quantidade de um feixe de luz com um comprimento de onda determinado absorvido por uma suspensão (amostra).



**Esquema 2:** Esquema da metodologia do ELISA. (1) O primeiro passo para o método do ELISA é ligar o anticorpo de captura à placa. (2) Depois o antígeno (amostra) é adicionado e se liga ao anticorpo. (3) O segundo anticorpo ligado à enzima é adicionado e após o tempo de incubação do anticorpo o substrato é adicionado, o substrato é incolor e, quando ativado pela porção enzimática do ligante, produz um produto final colorido (4) (Abbas, 2008).

### 3.4.1 Citocinas mensuradas através do método de ELISA

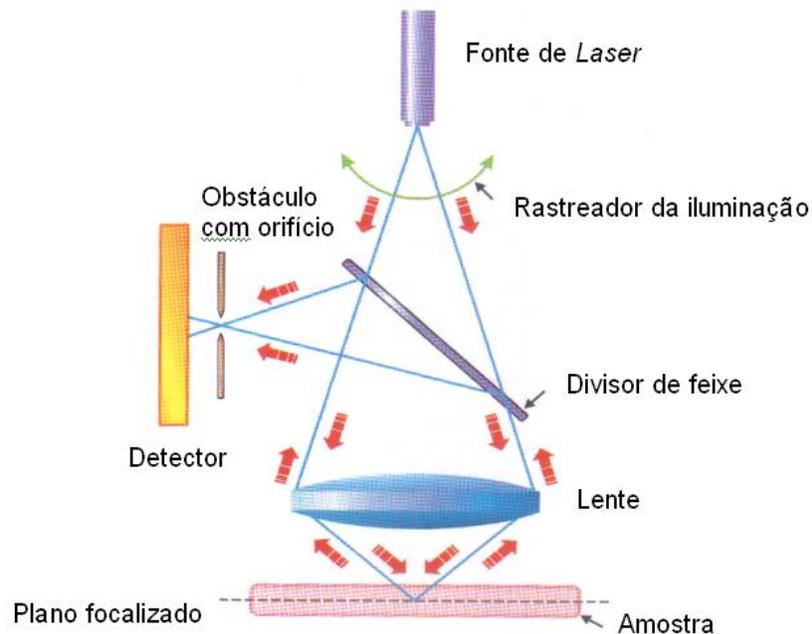
Foram utilizados Kits comerciais de ELISA (R&D Systems) para quantificar diversas citocinas no soro dos animais tratados com as substâncias sensibilizantes, irritantes e seus respectivos controles. As seguintes citocinas foram mensuradas: TNF- $\alpha$  e IL-4. Segue a descrição da metodologia.

Para o Ensaio de Imunoabsorção por Ligação Enzimática (esquema 2), foram adicionados 50 $\mu$ l do anticorpo de captura, “overnight” a 4°C. No dia seguinte, o anticorpo não ligado foi retirado e a placa lavada 3 vezes com 200 $\mu$ l de uma solução de PBS/Tween 20 (PBS/Tween20 0,05%). A placa foi virada em um papel absorvente para remover qualquer resíduo do tampão. Em seguida foi adicionada a solução bloqueio (PBS/BSA 1%) na placa e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após o intervalo de 1h, foi desprezada a solução bloqueio e placa lavada 4 vezes com 200 $\mu$ l de uma solução de PBS/Tween 20 (PBS/Tween20 0,05%), Na última lavagem a placa foi virada em um papel absorvente para remover qualquer resíduo do tampão. Foram adicionados 100  $\mu$ l da curva padrão e feito uma diluição seriada de 1:2, nesse momento foi colocado 100  $\mu$ l das amostras nos poços correspondentes (nos poços que representam o branco foi colocado 100  $\mu$ l da solução PBS/BSA1%/Tween20 0,05%, a mesma solução que foi diluída a curva padrão e as amostras), as amostras foram incubadas “overnight” a 4°C. Após a incubação as amostras foram retiradas e os poços lavados 4 vezes com 200 $\mu$ l de uma solução de PBS/Tween 20 (PBS/Tween20 0,05%), Na última lavagem a placa foi virada em um papel absorvente. Foram colocados 50 $\mu$ l do anticorpo de detecção e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação as amostras foram retiradas e os poços lavados 4 vezes com 200 $\mu$ l de uma solução de PBS/Tween 20 (PBS/Tween20 0,05%), Na última lavagem a placa foi virada em um papel absorvente. Foram adicionados 100  $\mu$ l/poço da streptavidin-HRP e incubado por 30 minutos. A placa foi lavada 8 vezes com 200 $\mu$ l de uma solução de PBS/Tween 20 (PBS/Tween20 0,05%), Na última lavagem a placa foi virada em um papel absorvente para remover qualquer resíduo do tampão. Logo após a lavagem

foram adicionados 50µl/poço da solução reveladora (OPD) (solução OPD: 1 comprimido OPD o-Phenylenediamine) em 50ml do tampão OPD (1 cápsula do tampão fosfato citrato em perborato de sódio) em 100ml de água deionizada. A leitura foi feita em 450nm em um leitor de ELISA.

### 3.5 Microscopia Confocal

A microscopia confocal (Figura 6) utiliza uma fonte de luz (laser) que é projetada na amostra. A imagem coletada da amostra passa por um pequeno orifício e somente a imagem originada do plano focado alcança o detector. A luz proveniente de fora do plano de foco é em grande parte eliminada. O sinal gerado é visto em um monitor (Junqueira & Carneiro; 2004). As vantagens do microscópio confocal são: imagens multidimensionais, seccionamento óptico, melhor contraste e melhor resolução que a microscopia de luz convencional.



(modificado de Junqueira & Carneiro; 2004)

**Figura 6:** Microscopia confocal. A iluminação de uma fonte de laser atinge a amostra e é refletida. Um espelho dirige a luz refletida a um obstáculo que possui um pequeno orifício. A luz proveniente de planos da amostra que estão frente ou atrás do plano focalizado é bloqueada pelo obstáculo.

### **3.5.1 Análise dos linfonodos auriculares**

Após a eutanásia dos animais os linfonodos auriculares foram retirados, colocados em Tissue Tek (LEICA Instruments, Alemanha) e criopreservados em Nitrogênio líquido. Foram feitos cortes de 5µm de espessura com auxílio do criostato (Leica, GER). Para marcação dos receptores de superfície os cortes foram fixados com acetona PA (VETEC, BRA) por 10 minutos. Para o bloqueio de marcações inespecíficas os cortes foram incubados em uma solução de PBS/BSA 12,5% overnight. Para degradar o DNA utilizamos HCl 2N (Merck, GER) por 30 minutos e após o tempo de incubação neutralizamos com borato de sódio (Sigma, USA) pH 8.5 por 10 minutos. Foram adicionados os anticorpos CD4, CD8 e BrdU por 30 minutos e após este período os cortes foram lavados por imersão três vezes com PBS. As lâminas foram montadas com a solução de montagem (glicerina/PBS 1:3) e o material foi analisado através do microscópio Confocal.

### **3.5.2 Análises histopatológicas das orelhas**

As orelhas dos camundongos tratados com as substâncias irritantes, sensibilizantes e seus respectivos controles foram retiradas para análise histológica e colocadas em tubos falcon (15ml BD) contendo o fixador Milonic (fórmula em anexo 1) por no mínimo 24h.

As orelhas foram colocadas em cassetes e lavadas em água corrente por 30 minutos, em seguida os cassetes contendo as orelhas foram colocados em álcool absoluto em uma temperatura de 60°C, 3 vezes por 30 minutos cada. Este processo é chamado de desidratação e consiste na retirada de água do tecido. Os cassetes foram, então, colocados em xilol (Proquimios) 2 vezes por 30 minutos cada, processo chamado de diafanização, que consiste na retirada do álcool do tecido. Para o processo de impregnação, os cassetes foram banhados 2 vezes em parafina por 1 hora cada (todos os processos foram feitos em estufa com a temperatura a 60°C).

Em seguida os cassetes foram emblocados com parafina (Easy Path) derretida. Após o resfriamento da parafina os blocos foram colocados na superfície fria da máquina de emblocamento e, após estarem completamente endurecidos, retirados do molde. Os cortes foram feitos com auxílio de um micrótomo (Leica, GER), colocados no banho histológico (Leica, GER) e aderidos a lâminas de vidro.

Para o procedimento de coloração com hematoxilina e eosina, as lâminas contendo os cortes das orelhas foram colocadas na estufa por 30 minutos. As lâminas passaram por 3 banhos em xilol por 10 minutos cada (esse processo é para retirar o que sobra de parafina no material). Para retirar o excesso de xilol, as lâminas foram banhadas 3 vezes em álcool absoluto 5 minutos cada. Foram lavadas em água corrente por 2 minutos e colocadas em uma cuba com hematoxilina por 50 segundos, após a coloração com a hematoxilina, as lâminas foram lavadas em água corrente por 4 minutos, depois foram colocadas em uma cuba contendo a Eosina por 40 segundos e lavadas por 2 minutos em água corrente. As lâminas foram novamente banhadas em álcool 3 vezes por 5 minutos e depois banhadas 3 vezes no xilol por 5 minutos cada. As lâminas foram montadas com entellan (Merck, GER) e analisadas no microscópio de campo claro.

### **3.6 Análise Estatística**

A análise descritiva foi realizada com auxílio dos softwares Excel 2007 e Graph prism 5.1. Para analisar a significância dos dados obtidos o Teste não paramétrico *Mann-Whitney* foi aplicado com o auxílio do programa Graph prism 5.1. Os dados foram estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

## IV. Resultados

### 4.1 Peso dos animais

Inicialmente, buscamos avaliar se a toxicidade das substâncias sensibilizantes e irritantes nas doses utilizadas poderia interferir no peso dos animais. Todos os animais foram pesados e tratados por três dias consecutivos no dorso de ambas as orelhas com o veículo acetona/azeite de oliva (A/OO 4:1), com os sensibilizantes dinitroclorobenzeno (DNCB 1%) e parafenilenodiamina (PPD 1%), os irritantes lauril sulfato de sódio (LSS 25%), tritonX-100 (TX-100 25%) e o veículo etanol (30%). Os pesos dos animais foram registrados durante os três primeiros dias e no último dia de ensaio. Não observamos diferenças significativas na perda de peso em relação aos grupos tratados e os grupos controle (Tabela 5).

**Tabela 5:** Peso dos animais. A tabela apresenta a média dos primeiros 3 dias de tratamento (peso inicial) e o dia da eutanásia (peso final). Animais tratados com as substâncias sensibilizantes DNCB e PPD e o controle A/OO, bem como os tratados com LSS, TX-100 e o controle etanol. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, n=10 camundongos por grupo.

Substâncias	peso inicial (g)		peso final (g)	
	média	(+/-)	média	(+/-)
<b>Sensibilizantes</b>				
A/OO	18,87	2,12	19,10	2,12
DNCB	18,69	1,37	18,80	1,41
PPD	19,12	1,70	19,00	1,76
<b>Irritantes</b>				
Etanol	20,04	2,69	20,17	2,58
LSS	19,47	1,75	18,16	2,37
TX-100	18,05	1,55	18,30	1,45

### 4.2 Padronização do Ensaio do Linfonodo Local Murino

Duas abordagens foram testadas para padronização do LLNA alternativo. Na primeira, a possibilidade de utilizar um kit comercial ou de fazer os reagentes necessários para a marcação do BrdU. Os resultados obtidos (Tabela 6) tanto com o kit e com os reagentes preparados no laboratório não demonstraram nenhuma

diferença considerável, e por isso, os outros experimentos foram realizados sem o kit, o que tornou o procedimento mais barato.

**Tabela 6:** Número absoluto de células BrdU+ em animais tratados com as substâncias sensibilizantes e seu controle. Células BrdU+ foram obtidas de linfonodos de drenagem através do kit comercial e com reagentes preparados no laboratório. Dados estão apresentados como média com n= 4 camundongos por grupo.

<b>Substâncias</b>	<b>Nº absoluto de células BrdU+</b>	<b>Nº absoluto de células BrdU+(Kit)</b>
<b>A/00</b>	1,48E+04	1,25E+04
<b>DNCB</b>	4,67E+04	4,75E+04

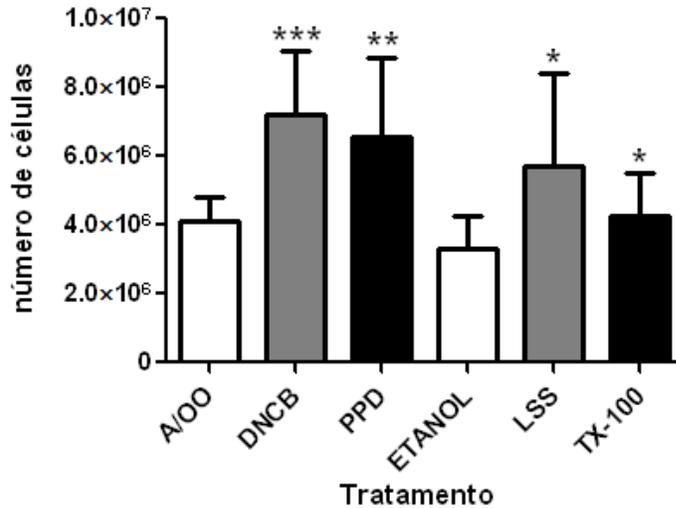
A segunda questão era a possibilidade de utilizarmos para o ensaio não um pool de linfonodos dos animais tratados e sim os linfonodos dos animais individuais. O único obstáculo a ser superado era o número de células a serem obtidas, que caso muito baixo prejudicaria naturalmente as análises posteriores. Diminuindo o valor total necessário por trabalharmos em placas de 96 poços e não em tubos de FACS diretamente, foi possível alcançar o número de células necessárias para a leitura, até 10.000 eventos por segundo no citômetro de fluxo (Tabela 7). Tendo em vista que a utilização de animais individualmente era estatisticamente mais interessante e que havia desta forma a possibilidade futura de diminuir ainda mais o número de animais utilizados neste ensaio todos os outros experimentos foram realizados com linfonodos de cada animal tratado.

**Tabela 7:** Número de células de pool de linfonodos e dos linfonodos individuais de animais. A tabela apresenta o número de células de linfonodos de animais individuais e do pool de células de linfonodos dos animais tratados com as substâncias sensibilizantes, irritantes e seus respectivos controles. Também são mostrados os números de eventos lidos por segundo no citômetro de fluxo. Dados estão apresentados como média com n= 4 camundongos por grupo.

<b>Total de células dos linfonodos de drenagem de animais individuais</b>						
<b>Substâncias</b>	<b>Etanol</b>	<b>LSS</b>	<b>TX-100</b>	<b>A/OO</b>	<b>DNCB</b>	<b>PPD</b>
<b>Nº de células</b>	3,3E+06	5,7E+06	4,3E+06	4,1E+06	7,2E+06	6,6E+06
<b>Nº de eventos</b>	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000
<b>Pool de células dos linfonodos de drenagem</b>						
<b>Nº de células</b>	2,7E+07	3,2E+07	1,7E+07	2,5E+07	5,1E+07	4,8E+07
<b>Nº de eventos</b>	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000

### 4.3 Análise da celularidade dos linfonodos de drenagem

Para analisar a celularidade total, utilizamos o corante de viabilidade azul de tripam. Observamos um aumento da celularidade nos grupos tratados com as substâncias sensibilizantes DNCB ( $7,2 \times 10^6$ ) e PPD ( $6,6 \times 10^6$ ) em relação ao controle A/OO ( $4,1 \times 10^6$ ), o mesmo aconteceu com as substâncias irritantes LSS ( $5,7 \times 10^6$ ) e TX-100 ( $4,3 \times 10^6$ ) em relação ao controle Etanol ( $3,3 \times 10^6$ ) (Figura 7). Esse aumento foi cerca de 2 vezes para os animais que receberam o DNCB. A substância irritante LSS teve aumento semelhante ao DNCB quando comparado ao controle etanol. O aumento da celularidade no linfonodo auricular dos camundongos tratados tanto com as substâncias irritantes quanto com as sensibilizantes foi significativo.



**Figura 7:** Aumento da celularidade dos linfonodos de drenagem. Contagem de linfócitos nos linfonodos de camundongos tratados com as substâncias sensibilizantes DNCB e PPD e o controle A/OO. Também são mostrados as substâncias irritantes LSS e TX-100 e o controle etanol. Dados apresentados como média ± desvio padrão, com 4 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  demonstram que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

#### 4.4 Análise de subpopulações de linfócitos

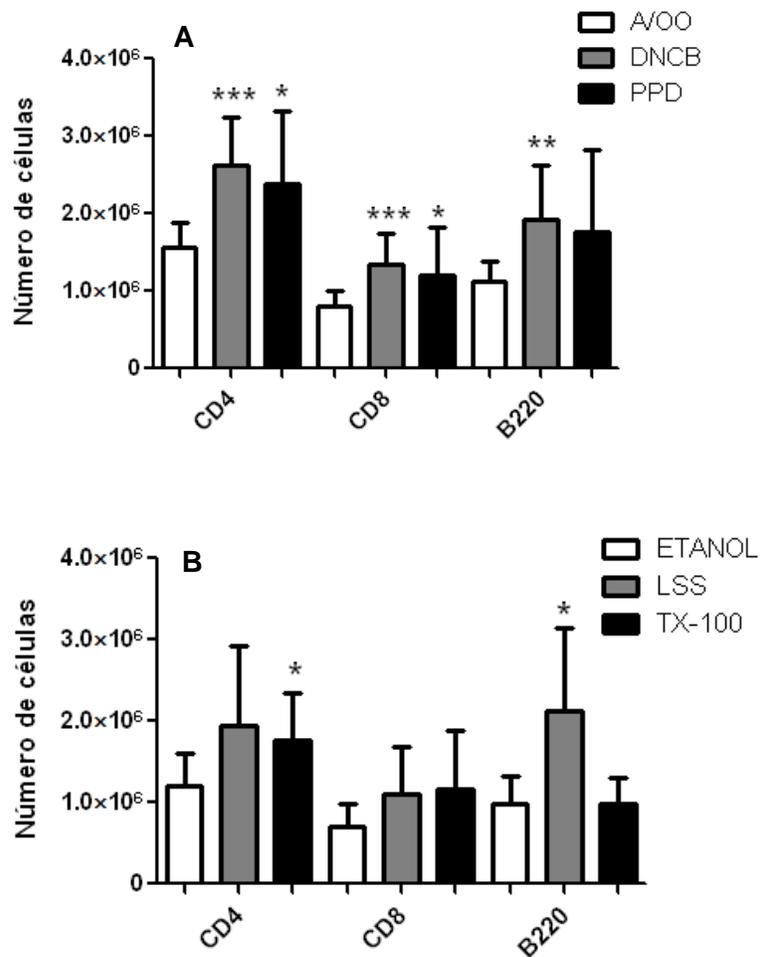
Após analisar a celularidade dos linfonodos de drenagem de animais tratados com as substâncias sensibilizantes, irritantes e seus respectivos controles, investigamos a expressão das moléculas CD4, CD8 e B220, inicialmente através da citometria de fluxo.

No que diz respeito ao percentual de células positivas para as moléculas CD8 e B220 não houve diferença significativa nos valores percentuais dessas subpopulações, apenas no percentual das células CD4+ em camundongos tratados com TX-100, sendo este aumento cerca de 5% quando comparado com o controle (Tabela 8). Por outro lado, a análise do número absoluto dessas células, demonstrou um aumento significativo de células CD4+ e CD8+ em animais tratados com as substâncias DNCB, PPD em relação ao controle A/OO, na expressão da molécula B220+ esse aumento foi significativo apenas para animais

tratados com a substância DNCB (Figura 8A). Já nas substâncias irritantes, um aumento significativo pode ser evidenciado no número de células B220+ em animais tratados com LSS e no número de células CD4+ em animais tratados com TX-100, todos em relação ao controle etanol (Figura 8B)

**Tabela 8:** Camundongos tratados com DNCB, PPD e o controle A/OO e animais tratados com LSS, TX-100 e o controle etanol. Os dados estão apresentados como mínimo, Q1 (corresponde a 25% das amostras), Mediana (valor no qual se encontram 50% das amostras), Q3 (correspondente a 75% das amostras), máximo, média e  $\pm$  desvio padrão, com 4 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

	Sensibilizantes			Irritantes			
	A/OO	DNCB	PPD	Etanol	LSS	TX-100	
mínimo	31,27	28,79	32,79	29,50	26,67	31,96	<b>CD4 (%)</b>
Q1	35,72	34,36	36,15	31,75	29,64	38,49	
mediana	37,76	36,54	37,56	35,64	35,13	40,89 *	
Q3	39,10	38,90	38,38	40,02	39,64	43,95	
máximo	44,30	41,45	45,07	42,10	43,15	47,17	
média	37,87	36,47	37,54	35,89	34,71	41,01 *	
(+/-)	3,60	3,57	3,23	4,59	5,79	4,45	
mínimo	14,74	12,49	15,88	14,06	12,88	17,08	<b>CD8 (%)</b>
Q1	17,28	14,95	16,61	16,84	16,03	20,24	
mediana	19,27	19,08	18,57	19,49	20,09	23,42	
Q3	22,50	20,97	21,86	23,79	23,04	25,33	
máximo	24,89	24,40	25,09	29,69	25,50	26,36	
média	19,55	18,52	19,24	20,39	19,69	22,79	
(+/-)	3,29	3,90	2,89	4,74	3,99	3,18	
mínimo	19,57	18,92	22,15	22,30	24,87	11,41	<b>B220 (%)</b>
Q1	20,46	21,52	22,61	25,80	32,21	22,39	
mediana	28,86	24,81	24,68	28,36	34,38	26,14	
Q3	29,01	30,61	29,89	34,67	40,85	28,47	
máximo	37,26	38,67	35,65	38,07	46,06	32,83	
média	27,47	26,07	27,02	29,75	36,11	24,55	
(+/-)	5,65	6,38	4,79	5,42	6,65	7,18	



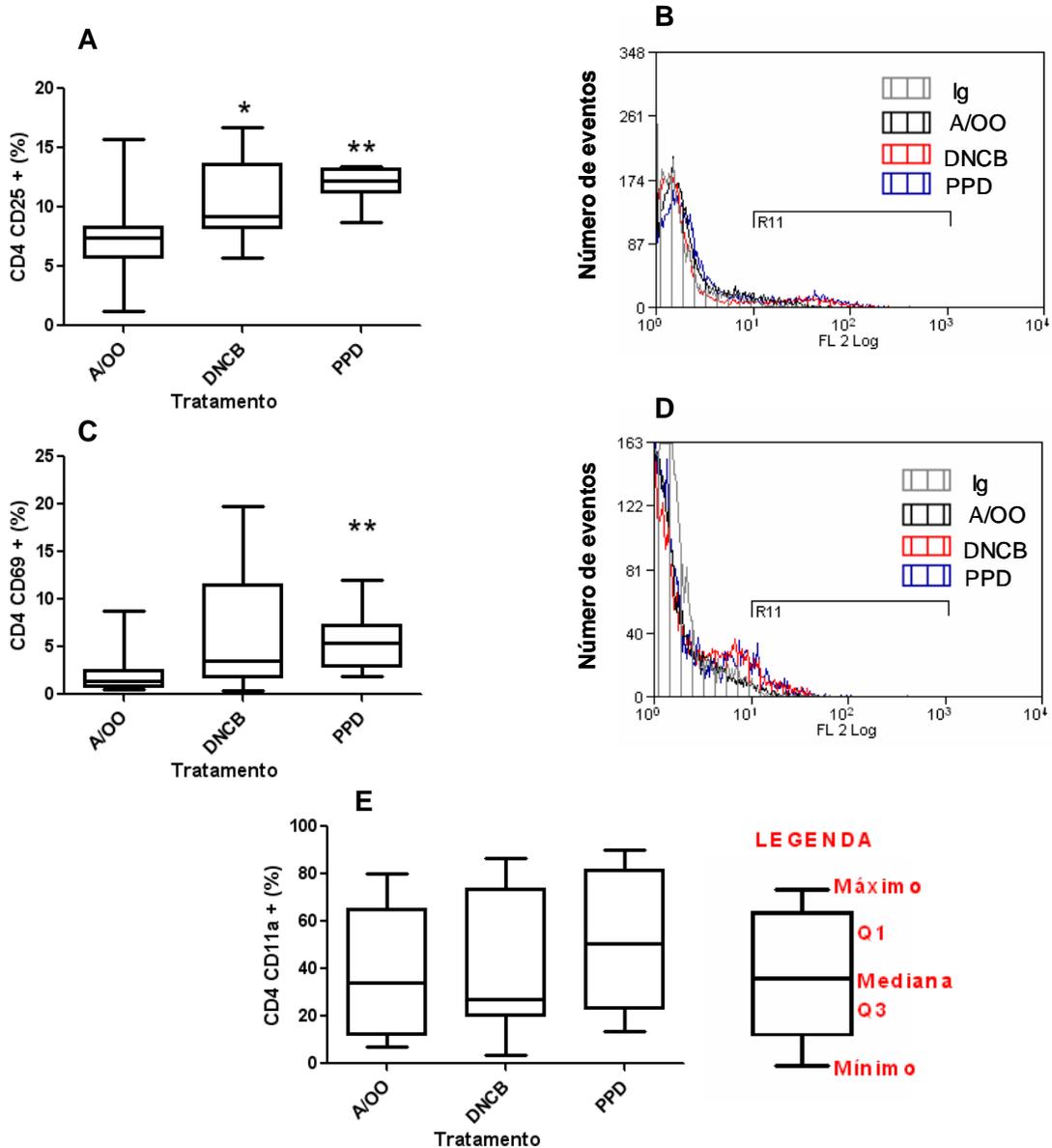
**Figura 8: Aumento de Células CD4+ CD8+ e B220+ linfonodos de drenagem.** (A) Número absoluto de linfócitos T CD4, TCD8 e B B220, animais tratados com, DNCB, PPD e o controle A/OO (B) Também são mostrados números absolutos de células CD4+, CD8+ e células B220+, animais tratados com LSS e TX-100 e o controle etanol. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com 4 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  demonstram que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

#### 4.5 Expressão de marcadores de ativação celular e adesão

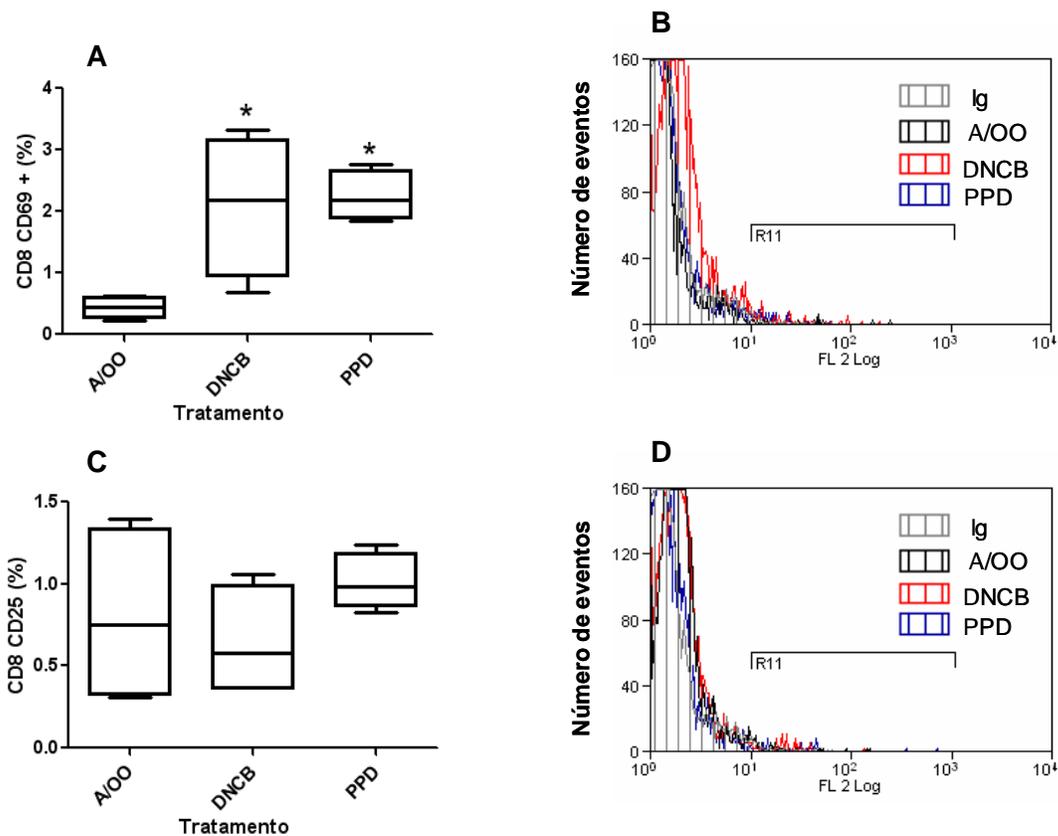
Tendo sido confirmado o acúmulo de células TCD4, TCD8 e B (B220) nos linfonodos de drenagem, ainda por citometria de fluxo, foi avaliada a expressão de alguns marcadores de ativação celular, como por exemplo, a cadeia  $\alpha$  do receptor IL-2 (CD25) e o CD69, que são expressos em células T e B. Também foi estudado o marcador de adesão CD11a que é também conhecido como a cadeia  $\alpha$ L do LFA-1 (*antígeno 1 associado à função leucocitária*), sendo expresso constitutivamente nas células T maduras e podendo aumentar sua intensidade de expressão frente a ativação celular.

Em relação aos marcadores de ativação CD25 e CD69 em relação as substâncias sensibilizantes, foi observado um aumento significativo de células CD4+CD25+ em animais que foram tratados com DNCB e PPD quando comparados com o controle A/OO (Figura 4.3A). Esse aumento também está representado pelo histograma na figura 4.3B. Também foi observado um aumento no percentual de células CD4+CD69+ em animais tratados com PPD (Figura 4.3C e 4.3D). Encontramos um aumento de células CD8+CD69+ em animais tratados com DNCB e PPD (Figura 4.4A e 4.4B). As subpopulações CD8+CD25+, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com o grupo A/OO (Figura 4.4C e 4.4D).

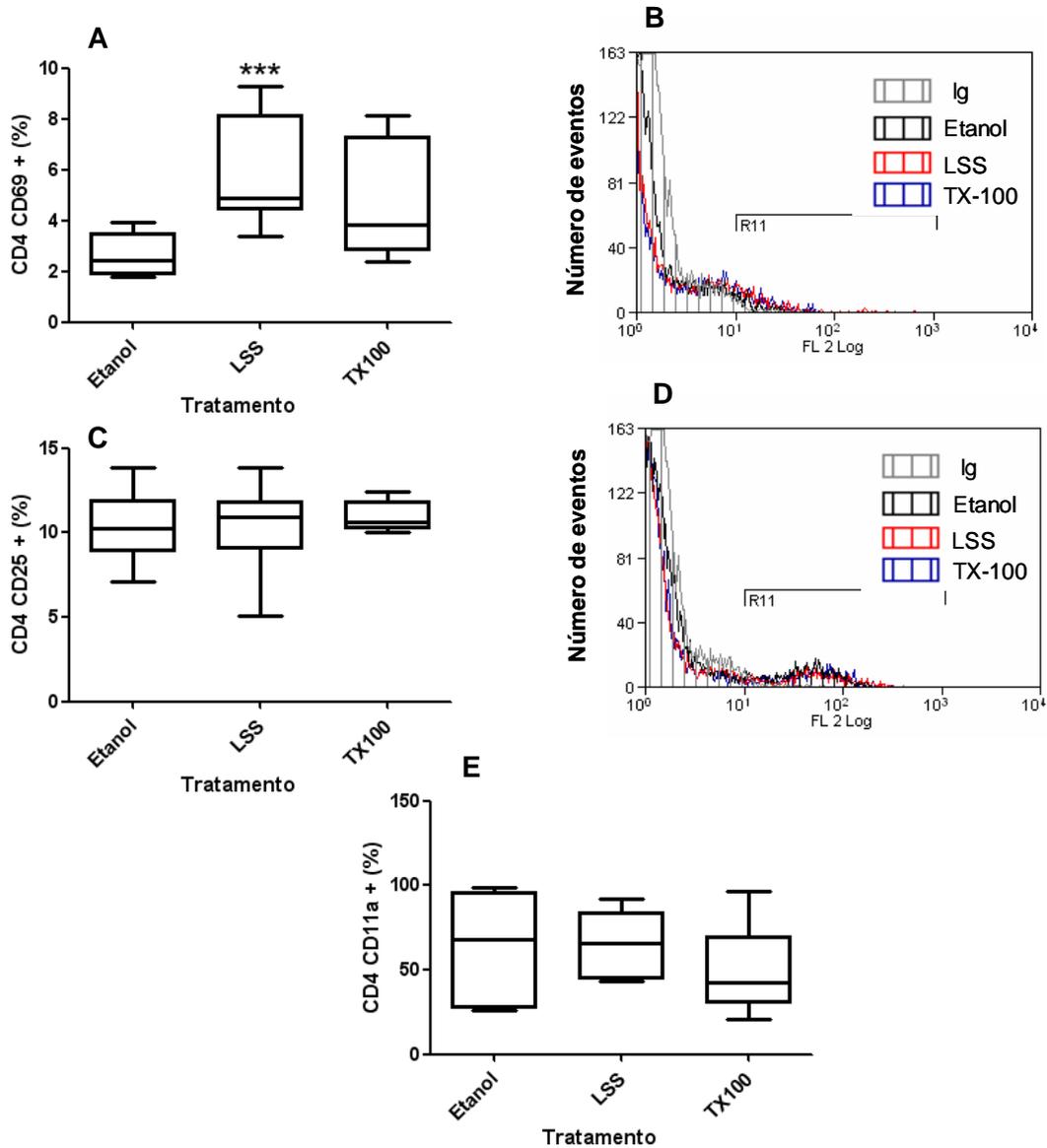
No entanto, quando os animais foram tratados com as substâncias irritantes, o aumento de células CD4+ foi significativo apenas para o marcador de ativação CD69 (Figura 4.5A e 4.5B) e esse aumento foi visto apenas na substância LSS em relação ao controle etanol. Não foi observada diferença significativa no percentual de células CD4+CD25+ (Figura 4.5C e 4.5D). O marcador de adesão CD11a não apresentou um aumento significativo para as substâncias irritantes quando comparados ao controle (Figura 4.5D). No entanto, os animais que foram tratados com o PPD revelaram um discreto aumento da expressão de células CD4+CD11a+ quando comparados aos animais tratados com o veículo A/OO (Figura 4.3E).



**Figura 9:** Expressão de marcadores de ativação e adesão. (A) Percentual de células CD4+CD25+ em animais tratados com DNCB e PPD e o controle A/OO. (B) Histograma com expressão de CD4+CD25+ em animais tratados com controle isotipo (Ig) (cinza), A/OO (preto), DNCB (vermelho) e PPD (Azul). (C) Percentual de células CD4+CD69+ em animais tratados com DNCB e PPD e o controle A/OO. (D) Histograma com expressão de CD4+CD69+ em animais tratados com controle isotipo (Ig) (cinza), A/OO (preto), DNCB (vermelho) e PPD (Azul). (E) Percentual de células CD4+CD11a em animais tratados DNCB e PPD e o controle A/OO. Dados apresentados com 4 animais por grupo. \* $p < 0,05$  demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.



**Figura 10:** Expressão de marcadores de ativação e adesão. (A) Percentual de células CD8+CD69+ em animais tratados com DNCB e PPD e o controle A/OO. (B) Histograma com expressão de CD4+CD69+ em animais tratados com controle isotipo (Ig) (cinza), A/OO (preto), DNCB (vermelho) e PPD (Azul). (C) Percentual de células CD8+CD25+ em animais tratados com DNCB e PPD e o controle A/OO. (D) Histograma com expressão de CD4+CD25+ em animais tratados com controle isotipo (Ig) (cinza), A/OO (preto), DNCB (vermelho) e PPD (Azul). Dados apresentados com 4 animais por grupo. \* $p < 0,05$  demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.



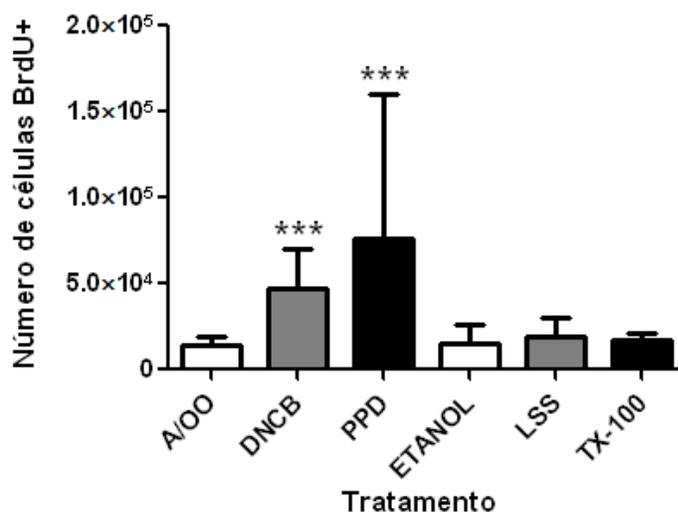
**Figura 11:** Expressão de marcadores de ativação e adesão. (A) Percentual de células CD4+CD69 em animais tratados com LSS e TX-100 e o controle etanol. (B) Histograma com expressão de CD4+CD69+ em animais tratados com controle isotipo (Ig) (cinza), etanol (preto), LSS (vermelho) e TX-100 (Azul). (C) Percentual de células CD4+CD25+ em animais tratados com LSS e TX-100 e o controle etanol. (D) Histograma com expressão de CD4+CD25+ em animais tratados com controle isotipo (Ig) (cinza), etanol (preto), LSS (vermelho) e TX-100 (Azul). (E) Percentual de células CD4+CD11a+ em animais tratados com LSS e TX-100 e o controle etanol. Dados com 4 animais por grupo. \*\*\* $p < 0,001$  demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

## **4.6 Proliferação celular nos linfonodos de drenagem**

A análise do número absoluto de células CD4+ CD8+ e células B B220+ mostrou que os camundongos tratados com as substâncias sensibilizantes, quando comparados aos animais tratados com o veículo A/OO, apresentavam um aumento significativo do número total dessas células. Com as substâncias irritantes, foi observado um aumento significativo no número de células CD4+ quando os animais foram tratados com a substância TX-100 e um aumento no número de células B (B220) quando os animais foram tratados com a substância LSS. O próximo passo foi investigar a proliferação dessas subpopulações específicas nos linfonodos de drenagem.

### **4.6.1 Proliferação no total de células**

A suspensão celular dos linfonodos de drenagem de todos os grupos foi marcada com o anti-BrdU e analisada por citometria de fluxo. Os resultados mostraram um aumento no número total de células proliferando nos linfonodos de animais tratados com DNCB ( $4,5 \times 10^4$ ) e PPD ( $8,4 \times 10^4$ ) em relação ao controle A/OO ( $1,4 \times 10^4$ ). Entretanto, nos animais tratados com as substâncias irritantes LSS ( $1,5 \times 10^4$ ) e TX-100 ( $1,9 \times 10^4$ ), não houve diferenças significativas quando comparamos com o controle etanol ( $1,7 \times 10^4$ ) (Figura 12).



**Figura 12: Número de células BrdU+ nos linfonodos de drenagem.** Número total de células BrdU+ em animais tratados com as substâncias sensibilizantes DNCB e PPD e o controle A/OO. Também é mostrado número total de células BrdU+ em animais tratados com as substâncias irritantes e o controle etanol. Dados apresentados como média ± erro padrão, com 4 animais por grupo. \*\*\*  $p < 0,001$  demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

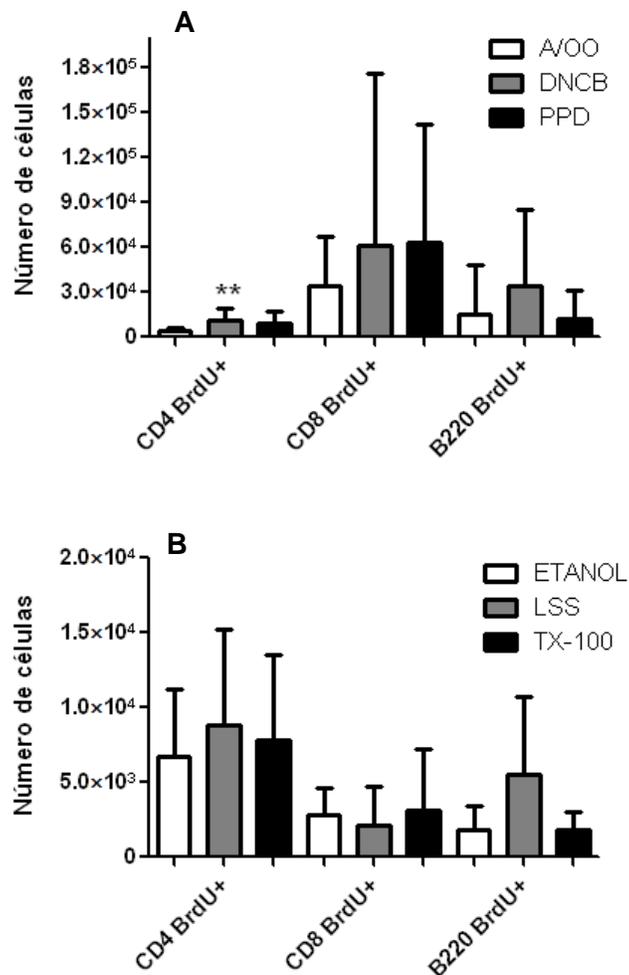
#### 4.6.2 Proliferação de subpopulações

A análise dos linfonodos de drenagem mostrou um aumento no número total de células BrdU+ nos animais que foram tratados com as substâncias sensibilizantes quando comparadas com o controle. Investigamos então, as subpopulações de células CD4+, CD8+ e B220+ quanto à proliferação nos linfonodos de drenagem de animais tratados com as substâncias sensibilizantes, irritantes e seus respectivos controles.

Em relação as substâncias sensibilizantes (Figura 13A) foi constatado um aumento significativo no número absoluto de células CD4+ quando comparado com o seu controle, esse aumento foi significativo apenas para o grupo tratado com DNCB. Quanto a subpopulação de células CD8+ houve um claro aumento destas células tanto no grupo tratado com DNCB quanto com PPD quando comparados ao controle A/OO. No que concerne as subpopulações de células B,

marcadas com anti-B220, foi encontrado em média cerca do dobro de células nos linfonodos dos animais tratados com DNCB quando comparados com o controle. Este achado, no entanto, não pode ser confirmado estatisticamente, provavelmente devido a uma grande variação individual no grupo DNCB.

Já com as substâncias irritantes, não foram observadas diferenças significativas na proliferação de células CD4+, CD8+ e B B220+ quando comparamos com os grupos tratados com LSS, TX-100 e os grupos tratados com etanol. No entanto, há uma tendência ao aumento de células B B220+ (Figura 13B) nos animais tratados com LSS ( $5,5 \times 10^3$ ) em relação ao etanol ( $1,8 \times 10^3$ ).



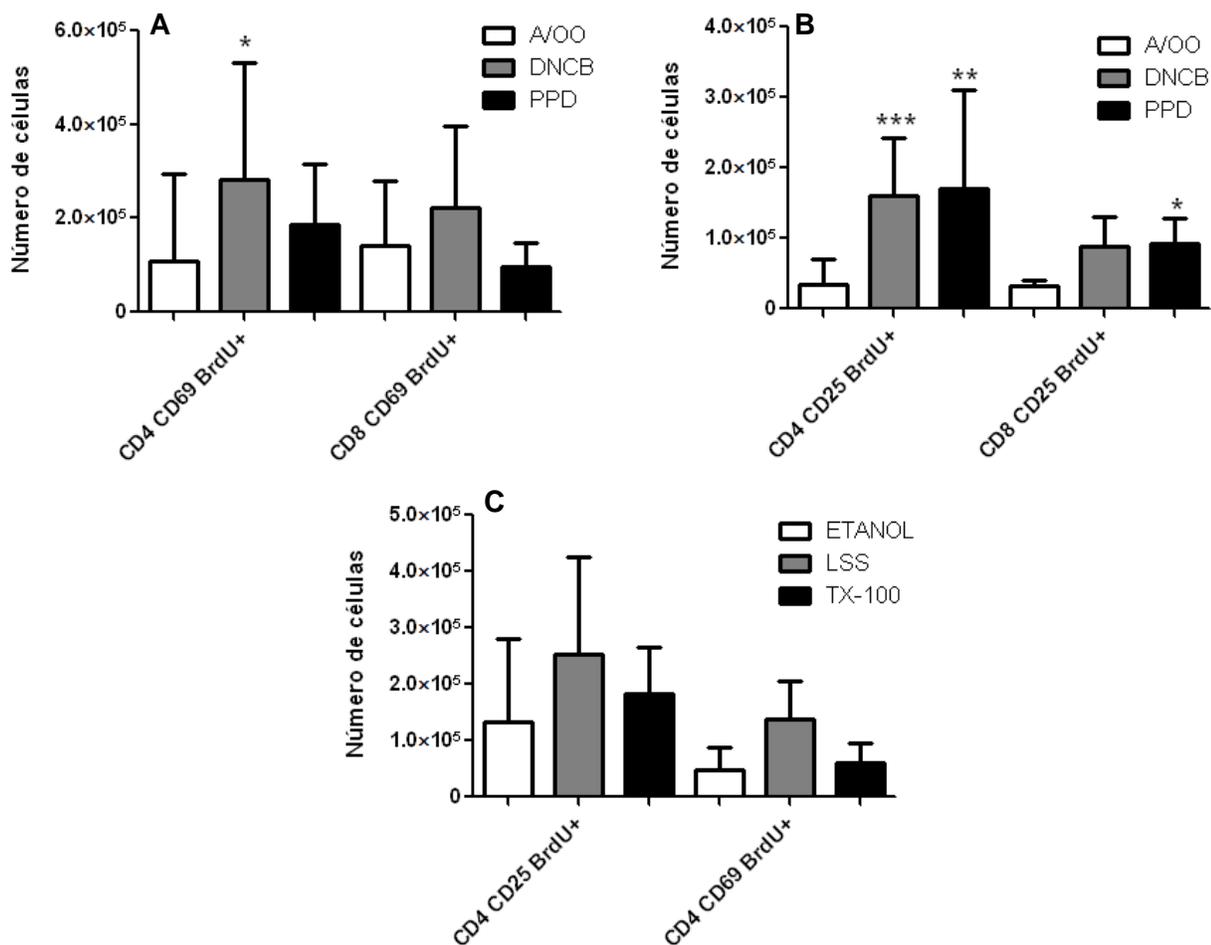
**Figura 13:** Expressão de BrdU em subpopulações de linfócitos. (A) Números absolutos de células CD4+BrdU+, CD8+BrdU+ e B220+BrdU+ em animais tratados com as substâncias sensibilizantes DNCB e PPD e o controle A/OO. (B) Números absolutos de células CD4+BrdU+, CD8+BrdU+ e B220+BrdU+ em animais tratados com as substâncias irritantes e o controle etanol. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com 4 animais por grupo. \*\*  $p < 0,001$  demonstra que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

### 4.6.3 Proliferação em subpopulações ativadas nos linfonodos de drenagem

O número absoluto e o percentual das subpopulações CD4+, CD8+ e B220+ que expressavam os marcadores de ativação CD25 e CD69 e BrdU foram também quantificados. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com as substâncias teste e os tratados com os veículos (Tabela 9). Porém quando analisado o número absoluto dessas células, foram observadas algumas diferenças significativas, como por exemplo, o grupo de animais tratados com o DNCB apresentou um aumento significativo na subpopulação CD4+CD69+BrdU+ (Figura 14A), esse aumento também foi observado para a subpopulação CD4CD25BrdU+ em animais tratados com DNCB e PPD e para a subpopulação CD8CD25BrdU+ em animais tratados com PPD (Figura 14B), todos quando comparados aos dados apresentados em relação aos camundongos tratados com o veículo A/OO. Quando os animais foram tratados com as substâncias irritantes não observamos diferenças significativas entre o grupo tratado com o veículo etanol e as substâncias irritantes LSS e TX-100 (Figura 14C).

**Tabela 9:** Células CD4 e CD8+ expressando os marcadores de ativação CD25, CD69 e o marcador de proliferação BrdU. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com 4 animais por grupo. (N.V= Nenhum valor, não foi possível realizar).

Substâncias	CD4CD25BrdU+ (%)	CD8CD25BrdU+ (%)	CD4CD69BrdU+(%)	CD8CD69BrdU+ (%)
A/OO	5,2 $\pm$ 1,8	11,8 $\pm$ 5,8	5,2 $\pm$ 1,8	10,1 $\pm$ 0,5
DNCB	7,4 $\pm$ 3,5	12,2 $\pm$ 9,7	7,4 $\pm$ 3,5	8,2 $\pm$ 3,7
PPD	4,5 $\pm$ 1,2	7,6 $\pm$ 4,9	4,5 $\pm$ 1,2	8,1 $\pm$ 0,7
Etanol	4,5 $\pm$ 2,9	N.V	4,3 $\pm$ 0,9	N.V
LSS	3,4 $\pm$ 1,6	N.V	3,1 $\pm$ 2,4	N.V
TX-100	3,7 $\pm$ 2,7	N.V	5,5 $\pm$ 2,8	N.V

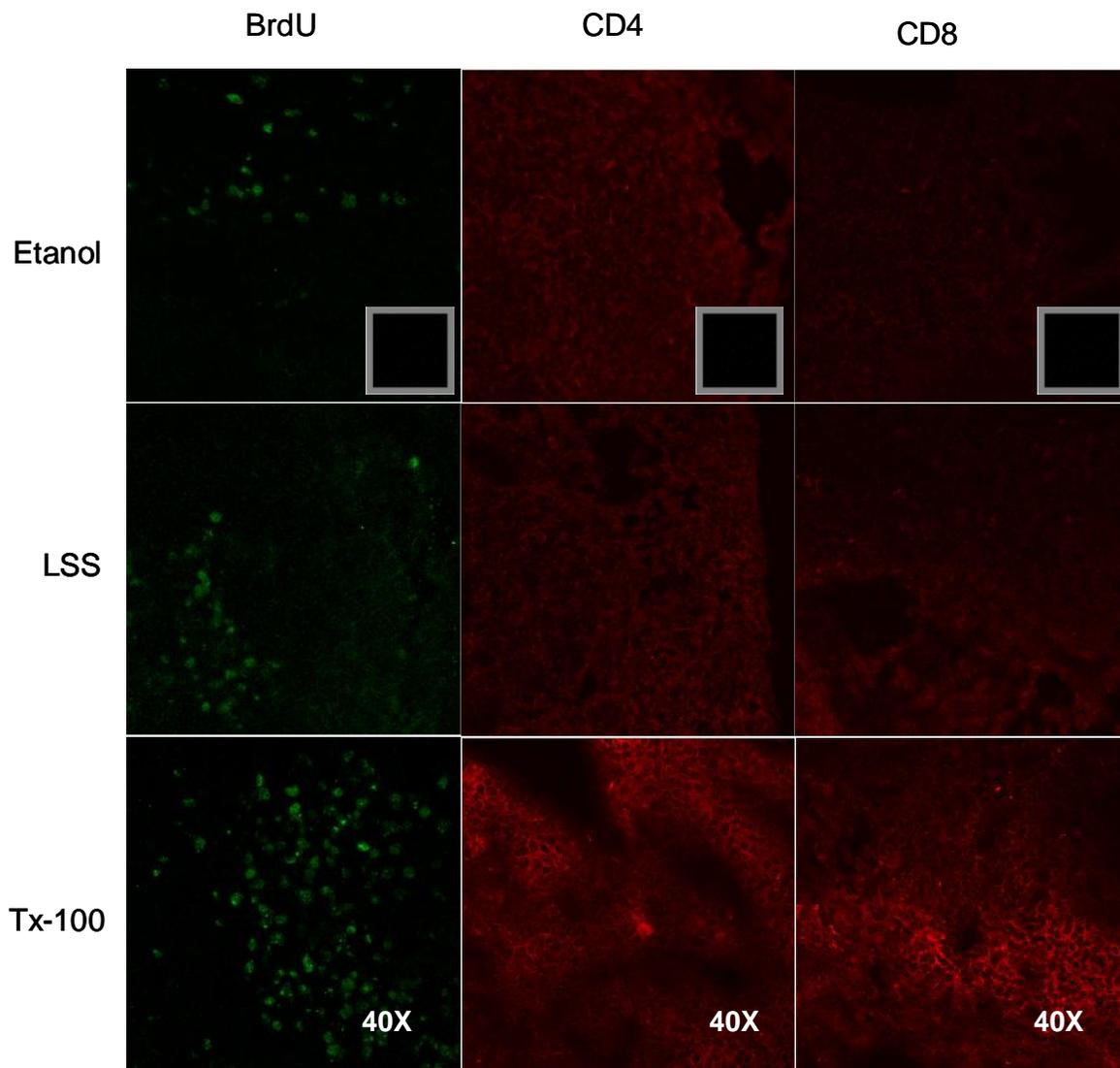


**Figura 14:** Aumento proliferativo de subpopulações. (A) Aumento significativo da subpopulação CD4+CD69+BrdU+ animais tratados com DNCB em relação ao controle A/OO. (B) Aumento significativo das subpopulações CD4+CD25+BrdU+ e em animais tratados com DNCB e PPD e CD8+CD25+BrdU+ em animais tratados com PPD, em relação ao controle A/OO. (C) Aumento não significativo das subpopulações CD4+CD25+BrdU+ e CD4+CD69+BrdU+ em animais tratados com LSS em relação ao controle etanol e PPD em relação ao controle A/OO. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com 4 animais por grupo. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  demonstram que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle segundo teste não paramétrico *Mann-Whitney* com índice de confiança de 95%.

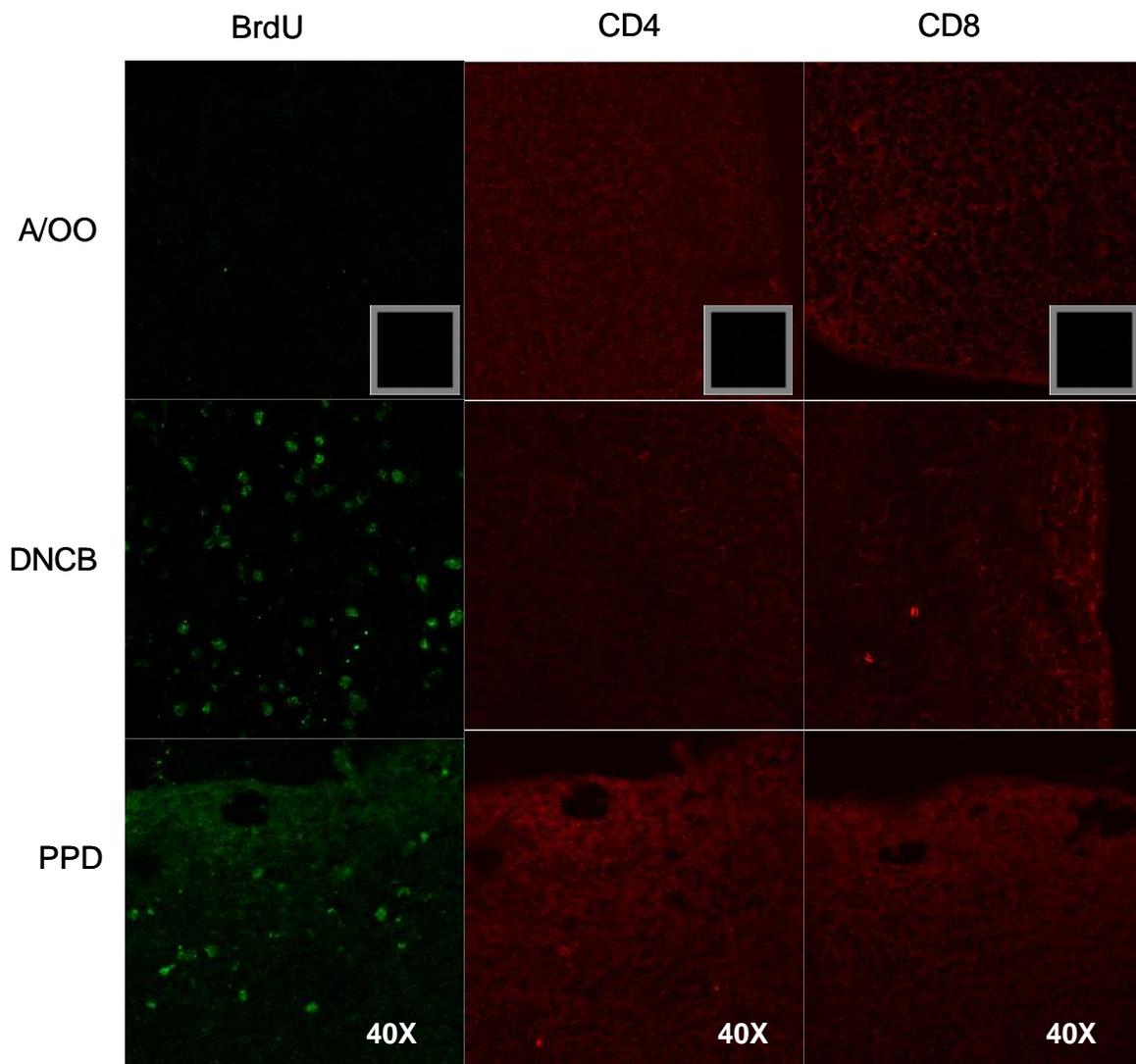
#### **4.7 Análise de proliferação celular nos linfonodos de drenagem por microscopia confocal**

Tendo sido encontradas diferenças significativas no número absoluto de células CD4+, CD8+ e BrdU+ através de citometria de fluxo, tornou-se interessante realizar uma análise *in situ* dessas subpopulações. Para tal fim a microscopia confocal a *laser* foi a metodologia escolhida.

Os linfonodos dos animais tratados com LSS apresentaram uma marcação muito clara para o BrdU, quando comparados ao controle (Figura 15). Já as moléculas CD4 e CD8 não apresentaram essa marcação, quando comparados com o controle etanol (Figura 15). Por outro lado, quando avaliamos os animais tratados com TX-100, há uma forte marcação para as três moléculas estudadas CD4, CD8 e do marcador de proliferação BrdU, quando comparados com o etanol (Figura 15). Analisando de forma qualitativa os resultados indicam uma maior expressão do marcador BrdU e das moléculas CD4 e CD8, nos animais tratados com TX-100, quando comparamos com os animais tratados com LSS. Da mesma forma, os animais que foram tratados com as substâncias sensibilizantes DNCB e PPD apresentaram uma forte marcação do BrdU, quando comparados com o controle A/OO. Com as moléculas CD4 e CD8 não foram constatadas diferenças quando comparadas com a A/OO (Figura 16).



**Figura 15:** Expressão de BrdU, CD4 e CD8 nos linfonodos. Corte de linfonodos congelados, analisados com os anticorpos CD4, CD8 e BrdU nos linfonodos de animais tratados com LSS, TX-100 e o controle Etanol, analisados em microscópio confocal. Os insertos representam a Ig. Aumento 40X.



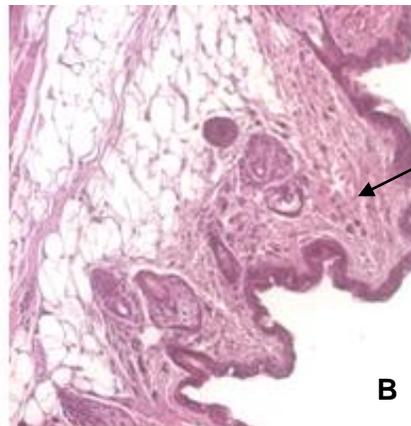
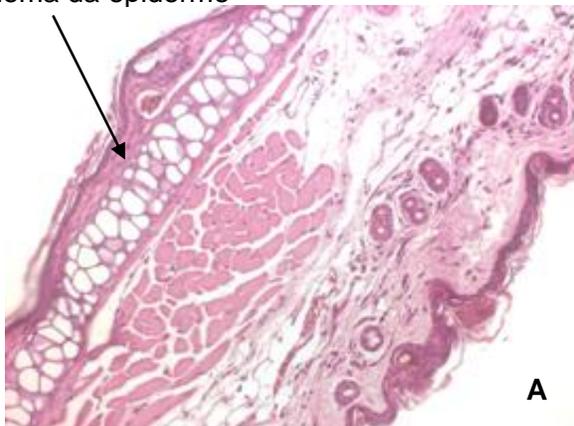
**Figura 16:** Expressão de BrdU, CD4 e CD8 nos linfonodos. Corte de linfonodos congelados, analisados com os anticorpos CD4, CD8 e BrdU nos linfonodos de animais tratados com DNCB, PPD e o controle A/OO, analisados em microscópio confocal. Os inserts representam a Ig. Aumento 40X.

#### **4.8 Alterações histológicas das orelhas de camundongos**

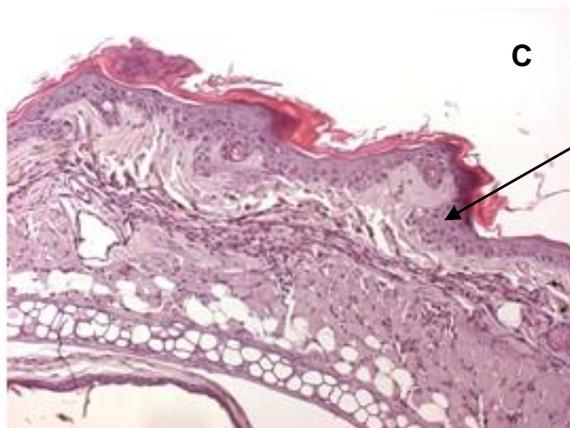
Diversos trabalhos demonstram que depois do tratamento por três dias consecutivos, a espessura das orelhas dos camundongos é aumentada significativamente, quando comparadas com os animais que foram tratados com substâncias sensibilizantes e irritantes em relação aos seus controles (Saint-Mezard *et al.*, 2003, O' Leary *et al.*, 2006, Bonneville *et al.*, 2007, Larsen *et al.*, 2007, Ku *et al.*, 2008). Este desfecho vem sendo sugerindo na literatura como aprimoramento do LLNA. Faltam, no entanto, dados sobre a histopatologia comparativa das orelhas dos animais. No presente trabalho, um exame histopatológico preliminar das orelhas de animais tratados com as substâncias sensibilizantes e irritantes foi feito.

Nos grupos tratados com os veículos Etanol e A/OO não foram encontradas alterações patológicas teciduais, a partir do exame histológico (Figura 17A e Figura 18A). Já as substâncias sensibilizantes (DNFB e PPD) (Figura 17B e 17C), e as substâncias irritantes (LSS e Triton X-100) (Figura 18B e 18C), induziram uma hiperplasia da epiderme, e infiltrado celular nas orelhas dos animais.

Camada basal e células epidérmicas preservadas, ausência de edema da epiderme



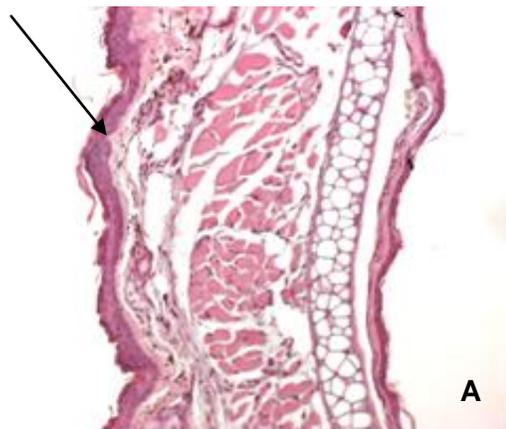
Presença de edema da epiderme



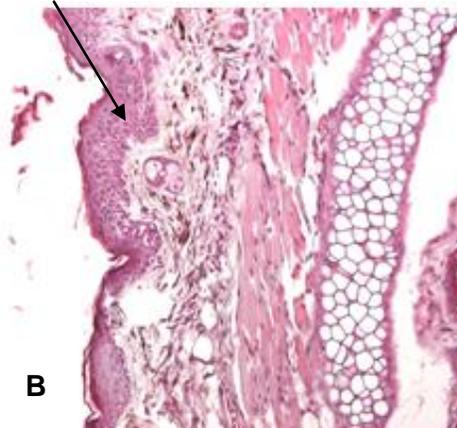
Presença de infiltrado celular e edema da epiderme

**Figura 17:** Mudança nas orelhas dos animais. (A) H&E das orelhas dos animais tratados com o veículo Etanol (aumento de 20X), ausência de infiltrado inflamatório e edema da epiderme. (B) H&E das orelhas dos animais tratados com LSS (aumento de 20X), presença de infiltrado inflamatório e edema da epiderme. Também é mostrado H&E das orelhas dos animais tratados com Triton X-100 (aumento de 20X), presença de infiltrado inflamatório e edema da epiderme.

Camada basal e células epidérmicas preservadas, ausência de edema da epiderme



Presença de infiltrado celular e edema da epiderme e derme.



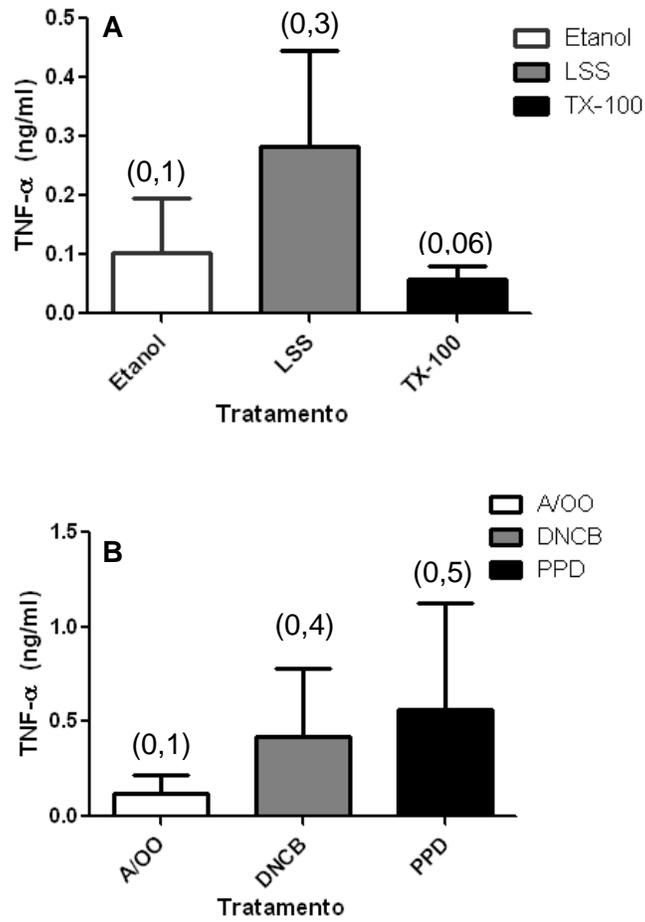
Presença de infiltrado celular e edema da epiderme.

**Figura 18:** Mudança nas orelhas dos animais. (A) H&E das orelhas dos animais tratados com o veículo A/OO (aumento de 20X), ausência de infiltrado inflamatório e edema da epiderme. (B) H&E das orelhas dos animais tratados com DNCB (aumento de 20X), presença de infiltrado inflamatório e edema da epiderme. Também é mostrado H&E das orelhas dos animais tratados com PPD (aumento de 20X), presença de infiltrado inflamatório e edema da epiderme.

#### **4.9 Análise de citocinas no soro dos animais tratados com sensibilizantes e irritantes.**

Os linfócitos TCD4 e TCD8 secretam uma variedade de citocinas que parecem estar envolvidas na resposta inflamatória da hipersensibilidade de contato (Goutet, 2005). Além disso, o papel das citocinas na DCA e DCI é de grande interesse da comunidade científica, isso porque diferentes citocinas são provavelmente secretadas na DCI e nas diferentes fases da DCA (Effendy, 2000). Desse modo, nós investigamos o perfil de duas citocinas, a Interleucina-4 (IL-4), secretada por células T<sub>H</sub>2 (subpopulação de células TCD4 efetora), e TNF- $\alpha$ , secretada por queratinócitos nas dermatites de contato, macrófagos e células T.

Foi observado um aumento da citocina TNF- $\alpha$  nos soros de animais tratados com os sensibilizantes DNCB e PPD, comparados aos soros de animais que foram tratados com o veículo A/OO. Nos soros de animais tratados com os irritantes, observamos o aumento da citocina TNF- $\alpha$  apenas nos animais que foram tratados com LSS, comparados aos animais que foram tratados com o veículo etanol (Figura 19). Em relação a citocina IL-4 não encontramos uma quantidade suficiente da citocina para que fosse analisada, tanto para os animais tratados com os sensibilizantes, quanto para os animais tratados com os irritantes.



**Figura 19:** Aumento da citocina TNF- $\alpha$ . (A) Aumento da secreção de citocinas no soro de animais tratados com os irritantes LSS e TX-100, em relação ao controle etanol. (B) Aumento da secreção de citocinas no soro de animais tratados com os sensibilizantes DNCB e PPD, em relação ao controle A/OO. Dados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, com 4 animais por grupo

## V. DISCUSSÃO

A regulamentação do uso de animais para fins científicos e didáticos é uma preocupação constante no meio acadêmico, além de ser assunto que desperta o interesse da sociedade. Nas últimas décadas surgiram várias instituições com a finalidade de implementar condutas, legislações e fiscalizações a respeito da utilização de animais em pesquisa. Diversas metodologias alternativas já foram implantadas, sendo este um processo complexo desde seu desenvolvimento até sua aceitação regulatória (CAZARIN *et al.*, 2004). É de grande interesse das instituições regulamentadoras a busca de novas metodologias e aprofundamento das metodologias já validadas.

Hoje na literatura, encontramos diversas metodologias alternativas ao uso de animais de laboratório. No presente estudo o LLNA foi investigado visando o aprimoramento deste teste que é atualmente o ensaio alternativo aos testes de Buhler e maximização. Diversos trabalhos demonstraram a funcionalidade do LLNA e a importância desse teste para a avaliação do potencial sensibilizante de várias substâncias, presentes principalmente no meio ambiente, cosméticos e produtos de higiene pessoal (SUDA *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004; JUNG *et al.*, 2009). O aprimoramento do LLNA vem sendo alvo de discussão nos grupos científicos que se preocupam com o desenvolvimento de metodologias alternativas, visto que o desfecho do teste, proliferação celular é falho. Nessa dissertação foram abordados: a padronização do teste com o marcador de proliferação BrdU, a expressão de distintas moléculas em células dos linfonodos tratados com substâncias sensibilizantes e irritantes, a quantificação de citocinas importantes na DCA e DCI e a morfologia das orelhas dos camundongos através de análise histopatológica.

Dada a complexidade dos dados obtidos nesta dissertação, esta discussão foi dividida em tópicos.

### **Peso dos animais**

Inicialmente, foi investigado se nas doses utilizadas as substâncias sensibilizantes e irritantes poderiam induzir a perda de peso nos animais. De fato uma alteração no peso dos animais poderia influenciar no sistema imunológico dos animais (RIBEIRO *et al.*, 2004) e deixaria dúvidas quanto as reações observadas neste estudo. Os resultados obtidos demonstraram que os animais tratados tanto com as substâncias sensibilizantes, quanto com as substâncias irritantes não apresentaram perda de peso durante o tratamento. Pode-se então afirmar que a dose utilizada não gerou nenhuma toxicidade que induzisse a perda de peso dos animais.

### **Padronização do LLNA**

O Ensaio do linfonodo local murino está descrito nos compêndios do ECVAM e ICCVAM (ICCVAM, 1999; ECVAM, 2000), com o desfecho de proliferação medido com timidina tritiada. Mais recentemente, também o LLNA alternativo, onde a proliferação celular é medida através do marcador não radioativo BrdU foi descrito por esses órgãos (ECVAM, 2008; ICCVAM, 2008). No entanto, pelo menos duas características do teste permanecem em aberto, sua padronização depende do laboratório interessado no ensaio. Uma delas é como mensurar o BrdU e quais reagentes utilizar. Nesta dissertação o BrdU foi marcado utilizando um kit comercial e com reagentes preparados no laboratório e quantificado através de duas metodologias: citometria de fluxo e imunofluorescência *in situ*, através de microscopia confocal a *laser*. Em ambas (kit e reagentes preparados no laboratório) podemos confirmar a marcação do BrdU. As duas metodologias empregadas foram recomendáveis, nas condições deste estudo para a avaliação do BrdU. No entanto a quantificação desta molécula só foi possível por citometria de fluxo. A avaliação quantitativa *in situ* exigiria um número muito maior de amostras. Neste caso esta metodologia, embora muito interessante, quando se objetiva avaliar comparativamente os resultados obtidos com a citometria, fugiríamos do escopo de metodologia alternativa, pois o número de animais a serem utilizados seria o mesmo do teste de Buhler e maximização

(10/20 animais por grupo). Outra característica do LLNA descrita nesta dissertação é que enquanto muitos trabalhos na literatura utilizam pool de linfonodos dos grupos tratados e controles (SIKORSKI *et al.*, 1996; GERBERICK *et al.*, 2002; HUMPHREYS *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2004; GERBERICK *et al.*, 2007; BETTS *et al.*, 2007), no presente estudo foi utilizado o pool dos dois linfonodos de cada camundongo tratado. Sendo assim, os dados individuais foram obtidos e foi possível observar a variação do tratamento em cada grupo. Isto só foi possível, com a utilização de placas de 96 poços para a marcação das células, necessitando desta forma de um volume menor tanto de células quanto de anticorpos quando comparados ao volume necessário para tubos específicos de citometria de fluxo.

Por fim, o teste foi padronizado utilizando reagentes preparados no laboratório, a quantificação das amostras foi feita através de citometria de fluxo e os dados foram obtidos com pool de dois linfonodos de cada camundongo tratado.

### **Análise das subpopulações de linfócitos**

O próximo passo foi avaliar a celularidade, ativação e proliferação dos linfócitos nos linfonodos de drenagem desses animais. A aplicação tópica de alérgenos químicos (haptens) leva a expansão de células nos linfonodos de drenagem. Esses haptens são reconhecidos e capturados por células especializadas e logo após essa captura migram para o linfonodo de drenagem mais próximo. No linfonodo essas células apresentam esses antígenos aos linfócitos, esse processo é importante para maturação, ativação, expansão dessas células e o desenvolvimento da resposta imune (SAINT – MEZARD *et al.*, 2004; BONNEVILLE *et al.*, 2007; TOEBACK *et al.*, 2009). Os resultados aqui obtidos revelaram um aumento da celularidade nos linfonodos de animais tratados tanto com as substâncias sensibilizantes DNFB e PPD quanto com as substâncias irritantes LSS e TX-100. Embora a grande maioria dos irritantes sejam negativos para o LLNA, na literatura encontramos artigos que mostram que alguns irritantes induzem acúmulo e proliferação celular, assim como os sensibilizantes (GERBERICK *et al.*, 1992; MONTELIUS *et al.*, 1994; BASKETTER *et al.*, 1998,

JUNG *et al*, 2009). Em um estudo realizado por de Silva colaboradores (1993), foi visto um aumento no número total de linfócitos T em camundongos com o alérgeno DNCB, esse aumento foi maior do que o observado com o irritante LSS. Ku e colaboradores também observaram um aumento da celularidade em alérgenos e irritantes, o aumento da celularidade também foi maior para os animais tratados com as substâncias sensibilizantes (KU *et al.*, 2008) Da mesma forma, descrevemos que este aumento foi maior para o primeiro grupo (Sensibilizantes). Demonstramos um aumento da celularidade nos linfonodos dos camundongos após o tratamento com as substâncias sensibilizantes e irritantes, sendo que somente o tratamento com as substâncias sensibilizantes foi capaz de induzir um aumento significativo de células positivas para o BrdU, indicando dessa forma, que houve proliferação celular nos linfonodos de drenagem dos animais tratados com PPD e DNCB. Jung e colaboradores indicam um aumento da incorporação de BrdU após tratamento com LSS (JUNG *et al.*, 2009), no entanto não confirmamos esses dados. Este fato deve-se provavelmente, por questões metodológicas e principalmente pela diferença da cepa utilizada nessa dissertação (CBA) e a que foi utilizada no trabalho do autor (BALB/c).

Em seguida os linfócitos T e B foram analisados através da marcação de CD4, CD8 e B220 respectivamente.

A contribuição respectiva das células TCD4 e TCD8 na dermatite de contato tem sido analisada através de algumas estratégias como, por exemplo, depleção *in vivo* de camundongos normais com anticorpos monoclonais (mAbs) anti-CD4 e anti-CD8 e o uso de camundongos nocautes para MHC de classe II e MHC de classe I (deficientes em células T CD4 e TCD8 respectivamente). Usando a depleção *in vivo* de subpopulações de células T CD4 e CD8, Gocinski e Tigelar foram os primeiros a sugerir que as células T CD8 podiam mediar à resposta da DC ao sensibilizante dinitrofluorbenzeno (DNFB) e outros haptenos fortes. Os mesmos autores, posteriormente, mostraram que as células TCD4 podiam regular a resposta a DC, uma vez que a reação se tornava exacerbada com depleção *in vivo* das células TCD4. Bour e colaboradores usaram camundongos nocautes

para MHC de classe I e MHC de classe II, que são deficientes em células T CD8 e T CD4, respectivamente. Os camundongos nocautes para MHC I, ou seja deficientes para células T CD8, não desenvolveram nenhuma resposta ao sensibilizante DNFB, indicando que essas células eram essenciais para o desenvolvimento da patologia. Em camundongos nocautes para MHC de classe II uma reação exacerbada foi observada com inflamação cutânea crônica. Os autores concluíram que as células T CD4 se comportariam como células reguladoras e as células T CD8 seriam efetoras na dermatite de contato (BOUR *et al.*, 1995). Embora, esses autores tenham mostrado que as células T CD8 têm um papel efetor na dermatite de contato (DC), outros estudos mostram que as células T CD4 podem ser efetoras na dermatite de contato quando a população de células TCD8 é deficiente. Usando camundongos C57BL/6 normais e camundongos nocautes para MHC classe I, esses autores estudaram a dermatite de contato com os sensibilizantes Dinitrofenol (DNP) e Trinitrofenol (TNP). O TNP foi capaz de induzir uma resposta de DC nos C57BL/6 que foi inibida pela depleção *in vivo* das células T CD8 usando anticorpos monoclonais específicos. Os camundongos nocautes para classe I foram capazes de desenvolver uma reação de hipersensibilidade de contato normal ao TNP (MARTIN *et al.*, 2000).

Larsen e colaboradores demonstraram a importância dos linfócitos T nas duas fases da dermatite de contato, a fase aferente (sensibilização) e a fase eferente (desafio). Esses autores encontram um acúmulo e uma maior proliferação de célula TCD4 na fase aferente, sugerindo que essas células são dominantes nessa fase, e um maior número de células TCD8 proliferando na fase eferente, sugerindo que essas células têm um papel decisivo nessa fase (LARSEN *et al.*, 2007). Na literatura encontramos algumas controvérsias, animais tratados com DNCB e LSS tiveram o percentual de células CD4+ e CD8+ diminuído em relação aos seus respectivos controles (LEE *et al.*, 2004). Sikorski e colaboradores observaram um aumento de células TCD4 nos linfonodos de animais tratados com o irritante Cloreto de benzalcônio (BC), e um decréscimo de células CD4+ em animais tratados com Tinitroclobenzeno (TNCB) (SIKORSKI *et al.*, 1996). O mesmo autor não observou diferença na subpopulação de células CD8+ em

animais tratados com irritantes e sensibilizantes. Tanto os dados obtidos com a citometria de fluxo quanto com a microscopia confocal não revelaram alteração no percentual dessas subpopulações linfocitárias. Por outro lado, foi demonstrado um aumento significativo no número absoluto de células CD4+ e CD8+ nos linfonodos de drenagem de animais tratados com DNCB e PPD em relação ao controle A/OO. Já nas substâncias irritantes encontramos um aumento significativo somente de células CD4+, e esse aumento foi apenas para animais tratados com o TX-100, assim como no percentual. O aumento do número absoluto dos linfócitos TCD4 e TCD8 também foi visto em animais tratados com o sensibilizante DNFB (LARSEN et al., 2007), e animais tratados com os sensibilizantes Oxazolina e TNCB e o irritante BC (SIKORSKI et al., 1996). Quando comparamos as substâncias sensibilizantes com as irritantes, encontramos um maior número de células CD4+ nas substâncias sensibilizantes, no entanto, em relação as células CD8+ não houve diferença. Na literatura, encontramos poucos trabalhos com as substâncias irritantes envolvendo a participação das células CD4+ e CD8+. Em relação a atividade proliferativa das subpopulações CD4 e CD8 nos linfonodos de drenagem, os resultados obtidos aqui apontaram um aumento das células CD4+BrdU+ nos animais tratados com DNCB, quando comparamos com o veículo A/OO. Esse resultado também foi visto em um estudo realizado por Kuhn e colaboradores (1995) com o sensibilizante oxazalina, os autores observaram a proliferação de células CD4+, quando comparado com o controle. Suda e colaboradores também observaram um aumento proliferativo das células CD4+ em relação ao controle (SUDA et al., 2002). Os resultados aqui obtidos revelaram um maior número de células CD8+ em relação as células CD4+, esse aumento foi visto apenas nos linfonodos de animais tratados com as substâncias sensibilizantes. Os resultados aqui descritos podem indicar o papel efetor das células CD8+ na dermatite de contato.

No que diz respeito as células B, camundongos expostos a alérgenos tiveram o percentual de células B aumentado nos linfonodos de drenagem (SUDA et al., 2002; LEE et al., 2004). Gerberick e colaboradores sugeriram que análise da expressão do marcador B220 pode diferenciar alérgenos de irritantes

(GERBERICK *et al.*, 2002). Outros autores demonstraram a importância das células B-1 (uma subpopulação de células B envolvida na resposta imune inata). Essas células são ativadas nos órgãos linfóides e produzem anticorpos IgM logo após a sensibilização cutânea. Esses anticorpos se ligam aos haptenos imediatamente após o contato (CAMPOS *et al.*, 2003). Além disso, camundongos desprovidos de células B têm a resposta a hipersensibilidade de contato reduzida (SEIDEL-GUYENOT *et al.*, 2004). Demonstramos um aumento no número absoluto de células B220+. Esse aumento foi significativo para a substância sensibilizante DNCB e para substância LSS, quando comparados com seus respectivos controles. Encontramos um maior número de células B nas substâncias irritantes e não nas substâncias sensibilizantes, ao contrário do que descrito por Geberick e colaboradores (2002). Quando comparamos o número absoluto dessas células com as células T nas substâncias irritantes, observamos um aumento em relação às células T. O aumento das células B em relação às células T já foi observado, porém com substâncias sensibilizantes (KUHN *et al.*, 1995, SIKORSKI *et al.*, 1996, LARSEN *et al.*, 2007). O tratamento com a substância sensibilizante PPD revelou uma tendência ao aumento das células B e com a substância irritante TX-100 não observamos um aumento quando comparamos com o seu controle. Em relação a subpopulação de células B220+BrdU+ nos linfonodos de drenagem, tenderam a aumentar com o irritante LSS e o sensibilizante DNCB, quando comparados com seus controles, porém esta tendência não foi estatisticamente significativa. No entanto, um maior número de células B proliferando nas substâncias sensibilizantes e não nas substâncias irritantes foi visto. Esse aumento proliferativo das células B também foi visto por Larsen e colaboradores (2007), indicando uma participação das células B na dermatite de contato alérgica.

Além da análise de células T e B, investigamos também se essas subpopulações expressavam alguns marcadores de ativação, como por exemplo, CD25 e o CD69 e o marcador de adesão CD11a. Este último é também conhecido como LFA-1 (*antígeno 1 associado à função leucocitária*), sendo expresso na grande maioria das células T ativadas.

Um dos primeiros antígenos de superfície celular expresso pelas células T após a ativação é o CD69. Uma vez expresso nas células, o CD69 atua como uma molécula de co-estimulação para a proliferação de células T e também é expresso pelas células B, células *natural killer* (NK), monócitos, neutrófilos e eosinófilos, e é constitutivamente expresso pelos timócitos maduros e plaquetas (ZIEGLER et al., 1994). O CD25 é a cadeia  $\alpha$  do receptor IL-2 e expresso em células T e B ativadas (RING et al., 2009). Neste estudo quando analisamos os linfócitos T em relação aos marcadores de ativação CD25 e CD69, observamos um aumento no número absoluto das células CD4 e CD8 expressando esses dois marcadores de ativação. Este aumento das células CD4+CD25+ e CD8+CD69+ ocorreu nos linfonodos de animais tratados com as substâncias sensibilizantes DNCB e PPD. Para a subpopulação de células CD4+CD69+ esse aumento foi visto apenas em animais tratados com a substância PPD. Nos linfonodos de animais tratados com as substâncias irritantes um aumento de células CD4+CD69+ foi apenas detectado no grupo tratado com LSS. Já o grupo tratado com TX-100 mostrou uma tendência ao aumento destas células, porém este resultado não pode ser confirmado estatisticamente. Por questões técnicas não analisamos as células CD8, nas substâncias irritantes. Os dados descritos aqui para as substâncias sensibilizantes estão de acordo com Homey e colaboradores (1998), estes autores observaram que o tratamento tópico com oxazolina provocou um aumento de células expressando os marcadores de ativação CD25 e CD69, quando comparado com o seu controle. Esse aumento foi maior em células CD4+ em relação as células CD8+. Os mesmos autores quando analisaram a substância irritante óleo de cróton não observaram um aumento significativo quando comparado com o controle (HOMEY et al., 1998). Em relação o marcador BrdU+ nessas subpopulações, não encontramos diferenças significativas nos linfonodo de animais tratados com LSS e TX-100. Porém, os resultados indicam um aumento de células CD4+CD69+BrdU+ e CD4+CD25+BrdU+ em animais tratados com a substância LSS em relação ao controle etanol. No entanto, no que diz respeito aos animais tratados com as substâncias sensibilizantes, observamos um aumento BrdU+ nas células CD4+CD69+ para animais tratados com DNCB,

CD4+CD25+ para animais tratados com DNCB e PPD e nas células CD8+CD25+ para animais tratados com PPD.

Além de analisar a expressão das subpopulações CD4, CD8 e o marcador de proliferação BrdU por citometria de fluxo, analisamos também a expressão dessas moléculas *in situ*. Alguns artigos anteriormente, mostraram a expressão *in situ* do marcador de proliferação BrdU. Boussiquet e colaboradores (1995) foram os primeiros a demonstrarem a possibilidade de analisar *in situ* o marcador de proliferação não-radioativo no método alternativo LLNA. Esses autores mostraram uma resposta proliferativa ao dicromato de potássio e identificaram a área paracortical como o local de maior proliferação celular (apud LEE *et al.*, 2002). Lee e colaboradores utilizando camundongos da cepa Balb/c observaram *in situ* aumento da expressão de células B, via receptor B220 (LEE *et al.*, 2002). Os mesmos autores demonstraram aumento na proliferação celular nos linfonodos de animais tratados com os sensibilizantes DNCB, HCA (Cinamaldeído Hexyl- $\alpha$ ) e o alérgeno respiratório TDI (Diisocianato de tolueno), porém, esse aumento não foi visto com o irritante LSS (LEE *et al.*, 2003). Recentemente, esse aumento do marcador de proliferação BrdU também foi visto nas substâncias sensibilizantes PPD e DNCB e na substância irritante LSS (JUNG *et al.*, 2009). Os resultados obtidos sugerem um aumento de proliferação nos animais tratados com as substâncias sensibilizantes DNCB e PPD, quando comparado com o controle A/OO, mas também animais tratados com as substâncias LSS e TX-100. Visto que não foi observado um aumento na marcação de BrdU por citometria de fluxo para as substâncias irritantes este resultado não era esperado. Por outro lado, seriam necessários aqui estudos envolvendo um maior número de animais e de amostras para que uma análise quantitativa fosse realizada e também para que um número maior de campos nas lâminas pudesse ser analisado. Em relação a expressão das moléculas CD4 e CD8 não encontramos diferenças entre os animais tratados com o controle A/OO e as substâncias sensibilizantes. Na substância LSS parece também não existir um aumento dessas moléculas em relação ao controle etanol. Por outro lado, quando avaliamos os animais tratados com TX-100, verificamos uma tendência ao aumento tanto das moléculas CD4, CD8, quando comparadas

com o veículo etanol. Esse resultado confirma o que vimos por citometria de fluxo, um aumento das moléculas CD4 em animais tratados com a substância TX-100, tanto no número absoluto quanto na porcentagem dessas células, novamente esses resultados devem ser consideráveis apenas como preliminares. No entanto, o estudo comparativo da expressão das moléculas CD4 e CD8 após tratamento com substâncias sensibilizantes e irritantes *in situ* ainda não foi publicado por nenhum autor.

### **Perfil de citocinas na DCA e DCI**

Uma variedade de citocinas parece exercer papéis fundamentais para a resposta da dermatite de contato, como por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-4 e IL-6 (WATANABE *et al.*, 2002; SEBASTIANI *et al.*, 2002; AZAM *et al.*, 2005; ANTONOPOULOS *et al.*, 2008; TOEBAK *et al.*, 2009). O papel das citocinas é de grande interesse para o entendimento dos mecanismos patológicos da DCA e DCI (EFFENDY *et al.*, 2000). O TNF-  $\alpha$ , por exemplo, é secretado principalmente por queratinócitos e células T, e de acordo com a literatura esse tipo celular não está envolvido somente na DCA, mas também na DCI (EFFENDY *et al.*, 2000). O TNF-  $\alpha$  é encontrado aumentado na DCI, desse modo, acredita-se que esse seja um mediador inflamatório importante (SAINT – MEZARD *et al.*, 2004). Na DCA essa citocina também encontra-se aumentada estando envolvida na migração das CL para linfonodos de drenagem, sendo muito importante para o início da resposta a (KIMBER *et al.*, 2002, 2003). No presente estudo a citocina TNF-  $\alpha$  foi investigada no soro de animais tratados com sensibilizantes e irritantes. Os resultados preliminares aqui obtidos demonstraram um aumento dessa citocina no soro de animais tratados tanto com os sensibilizantes quanto com os animais tratados com o irritante LSS, quando comparados com seus respectivos controles. No entanto, esse resultado não pode ser confirmado estatisticamente. E isso se deve provavelmente ao fato de que poucas amostras foram analisadas até a presente data. Outra citocina importante é a IL-4, essa citocina parece exercer um importante papel durante a fase eferente (desafio, re-exposição do antígeno). Weigmann e colaboradores (1997) demonstraram que a resposta a DCA na fase

do desafio foi comprometida em animais deficientes para IL-4. Em relação a citocina IL-4, não foi encontrada uma quantidade suficiente para a análise, tanto no soro de animais tratados com os irritantes quanto para os animais tratados com os sensibilizantes. De fato, isso já era esperado, pois um maior aumento dessa citocina é encontrado na fase eferente da DCA e essa fase não é avaliada no LLNA.

### **Alterações patológicas nas orelhas dos animais**

De acordo com Sociedade Brasileira de Dermatologia (2001), o exame histopatológico diagnóstico para a dermatite de contato apresenta os seguintes critérios: o estrato córneo apresenta-se normal, a epiderme pode estar espessada com a presença de edema entre queratinócitos progredindo para a formação de vesículas intra-dérmicas. Há presença de exocitose de linfócitos (presença de linfócitos invadindo a epiderme) e infiltrado inflamatório. Na literatura encontramos diversos artigos que mostram algumas dessas alterações histopatológicas. Lee e seus colaboradores observaram um aumento proliferativo com o marcador BrdU nas células da epiderme, em animais tratados com DNCB, TDI, HCA e LSS quando comparados com seus controles (LEE *et al.*, 2003). Outros autores analisaram a contribuição das células TCD4 e TCD8 na Dermatite de contato alérgica primária (Indivíduos que podem desenvolver uma dermatite de contato com uma única aplicação de um sensibilizante forte). Usando anticorpos monoclonais, os animais tiveram as células TCD4 e TCD8 depletadas e foram tratados com o sensibilizante severo DNFB. Os animais que tiveram as células TCD4 depletadas apresentaram um maior edema da derme e uma significativa infiltração celular, quando comparados com animais normais tratados com DNFB. Em contraste, os animais sem as células TCD8 não exibiram nenhuma alteração patológica. Bonneville e colaboradores mostraram que a resposta a DCI é mais severa em camundongos da cepa C57Bl/6 do que em camundongos da cepa BALB/c. Os camundongos das duas cepas foram tratados com DNFB, e a espessura das orelhas foi avaliada, camundongos da cepa C57Bl/6 após 3 horas do tratamento demonstravam um edema maior que os camundongos BALB/c. Da

mesma forma, a análise histológica demonstrou que após 6 horas do tratamento os camundongos C57Bl/6, revelaram um infiltrado celular na derme e um edema maior dos que os animais BALB/c (BONNEVILLE *et al.*, 2007). Jung e colaboradores mostraram um aumento de peso das orelhas que foram tratadas com LSS e PPD 1%, em relação aos controles e analisando o aspecto histológico encontraram hiperplasia da epiderme e infiltrado inflamatório (JUNG *et al.*, 2009). Da mesma forma, Ku e colaboradores mostram com outros sensibilizantes (DNFB e OXA) e o irritante óleo de cróton (CRO), que essas substâncias induzem hiperplasia da epiderme e infiltrado inflamatório (KU *et al.*, 2009). Os resultados aqui estão de acordo com os achados de Jung e colaboradores (2009) e Boneville e colaboradores (2007), tendo sido encontradas as mesmas alterações patológicas, hiperplasia e infiltrado, tanto para as substâncias sensibilizantes quanto para irritantes.

## VI CONCLUSÃO

Com os dados apresentados nesta dissertação é possível concluir que:

- A marcação de BrdU, tanto com o kit quanto com os reagentes comprados separadamente e preparados em laboratório é viável.
- O ensaio pode ser realizado com pool de linfonodos auriculares de cada camundongo individualmente, desde que sejam utilizadas placas de 96 poços e não tubos de FACS.
- A quantificação do BrdU por citometria de fluxo para desfecho de proliferação celular para identificação de substâncias sensibilizantes severas no LLNA é possível. No entanto, quando avaliado o mesmo marcador de proliferação celular por microscopia confocal este desfecho se mostrou questionável. Destarte, não foi possível investigar no âmbito desta dissertação o que aconteceria caso utilizadas substâncias moderadas e fracas. Estas questões permanecem em aberto e poderão ser estudadas posteriormente.
- Dos receptores estudados o mais promissor para identificação de substâncias sensibilizantes severas foi a cadeia  $\alpha$  do receptor IL-2. Sendo este receptor tanto um marcador de ativação quanto de células T reguladoras, este achado se torna bastante interessante. Além disso, já foi proposto que células T regulatórias participariam da DCA (RING et al., 2009) Para tal fim os marcadores FOXP3 e NP1 (Neuropilina) seriam os mais indicados (CORBEL *et al.*, 2007; RING et al., 2009).
- Os dados do ELISA demonstraram que mensurar citocinas também poderia ser uma alternativa para a identificação de substâncias sensibilizantes e

irritantes no LLNA. Talvez aqui, possa ser aplicada uma técnica onde o rastreamento simultâneo de varias citocinas, dentre elas quimiocinas, seja possível, tal como LUMINEX.

- Por fim, as análises histopatológicas das orelhas dos animais tratados com substâncias sensibilizantes e irritantes, não apresentaram diferenças.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Elsevier, 2006.

ABIHPEC. **Dados de Mercado**: Indicadores Econômicos. Disponível em: <[http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado.indicadores\\_economicos.php](http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado.indicadores_economicos.php)>. Acesso em: 02 abr. 2010.

ANDERSEN, K. E. Occupational issues of allergic contact dermatitis. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 76, p. 347-350. 2003.

ANTONOPOULOS, C. et al. IL-18 is a key proximal mediator of contact hypersensitivity and allergen-induced Langerhans cell migration in murine epidermis. **J Leukoc Biol**. v. 83, n. 2, p. 361-367. 2007

AZAM, P.; PEIFFER, J. L.; CHAMOUSSET, D.; TISSIER, M. H.; BONNET, P. A.; VIAN, L.; FABRE, I.; OURLIN, J. C. (2005) The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. **Toxicol Appl Pharmacol**. 1;212 (1):14-23.

BARDANA, J. R. B. J. (2003) Occupational asthma and allergies. **J. Allergy Clin. Immunol**. 111: S530-S539.

BASKETTER, D. A.; GERBERICK, G. F.; KIMBER, I. (1998) Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization test. **Food Chem. Toxicol**.36:237-333.

BASKETTER, D. A.; GERBERICK, G. F.; KIMBER, I.; (1998) Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization test. **Food Chem. Toxicol**.36:237-333.

BASKETTER, D.; DARLENSKI, R.; FLUHR, J. W. (2008) Skin irritation and sensitization: mechanisms and new approaches for risk assessment. **Skin Pharmacol Physiol** 21(4):191-202.

BETTS, C. J.; DEARMAN, R.J.; KIMBER, I.; RYAN, C.A.; GERBERICK, G. F.; LALKO, J.; API, A..M. (2007) B220 analysis with the lymph node assay: proposal for a more flexible prediction model. **J. Appl. Toxicol**. 27(5): 506-510

BEVAN. M. J. (2004) Helping the CD8+ T-cell response. **Nature Reviews Immunology** 4, 595-602.

BIGAZZI, P. E. (1997) Autoimmunity caused by xenobiotics. **Toxicology** 119:1-21

BONNEVILLE, M.; CHAVAGNAC, C.; VOCANSON, M.; ROZIERES, A.; BENETIERE, J.; PERNET, I.; DENIS, A.; NICOLAS, J.F.; HENNINO, A. (2007) Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 127(6):1430-5.

BOUR, H.; PEYRON, E.; GAUCHERAND, M.; GARRIGUE, J. L.; DESVIGNES, C.; KAISERLIAN, D. (1995) Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol.* 25: 306-10.

BOUSSIQUET-LEROUX, C.; DURAND-CAVAGNA, G.; HERLIN, K.; HOLDER, D. (1995) Evaluation of lymphocyte proliferation by immunohistochemistry in the local lymph node assay. *J. Appl. Toxicol.* 15, 465–475.

CAMPOS, R. A.; SZCZEPANIK, M.; ITAKURA, A.; AKAHIRA-AZUMA, M.; SIDOBRE, S.; KRONENBERG, M. (2003) Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant V $\alpha$ 14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med.* 198:1785-96.

CASEMIRO, L. Riscos da beleza: Anvisa fará campanha sobre uso de cosméticos. *O Globo*, Rio de Janeiro, Março. 2008. Disponível em: [http://oglobo.globo.com/vivermelhor/mat/2008/03/31/riscos\\_da\\_beleza\\_anvisa\\_far\\_a\\_campanha\\_sobre\\_uso\\_de\\_cosmeticos-426612908.asp](http://oglobo.globo.com/vivermelhor/mat/2008/03/31/riscos_da_beleza_anvisa_far_a_campanha_sobre_uso_de_cosmeticos-426612908.asp). Acesso em 30/03/2010.

CAZARIN, K. C. C.; CORREA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. (2004) Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 40.

CORBEL, C.; LEMARCHANDEL, V.; THOMAS-VASLIN, V.; PELUS, A. S.; AGBOTON, C.; ROMÉO, P. H. (2007) Neuropilin 1 and CD25 co-regulation during early murine thymic differentiation. *Dev Comp Immunol.* 31(11):1082-94.

CORSINI, E.; MITJANS, M.; GALBIATI, V.; LUCCHI, L.; GALLI, C. L.; MARINOVICH, M. (2009) Use of IL-18 production in a human keratinocyte cell line to discriminate contact sensitizers from irritants and low molecular weight respiratory allergens. *Toxicol In Vitro.* 23(5):789-96.

DE GROOT, A. V. (1996) *Patch Testing: tests concentrations and vehicles for 3500 allergens.* Amsterdam: Elsevier.

DE JONG, W. H.; ARTS, J. H.; DE KLERK, A.; SCHIJF, M. A.; EZENDAM, J.; KUPER, C. F.; VAN LOVEREN, H. (2009) Contact and respiratory sensitizers can be identified by cytokine profiles following inhalation exposure. *Toxicology.* 10;261(3):103-11.

DE SILVA, O.; PEREZ, M. J.; PINEAU, N.; ROUGIER, A.; DOSSOU, K. G. (1993) Local lymph node assay: study of the in vitro proliferation and control of the specificity of the response by FACScan analysis. *Toxicology in vitro* 7(4):299-303.

DELAUNAY, J. L.; BRETON, M.; TRUGNAN, G.; MAURICE, M. (2008) Differential solubilization of inner plasma membrane leaflet components by Lubrol WX and Triton X-100. *Biochim Biophys Acta*. 1778 (1):105-12.

DENING, N. I.; HOKE, A. W.; MAIBACH, H. I. (1998) Irritant contact dermatitis - clues to causes, clinical characteristics and control. *Postgraduate Medicine*. 103(5):199-213.

DESCOTES, J. (1999) *An Introduction to immunotoxicology*. Taylor & Francis Reino Unido.

DIEPGEN, T. L. (2003) Occupational skin-disease data in Europe. *Int Arch Occup Environ Health* 76: 331-338.

DOS SANTOS, G. G.; REINDERS, J.; OUWEHAND, K.; RUSTEMEYER, T.; SCHEPER, R. J.; GIBBS, S. (2009) Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicol Appl Pharmacol*. 236(3):372-82.

DUARTE, I.; LAZZARINI, R.; BUENSE, R.; PIRES, M. C. (2000) Dermatite de contato. Contact dermatitis. *An bras Dermatol, Rio de Janeiro*, 75(5):529-548.

EBERHARD, Y.; ORTIZ, S.; RUIZ LASCANO, A.; KUZNITZKY, R.; SERRA, H. M. (2004) Up-regulation of the chemokine CCL21 in the skin of subjects exposed to irritants. *BMC Immunol*. 2004; 26:7.

(ECVAM) European Centre for the Validation of Alternative Methods (2008). Murine Local Lymph node assay Performance Standards.

(ECVAM) European Centre for the Validation of Alternative Methods (2000). Murine Local Lymph node assay Performance Standards.

EFFENDY, I.; LOFFIER, H.; MAIBACH, H. I. (2000) Epidermal cytokines in murine cutaneous irritant responses. *J. Appl. Toxicol*. 20:335-41.

FENWICK, N.; GRIFFIN, G.; GAUTHIER, C. (2009). The welfare of animals used in science: How the "Three Rs" ethic guides improvements. *Can Vet J*. 50(5): 523-530

GERBERICK GF, RYAN CA, DEARMAN RJ, KIMBER I. (2007) Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods*. 41(1):54-60.

GERBERICK, G. F.; CRUSE, L. W.; MILLER, C. M.; RIDDER, G. M. (1999 a) Selective modulation of B-cell activation markers CD86 and I-Ak on murine draining lymph node cells following allergen or irritant treatment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1;159 (2):142-51.

GERBERICK, G. F.; CRUSE, L. W.; RYAN, C. A. (1999b) Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry. *Methods.* 19(1): 48-55.

GERBERICK, G. F.; CRUSE, L. W.; RYAN, C. A.; HULETTE, B. C.; CHANEY, J. G.; SKINNER, R. A.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. (2002) Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicol Sci.* 68(2):420-8.

GERBERICK, G. F.; HOUSE, R. V.; FLETCHER, F. R.; RYAN, C. A (1992) Examination of the local lymph node assay for use in contact sensitization risk assessment. *Fundam Appl Toxicol.* 19: 438-445.

GOCINSKI, B. L.; TIGELAAR, R. E. (1990) Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J Immunol.*144:4121-8.

GOLDIM, R. J. & RAYMUNDO, M. M. (2002) Ética da pesquisa em modelos animais. *Bioética* vol. 10 - nº 1.

GOUTET, M.; PÉPIN, E.; LANGONNÉ, I.; HUGUET, N.; BAN, M. (2005) Identification of contact and respiratory sensitizers using flow cytometry. *Toxicology and Applied Pharmacology* 205: 259-270.

HAYASHI, T.; HASEGAWA, K.; ADACHI, C. (2005) Elimination of CD4+CD25+ T accelerates the development of glomerulonephritis during the preactive phase in autoimmune-prone female NZBX NZW F1 mice. *Int J Exp Path* 86:289-296.

HENINO, A.; SAINT-MEZARD, P.; NICOLAS, J. F; VACANSON, M.; DUBOIS, B.; CHAVAGNAC, C.; KAISERLIAN, D. (2005) Fisiopatologia da dermatite de contato alérgica: papel das células T CD8 efetoras e das células T CD4 regulatórias. *An Bras Dermatol.* 80 (4):335-47.

HOGAN, D & LEDET J. J. (2009) Impact of regulation on contact dermatitis. *Dermatol Clin.*

HOMEY, B.; VON SCHILLING, C.; BLUMEL, J.; SCHUPPE, H. C.; RUZICKA, T.; AHR, H. J.; LEHMANN, P.; VOHR, H. W. (1998) An Integrated Model for the Differentiation of Chemical-Induced Allergic and Irritant Skin Reactions. *Toxicology and applied pharmacology* 153, 83–94.

HUMPHREYS, N. E.; DEARMAN, R. J.; KIMBER, I. (2003) Assessment of cumulative allergen-activated lymph node cell proliferation using flow cytometry. *Toxicological Sciences* 73:80-89.

IDEHARA, K.; YAMAGISHI, G.; YAMASHITA, K.; ITO, M. (2008) Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 18462956.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. [www.inca.gov.br/conteudo](http://www.inca.gov.br/conteudo). Acesso no dia 03 de março de 2010.

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde [Fiocruz]. *Atividades Institucionais 2001/2004*, Rio de Janeiro: 2004.

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) (2008) Independent Scientific Peer Review Panel Meeting Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products: Validation Status of New Versions and Applications of the Murine Local Lymph Node Assay (LLNA).

Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)(1999). *The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)*. NIH Publication No. 99-4494.

JUNG, K. M.; BAE, H. I.; KIM, H. B.; KIM, K. W.; CHUNG, H.J.; PARK, H. Y.; LIM, M. K. (2009) Comparison of flow cytometry and immunohistochemistry in non radioisotopic murine lymph node assay using bromodeoxyuridine *Toxicology Letters* 192 229–237.

JUNQUEIRA, L.C & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10 ed. Guanabara Koogan, 2004.

KIMBER, I.; BASKETTER, A. D.; GERBERICK, G. F.; DEARMAN, R. J. (2002) Allergic contact dermatitis *International Immunopharmacology*. 2 201-211.

KIMBER, I.; CUMBERBATCH, M.; BETTS, C. J.; DEARMAN, R. J. (2003) Dendritic cells and skin sensitization hazard assessment. *Toxicology in vitro*. 18 195-202.

KIMBER, I.; DEARMAN, R. J.; BASKETTER, D. A.; RYAN, C. A.; GERBERICK, G. F. (2002) The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermat*. 47: 315-328.

KIMBER, I.; HILTON, J.; WEISENBERGER, C. (1998) The murine local lymph node assay for identification of contact allergens: A preliminary evaluation of in situ measurement of lymphocytes proliferation. *Contact Derm.* 21: 215-220

KREILING, R.; HOLLNAGEL, H. M.; HARENG, L.; EIGLER, D.; LEE, M. S.; GRIEM, P.; DREESSEN, B.; KLEBER, M.; ALBRECHT, A.; GARCIA, C.; WENDEL, A. (2008) Comparison of the skin sensitizing potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem Toxicol.* 46(6):1896-904.

Ku, H.O., Jeong, S.H.; Kang, H. G.; Pyo, H.M.; Cho, J.H.; Son, S.W.; Yun, S.M.; Ryu, D.Y. Gene expression profiles and pathways in skin inflammation induced by three different sensitizers and an irritant. *Toxicol Lett.* 2009 Oct 28;190(2):231-7. Epub 2009 Jul 30.

KU, H.O.; JEONG, S. H.; KANG, H. G.; PYO, H. M.; CHO, J. H.; SON, S. W.; RYU, D. Y.(2008) Analysis of differential gene expression in auricular lymph nodes draining skin exposed to sensitizers and irritants.*Toxicol Lett.* 177(1):1-9.

KUHN, U.; LEMPertz, U.; KNOP, J.; BCKER, D. (1995) A new method for phenotyping proliferating cell nuclear antigen positive cells for analysis of the flow cytometry: Implications for analysis of the immune response in vivo. *J. Immunol. Meth.* 179, 215-222.

KUPPER, T. S.; FUHLBRIGGE, R. C. (2004) Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 4(3):211-22.

LANDSVERK, O. J.; BAKKE, O.; GREGERS, T. F. (2009) MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scand J Immunol.* 70(3):184-93.

LARSEN, J. M.; GEISLER, C.; NIELSEN, M. W.; BODING, L.; VON ESSEN, M.; HANSEN, A. K.; SKOV, L.; BONEFELD, C. M. (2007) Cellular dynamics in the draining lymph nodes during sensitization and elicitation phases of contact hypersensitivity. *Contact Dermatitis* 57(5):300-8.

LEE, J. K.; PARK, J. H.; KIM, H. S.; CHUNG, S.T.; EOM, J. H.; NAUM, K.T.; OH, H.Y.(2003) Evaluation of cell proliferation in ear and lymph node using BrdU immunohistochemistry for mouse ear swelling test. *Environmental toxicology and pharmacology* 14 61-68.

LEE, J. K.; PARK, S. H.; BYUN, J. A.; KIM, H. S.; OH, H.Y. (2004) Evaluation of lymphocyte subpopulations in draining lymph node cells following allergen and irritant. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 17:95-102.

LEVIN, C. Y.; MAIBACH, H. I. (2002) Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? *Int. Immunopharmacol.* 2:183-9.

LILIENBLUM, W.; DEKANT, W.; FOTH, H.; GEBEL, T.; HENGSTLER, J. G.; KAHL, R.; KRAMER, P. J.; SCHWEINFURTH, H.; WOLLIN, K. M. (2008) Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Arch Toxicol.* 82(4):211-36.

MANETZ, T. S.; MEADE, B. J. (1999) Development of a combined irritancy/phenotypic analysis assay for the identification and differentiation of chemicals with the potential to elicit irritation, IgE-mediated, or T cell mediated hypersensitivity responses. *Am J Ind Med.* 1:136-138.

MARAKCHI, S & MAIBACH, H. I. (2006) Sodium lauryl sulphate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences. *Skin Pharmacol. Physiol.* 19: 177–80.

MARTIN, S.; LAPPIN, M. B.; KOHLER, J.; DELATTRE, V.; LEICHT, C.; PRECKEL, T. (2000) Peptide immunization indicates that CD8+ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 115: 260-6.

MAURER, T. (1983) *Contact and Photocontact Allergens. A manual of predictive test methods.* Marcel Dekker, Basel, Swiss.

MAURER, T. (2007) Guinea pigs in hypersensitivity testing. *Methods* 41:48-53.

MINTERN, J. D.; DAVEY, G. M.; BELZ, G. T.; CARBONE, F. R.; HEATH, W. R. (2002) Cutting edge: precursor frequency affects the helper dependence of cytotoxic T cells. *J Immunol.* 1;168(3):977-80.

MOCHIMARU, H.; USUI, T.; YAGUCHI, T.; NAGAHAMA, Y.; HASEGAWA, G.; USUI, Y.; SHIMMURA, S.; TSUBOTA, K.; AMANO, S.; KAWAKAMI, Y.; ISHIDA, S. (2008) Suppression of alkali burn-induced corneal neovascularization by dendritic cell vaccination targeting VEGF receptor 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 49(5):2172-7.

MONTELIUES, J.; WAHLKVIST, H.; BOMAN, A.; FERNSTROM, P.; GRABERGS, L.; WAHLBERG, J. E. (1994) Experience with the murine local lymph node assay: Inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Dem Venereol* 74:22-27.

MONTELIUES, J.; WAHLKVIST, H.; BOMAN, A.; FERNSTROM, P.; GRABERGS, L.; WAHLBERG, J. E. (1994) Experience with the murine local lymph node assay: Inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Dem Venereol* 74:22-27.

NEVES, B. M.; CRUZ, M. T.; FRANCISCO, V.; GONÇALO, M.; FIGUEIREDO, A.; DUARTE, C. B.; LOPES, M. C. (2008) Differential modulation of CXCR4 and CD40 protein levels by skin sensitizers and irritants in the FSDC cell line. *Toxicol Lett.* 28;177(1):74-82.

NOSBAUM A, VOCANSON M, ROZIERES A, HENNINO A, NICOLAS JF. (2009) Allergic and irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol.* 19(4):325-32.

OBAR, J. J.; LEFRANÇOIS, L. (2010) Memory CD8+ T cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 1183:251-66.

O'LEARY, J. G.; GOODARZI, M.; DRAYTON, D. L.; VON ANDRIAN, U. H.T. (2006) Cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol.* 7(5):507-16.

OLIVER, G. J.; BOTHAM, P. A.; KIMBER, I. (1986) Models for contact sensitization--novel approaches and future developments. *Br J Dermatol.* 115 31:53-62.

OMORI, T.; IDEHARA, K.; KOJIMA, H.; SOZU, T.; ARIMA, K.; GOTO, H.; HANADA, T.; IKARASHI, Y.; INODA, T.; KANAZAWA, Y.; KOSAKA, T.; MAKI, E.; MORIMOTO, T., SHINODA, S., SHINODA, N.; TAKEYOSHI, M.; TANAKA, M.; URATANI, M.; USAMI, M.; YAMANAKA, A.; YONEDA, T.; YOSHIMURA, I.; YUASA, A. (2008) Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 58(1):11-26.

PEASE, C. K. S.; BASKETTER, D. A.; PATLEWICZ, G.Y. (2002) Contact allergy: the role of Skin chemistry and metabolism. *Clinical and Experimental Dermatology.* 28 117-183.

PIGUET, P. F.; GRAU, G. E.; HAUSER, C.; VASSALLI, P. (1991) Tumor necrosis factor is a critical mediator in hapten induced irritant and contact hypersensitivity reactions. *J. Exp. Med.* 1991; 173-180.

PRESGRAVE, F. A. O. *Animais de Laboratório: criação e experimentação* - Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 361-367.

REY, M. C. W.; BONAMIGO, R. R. Tratamento da Alopecia areata. (2006) *Med Cutan Iber Lat Am.* 34 (2) 49-56.

RIBEIRO, J. N.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; FLORES, A. V. (2004) Avaliação da toxicidade da antocianina de uva, através da quantificação espectrofotométrica

de constituintes do sangue, e medida de massa corporal de coelhos saudáveis. *Revista analítica* 50-55

RING, S.; OLIVER, J.F.; BRUCE, N.; CRONSTEIN, A. H. E.; MAHNKE, K. (2009) CD4+CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions through a CD39, adenosine dependent mechanism. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. 123: 1287-1296.

SAINT-MEZARD, P.; KRASTEVA, M.; CHAVAGNAC, C.; BOSSET, S.; AKIBA, H.; KEHREN, J.; KANITAKIS, J.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. F.; BERARD, F. (2003) Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol*. 120(4):641-7.

SAINT-MEZARD, P.; ROSIERES, A.; KRASTEVA, M.; BERARD, F.; DUBOIS, B.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. F. (2004) Allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol*. 14(5):284-95.

SCHIFFELERS, M. J.; BLAAUBOER, B. J., FENTENER VAN VLISSINGEN J. M.; KUIL, J. REMIE, R.; THURING, J. W.; VAAL, M.A.; HENDRIKSEN, C. F. (2007) Factors stimulating or obstructing the implementation of the 3Rs in the regulatory process. *ALTEX* 24(4):271-8.

SEBASTIANI, S.; ALBANESI, C.; PUDDU, P.; CAVANI, A.; GIROLOMONI, G. (2002) The role of chemokines in allergic contact dermatitis. *Arch Dermatol Res*. 293(11):552-9.

SEIDEL-GUYENOT, W.; ALT, R.; PERSCHON, S.; KNOP, J.; STEINBRINK, K. (2004) B cells are not required for T cell priming in low zone tolerance to contact allergens and contact hypersensitivity. *Eur J Immunol*. 34: 3082–3090.

SÉRGIO GREIF & THALES TRÉZ. (2000) *A Verdadeira Face da Experimentação Animal: sua saúde em perigo*.

SIKORSKI, E. E.; GERBERICK, G. F.; RYAN, C. A.; MILLER, C. M.; RIDDER, G. M. (1996) Phenotypic analysis of lymphocyte subpopulations in lymph nodes draining the ear following exposure to contact allergens and irritants. *Fundam Appl Toxicol*. 34(1):25-35.

SLODOWNIK, D.; LEE, A.; NIXON, R. (2008) Irritant Contact dermatitis: Review. *Australasian Journal of Dermatology* 49, 1-11.

SUDA, A.,; YAMASHITA, M.; Tabei, M. (2002) Local lymph node assay with non-radioisotope alternative endpoints. *J Toxicol Sci* 27: 205–218.

TOEBAK, M. J.; GIBBS, S.; BRUYNZEEL, D. P.; SCHEPER, R. J.; RUSTEMEYER, T. (2009) Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis*. 60(1):2-20.

TÜZÜN, Y.; ANTONOV, M.; DOLAR, N.; WOLF, R. (2007) Keratinocyte cytokine and chemokine receptors. *Dermatol Clin*. 25(4):467-76.

VAN OCH, F. M.; VAN.; LOVEREN, H.; VAN WOLFSWINKEL, J. C.; MACHIELSEN, A. J.; VANDEBRIEL, R. J. (2005) Assessment of potency of allergenic activity of low molecular weight compounds based on IL-1alpha and IL-18 production by a murine and human keratinocyte cell line. *Toxicology*. 1;210(2-3):95-109.

VILAPLANA, J.; ROMAGUERA C. (2006) Dermatitis de contacto por parafenilenodiamina: una sensibilización con múltiples problemas. *Med cutan Iber Lat Am*. 34 (4): 173-178.

VOCANSON, M.; HENNINO, A.; ROZIÈRES, A.; CLUZEL-TAILHARDAT, M.; POYET, G.; VALEYRIE, M.; BÉNETIÈRE, J.; TÉDONE, R.; KAISERLIAN, D.; NICOLAS, J. F. (2009a) Skin exposure to weak and moderate contact allergens induces IFN $\gamma$  production by lymph node cells of CD4 $^{+}$  T-cell-depleted mice. *J Invest Dermatol*. 129(5):1185-91.

VOCANSON, M.; HENNINO, A.; ROZIÈRES, A.; POYET, G.; NICOLAS, J. F. (2009b) Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*. 64(12):1699-714.

WATANABE, H.; UNGER, M.; TUVEL, B.; WANG, B.; SAUDER, D. N. (2002) Contact hypersensitivity: the mechanism of immune responses and T cell balance. *J Interferon Cytokine Res*. 22(4):407-12.

WEIGMANN, B.; SCHWING, J.; HUBER, H.; ROSS, R.; MOSSMANN, H.; KNOP, J.; RESKE-KUNZ, A.B. (1997) Diminished contact hypersensitivity response in IL-4 deficient mice at a late phase of the elicitation reaction. *Scand J Immunol*. 45(3):308-14.

WERNER, V. H.; JUGEN, A. H. (2005) The local lymph node assay being too sensitive? *Arch Toxicol* 79: 721-728.

YAMANO, T & SHIMIZU, M. (2009) Skin sensitization potency and cross-reactivity of p-phenylenediamine and its derivatives evaluated by non-radioactive murine local lymph node assay and guinea-pig maximization test. *Contact Dermatitis*. 60(4):193-8.

ZIEGLER, S. F.; RAMSDELL, F.; ALDERSON, M. R. (1998) The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12: 456-465.

