

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**Padronização de técnicas de isolamento de células de Langerhans imaturas
e desenvolvimento de um modelo tridimensional de pele humana para testes
de sensibilidade *in vitro***

Dayane Piffer Luco

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientadora: Dra. Monica Beatriz Mathor

São Paulo

2014

*Ao meu grande amor, meu melhor amigo, meu
companheiro e incansável incentivador, Rafael Luco.
A você, dedico não só este trabalho, mas também o
mérito por grande parte das alegrias destes tempos tão
insanos!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro por meio do processo nº 2012/06575-2.

À Dra. Monica Beatriz Mathor, pela oportunidade, orientação, confiança, compreensão e amizade depositadas em mim durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Patricia Santos Lopes, pela orientação, incentivo, ideias e oportunidades trazidas e compartilhadas desde o início deste mestrado. Também agradeço a ela, o constante bom humor e deliciosos/reconfortantes quitutes, que chegavam sempre em boa hora.

À todas as doadoras, ao Dr. Fábio Kamamoto, Dr. Rodrigo Dornelles, Dr. Cesar Isaac e ao Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP, pela doação das peles para obtenção das células empregadas neste trabalho.

Ao Dr. Décio dos Santos Pinto Jr. e ao Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP por permitir a utilização de seus laboratórios, sempre que se fez necessário. Um agradecimento especial a Elisa Santos que sempre esteve disposta a me auxiliar em todas as ocasiões.

À querida Maria de Fátima Guarizo Klingbeil por toda a sua ajuda, apoio, ensinamentos preciosos, conversas e momentos de descontração, assim como, pela amizade.

Aos engenheiros, Elizabeth Somessari e Carlos Gaia, pela irradiação das células, pela esterilização dos materiais e pela disponibilidade em ajudar, sempre.

Ao Dr. José Alexandre M. Barbuto e suas alunas, que prontamente disponibilizaram importantes materiais de pesquisa, sempre que foi necessário.

A Dra. Vânia R. Leite e Silva, pelas oportunidades, apoio e incentivo para buscar novos desafios, dentro e fora da área acadêmica.

Aos secretários, Cláudia Nolla, Marcos Cardoso da Silva, Rute Batista e Arlete Correia, pela constante ajuda e amizade.

Aos colegas do CB, Johnny, Zé Maria, Junqueira, Peres, Karen, Marina e Fernando, que sempre estiveram dispostos a me ajudar quando precisei, e pela amizade.

Às amigas queridas do IPEN, Rejane, Luana e Stefany, por todo o apoio, consolo nas horas difíceis e amizade construída nestas dependências. E aos amigos, Mosca, Nelson, Tomaz e Gustavo.

Às queridas, Bianca da Silva Sufi e Marcelly Tochimi Uemura, pela amizade e parceria, sempre tão importantes. Bianca, o meu muito obrigada, pelos ensinamentos das práticas de cultura celular e por tentar de forma tão sutil, me ensinar sobre como agir em ambientes “hostis”. Marcelly, minha parceira de conversas e congressos, obrigada pela descontração e sinceridade.

Aos queridos novos amigos do Sul, Daniela Steffens e Leonardo Dalla Porta Dornelles, que apesar do pouco tempo, se mostraram verdadeiros amigos e parcerias sem igual. Agradeço por toda a ajuda que prontamente me prestaram, pelas risadas e pela preciosa sinceridade dos sulistas! Dani, sem você, esse trabalho não teria ficado completo.

Às minhas grandes amigas e madrinhas, Fernanda e Giselle por todo o amor, apoio e incentivo, pelas muitas horas de risadas, conversas e conselhos, apesar da distancia que agora nos separa. Gi querida, obrigada pelas tantas revisões, sempre de última hora.

Às minhas outras grandes e amadas amigas do sul, Rosa, Talita, Priscila, Ana, Karine, Patricia e Beatriz, pelas risadas, conversas, desabafos, companheirismo e amizade verdadeira, tão importante na minha vida.

Às minhas amigas tão queridas, de outras partes do Brasil, Alessandra (minha comadre), Marina, Rosana, Joana, Carolina e Magali, pelas muitas horas de boas conversas, conselhos e alegrias, que tivemos de sobra nestes últimos anos.

Aos meus pais, Neusimar e Salazar, pelo amor, incentivo, apoio e admiração, que sempre demonstraram por mim, impulsionando nas horas difíceis, que não foram poucas, e celebrando nas horas felizes.

Às minhas irmãs, em especial a Iara, que sempre se fez presente no decorrer deste trabalho, incentivando e apoiando de todas as formas, sempre trágica e engraçada por sua visão de mundo tão diferente da minha, mas muito importante na minha vida.

E o meu maior agradecimento é para o meu marido, meu porto seguro, meu amor! Você esteve presente em cada um dos momentos - tristes e felizes - desta caminhada, com suas palavras de incentivo, sua inesgotável positividade e dedicação. Até mesmo no laboratório você me ajudou. Sem você, este mestrado não teria sido possível, pelo menos da forma como foi feito. Não tenho palavras para expressar toda a gratidão e amor que sinto por você! Muito obrigada!

Padronização de técnicas de isolamento de células de Langerhans imaturas e desenvolvimento de um modelo tridimensional de pele humana para testes de sensibilidade *in vitro*

DAYANE PIFFER LUCO

RESUMO

A pele é o maior órgão do corpo humano e constitui a principal defesa do organismo contra agentes físicos e químicos, sendo também fundamental para evitar a perda de água por dessecação. Formada por três camadas distintas, mas complementares, sendo as duas principais denominadas derme e epiderme, contendo diferentes tipos celulares, como fibroblastos, queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans, sendo que estas últimas desempenham um papel fundamental na hipersensibilidade de contato. Devido à importância da manutenção da pele saudável para a vida humana, existe uma crescente necessidade da elaboração de substitutos de tecidos para o tratamento de feridos e doentes, assim como, há grande demanda de pele para testes químicos das áreas farmacêutica e cosmética. Outro fator de fundamental importância para o desenvolvimento de métodos alternativos *in vitro*, é a pressão mundial para que estes testes substituam os modelos animais. Esta abordagem vai de encontro aos novos conceitos de substituição, redução e refinamento na utilização de animais em estudos científicos, ditando o futuro da cultura celular e bioengenharia de tecidos. Graças ao grande desenvolvimento do cultivo celular e descoberta de que as células cultivadas podem ser reagrupadas de acordo com o delineamento experimental, se torna possível a criação de equivalentes dermoepidérmicos para estudos *in vitro*, como por exemplo, testes de cito e fototoxicidade ou avaliação da fase inicial da reação alérgica e processos de sensibilização da pele. Neste caso, se faz necessária a obtenção de grande quantidade de células de Langerhans imaturas. As células de Langerhans (CLs) são células dendríticas imaturas localizadas na epiderme e epitélio superficial que desempenham um papel central na imunidade da pele, agindo como verdadeiras sentinelas capazes de captar antígenos de contato. Desta forma, foram testados quatro diferentes protocolos para extração e criopreservação destas células, sendo ainda analisadas as suas características morfológicas e fenotípicas. Obtivemos resultados não expressivos quanto ao isolamento, pureza e marcação positiva para CD1a no Protocolo 2 (Expansor de Pele). Os Protocolo 1A (Coleta de Sobrenadante) e 3 (Epiderme + Gradiente de Ficoll Paque) ofereceram altos níveis de células marcadas positivamente para CD1a, apresentando a mesma qualidade de marcação. No entanto, o Protocolo 3 forneceu um maior número de células viáveis, e uma maior pureza da amostra, uma vez que só utiliza a epiderme para a obtenção da suspensão de células, o que o coloca como modelo a ser seguido em posteriores experimentos. Os métodos aqui apontados como mais promissores, podem ser reproduzidos em laboratórios de cultura celular convencionais, contribuindo para aumentar a reprodutibilidade e confiabilidade de resultados experimentais relativos às CLs. Da mesma forma, avaliamos a utilização dos equivalentes de pele humana para a realização de testes *in vitro* de cito e fototoxicidade, os quais podem de fato reduzir a utilização de modelos animais para identificação do perfil tóxico de uma substância ou de formulações mais complexas.

Standardization of techniques for isolation of immature Langerhans cells and development of a three-dimensional human skin model for *in vitro* sensibility tests

DAYANE PIFFER LUCO

ABSTRACT

The skin is the largest organ from the human body and constitutes the main protection of the organism against physical and chemical agents and it is also fundamental to avoid water loss by desiccation. Formed by three distinct stratus, yet complementary, being the two main called dermis and epidermis, containing different cell types, as fibroblasts, keratinocytes, melanocytes, Merkel cells and Langerhans cells (LCs), being these latter fundamental in the contact hypersensitivity. Due to the importance of the healthy skin maintenance to the human's life, there is a growing need of elaboration of skin models to the treatment of injured and diseased, as well as there is a big demand of skin models to chemical tests from the pharmaceuticals and cosmetology fields. Another factor of fundamental importance to the development of alternative *in vitro* methods is the worldwide pressure for these tests to replace animal models. This approach meets new concepts of replacement, reduction and refinement in the use of animals in scientific studies, dictating the future of cell culture and bioengineering of skin models. Thanks to the large development of cell culture and the discovery that the cultured cells can be regrouped according to the experimental delineation, the creation of skin models to *in vitro* studies is made possible, as for instance, tests of cytotoxicity and phototoxicity or evaluation of the initial phase from the allergic reaction and processes of skin sensitization. In this case, it is necessary the achievement of a large amount of immature Langerhans cells. The LCs are immature dendritic cells located in the epidermis and superficial epithelium that perform a central role in the skin immunity, acting as real sentinels able to collect contact antigens. Accordingly, were tested four different protocols for extraction and cryopreservation of these cells, and further analyzed its morphological and phenotypic features. We obtained no significant results in relation to the isolation, purity and CD1a positive expression in the Protocol 2. The Protocols 1A and 3 offered high levels of CD1a positively marked cells, showing the same expression levels. However, the Protocol 3 provided a bigger number of viable cells and a high purity yield, since it only uses the epidermis to obtain the single cell suspension, which places it as a model to be followed in subsequent experiments. The methods appointed here as the most promising, can be reproduced in conventional cell culture labs, contributing to increase the reproducibility and reliability of experimental results related to the LCs. In the same way, we evaluated the use of the human skin equivalents to the accomplishment of *in vitro* tests of cyto and phototoxicity, which can in fact reduce the use of animal models to the identification of single substances toxicity or even complex formulations.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.1.1	Etapas do Trabalho	17
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
3.1	A Pele Humana	18
3.1.1	A Epiderme	18
3.1.2	Queratinócitos.....	19
3.1.3	Melanócitos.....	20
3.1.4	Células de Merkel	20
3.1.5	Células de Langerhans	20
3.1.5.1	Isolamento das células de Langerhans	22
3.1.5.2	Criopreservação das células de Langerhans.....	23
3.1.6	Membrana Basal	24
3.1.7	A Derme.....	24
3.1.7.1	Fibroblastos	25
3.2	Substituição dos Modelos Animais.....	26
3.3	Cultura Celular e Bioengenharia de Tecidos	27
3.4	Testes de Citotoxicidade e Fototoxicidade <i>in vitro</i>	28
3.4.1	Citotoxicidade.....	29
3.4.2	Fototoxicidade	29
3.4.3	Câmara para ensaio de fototoxicidade	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Obtenção dos materiais biológicos	31
4.2	Preparo dos meios de cultura	32

4.2.1	Meio para cultivo de fibroblastos (D10):.....	32
4.2.2	Meio para cultivo de queratinócitos (K ⁻):.....	32
4.2.3	Meio de congelamento padrão.....	32
4.2.4	Meio de cultivo para células de Langerhans – migração.....	32
4.2.5	Meio de congelamento para células de Langerhans	33
4.3	Preparo das biopsias para isolamento celular	33
4.4	Obtenção dos queratinócitos e melanócitos humanos	33
4.5	Obtenção dos fibroblastos humanos	34
4.6	Obtenção das células de Langerhans	35
4.6.1	Protocolo 1 - Obtenção enzimática direta.....	35
4.6.2	Protocolo 2 – Expansor de Pele	36
4.6.3	Protocolo 3 – Epiderme + Gradiente de Ficoll Paque	36
4.7	Análise imunofenotípica de células de Langerhans.....	37
4.8	Identificação das células de Langerhans por microscopia de fluorescência... 38	
4.9	Criopreservação e descongelamento das células de Langerhans	38
4.10	Avaliação do uso das células de Langerhans como teste de sensibilidade .39	
4.10.1	Preparo das células de Langerhans e das substâncias empregadas no teste	39
4.10.2	Análise da sensibilização por citometria de fluxo	40
4.11	Amplificação das culturas	40
4.12	Preparo das bases dérmicas acelulares como suporte das culturas	41
4.13	Cultura das células dérmicas e epidérmicas sobre base dérmica em placas multipoços.....	42
4.14	Validação do equivalente dermoepidérmico como teste de toxicidade	43
4.14.1	Formulação dos protetores solares e processo de degradação	43
4.14.2	Construção dos equivalentes dermoepidérmicos e aplicação das formulações.....	44
4.14.3	Exposição dos equivalentes a irradiação em câmara de fototoxicidade ..	44

4.14.4	Avaliação das modificações induzidas pela radiação UVA	45
4.15	Estudos histológicos do equivalente dermoepidérmico reconstruído <i>in vitro</i>	45
4.16	Estudos histológicos - imunohistoquímica.....	45
5	RESULTADOS.....	47
5.1	Obtenção de células isoladas – Queratinócitos.....	47
5.2	Obtenção de células isoladas – Fibroblastos.....	48
5.3	Obtenção de células isoladas – Células de Langerhans imaturas	48
5.3.1	Protocolo 1.....	48
5.3.2	Protocolo 2.....	50
5.3.3	Protocolo 3.....	53
5.4	Identificação das células de Langerhans por microscopia de fluorescência...55	
5.5	Criopreservação e descongelamento das células de Langerhans.....	56
5.6	Validação do uso das células de Langerhans como teste de sensibilidade - Análise da sensibilização por citometria de fluxo	56
5.7	Cultura secundária de células dérmicas e epidérmicas sobre base dérmica acelular – sistema organotípico.....	58
5.8	Avaliação das modificações induzidas pela radiação UVA em câmara de fototoxicidade - Testes de toxicidade celular em equivalentes dermoepidérmicos.....	61
5.8.1	Resultados histológicos dos equivalentes dermoepidérmicos provenientes dos testes de toxicidade	62
5.9	Cultura secundária de células dérmicas e epidérmicas sobre base dérmica acelular – Inclusão das células de Langerhans	64
6	DISCUSSÃO	68
7	CONCLUSÕES	86
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores relativos à contagem de células realizadas na etapa de obtenção de células epidérmicas para cada uma das amostras. Comparativo entre o rendimento celular total e o rendimento de células/cm ²	47
Tabela 2 - Valores relativos à contagem de células realizadas na etapa de obtenção de células de Langerhans – Protocolo 1A e 1B.	49
Tabela 3 - Porcentagens de células CD1a ⁺ e HLA-DR ⁺ para o Protocolo 1B.	50
Tabela 4 – Tempo de permanência na Dispase II [®] versus concentração e derme retirada. Sendo: S = sim; RP = retirada parcial da derme; x = não avaliado.	51
Tabela 5 - Valores relativos à contagem de células realizadas na etapa de obtenção de células de Langerhans – Protocolo 2	51
Tabela 6 - Porcentagens de células CD1a ⁺ e HLA-DR ⁺ para o Protocolo 2.	52
Tabela 7 - Valores relativos à contagem de células realizadas na etapa de obtenção de CLs – Protocolo 3.	53
Tabela 8 - Porcentagens de células CD1a ⁺ e HLA-DR ⁺ para o Protocolo 3.	54
Tabela 9 - Porcentagens de células CD1a ⁺ para teste de sensibilidade.	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Estrutura da pele humana, evidenciando as camadas que compõem a epiderme e suas células correspondentes (adaptado de www.protein-structure.net/reading-154-Epidermis-Definition-and-Structure). 19
- Figura 2 - Esquema representativo do preparo do ensaio químico (teste de sensibilidade) nas placas de 96 poços. Sendo: B = branco (contém só meio de cultura); CN1 = Controle Negativo (células + meio de cultura); CN2 = Controle Negativo (células + meio de cultura acrescido de GM-CSF); G1 – G4 em tons de azul = 4 concentrações da substância Glicerina (células + amostra); F1 – F4 em tons de verde = 4 concentrações da substância Formaldeído (células + amostra). 40
- Figura 3 - Imagem das subpopulações (setas vermelhas) adquiridas pelo Protocolo 1A (Imagem A), e da população de células (setas vermelhas) adquiridas pelo Protocolo 1B (Imagem B). 49
- Figura 4 - Análise por citometria de fluxo do fenótipo de superfície das CLs isoladas com os marcadores CD1a e HLA-DR. Janela P5: Expressão de marcação elevada para CD1a⁺ e moderada para HLA-DR⁺. 50
- Figura 5 Análise por citometria de fluxo do fenótipo de superfície das CLs isoladas com os marcadores CD1a e HLA-DR. Janela P5: Expressão de marcação elevada para CD1a⁺ e baixa para HLA-DR⁺. As cores são aleatórias e determinadas pelo equipamento. 52
- Figura 6 - Análise por citometria de fluxo do fenótipo de superfície das CLs isoladas com os marcadores CD1a e HLA-DR. Janela P5: Expressão de marcação elevada para CD1a⁺ e moderada e elevada para HLA-DR⁺. 54
- Figura 7 – Exemplo de análise, por citometria de fluxo, do fenótipo de superfície das CLs isoladas. (A) com o marcador CD14 como controle negativo de especificidade de marcação (Janela P5) e (B) com marcador 7AAD para viabilidade celular (Janela P4). 55

- Figura 8 - Células de Langerhans marcadas com HLA-DR conjugado com FITC. (setas brancas) Morfologia típica das CLs em cultura com núcleo pequeno e aparente e pequenos dendritos abundantemente distribuídos por toda a superfície celular..... 55
- Figura 9 – Análise por citometria de fluxo do fenótipo de superfície das CLs isoladas e submetidas ao teste de sensibilidade com o marcador CD1a. Janela P6: Expressão elevada de marcação CD1a⁺ para Controle 1, moderada para Controle 2 e baixa para CLs expostas a substância sensibilizadora (Formaldeído) e não-sensibilizadora (Glicerina)..... 57
- Figura 10 - Análise histológica do equivalente dermoepidérmico - Avaliação quanto à quantidade de células utilizadas para a construção do modelo versus a dose de irradiação empregada na derme humana acelular. Foram semeados 200.000 FH (cél/cm²) em todos os equivalentes apresentados, 400.000 QH (cél/cm²) nos equivalentes da 1^a linha (**A1, A2 e A3**), 300.000 QH (cél/cm²) na 2^a linha (**B1, B2 e B3**) e 150.000 QH (cél/cm²) na 3^a linha (**C1, C2 e C3**), onde as imagens **A, B e C** da 1^a coluna possuem os equivalentes construídos com derme acelular não irradiada, as imagens **A, B e C** da 2^a coluna irradiada a 25 kGy e as imagens **A, B e C** da 3^a coluna irradiada a 50 kGy. Cultivo de 21 dias. Microscopia óptica HE. Aumento original 100X..... 59
- Figura 11 - Equivalente dermoepidérmico. Perfeita distribuição dos fibroblastos humanos na derme acelular irradiada a 25 kGy - flechas vermelhas. Microscopia óptica HE. Aumento original 100X..... 60
- Figura 12 - Equivalente dermoepidérmico e derme acelular em sistema ar-líquido sobre grelha suspensa. Pigmentação da superfície semeada com as células epidérmicas - flechas amarelas. Notada contração da base dérmica semeada com FH e QH (equivalente da direita) em comparação com a base dérmica não semeada (equivalente da esquerda) – flechas azuis. Derme acelular irradiada a 25 kGy, após 21 dias de cultivo celular..... 60
- Figura 13 – Gráficos de comparação entre a viabilidade celular dos equivalentes dermoepidérmicos expostos e não expostos à radiação UVA em câmara de fototoxicidade com formulações bases e acrescidas de fotoprotetor UVA Avobenzona e UVB Metoxicinamato. **PBS** - controle sem formulação; **Controle** – formulação base; **Cov** - formulação coberta por folha de alumínio; **Deg** -

formulação degradada; **AVB** - formulação base acrescida de fotoprotetor UVA (gráfico **A**); **OMC** - formulação base acrescida de fotoprotetor UVA (gráfico **B**); **UVA+** formulações expostas à irradiação e **UVA-** formulações não expostas à irradiação. *Diferença estatística significativa entre as duas condições.61

Figura 14 - Análise histológica do equivalente dermoepidérmico. Avaliação da integridade da estrutura do modelo de pele humana após os testes de cito e fototoxicidade. - Equivalente construído com 400.000 QH + 200.000 FH (cél/cm²) sobre derme humana acelular irradiada. Grupo controle com PBS (imagens **A1** e **A2**), grupo onde foi aplicada a formulação base (imagens **B1** e **B2**) e grupo com as formulações fotoprotetoras (imagens **C1** e **C2**) Estes resultados foram similares em presença (UVA+ _ **A1**, **B1** e **C1**) ou ausência de radiação (UVA- _ **A2**, **B2** e **C2**). Cultivo de 21 dias. Microscopia óptica HE. Aumento original 100X.63

Figura 15 - Cortes histológicos do equivalente dermoepidérmico acrescido de células de Langerhans (500.000 CLs/cm²) semeadas sobre a derme acelular 24 horas antes das demais células (400.000 QH/cm² + 200.000 FH/cm²) sobre derme humana acelular não irradiada (esquerda, **A1** e **B1**) e irradiada a 25 kGy (direita, **A2** e **B2**). **A1** e **A2** CLs com fator GM-CSF. **B1** e **B2** CLs sem fator GM-CSF. Ambos equivalentes cultivados por 7 dias. Aglomerado celular com CLs de aparência granular facilmente visualizado em todas as figuras acima (**flechas vermelhas**). Microscopia óptica HE. Aumento original 100X.64

Figura 16 - Análise histológica do equivalente dermoepidérmico acrescido de CLs (400.000 QH + 200.000 FH + 500.000 CLs (cél/cm²)) sobre derme humana acelular não irradiada (esquerda, **A1** e **B1**) e irradiada a 25 kGy (direita, **A2** e **B2**). **A1** e **A2** correspondem a todas as células semeadas simultaneamente. **B1** e **B2** correspondem às CLs semeadas 24 horas após a semeadura dos QH e FH. Células cultivadas por 21 dias. Encapsulado celular com CLs de aparência granular facilmente visualizado em todas as figuras acima (**flechas vermelhas**). Microscopia óptica HE. Aumento original 100X.65

Figura 17 - Análise imunohistoquímica com o anticorpo CD1a para marcação de CLs. Equivalente dermoepidérmico acrescido de CLs (400.000 QH + 200.000 FH + 500.000 CLs (cél/cm²)). **A1** e **A2** correspondem às células com fator GM-CSF

semeadas sobre a derme acelular 24 horas antes das demais células e cultivadas por 7 dias. **B1** e **B2** correspondem a todas as células semeadas simultaneamente. **C1** e **C2** correspondem às CLs semeadas 24 horas após a semeadura dos QH e FH. Ambas cultivadas por 21 dias. Encapsulado celular com CLs de aparência granular marcadas em marrom (**flechas vermelhas**) em todas as imagens acima. Microscopia óptica HE. Aumento original 100X (esquerda, **A1** a **C1**) e 400X (direita, **A2** a **C2**). 66

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

- μg = microgramas
- APCs = células apresentadoras de antígeno
- ATCC = American Type Culture Collection
- CCL-92 = linhagem celular de fibroblastos murinos
- CDs = células dendríticas
- CLs = células de Langerhans
- cm = centímetros
- cm^2 = centímetros quadrados
- CO_2 = dióxido de carbono
- Co_{60} = Cobalto 60
- DMEM = *Dulbec's Modified Eagle's Medium*
- EDTA = ácido etilenodiaminotetracético
- eV = elétrons volt
- FH = fibroblastos humanos
- F12 = F12 Nutrient Mixture
- g = gramas
- GB = Grânulos de Birbeck
- GLN = glutamine
- GM-CSF = Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
- Kg = kilogramas
- mg = miligramas
- MHC = complexo *major* de histocompatibilidade
- mL = mililitros
- mm = milímetros
- mM = milimolar
- MTS = composto tetrazólico, reduzida pela atividade de enzimas mitocondriais, a um produto formazana, cuja intensidade de coloração é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis em cultura
- nm = nanômetro

- NR = do inglês *Neutral Red*
- POP = Procedimento operacional padrão
- PBS = Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato)
- pH = potencial hidrogeniônico
- QH = queratinócitos humanos
- rpm = rotações por minuto
- SFB = soro fetal bovino
- T3 = triiodotironina
- TC = toxina da cólera
- T-E = tripsina/EDTA
- UV = ultravioleta
- UVA = ultravioleta do tipo A
- UVB = ultravioleta do tipo B
- UVC = ultravioleta do tipo C

1 INTRODUÇÃO

A pele pode ser considerada como o maior órgão do corpo humano, correspondendo a 16% do nosso peso total, sendo responsável pela regulação da temperatura corporal, controle do fluxo sanguíneo, por funções sensoriais e pela proteção contra os mais diversos agentes externos, como a radiação, dessecação, penetração de microrganismos, dentre outros. Desta forma, se torna evidente que a pele é totalmente ligada a funções vitais do nosso organismo e que seria impossível sobreviver sem ela (Kanitakis, 2002).

Há uma série de considerações que devem ser levadas em conta na elaboração de um modelo de sensibilização *in vitro*. Mas em todos os casos, para um modelo *in vitro* substituir um modelo animal, este deve ser capaz de distinguir um “sensibilizador” de um “não sensibilizador” no mesmo grau que os modelos animais atuais o fazem. No entanto, o aspecto mais importante no desenvolvimento dos testes *in vitro*, é o alcance do nível máximo de correlacionamento destes com a experimentação humana. Tão importante quanto a matriz extracelular e os tipos celulares utilizados para o desenvolvimento dos testes de sensibilização *in vitro*, é o tipo de biomarcador utilizado para a leitura das reações apresentadas nos tecidos (dos Santos et al., 2009).

Os modelos de pele reconstituída *in vitro* têm se aprimorado ao longo dos anos pela incorporação de diferentes tipos celulares, formando, por exemplo, os modelos de equivalentes dermoepidérmico imunocompetentes, que apresentam estruturas mais complexas envolvendo melanócitos e células dendríticas, representando uma nova geração de substitutos, os quais possibilitam a avaliação do potencial alergênico de sensibilização de novas moléculas administradas por via tópica e/ou sistêmica (Auxenfans et al., 2009).

Modelos animais têm sido utilizados por décadas como método mais eficaz para testes de sensibilidade da pele. No entanto, os modelos animais não podem ser considerados como modelos ideais para estes testes, devido às diferenças fisiológicas entre animais e humanos, sendo os resultados nem sempre preditivos para aqueles encontrados em seres humanos (Fentem et al., 2001). Além disso, ocorre uma pressão cada vez maior por parte das novas leis de ética na experimentação animal, pois estes testes podem lhes causar dor e desconforto. Se os modelos de sensibilização *in vitro* se mostrarem sensíveis a compostos alergênicos, estes poderiam substituir os tradicionais

testes em animais e humanos para determinar o potencial de sensibilização cutânea de uma matéria-prima ou um produto acabado. Embora tais modelos não possam substituir completamente a necessidade de alguma experimentação animal, podem reduzir enormemente o número de testes de dermato-toxicidade animal na cosmetologia e dermatologia (Huang & Fu, 2011).

Existem inúmeros movimentos ao redor do mundo que desaprovam o uso de animais para testes laboratoriais e clínicos, sendo que, na Europa os testes em animais na indústria cosmética, para produtos acabados, não são mais permitidos desde 2013. Seguindo os passos da União Europeia, o Brasil vem discutindo novas leis de proteção aos animais de laboratório, e os tipos de testes que poderiam ser realizados nestes modelos. Em janeiro do corrente ano (2014), foi vetada a utilização de animais para testes de cosméticos no Estado de São Paulo, sendo também encaminhado para o Senado um projeto de lei que proíbe a utilização de animais para testes de substâncias já existentes e comprovadamente seguras para a utilização humana. Neste projeto de lei, a indústria cosmética brasileira terá cinco anos para se adequar as novas leis e interromper definitivamente os testes em modelos animais.

Componentes essenciais da pele, as células dendríticas (CDs) formam uma população celular subdividida de acordo com a sua função, fenótipo e localização, sendo as células de Langerhans suas representantes atuantes na epiderme, assim como em outros epitélios (Shortman & Naik, 2007). As células de Langerhans (CLs) formam uma rede de sentinelas na epiderme, capturando, entre outros, alérgenos de baixo peso molecular ligados a proteínas epidérmicas, induzindo sua ativação e migração da epiderme para os vasos linfáticos aferentes em busca dos gânglios linfáticos, onde elas apresentam o antígeno processado para as células T virgens (*naïve*), comportando-se, portanto como células apresentadoras de antígeno (APCs), e simultaneamente, expressando moléculas co-estimuladoras e citocinas que induzem uma resposta imune cutânea primária (fase de sensibilização) (Ullrich, 1995). A migração das células dendríticas ocorre simultaneamente com a sua maturação, que se traduz pelas alterações funcionais e fenotípicas, que se caracterizam pela redistribuição das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), alterações morfológicas e reorganização do citoesqueleto, produção de citocinas, quimiocinas (IL-12, TNF e IFN- β) e proteases e pela expressão aumentada de moléculas co-estimuladoras, tais como, CD40, CD83 e CD86 envolvidas numa eficiente apresentação de antígenos aos

linfócitos T e ainda a expressão de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas (Marques, 2010).

Estas podem ser consideradas as células imunocompetentes da epiderme, desempenhando um papel fundamental na hipersensibilidade de contato (Kimber et al., 1998).

No entanto, muitas das limitações para se realizar estudos aprofundados e abrangentes sobre CDs e/ou CLs da pele humana referem-se à falta de métodos experimentais de fácil empregabilidade tanto para um processo de isolamento e purificação eficiente destas células, como para avaliação das suas características *in situ*. Muitos dos métodos existentes para o isolamento de CDs da pele são extremamente laboriosos e implicam diretamente na quantidade de pele que pode ser processada, juntamente com o fato de que a manipulação prolongada da pele está associada com o aumento do risco de indução da maturação destas células (Bond et al., 2009).

De acordo com o exposto, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de um modelo *in vitro*, para estudos sobre a fase inicial da reação alérgica e processos de sensibilização da pele como um todo, onde as CLs são fortes candidatas a ocupar este papel. Devido a grande complexidade envolvida na construção de um modelo tridimensional de pele humana contendo CLs em sua estrutura, a utilização destas células imunes ainda que de forma individual, pode ser uma alternativa altamente efetiva para a identificação de substâncias sensibilizadoras, mostrando-se capazes de suplantar a necessidade da utilização de modelos animais, ao menos nas fases iniciais de testes de alergenicidade de cosméticos e fármacos em geral.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de modelo de equivalente dermoepidérmico *in vitro*, contendo fibroblastos, queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans, para testes de sensibilização da pele, no intuito de reduzir a utilização de animais para testes de alergenicidade de cosméticos, medicamentos e seus componentes.

2.1.1 Etapas do Trabalho

- ✓ Testar e padronizar protocolos de obtenção de células de Langerhans imaturas para inclusão nos equivalentes dermoepidérmicos;
- ✓ Promover a manutenção da viabilidade e do estágio imaturo das células de Langerhans até o momento de sua utilização;
- ✓ Utilizar as CLs isoladas para testes de sensibilização *in vitro* utilizando a citometria de fluxo para verificação da maturação celular;
- ✓ Isolar e cultivar queratinócitos, melanócitos e fibroblastos humanos para composição do equivalente dermoepidérmico imunosensível;
- ✓ Avaliar a dose de irradiação mais adequada para a derme humana preservada em glicerol utilizada como suporte para o cultivo das células isoladas;
- ✓ Avaliar a quantidade de células epidérmicas mais adequadas para a construção do equivalente dermoepidérmico;
- ✓ Desenvolver e selecionar a melhor estrutura tridimensional do equivalente dermoepidérmico, utilizando testes que mimetizem a reatividade à toxicidade de compostos químicos aplicados topicamente;
- ✓ Após a padronização do equivalente, avaliar a melhor forma de inclusão das CLs na sua estrutura;
- ✓ Submeter o equivalente dermoepidérmico a testes histológicos e imunohistoquímicos para averiguar sua estrutura tridimensional e integração das células de Langerhans;

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 A Pele Humana

A pele é um órgão complexo que cobre toda a superfície corporal, formando um escudo flexível que constitui a primeira barreira protetora contra as agressões do meio ambiente, não permitindo a entrada de substâncias estranhas no organismo e ao mesmo tempo evitando a perda de água, colaborando na termorregulação e sediando a formação de vitamina D. A sua composição química é basicamente 70% água, 25% de proteínas e 3% de lipídios (Junqueira & Carneiro, 2012).

A estrutura da pele de um ser humano adulto é composta por três camadas principais: uma camada superficial não vascularizada formada por tecido epitelial denominada epiderme, uma segunda camada, que pode ser dividida em duas diferentes partes, sendo a primeira, bastante delgada, mas altamente vascularizada chamada de derme papilar, e a segunda parte, denominada derme reticular, que é altamente colagenosa e mais espessa, sendo as duas compostas por tecido conjuntivo. Estas duas camadas de pele se encontram acima da hipoderme, que pode ser considerada como uma terceira camada, e é principalmente constituída por células adiposas (Junqueira & Carneiro, 2012).

3.1.1 A Epiderme

A epiderme (Figura 1) é a camada mais externa da pele, compacta e praticamente impermeável, formando a primeira barreira física contra agentes externos, composta por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, de origem ectodérmica e formada por quatro tipos celulares distintos: os queratinócitos, considerados as células mais importantes da epiderme, somando 80% das células que compõem este epitélio, os melanócitos, responsáveis pela produção de melanina, formando 13% da população celular da epiderme, as células de Langerhans, responsáveis pelo sistema de imunovigilância cutâneo, representando 4% do número total de células da epiderme e ainda as células de Merkel, receptoras para o tato, correspondendo a 3% da população celular epidérmica. Não possui sistema de irrigação

sanguínea direta, sendo nutrida pela permeação dos nutrientes procedentes da derme por capilaridade (Peyrefitte et al., 1998; Harris, 2009).

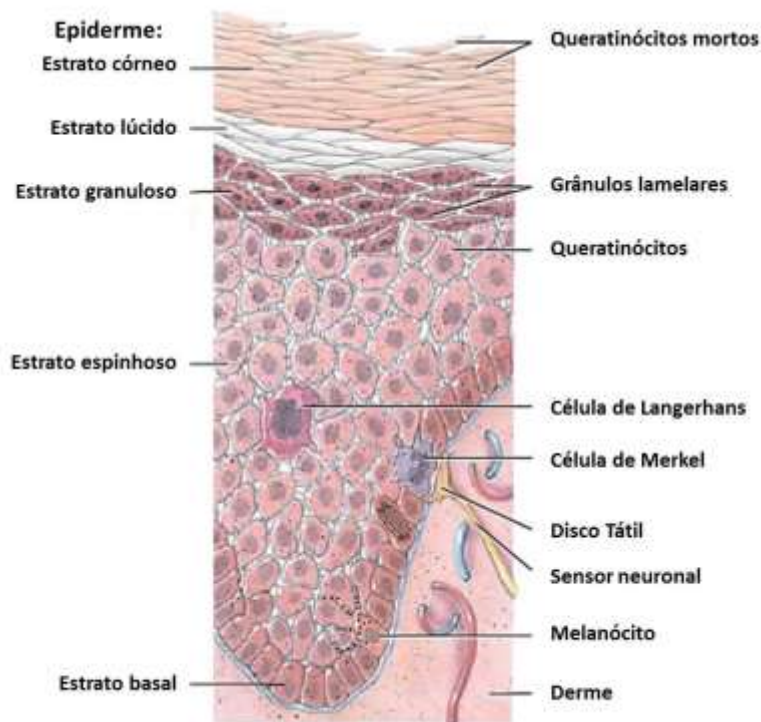


Figura 1- Estrutura da pele humana, evidenciando as camadas que compõem a epiderme e suas células correspondentes (adaptado de www.protein-structure.net/reading-154-Epidermis-Definition-and-Structure).

3.1.2 Queratinócitos

Assim como as células-tronco, os queratinócitos possuem a habilidade de se diferenciar e migrar formando as camadas da epiderme, sofrendo progressivas mudanças em sua morfologia e conteúdo e, eventualmente se transformando de células poligonais vivas em células mortas e achatadas repletas de queratina (Standring, 2008). Tradicionalmente, o termo queratinização epidérmica aplica-se ao estágio final de diferenciação dos queratinócitos, no qual estes são convertidos em células achatadas, muito resistentes e anucleadas com grande quantidade de filamentos queratinizados, denominados corneócitos (Peyrefitte et al., 1998). No entanto, as células da epiderme têm um padrão bastante variado e mutável quanto à química dos filamentos de queratina, visto que estes se modificam de acordo com a maturidade dos queratinócitos. A queratina presente nos queratinócitos basais difere daquela presente nos queratinócitos em estágio de diferenciação, sendo somente nas células mais superficiais

da camada espinhosa que a composição final dos filamentos de queratina começa a surgir. O processo clássico de queratinização epidérmica, apenas descreve os estágios finais de maturação, em que as células mortas preenchidas com queratina e outras proteínas, tais como involucrina, são formadas. De acordo com este processo de queratinização, a epiderme é usualmente dividida em camadas que representam os diferentes estágios de maturação dos queratinócitos (Standring, 2008).

3.1.3 Melanócitos

Os melanócitos se localizam predominantemente na camada basal da epiderme e tem como sua principal função a produção de melanina, um pigmento natural que dá cor a pele, protegendo as células dos efeitos nocivos da radiação UV. Seu formato dendrítico permite uma área de contato com muitos queratinócitos, facilitando a distribuição dos melanossomas ou grânulos de melanina (DuVivier, 1997). Independente da etnia, o número de melanócitos encontrados numa pessoa é sempre similar ao de qualquer outra, porém a coloração da pele é determinada pelo tamanho, quantidade e distribuição da melanina, que são fatores determinados geneticamente (Yaar & Gilchrest, 2001).

3.1.4 Células de Merkel

As células de Merkel estão presentes esparsamente na camada basal da epiderme e ligadas aos queratinócitos por meio de desmossomos. Estas são células relacionadas à atividade sensorial, estando presentes em associação com os nervos sensoriais. Contém granulações características, que correspondem a granulações pós-sinápticas, sendo denominadas de receptores da sensibilidade tátil (Khan et al., 2012)

3.1.5 Células de Langerhans

As células de Langerhans da pele foram inicialmente descritas por Paul Langerhans, como neurônios intraepiteliais, em 1868.

Componentes essenciais da pele, as células dendríticas formam uma população celular subdividida de acordo com a sua função, fenótipo e localização, tendo as células de Langerhans como suas representantes atuantes na camada suprabasal da epiderme, entre os queratinócitos, assim como em outros epitélios (Shortman & Naik, 2007). Estas

CDs formam uma população heterogénea de células e podem ser classificadas em CDs plasmocitóide e CDs mielóide, localizadas no sangue e nos tecidos, subdividindo-se em CDs inflamatórias e em CLs, que por sua vez, se encontram prioritariamente nos tecidos epidérmicos, sendo elas, células dendríticas imaturas, caracterizadas por estruturas bastonetiformes com estriações transversais presentes em seu citoplasma, chamados Grânulos de Birbeck (GB) (Valladeau et al., 2002). Estes grânulos são tidos como a principal organela citoplasmática das CLs, podendo ser descritos como uma estrutura membranar, trilaminar e em forma de bastão, inicialmente descrita em 1961 por Birbeck. A função exata dos GB ainda é desconhecida, existindo apenas evidências que levam a crer em sua possível capacidade para captação de antígenos (Lotze & Thomson, 2001).

Outra importante informação sobre a formação dos GB partiu da descoberta de uma lectina denominada Langerina, cuja principal função parece ser a indução da formação desses grânulos. Esta lectina é expressa na superfície de membrana das CLs, sendo rapidamente internalizada após contato com um antígeno externo, parecendo ser imediatamente transformada em GB (Valladeau et al., 2001). Mas além dos GB, as CLs apresentam outras características bastante peculiares: núcleo recortado, extensa região de Golgi e elevado número de mitocôndrias e lisossomos (Teunissen et al., 1990; Zambruno et al., 1995).

Representam 2-4% do total da população de células epidérmicas e a sua densidade varia entre, aproximadamente, 200 e 1000 células/mm² de superfície epidérmica, dependendo da área anatómica (mais abundantes na pele da face e do pescoço) (Stingl, 1990; Banchereau & Steinman, 1998).

As CLs da epiderme possuem origem hematopoética e assim como todas as células sangüíneas, são originadas a partir de células tronco hematopoéticas na medula óssea (Shortman & Naik, 2007). Podem ser consideradas as células imunocompetentes da epiderme, desempenhando um papel fundamental na hipersensibilidade de contato (Kimber et al., 1998).

Estas células migram para os vasos linfáticos aferentes após um forte estímulo imunológico, infeccioso ou de outra etiologia, iniciando um percurso no qual se diferenciam em células dendríticas maduras, destinadas à apresentação dos peptídeos antigênicos e à ativação dos linfócitos T e de memória. Já nos vasos linfáticos, perdem rapidamente a capacidade de captar e processar antígenos, sintetizando novas moléculas

MHC para a apresentação dos antígenos. Neste processo de maturação, as CLs aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras e de adesão, as quais viabilizam a sua interação com os linfócitos T e induzem uma resposta imune cutânea primária (fase de sensibilização) (Banchereau e Steinamn, 1998).

O processo de maturação das CLs é iniciado logo após o seu contato com um antígeno, sendo a sua migração em direção aos linfonodos, simultânea com a sua maturação, que é traduzida por típicas alterações funcionais e fenotípicas desta célula.

Assim como no processo de captação de antígenos e maturação, as CLs em cultura sofrem diversas modificações, alterando drasticamente o seu fenótipo já no primeiro dia de cultura. As células perdem os seus GB, sendo aumentada a expressão de moléculas co-estimuladoras específicas na apresentação antigênica (MHC de classe II, ICAM-1, ICAM-3, MHC classe I, CD40, CD80, CD83) (Banchereau e Steinamn, 1998; Anjuere et al., 1999).

3.1.5.1 Isolamento das células de Langerhans

Grande parte das limitações referentes à realização de estudos aprofundados e abrangentes sobre as CDs da pele humana está intimamente ligada aos diferentes problemas encontrados nas técnicas de separação e purificação destas células, assim como, na funcionalidade de experimentos que as avaliem *in situ*. Muitos dos métodos existentes para o isolamento de CDs da pele são extremamente laboriosos, o que implica diretamente na quantidade de pele que pode ser processada, tendo ainda como agravante, o fato de que quando expostas a tratamentos prolongados, as CDs da pele estão sujeitas a uma indução espontânea da maturação. Desta forma, para se obter resultados confiáveis quanto ao isolamento de CLs epidérmicas, se faz primordial a aplicação de métodos confiáveis para aquisição de populações homogêneas, sem a presença de outros tipos celulares, como queratinócitos e células dendríticas da derme (Bond et al., 2009).

Diferentes métodos para a extração de CLs da pele humana vêm sendo publicadas por pesquisadores de diversos países, sendo utilizadas esferas imunomagnéticas, marcações com anticorpos, centrifugação em gradiente de densidade, migração espontânea, entre outros. Todos estes processos pelos quais estas células passam antes, durante e depois de seu isolamento, podem alterar as suas funções e

morfologia, quando comparadas as CLs residentes na epiderme (Teunissen, 1992; Peguet-Navarro et al., 1994; Pena-Cruz et al., 2001).

Mas independentemente do método empregado, os experimentos *in vitro*, utilizando CLs humanas isoladas diretamente da epiderme têm sido bastante limitados, isto, devido a estas células compreenderem apenas 2-4% das células que compõem a epiderme humana, além de não serem proliferativas. Ainda não existem linhagens celulares humanas idênticas as CLs, sendo utilizadas mais comumente, células de origem mielóide que podem ser induzidas *in vitro* a uma diferenciação que as leva a serem consideradas *CL-like*, bastante correlatas com as funções desempenhadas pelas CLs epidérmicas. A diferenciação de células tronco hematopoiéticas CD34⁺ tem sido amplamente utilizada para estudos sobre CLs desde meados da década de 1990, sendo considerada por muitos pesquisadores como a fonte mais adequada de obtenção deste tipo celular. No entanto, ainda existem controvérsias sobre a sua completa equivalência em relação as CLs da epiderme (Pena-Cruz et al., 2001; Bond et al., 2009).

3.1.5.2 Criopreservação das células de Langerhans

As técnicas de criopreservação vêm sendo desenvolvidas e aprimoradas de forma bastante considerável, tornando possível o armazenamento de diferentes tipos de células de mamíferos quase que indefinidamente, embora mantendo ausente em grande parte das vezes, a perda de funções inerentes ou propriedades. Desta forma, a criopreservação pode superar os inconvenientes associados à cultura contínua de células, como por exemplo, possíveis contaminações por microrganismos, elevado custo de manutenção e as alterações de fenótipo que podem ocorrer devido às passagens celulares. No entanto, poucos relatos são encontrados sobre a utilização e padronização de métodos de criopreservação para CLs humanas, muito necessários para aquisição de resultados mais confiáveis quanto à reprodutibilidade de experimentos envolvendo este tipo celular.

Apenas no ano de 2002, Seo et al. publicou um artigo sobre as dificuldades de criopreservação deste tipo celular específico, direcionando grande parte das dificuldades ao fato destas células serem terminalmente diferenciadas e muito sensíveis a lesões causadas pelo congelamento rápido. Seo sugere que estas células devem ser inicialmente resfriadas para serem então gradualmente congeladas, sem que a formação dos cristais de gelo venha a inviabilizar sua posterior utilização.

3.1.6 Membrana Basal

A membrana basal, camada que suporta a maioria dos epitélios, integra a interface entre a derme e epiderme, diferenciando-se dos tecidos adjacentes em virtude de sua estrutura e composição molecular. Na membrana basal estão fixados os queratinócitos através de hemidesmossomos, que apresentam diâmetros que variam de 500 a 1.000 nm (Harris, 2009). Sua espessura oscila de 60 a 140 nm, e na região mais profunda a laminina e a fibronectina, proteínas distintas da matriz extracelular, encontram-se associadas a uma rede de colágeno, proteoglicanas e outras proteínas, apresentando estrutura trançada com interstícios para acomodar os canais sudoríferos e os infundíbulo dos folículos pilosebáceos (Harris, 2009; Kierszenbaum & Tres, 2012).

A membrana basal é formada de dois componentes: a lâmina basal e a lâmina reticular. A lâmina basal é uma matriz extracelular em formato de lâmina que mantém contato direto com a superfície das células epiteliais, tendo origem no arranjo de moléculas de laminina com colágeno do tipo IV, entactina e proteoglicanas. A lâmina reticular é constituída por fibras de colágeno, que fornecem a sustentação para a lâmina basal, sendo sucessiva ao tecido conjuntivo (Kierszenbaum & Tres, 2012).

3.1.7 A Derme

A derme é constituída por uma espessa camada de tecido conjuntivo composto por grandes quantidades de elastina e colágeno, sobre a qual se apoia a epiderme. Nela se encontram algumas fibras elásticas e reticulares, bem como muitas fibras colágenas, onde estão presentes vasos sanguíneos e linfáticos, além de numerosas terminações nervosas. Algumas das principais funções da derme se resumem em servir como tecido de sustentação para a epiderme, manter a homeostase, promover flexibilidade e fornecer proteção contra traumas mecânicos. Na derme são encontradas células endoteliais, células musculares lisas, mastócitos, fibroblastos e demais células do sistema imunológico, assim como uma grande porção de matriz extracelular. Sendo responsáveis pela síntese de diferentes macromoléculas que compõe esta matriz, os fibroblastos também possuem uma intensa atividade durante o processo de cicatrização (Peyrefitte et al., 1998; Gamonal, 2002; Supp & Boyce, 2005). Acordando com esta composição diferenciada da pele, os fibroblastos dérmicos representam uma população

heterogênea de células, definidas de acordo com sua localização dentro da derme (Cormack, 1987).

3.1.7.1 Fibroblastos

Os fibroblastos originam-se de células mesenquimais indiferenciadas e tem como principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular. São os principais constituintes celulares do tecido conjuntivo, aparecendo desta forma, em praticamente todos os tecidos e órgãos do corpo que possuem tecido conjuntivo na sua constituição (Sorrell & Caplan, 2004; Masseno et al., 2010). O núcleo pode ser oval ou alongado, possuindo uma membrana nuclear delgada, um ou dois nucléolos distintos, e uma pequena quantidade de cromatina finamente granular. No entanto, podem apresentar uma variedade de formas e tamanhos quando em cultura (Midwood et al., 2004; Abraham, 2011).

Como maior componente celular do tecido conjuntivo, os fibroblastos são células capazes de modular a sua capacidade metabólica, sendo que as células com intensa atividade de síntese são denominadas fibroblastos ativos, enquanto as células quiescentes são chamadas de fibrócitos. Os fibroblastos ativos são células alongadas e fusiformes, que apresentam um citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvido (Gartner & Hiatt, 2007; Junqueira & Carneiro, 2012). Os fibrócitos são células menores do que os fibroblastos e possuem um citoplasma acidófilo com pouca quantidade de retículo rugoso (Gartner & Hiatt, 2007). Durante a cicatrização, os fibrócitos podem ser recrutados do tecido adjacente não lesado, se revertendo para o estado de fibroblasto e reativando sua capacidade de síntese (Masseno et al., 2010; Junqueira & Carneiro, 2012).

Existem evidências de que os fibroblastos desempenham um importante papel na comunicação celular que ocorre entre o endotélio e o epitélio, estando aptos a proporcionar uma superfície para os leucócitos no qual eles possam migrar através do interstício (Sirianni et al., 2006). Estas células também são capazes de secretar um diversificado repertório de citocinas, sendo capazes de ser ativadas por citocinas pré-inflamatórias e por contato célula-célula (Sato et al., 2002; Fitzgerald et al., 2004).

3.2 Substituição dos Modelos Animais

Devido a crescente necessidade da elaboração de substitutos de tecidos humanos para o tratamento de feridos e doentes, assim como, a grande demanda de pele para os testes químicos das áreas farmacêutica e cosmética, uma grande quantidade de pesquisadores de todo o mundo, vem desenvolvendo e aprimorando os modelos de equivalentes dermoepidérmicos já existentes.

Modelos animais têm sido utilizados por décadas como método mais eficaz para testes de sensibilidade da pele. No entanto, os modelos animais não podem ser considerados como modelos ideais para estes testes, devido às diferenças fisiológicas entre animais e humanos, as quais causam respostas nem sempre coincidentes com a resposta humana (Fentem et al., 2001). Testes de sensibilidade praticados em modelos animais, potencialmente lhes causam dor e desconforto, sendo os resultados nem sempre preditivos para aqueles encontrados em seres humanos. Além disso, ocorre uma pressão cada vez maior por parte das novas leis de ética na experimentação animal. Se os modelos de equivalentes dermoepidérmico possuírem as funções normais da barreira córnea epidérmica e se mostrarem sensíveis a compostos alergênicos, estes poderiam substituir os tradicionais testes em animais e humanos para determinar o potencial de sensibilização dérmica de uma matéria-prima ou um produto acabado. Embora tais modelos não possam substituir completamente a necessidade de alguma experimentação animal, podem reduzir enormemente o número de testes de dermato-toxicidade animal na cosmetologia e dermatologia (Huang & Fu, 2011).

No ano de 1959, foi publicado pela primeira vez o livro “The Principles of Human Experimental Technique”, por Russel & Burch no qual foi criada a expressão dos “3R’s”, uma abreviação das iniciais das palavras *replacement*, *reduction* e *refinement*, que, em português significam substituição (substituir a utilização de vertebrados por outros métodos equivalentes), redução (reduzir o número de animais utilizados no experimento, sempre que possível) e refinamento (minimizar ao máximo o desconforto e/ou sofrimento animal), respectivamente.

Existem inúmeros movimentos ao redor do mundo que desaprovam o uso de animais para testes laboratoriais e clínicos, sendo que, na Europa os testes em animais na indústria cosmética, para produtos acabados, não são mais permitidos.

3.3 Cultura Celular e Bioengenharia de Tecidos

Devido a crescente necessidade de métodos alternativos e efetivos para o tratamento de diferentes injúrias nos tecidos epiteliais, pesquisadores de todo o mundo vem desenvolvendo desde 1880 (Girdner, 1881) inúmeras alternativas para a substituição da pele humana afetada, por enxertos de pele autólogos, alogênicos e xenogênicos. Somente na segunda metade do século XX, as descobertas de Carrel & Burrows (1910) relativas à proliferação de queratinócitos aderidos a placas de cultura, foram utilizadas de forma efetiva para a multiplicação destas células *in vitro* sem a perda de sua viabilidade e potencial de cultivo (Shuck et al., 1969). O desenvolvimento da bioengenharia de tecidos associada à biologia molecular deu origem à cultura celular *in vitro* baseada nas condições encontradas *in vivo*, sendo esta prática imortalizada pelos experimentos de Rheinwald & Green (1975), e sua nova técnica de cultura de queratinócitos em múltiplas camadas, com presença de queratinização discreta nas camadas superficiais, levando à formação do primeiro equivalente epidérmico rudimentar.

A evolução dos métodos de cultivo de queratinócitos para a formação da epiderme foi bastante gradual, partindo do cultivo de pele humana fresca sobre derme reticular porcina (Freeman et al., 1976), para o cultivo de queratinócitos humanos sobre a membrana basal da derme lamelar também de porcos (Régner et al., 1981), simulando de maneira mais fidedigna as condições encontradas *in vivo*. No entanto, o primeiro pesquisador a estabelecer um protocolo realmente eficaz, muito semelhante aos ainda utilizados nos dias de hoje foi Pruniéras et al. em 1983. Este protocolo consistiu na cultura de queratinócitos humanos sobre derme humana morta e desepidermizada contando ainda com a exposição das células epidérmicas a uma interface ar-líquido possibilitando a síntese de queratinas e conseqüentemente a formação de um extrato córneo, fundamental para a formação de uma epiderme verdadeiramente funcional.

Durante as três últimas décadas, o cultivo seletivo de componentes celulares da pele foi alcançado, aumentando consideravelmente nosso entendimento de sua biologia e funcionamento. Além disso, descobriu-se que as células cultivadas podem ser reagrupadas de acordo com o delineamento experimental e das indicações de seu uso (Abdel-Naser et al., 2005).

Neste sentido, os modelos de cultura de tecidos vão desde uma simples cultura em monocamada de um único tipo celular, passando por coculturas mais elaboradas de

células epiteliais e mesenquimais e, finalmente, a culturas organotípicas¹ de equivalentes tridimensionais de pele, que formam um epitélio altamente organizado (Fusenig, 1994). Nestes modelos de equivalentes da pele, os queratinócitos que formam a epiderme, crescem expostos ao ar em uma matriz composta de derme acelular humana, cultivada com fibroblastos humanos ou uma linhagem específica de fibroblastos murinos, sendo possível a incorporação de outros tipos celulares, como os melanócitos e as células de Langerhans, dando origem a uma complexa arquitetura tecidual, comparada a estrutura normal do tecido (Stark, 1999).

Visando a obtenção de uma epiderme humana reconstruída *in vitro* com função imunitária, a equipe liderada por Régnier introduziu em 1997, células de Langerhans no modelo proposto por Bessou et al. em 1995, durante o período de formação da epiderme. Como fonte de obtenção das células de Langerhans deste experimento, foram utilizadas células provenientes de sangue de cordão umbilical, conhecidas como células progenitoras hematopoiéticas, as quais, após a sua coleta e separação, foram induzidas a se diferenciarem em células dendríticas (células de Langerhans) pelo Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e pelo Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α). Outra fonte também utilizada para a obtenção de CLs é o sangue periférico, conforme relatado por Régnier et al. (1998). No entanto, não foi encontrada nenhuma referencia na literatura relacionada a modelos de pele com função imunitária reconstruídos com a utilização de células de Langerhans isoladas diretamente da epiderme humana.

3.4 Testes de Citotoxicidade e Fototoxicidade *in vitro*

Os experimentos de citotoxicidade e fototoxicidade *in vitro*, avaliam substâncias, novas ou desconhecidas, em contato com as células da pele, com a finalidade de avaliar o seu potencial tóxico, presumindo os efeitos causados por tais componentes quando em contato com a pele em ausência e presença de luz.

¹ Conjunto de técnicas que permite a cultura e reagrupamento de células de diferentes linhagens (queratinócitos e fibroblastos, por exemplo) para recriar equivalentes tridimensionais de pele *in vitro* utilizando sistema ar-líquido.

3.4.1 Citotoxicidade

A década de 80 foi marcada por uma fase de esforço considerável no sentido de estabelecer a utilidade de testes de citotoxicidade *in vitro* para prever o potencial tóxico de substâncias químicas *in vivo*. Os resultados obtidos da toxicidade *in vitro* corroboram com os obtido *in vivo*, provando a eficiência destes testes na predição da toxicidade aguda de novos produtos químicos (Garle et al., 1994).

Os testes de citotoxicidade podem ser realizados por meio de métodos que verificam a taxa de morte celular, apoptose ou a taxa de viabilidade celular. Um dos métodos mais comumente utilizado é o ensaio de Vermelho Neutro (NR, do inglês *Neutral Red*).

O ensaio NR é simples, preciso e produz resultados reproduzíveis. O principal componente deste ensaio é o corante vital NR (vermelho básico 5, Toluileno Vermelho). As células viáveis internalizam o corante por transporte ativo e o incorporaram nos lisossomos, enquanto as células não viáveis não são capazes de internalizar o corante. Este corante incorporado pode ser libertado do interior das células com uma solução de etanol acidificado. A quantidade de corante liberado é diretamente proporcional ao número de células vivas presentes na amostra. Uma quantidade maior ou menor de corante no sobrenadante indica o grau de citotoxicidade causada pela substancia ou pela formulação utilizada no ensaio (Triglia et al., 1991).

3.4.2 Fototoxicidade

A Fototoxicidade é definida por uma reação tóxica, causada por uma determinada substância após a exposição à luz. Esta reação pode ser provocada ou aumentada mesmo com baixas doses da substância, ou ainda induzida por irradiação da pele após a administração sistêmica de uma substância (OECD, 2004).

A realização dos testes de fototoxicidade é feita em câmara específica para este tipo de ensaio utilizando parâmetros pré-definidos. Este tipo de câmara pode ser adquirido comercialmente, porém também pode ser desenvolvida mediante o protocolo ©ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. INVITTOX n. 78, 2008.

3.4.3 Câmara para ensaio de fototoxicidade

Para a realização dos testes de fototoxicidade é necessária utilização de uma câmara específica. Esta câmara é comercializada, porém o guia [©]ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. INVITTOX n. 78 (2008), descreve os requisitos necessários para a sua construção.

Segundo o guia, a câmara deverá proporcionar um ambiente estável, ter aproximadamente 80 cm de altura e 50 cm de largura, permitir um bom ajuste da distância de exposição entre a placa e a luz UV, de aproximadamente 60 cm, para alcançar uma radiação UVA de $1,7 \text{ mW/cm}^2$ ($= 1 \text{ J/cm}^2$ para 10 minutos de exposição), sendo que para o teste de fototoxicidade, o protocolo OECD Toxicity Guide - 432, preconiza que a dose de radiação, sobre o composto químico em contato com as células, deve atingir 5 J/cm^2 (ECVAM, 2008; OECD, 2004).

A simulação solar deve ser feita com lâmpada de arco de xenônio e filtros apropriados, para permitir somente a passagem dos raios UVA. Sua fonte de luz deve ser estável e uniforme, de modo a atender os critérios de qualidade espectral especificados pelo guia (Azevedo-Filho, 2008).

A medida para validação e controle da dose de radiação emitida deve ser efetuada com o auxílio de um dispositivo físico. Este dispositivo físico deve determinar o número de fótons absorvidos em um dado feixe de luz em um espaço definido (Kuhn et al., 2004). Estes são subdivididos em dois principais tipos de detectores: os térmicos (que convertem energia radiante em calor), por exemplo, bolômetros e termistores; e fotoelétricos (que convertem energia radiante em corrente elétrica). Para detectar luz visível e UV são utilizados os que convertem energia eletromagnética em corrente elétrica, sendo estes: luxímetro, que mede a intensidade da luz visível, e radiômetro espectral que mede a irradiância emitida pela luz UV (Azevedo-Filho, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os testes descritos a seguir, foram realizados sob condições adequadas de assepsia, garantindo resultados confiáveis e eficientes nos testes. A descontaminação de superfícies, equipamentos e ambientes, foi periodicamente executada cumprindo os procedimentos operacionais padrões (POPs).

Em caso de ocorrência de contaminação, ou resíduo de tecidos utilizados para obtenção de células isoladas, os mesmos foram submetidos à ação de hipoclorito 2%, por 30 minutos, antes de serem descartados em sacos plásticos (branco leitoso), apropriados para o descarte de material infectante. Estes sacos foram devidamente depositados em recipiente adequado para coleta seletiva de materiais biológicos e hospitalares.

4.1 Obtenção dos materiais biológicos

Para o preparo das bases dérmicas, foram utilizadas lâminas de pele removidas de doadores multiórgãos, cedidas para finalidade de pesquisa pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A pele para isolamento celular, obtida de mamoplastia redutora, de mulheres entre 18 e 40 anos foi doada pelas pacientes, após leitura e autorização do “termo de consentimento livre e esclarecido”, por intermédio do Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP ou diretamente por intermédio dos cirurgiões plásticos, Dr. Fábio Kamamoto e Dr. Rodrigo Dornelles. O projeto em questão foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – FSPUSP sob o número CAAE 00583812.6.0000.5421.

Foram utilizadas peles de 12 doadoras, para o desenvolvimento dos protocolos e estudos de reprodutibilidade dos resultados. As biópsias utilizadas neste trabalho foram codificadas como: 483, 486, 001, 002, 003, 004, 005, 007, 009, 010, 011 e 012.

Os fibroblastos murinos foram adquiridos da empresa ATCC, sob o código CCL-92.

4.2 Preparo dos meios de cultura

4.2.1 Meio para cultivo de fibroblastos (D10):

O D10, assim denominado pelo nosso laboratório, é composto por meio DMEM (GIBCO) acrescido de 4 mM de L-Glutamina (GIBCO), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B (Invitrogen) e 10% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen).

4.2.2 Meio para cultivo de queratinócitos (K⁻):

O meio de cultura utilizado para a semeadura de queratinócitos, quando em baixa densidade, denominado pelo nosso laboratório de K⁻ (K menos), é composto por DMEM (GIBCO) e F12 (GIBCO) na proporção de 1:2, respectivamente, acrescido de 4 mM de L-Glutamina (GIBCO), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B (Invitrogen), adenina (0,18 mM), hidrocortisona (0,4 µg/mL), triiodotironina – T₃ (20 pM), toxina da cólera - TC (0,1 nM), insulina de pâncreas bovino (5 µg/mL) e 10% de Soro Fetal Bovino (Hyclone: Fetal Clone III - Thermo Scientific). Este mesmo meio de cultura quando utilizado para as subseqüentes trocas de meio, para manutenção das células, ou para a semeadura de queratinócitos em alta densidade, é acrescido de fator de crescimento epidérmico - EGF (10 ng/mL) e denominado de K⁺ (K mais).

4.2.3 Meio de congelamento padrão

O meio de congelamento utilizado para a criopreservação de queratinócitos é composto por meio de cultivo K⁻, 30% de Soro Fetal Bovino (Hyclone: Fetal Clone III - Thermo Scientific), e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma). Para a criopreservação de fibroblastos, meio de cultivo D10, 30% de Soro Fetal Bovino (Invitrogen) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma).

4.2.4 Meio de cultivo para células de Langerhans – migração

O meio de cultivo utilizado para favorecer a migração espontânea das CLs é composto por RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma), 1% de estreptomicina e de penicilina (Sigma), 10% de soro fetal bovino (FBS,

Invitrogen) suplementado com 1% de tampão HEPES (GIBCO) e 40 ng/ml de GM-CSF (Pepro-Tech).

4.2.5 Meio de congelamento para células de Langerhans

Meio de congelamento diferenciado para este tipo celular, composto por 90% de SFB (FBS, Invitrogen) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma).

4.3 Preparo das biopsias para isolamento celular

Todo o processo foi realizado sob condições assépticas e em ambiente controlado, utilizando fluxo laminar do tipo vertical e materiais esterilizados.

As amostras de tecido foram previamente submetidas à lavagem em solução fisiológica para remoção dos resíduos de sangue. Em seguida, feita à desinfecção do tecido, agitando-o em solução alcoólica a 70% durante aproximadamente 30 segundos. A lavagem e desinfecção do tecido é finalizada com a realização de três banhos sequenciais em solução fisiológica, para remoção de resquícios de álcool e sangue ainda presentes na amostra.

Após a desinfecção, foi feita a transferência da amostra de pele para uma placa de Petri e realizada a remoção do tecido celular subcutâneo e do máximo de derme possível com auxílio de pinça clínica e tesoura curva, obtendo pele de espessura parcial bastante fina (aproximadamente 0,2 mm).

O tecido resultante desse processo foi submetido às técnicas de explante e/ou de enzima digestiva, para obtenção das células isoladas.

4.4 Obtenção dos queratinócitos e melanócitos humanos

Para a obtenção dos queratinócitos e melanócitos humanos, foi seguida a técnica utilizada por De Luca & Cancedda (1992), que é baseada no método proposto por Rheinwald & Green (1975), onde queratinócitos e melanócitos podem ser cultivados em cocultura sobre camada de sustentação (*feeder layer*). A amostra de pele de espessura parcial já lavada e descontaminada, foi cortada em fragmentos menores que 1 mm², imersa em tripsina 0,05% + EDTA 0,02% e transferida para um tripsinizador, sendo mantida sob agitação em estufa a 37 °C, CO₂ (5%) por 30 minutos. Findado este tempo, a solução de tripsina contendo células em suspensão foi transferida para um tubo de

fundo cônico e a ação da enzima neutralizada pela adição de solução contendo íon cálcio e albumina (v/v). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1500 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspendido em meio de cultura próprio para queratinócitos (K⁻) sem adição de fator de crescimento epitelial (EGF), sendo então, retirada uma alíquota para a contagem das células em câmara hemocitométrica e, reservadas.

Este processo foi repetido até observar-se o decréscimo no rendimento de células obtidas no intervalo, sendo as células adquiridas no processo, semeadas em garrafas de cultura de 25 cm², na proporção de 4x10⁴ células/cm² sobre camada de sustentação constituída por 3x10⁴ células/cm² CCL-92 (ATCC) previamente irradiadas a 60 Gy em irradiador de Cobalto-60 tipo Gammacell e incubadas em estufa a ± 37 °C e CO₂ (5%). O meio de cultura K⁻ adicionado de EGF foi utilizado nas trocas subsequentes (a cada 48 horas) para manutenção das células.

4.5 Obtenção dos fibroblastos humanos

A obtenção dos fibroblastos humanos ocorreu segundo a técnica de explante proposta por Carrel & Burrows (1910). As amostras de tecido foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 mm² e levemente banhadas em soro bovino para melhorar sua aderência, sendo então, “coladas“ uma a uma, sobre a superfície da garrafa de cultura de 25 cm² de maneira que a derme papilar permanecesse em contato com a superfície de cultivo do frasco.

Após esta etapa, foi adicionado 5 mL de meio D10 a garrafa de cultura, e esta, mantida em incubadora úmida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, sendo a troca de meio efetuada a cada 72 horas até que um número suficiente de células migrasse do tecido para a garrafa de cultura, apresentando aspecto de subconfluência, no seu micro ambiente. Neste momento os fragmentos dermoepidérmicos foram descartados e pode ser realizada a amplificação da cultura da seguinte maneira: a superfície interna do frasco lavada com solução fisiológica e nele adicionados 3 mL de solução de tripsina 0,05% + EDTA 0,02%. A reação enzimática sempre realizada em incubadora úmida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, até que as células se desprendessem do fundo da garrafa.

A ação da tripsina é neutralizada com o mesmo volume de meio de cultura acrescido de 10% de soro fetal bovino, antibióticos e antimicótico. O conteúdo da

garrafa de cultura pode ser então transferido para um tubo de fundo cônico e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm.

O sobrenadante desta centrifugação descartado e o botão celular (pellet) ressuspenso em meio de cultura fresco, homogeneizado e semeado em novas garrafas. Amplificações subsequentes foram realizadas até obtenção do número necessário de células para a realização dos experimentos.

Outro método utilizado para a obtenção de fibroblastos foi o plaqueamento das células provenientes da primeira e da última tripsinização de cada uma das peles processadas em formato de “pool”, em meio D10. Da mesma forma como procedido no método de explante, as células foram cultivadas em garrafa de cultura e esta, mantida em incubadora úmida a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, sendo a primeira troca de meio efetuada em 72 horas. No momento em que a garrafa de cultura apresentasse subconfluência de fibroblastos, esta era imediatamente submetida a um processo enzimático para retirada dos mesmos, e amplificação da cultura, até a obtenção do número necessário de células para a realização dos experimentos.

4.6 Obtenção das células de Langerhans

4.6.1 Protocolo 1 - Obtenção enzimática direta

No primeiro protocolo utilizado para o isolamento das CLs, a amostra de pele foi inteiramente processada seguindo o protocolo para obtenção de queratinócitos, estabelecido por Rheinwald & Green em 1975, que apresentou uma grande quantidade de células isoladas em suspensão. Esta suspensão foi então dividida em duas partes iguais, sendo a primeira, semeada em garrafas de cultivo para adesão dos queratinócitos e melanócitos presentes na suspensão e posterior coleta das células não aderentes – após 24 horas do semeadura. Após o período necessário para adesão das células, o sobrenadante de todas as garrafas foi coletado, as células contadas com Azul de Tripán e criopreservadas em meio apropriado para manutenção das CLs (Protocolo 1A - Coleta de sobrenadante). A segunda parte da suspensão de células epidérmicas foi centrifugada a 1800 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso em PBS. A suspensão foi então submetida ao tratamento com gradiente de Ficoll Paque Plus, para separação das células mononucleadas, como as CLs, sendo estas, centrifugadas a 1800 rpm por 20 minutos, contadas em câmara hemocitométrica com

Azul de Trypan e criopreservadas na sequência (Protocolo 1B – Epiderme/derme + Gradiente de Ficoll Paque).

4.6.2 Protocolo 2 – Expansor de Pele

No segundo protocolo para isolamento das CLs, a pele integra passou pelo processo de assepsia, retirada de vasos e tecido adiposo, conforme descrito no item 4.3, para então ser separada em três partes iguais, sendo uma delas, voltada para a obtenção de queratinócitos, e as outras duas, para a obtenção das CLs. Esta segunda parte do tecido foi testada quanto a quantidade de derme retirada antes da aplicação da Dispase II[®] (Quadro 1), para então ser cortada de forma a mimetizar uma rede. Esta rede foi fragmentada nas dimensões de 2,0 x 1,5 cm e incubada por 90 minutos a 37 °C em solução de Dispase II[®] (1,5 mg/mL, Sigma), sendo necessário 1 mL da solução para cada cm² de tecido. Dado esse período, a solução de Dispase II[®] foi neutralizada e a separação entre derme e epiderme efetuada com o auxílio de duas pinças.

Quadro 1 – Quantidade de derme retirada da pele antes da permanência em Dispase II[®] para separação entre derme e epiderme.

Simbologia da derme	Definição da retirada da derme
++	Derme aparentemente ausente (epiderme visível)
+	Derme de espessura bastante fina, mas presente
-	Derme de espessura fina
--	Derme de espessura média, retirado apenas o excesso

Depois de separada, a epiderme foi lavada por três vezes em PBS e incubada em meio específico para favorecer a migração das CLs por 48 horas, à 37 °C. Após este período, a suspensão de células, foi filtrada por um filtro de nylon com porosidade de 70 µm, para a remoção dos fragmentos epidérmicos, centrifugada a 1800 rpm por 5 minutos, contadas em câmara hemocitométrica com Azul de Tripán e criopreservadas na sequência.

4.6.3 Protocolo 3 – Epiderme + Gradiente de Ficoll Paque

No terceiro protocolo para isolamento das CLs, a pele integra passou pelo processo de assepsia, retirada de vasos e tecido adiposo, conforme descrito no item 4.3, para então ser separada em três partes iguais, sendo uma delas, voltada para a obtenção de queratinócitos, e as outras duas, para a obtenção das CLs. Esta segunda parte do tecido, foi então cortada em fragmentos de 2,0 x 1,5 cm e incubada por 90 minutos à

37 °C em solução de Dispase II[®] (1,5 mg/mL - SIGMA), sendo necessário 1 mL da solução para cada cm² de tecido. Dado esse período, a solução de Dispase II[®] foi neutralizada e a separação entre epiderme e derme efetuada com o auxílio de duas pinças. Depois de separada, a epiderme foi incubada em tripsina 0,05% + EDTA 0,02% e transferida para um tripsinizador, sendo mantida sob agitação em estufa a 37 °C, CO₂ (5%) por 30 minutos. Findado este tempo, a solução de tripsina contendo células em suspensão foi transferida para um tubo de fundo cônico e a ação da enzima neutralizada pela adição de solução contendo íon cálcio e albumina (v/v). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1800 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso em PBS. A suspensão de células epidérmicas foi então submetida ao tratamento com gradiente de Ficoll para separação das CLs, após separadas, centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos, contadas em câmara hemocitométrica com Azul de Tripán e criopreservadas na sequência.

4.7 Análise imunofenotípica de células de Langerhans

A análise do fenótipo celular que caracteriza as células de Langerhans, foi realizada por meio de citometria de fluxo, utilizando-se o equipamento FACSCanto (BD Biosciences), para 3 fluorescências, o qual é equipado com laser de argônio para 488 nm, sendo a análise realizada diretamente no software FACSDiva (BD Biosciences). Foram adquiridos 10.000 eventos para a avaliação da presença ou ausência de células marcadas, sendo utilizados anticorpos monoclonais anti-receptores de superfície, característicos deste tipo celular. Por serem APCs profissionais, estas células apresentam inúmeros receptores correspondentes, sendo selecionados os seguintes marcadores: CD1a marcado com o fluorocromo FITC (Dako), membro da superfamília das imunoglobulinas é também uma glicoproteína de membrana do tipo I, com semelhanças estruturais com o MHC de classe I, e o marcador HLA-DR um anticorpo monoclonal conjugado a um fluorocromo FITC (Millipore) que possibilita a identificação de determinados tipos de células apresentadoras de antígeno por citometria de fluxo, assim como, selecionamos um anticorpo monoclonal que este tipo celular não expressa de maneira representativa, o CD14 (BD Biosciences).

O procedimento de marcação das células foi realizado após a criopreservação das mesmas, sendo elas descongeladas no momento da marcação para a análise fenotípica. As células, descongeladas, foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm, para retirada

do meio de congelamento, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 100 µl de PBS-Azida. Foram utilizados apenas 2 µl de cada anticorpo monoclonal anti-humano e controles isotípicos correspondentes para a incubação junto as células por um período de 30 minutos a 4 °C protegidos da luz. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS-Azida e novamente centrifugadas por 6 minutos a 2000 rpm. Parte do sobrenadante foi desprezado e, em seguida, a aquisição dos eventos foi realizada nos 50 µl restantes.

4.8 Identificação das células de Langerhans por microscopia de fluorescência

Outro método utilizado para a confirmação da presença de células de Langerhans nas amostras foi a utilização do marcador HLA-DR conjugado a um fluorocromo FITC para observação das células por microscopia de fluorescência. A marcação das células foi conduzida após a contagem das mesmas em câmara hemocitométrica, com averiguação da viabilidade celular com Azul de Tripán, sendo iniciada então com a lavagem das células, fixação por metanol, bloqueio, incubação com o anticorpo monoclonal conjugado, disposição das células já marcadas em lâminas silanizadas e observação destas ao microscópio.

4.9 Criopreservação e descongelamento das células de Langerhans

Seguindo o método proposto por Seo et al. (2002), com algumas adaptações, o congelamento das CLs foi realizado de forma lenta gradual, à uma razão de -1 a -3 °C por minuto. As CLs, separadas pelos diferentes protocolos citados nos itens anteriores, foram ressuspensas com meio de congelamento composto por 90% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a 4 °C, e então aliqüotadas em tubos criogênicos. Os tubos criogênicos, contendo a solução de células em meio de congelamento, foram colocados num recipiente de congelamento específico, que apresenta uma taxa de arrefecimento na amostra de 1°C por minuto, sendo então colocado num ultrafreezer -70 °C por 24 horas e por fim estocados à -196 °C em tanque de nitrogênio líquido.

O descongelamento das células criopreservadas foi realizado de forma rápida, em banho aquecido a 37 °C, sendo as células retiradas do tubo criogênico lentamente, com uma solução composta por RPMI acrescido de SFB, num volume 10 vezes maior que o volume de meio congelado que contém as células criopreservadas. As centrifugações

efetuadas a 2200 rpm para a retirada da solução de congelamento das células e formação do botão celular, sendo as células descongeladas contadas com Azul de Tripam em câmara hemocitométrica para averiguação da sua viabilidade pós descongelamento.

4.10 Avaliação do uso das células de Langerhans como teste de sensibilidade

A fim de avaliar a efetividade das células de Langerhans como indicador de sensibilidade cutânea, estas foram expostas a dois agentes: Formaldeído (substância sensibilizadora) e Glicerina (substância não sensibilizadora) em diferentes concentrações conforme Quadro 2. Também foi avaliada a sua sensibilidade a permanência em cultivo e ao fator GM-CSF (20 ng/mL), em comparação com amostra de células apenas descongelada. Sua diferenciação foi avaliada por citometria de fluxo.

4.10.1 Preparo das células de Langerhans e das substâncias empregadas no teste

As soluções das substâncias de ensaio foram preparadas imediatamente antes da sua utilização. As diluições do Formaldeído (sensibilizador) foram feitas de maneira a ter dois valores acima e dois abaixo da IC50 encontrada na literatura para fibroblastos humanos (Bakand et al., 2005), com um fator de 1/20 entre elas, enquanto para a Glicerina (não sensibilizador) foi utilizado este mesmo fator, porém a partir de uma diluição próxima da sua IC50 (Quadro 2).

Quadro 2 – Preparo das diluições da substância sensibilizadora e não sensibilizadora e suas concentrações.

Concentração	Formaldeído (mg/mL)	Glicerina (mg/mL)
IC50	0,197	24,66
F1 e G1	14,55	19,72
F2 e G2	0,73	0,986
F3 e G3	0,036	0,0493
F4 e G4	0,0018	0,00247

A avaliação das CLs foi iniciada com o descongelamento das mesmas, sua contagem em câmara hemocitométrica com Azul de Tripam para verificação da sua viabilidade e semeadura das células em placa multipoços de 96 poços, na concentração de 1×10^5 células em 50 μ L por poço. Adicionou-se 100 μ L de meio de cultura nos poços periféricos da placa de 96 poços (= branco) e 50 μ L da suspensão de células em meio de cultivo nos poços demarcados (Figura 2). Após semeada, a placa de 96 poços

foi mantida por 1 hora em incubadora a 37 °C, com 5% de CO₂ para reestabelecimento das células antes da aplicação das substâncias sensibilizadora e não sensibilizadora.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
C	B	CN1	G4	G3	G2	G1	F1	F2	F3	F4	CN2	B
D	B	CN1	G4	G3	G2	G1	F1	F2	F3	F4	CN2	B
E	B	CN1	G4	G3	G2	G1	F1	F2	F3	F4	CN2	B
F	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
G	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Figura 2 - Esquema representativo do preparo do ensaio químico (teste de sensibilidade) nas placas de 96 poços. Sendo: B = branco (contém só meio de cultura); CN1 = Controle Negativo (células + meio de cultura); CN2 = Controle Negativo (células + meio de cultura acrescido de GM-CSF); G1 – G4 em tons de azul = 4 concentrações da substância Glicerina (células + amostra); F1 – F4 em tons de verde = 4 concentrações da substância Formaldeído (células + amostra).

Após o período de reestabelecimento das CLs, 50 µL das 4 diferentes diluições das 2 substâncias teste foram acrescentados a cada um dos poços da placa de 96 poços, em triplicata (Figura 2). As células foram então incubadas por 24 horas em incubadora a 37 °C, com 5% de CO₂.

4.10.2 Análise da sensibilização por citometria de fluxo

A análise das CLs por citometria de fluxo foi realizada da mesma forma descrita no item 4.7, sendo também utilizados os mesmos marcadores. O critério para determinação da maturação das CLs foi a medida do nível de marcação para CD1a apresentado pelas células em cada uma das concentrações dos compostos químicos testados, comparado com os controles.

4.11 Amplificação das culturas

Após o período de multiplicação das culturas celulares mantidas em incubadora a 37 °C, com 5% de CO₂ e meios de cultura trocados três vezes por semana, foi realizada a amplificação das culturas.

Para a amplificação das culturas de células primárias aderidas às garrafas de cultura, foram respeitadas as velocidades de duplicação dos diferentes tipos celulares,

assim como, a velocidade de duplicação diferenciada de cada uma das culturas de células provenientes de diferentes doadores.

No momento em que as culturas primárias apresentaram a subconfluência necessária, foi realizada a amplificação destas por meio de tripsinização, caracterizando o processo de amplificação celular, sendo feita a passagem das células das garrafas de 25 cm² para garrafas de 75 cm². Este procedimento foi repetido até que a cultura atingisse um número suficiente de células para realização dos experimentos, geralmente na segunda passagem, ou para a criação de um banco de células para cada um dos doadores, para experimentos posteriores.

4.12 Preparo das bases dérmicas acelulares como suporte das culturas

As amostras de pele humana de doador multiorgãos, conservadas em glicerol concentrado (mínimo de 85%) com espessura variando em torno de 0,8 a 1,2 mm, foram cedidas pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As amostras de tecido utilizadas foram cortadas em fragmentos circulares de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro e divididas em grupos, de acordo com a taxa de dose aplicada para cada experimento, sendo basicamente divididas em três grupos: pele glicerolada não irradiada, pele irradiada a 25 kGy e pele irradiada a 50 kGy.

Os fragmentos foram retirados da solução de glicerol e lavados por 15 minutos em solução salina a 0,9% por três vezes, para remoção do glicerol e então colocados em solução de Dispase II[®] a 0,25% (Boehringer-Mannheim) a 37 °C, ocorrendo o início da separação entre a epiderme e a derme após aproximadamente 90 minutos. As epidermes foram destacadas da derme com o auxílio de pinça de ponta redonda e descartadas na sequencia, enquanto os fragmentos dérmicos foram lavados em solução salina a 0,9% e expostos à ação complementar da tripsina a 0,05% + EDTA a 0,02%, durante 15 minutos, sendo novamente lavados com solução fisiológica após este período.

Para conservação da derme acelular contra a degradação durante a irradiação ou para sua conservação até o momento dos experimentos, todos os fragmentos foram novamente imersos em glicerol 98% e mantidos sob refrigeração a 4 °C por um mínimo de 21 dias (Pigossi et al., 1971) ou até a sua utilização. Após 21 dias os fragmentos foram acondicionadas em embalagem dupla de polietileno e seladas termicamente. Nos grupos de 25 kGy e 50 kGy as dermes foram irradiadas no irradiador de Cobalto-60

(Gammacell-220 Nordion Inc., Quebec, Canadá), do Laboratório de Fontes Intensas de Radiação, unidade do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR, IPEN-CNEN/SP), à temperatura de 2 a 8 °C, com atividade, no momento da irradiação, de 3.484,292 Ci e taxa de dose 2,88 kGy/h.

Foram realizadas três novas lavagens com solução salina a 0,9% nos fragmentos dérmicos, irradiados e não irradiados, para retirada total do glicerol, para serem dispostos individualmente em grelhas de aço inoxidável com a derme papilar voltada para cima, sendo estas por sua vez, encaixadas em placas de cultura tipo multipoços de 12 poços. Anéis estéreis de aço inoxidável com diâmetro interno de 8 mm foram colocados na superfície de cada base dérmica para fins de contenção do local de inoculação das células isoladas, assim como para a prevenção do acúmulo de células no fundo dos poços de cultura. Esses sistemas foram levados à incubadora com meio constituído de DMEM e antibióticos, ambos da marca GIBCO, até o momento da semeadura das células, sendo denominados de pré-equivalentes.

4.13 Cultura das células dérmicas e epidérmicas sobre base dérmica em placas multipoços

Foram realizados 5 experimentos comparativos para a escolha da derme a ser utilizada (derme glicerolada não irradiada, 25 kGy ou 50 kGy), assim como, para a padronização do número de células utilizadas para construção dos equivalentes dermoepidérmicos ($1,5 \times 10^5$, 3×10^5 e 4×10^5 células/cm² de queratinócitos; $1,5 \times 10^5$ e 2×10^5 células/cm² de fibroblastos e 5×10^5 células/cm² de células de Langerhans).

Para a montagem dos equivalentes dermoepidérmicos, foram semeados nas quantidades pré-estabelecidas, fibroblastos, células epidérmicas (relação entre melanócitos e queratinócitos 1:32 respectivamente) e 5×10^5 células/cm² células de Langerhans (apenas em alguns dos experimentos), no centro de anéis de aço inoxidável localizados na superfície dos fragmentos dérmicos acelulares.

Quanto à adição das CLs nos equivalentes de pele, foram também testados os momentos de semeadura e a ativação das células com GM-CSF anteriormente a sua inclusão no equivalente. Foram realizados 4 diferentes tipos de semeadura: 1. CLs semeadas diretamente sobre a derme acelular 24 horas antes das demais células; 2. CLs ativadas com GM-CSF e semeadas diretamente sobre a derme acelular 24 horas antes

das demais células; 3. CLs semeadas juntamente com as demais células sobre a derme acelular; 4. CLs semeadas sobre as demais células após 24 horas do início do cultivo.

Independentemente do modelo de equivalente, após a semeadura, todos os pré-equivalentes foram mantidos em incubadora úmida a 37 °C com 5% de CO₂, com meio K⁻ em sistema ar-líquido por 24 horas para a adesão das células. Após este período, foram colocados em sistema imerso, sendo realizadas as trocas de meio de cultivo a cada 48 horas com meio K⁺. Após 7 dias de cultivo os equivalentes dermoepidérmicos foram expostos à interface ar-líquido e após 21 dias de cultivo, foram fixados para a realização dos testes histológicos.

4.14 Validação do equivalente dermoepidérmico como teste de toxicidade

4.14.1 Formulação dos protetores solares e processo de degradação

Selecionamos para este ensaio, dois dos ingredientes cosméticos, mais utilizados nas formulações de protetores solares comercializados, a Avobenzona e o Metoxicinamato de Octila (Quadro 3).

Quadro 3 - Composição das formulações utilizadas para o ensaio de validação do equivalente dermoepidérmico como teste de toxicidade.

%	Formulação 1 (Base)	Formulação 2 (OMC)	Formulação 3 (AVB)
0,05	BHT	BHT	BHT
0,05	Methylchoroisothiazolinone/ Methylisothiazolinone	Methylchoroisothiazolinone/ Methylisothiazolinone	Methylchoroisothiazolinone/ Methylisothiazolinone
0,1	EDTA disodiun	EDTA disodium	EDTA disodiun
2,0	Glyceryl stearate	Glyceryl stearate	Glyceryl stearate
2,0	Stearyl alcohol	Stearyl alcohol	Stearyl alcohol
2,5	Cetearyl alcohol	Cetearyl alcohol	Cetearyl alcohol
3,0	Peg 100 stearate/glyceryl/stearate	Peg 100 stearate/glyceryl/stearate	Peg 100 stearate/glyceryl/stearate
3,0	Caprylyl methicone	Caprylyl methicone	Caprylyl methicone
4,0	Glycerin	Glycerin	Glycerin
10	C12-C15 alkyl benzoate	C12-C15 alkyl benzoate	C12-C15 alkyl benzoate
10		Octyl Methoxycinnamate	
4,0			Butyl Methoxydibenzoylmethane
Qsp 100	Acqua	Acqua	Acqua

As três formulações citadas, foram empregadas nos testes em duas diferentes condições: degradadas e não degradadas.

O processo de degradação de 2 g de cada amostra, espalhadas em placa de petri formando uma camada de aproximadamente 2 mm, foi conduzido em uma câmara de fotoestabilidade (Fotoestabilidade 424 CF - Nova Ética), sob condições controladas -

24,5 °C por 60 horas. As amostras não degradadas foram mantidas cobertas com folhas de alumínio no interior na câmara, durante o mesmo período de tempo e temperatura.

Como controles foram utilizadas: formulação base virgem (sem manipulação, ou seja, acondicionada em um frasco e mantida a temperatura ambiente) e somente PBS.

4.14.2 Construção dos equivalentes dermoepidérmicos e aplicação das formulações

As 4 placas multipoços de 12 poços que continham os 44 equivalentes construídos de acordo com o item 4.13, sem a inclusão de CLs em sua estrutura, sendo que foi efetuada aplicação tópica, em sextuplicata, de ~ 200 mg/cm² das formulações base, com fotoprotetor UVA (Avobenzona) e com fotoprotetor UVB (Metoxicinamato de Octila) nas mesmas quantidades. Os controles foram avaliados em quadruplicata.

4.14.3 Exposição dos equivalentes a irradiação em câmara de fototoxicidade

A simulação da luz solar por meio da irradiação com lâmpadas de UVA, foi realizada em uma câmara de testes de fototoxicidade, projetada e construída de acordo com o protocolo ©ECVAM DB-ALM: protocol INVITTOX com moldura de aço inoxidável e duas lâmpadas de Xenônio de 15 Watts. Esta câmara atinge uma irradiação UVA de 1,7 mW/cm² (1 J/cm² em 10 minutos de exposição) seguindo fielmente o protocolo da OECD Guia de Toxicidade 432, que propõe uma dose de radiação de 5 J/cm² para testes de desempenho da fototoxicidade de substâncias químicas em contato direto com as células estudadas (OECD, 2004; ECVAM, 2008). Esta câmara de fototoxicidade utilizada neste experimento foi concebida e validada em nossos laboratórios, como parte do projeto de mestrado intitulado "Utilização de cocultura de melanócitos e queratinócitos para avaliação do potencial do Líquido da Castanha de Caju (LCC) como agente despigmentante" (Sufi, 2013).

As placas multipoços, preparadas como descrito no item anterior, foram então divididas em dois grupos: o grupo exposto a radiação UVA e irradiados com 5 J/cm² (radiação UVA⁺), e o grupo colocado na área escura da câmara (UVA⁻) nas mesmas condições de tempo e temperatura que o grupo UVA⁺. Após o procedimento de irradiação, as formulações aplicadas topicamente foram retiradas e os modelos de pele lavados, sendo adicionado meio de cultivo fresco nos poços e as placas mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.14.4 Avaliação das modificações induzidas pela radiação UVA

Para a avaliação dos possíveis danos causados pela radiação UVA nas células dos equivalentes, após 24 horas do procedimento de irradiação, foi adicionada a solução de Vermelho Neutro (NR, do inglês *Neutral Red*) nas placas multipoços contendo os equivalentes e estes mantidos a 37 °C com 5% de CO₂ durante 3 horas. Após esse período, a solução de NR foi removida, os equivalentes lavados e uma solução solubilizante (SS) adicionada aos poços. As placas multipoços foram protegidas da luz e agitadas durante 10 minutos num agitador de placas. Após este período, 100 µl do sobrenadante contendo a SS e a solução de NR liberada pelas células foram dispostos em placas de 96 poços, para serem lidos em leitor de multiplacas (Multiskan EX 355, Thermo Electron Corporation), a 540 nm. Os dados e resultados obtidos por meio das leituras foram comparados e analisados no software OriginPro 8.

Como uma segunda forma de avaliação dos efeitos causados pela aplicação dos fotoprotetores e da radiação nos equivalentes dermoepidérmicos, assim como para a verificação da sua estrutura tridimensional, foram feitas lâminas histológicas com coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

4.15 Estudos histológicos do equivalente dermoepidérmico reconstruído *in vitro*

Após o período de construção do equivalente dermoepidérmico *in vitro* foi efetuada a fixação deste em formalina a 10% tamponada e em seguida feita a inclusão em parafina histológica. Foram feitos cortes histológicos com 5 µm de espessura de cada um dos equivalentes e estes, corados com Hematoxilina-Eosina (HE).

Um pequeno fragmento do total de uma das biópsias de pele foi submetido ao mesmo tratamento descrito acima, para ser utilizado como controle da morfologia da pele humana.

4.16 Estudos histológicos - imunohistoquímica

Os compostos dermoepidérmicos cultivados na interface ar-líquido no 21º dia de cultura foram fixados em solução de formaldeído a 10% tamponado, desidratados e incluídos em parafina.

Cortes de 4 µm de espessura foram colocados em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropiltriethoxi-silano a 10% em álcool absoluto. Os cortes foram então desparafinizados pela exposição a xilol a 60 °C (30 minutos), xilol a temperatura ambiente (20 minutos), etanol 70% (três imersões de 30 segundos), etanol 95% (30 segundos), etanol 100% (30 segundos), e lavados em água deionizada.

Foi efetuada a recuperação antigênica por meio de um banho-maria a 95 °C contendo ácido cítrico pH 6,0, sendo a peroxidase endógena bloqueada na sequência com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10% e metanol (1:1 v/v), por meio de dois banhos de 15 minutos cada, seguido de uma nova lavagem com água destilada por 10 minutos e, mais 2 banhos de 5 minutos cada em tampão TRIS-HCL (hidroximetil-amino-matano) 0,5 M e pH 7,4.

Para confirmação da presença das CLs inseridas na construção dos equivalentes dermoepidérmicos, um marcador molecular específico foi empregado, sendo ele: anticorpo monoclonal anti-CD1a para CLs.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário citado durante aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente. Após a aplicação do anticorpo primário, foi utilizado o Kit LSAB conforme instruções do fabricante. Esse sistema de marcação é baseado na técnica da avidina-biotina, na qual um anticorpo secundário biotinizado reage com várias moléculas de streptavidina-peroxidase conjugada.

Para a reação de revelação foi utilizado o sistema cromógeno DAB, que faz uso do corante 3,3'-diaminobenzidina, aplicado sobre os cortes por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados com água destilada e contracolorados com Hematoxilina de Mayer, previamente filtrada, por 5 minutos. Os cortes foram então, lavados rapidamente em imersões de água corrente, desidratados em uma cadeia descendente de etanol numa sequência de 100%, 90% e 70%, em banhos de 2 minutos, e diafanizados em xilol por 2 banhos de 5 minutos cada. As lâminas foram imediatamente montadas com lamínulas de vidro após o término da marcação.

Utilizamos como controle negativo, a omissão do anticorpo primário em uma das amostras. E como controle positivo foi utilizado um fragmento de pele íntegra, proveniente da coleta de pele para a extração das células utilizadas em todos os experimentos, a qual era sabidamente positiva para o anticorpo testado.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção de células isoladas – Queratinócitos

Os queratinócitos obtidos da pele, por método enzimático, foram utilizados em todos os experimentos. Estes foram congelados, e à medida que os experimentos prosseguiam, eram descongelados e colocados em cultura para a realização dos mesmos. Foram isoladas células de onze doadoras obtendo-se um rendimento médio por procedimento bastante heterogêneo. Isto, devido à diversidade das amostras coletadas. Estas amostras variaram entre si pelo tamanho dos fragmentos, quantidade e sítio de origem, sendo, no entanto, aptas para o processo de obtenção de células primárias (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores relativos à contagem de células realizadas na etapa de obtenção de células epidérmicas para cada uma das amostras. Comparativo entre o rendimento celular total e o rendimento de células/cm².

Doador n°	Pele (cm ²)	1ª Coleta (x10 ⁶)	2ª Coleta (x10 ⁶)	3ª Coleta (x10 ⁶)	4ª Coleta (x10 ⁶)	5ª Coleta (x10 ⁶)	6ª Coleta (x10 ⁶)	Total (x10 ⁶)	Cel/cm ² (x10 ⁶)
483- A	21,8	-	-	2,18	6,81	5,84	4,85	19,71	0,91
483- B	16,0	-	-	1,09	5,67	4,01	2,70	13,47	0,84
486- A	37,5	0,28	9,37	18,89	28,65	9,53	6,28	73,00	1,95
486- B	24,0	1,03	4,92	9,78	6,48	4,48	0,83	27,52	1,15
001	42,8	1,58	25,40	17,70	10,50	-	-	55,18	1,29
002	20,0	0,80	18,24	12,29	3,30	-	-	34,63	1,72
003	47,5	2,68	29,48	42,38	26,73	13,63	2,62	117,51	2,47
004	37,2	-	-	8,35	9,73	2,41	-	20,49	0,55
005	31,0	3,41	19,11	43,15	31,00	38,45	16,90	152,02	4,75
007	41,4	0,90	2,02	9,81	5,32	8,00	-	26,05	0,63
008	24,5	5,28	14,00	25,69	16,77	5,96	-	67,70	2,76
009	26,8	-	10,00	10,00	10,00	-	-	30,00	1,12
010	11,3	-	-	6,50	6,50	6,50	-	19,50	1,75

Apesar do emprego de procedimentos padronizados e eficazes para a obtenção de queratinócitos, nem todas as células obtidas dos fragmentos de pele puderam ser utilizadas para os experimentos ou mesmo para a inclusão em nosso banco de células. Isto devido à má condição das mesmas (elevado grau de diferenciação celular, crescimento lento e irregular) pertencentes aos doadores 001 e 007 e a uma contaminação por micoplasma² proveniente da amostra de pele do doador 003, que

² O micoplasma é um tipo de bactéria que não possui parede celular, e por isso, não é afetada por antibióticos comuns, como a penicilina. São as menores células vivas já descobertas, podendo sobreviver sem oxigênio e medindo cerca de 0,15 - 0,30 µm de diâmetro.

contaminou as culturas obtidas dos pacientes 004 e 005, os quais foram processados na sequência (Tabela 1).

Em relação ao crescimento das culturas, obtivemos uma média de $40,0 \times 10^6$ para cada $5,0 \times 10^6$ células semeadas no primeiro dia do cultivo, em cerca de 3 semanas após o início do cultivo, sendo estes resultados baseados nas culturas de células consideradas não diferenciadas ou de boa qualidade de acordo com nossos padrões internos (número de colônias, tempo de crescimento e formato das colônias).

5.2 Obtenção de células isoladas – Fibroblastos

Os fibroblastos foram obtidos em todos os experimentos para isolamento de células da pele, tanto quando utilizada a técnica de explante, como por método enzimático, podendo ser utilizados em todos os experimentos. Foram isoladas células de onze doadoras, obtendo-se um rendimento médio por tipo de procedimento e/ou quantidade de garrafas utilizadas para seu cultivo, bastante similar, sendo adquiridos em média $0,24 \times 10^6$ células/cm² em cada um dos experimentos, sendo a média em relação ao crescimento das culturas pouco acima de $20,0 \times 10^6$ células por procedimento em 4 semanas de cultivo, tanto para células provenientes de explante como para suspensões (processo enzimático). Estas células eram postas em cultivo, congeladas, descongeladas e amplificadas sempre que se fazia necessário, mantendo sua morfologia original e alcançando a subconfluência em apenas 4 dias.

5.3 Obtenção de células isoladas – Células de Langerhans imaturas

Foram realizados experimentos destinados ao isolamento das CLs com biópsias de peles de 12 diferentes doadoras, sendo estas divididas para três diferentes metodologias e suas variações.

5.3.1 Protocolo 1

O primeiro protocolo de isolamento foi realizado a partir da suspensão celular adquirida por meio de processo enzimático, revelando resultados bastante similares entre as amostras 483 e 486. Como descrito em Material e Métodos, estes protocolos foram denominados 1A e 1B, segundo a obtenção enzimática direta ou com a adição do gradiente de Ficoll, respectivamente.

Com relação ao protocolo 1A, apesar do maior rendimento de células viáveis em relação ao número total de células semeadas (49,5%), foram encontradas no sobrenadante da amostra examinada em câmara hemocitométrica, diferentes subpopulações, demonstrando uma grande impureza da amostra (Figura 3).

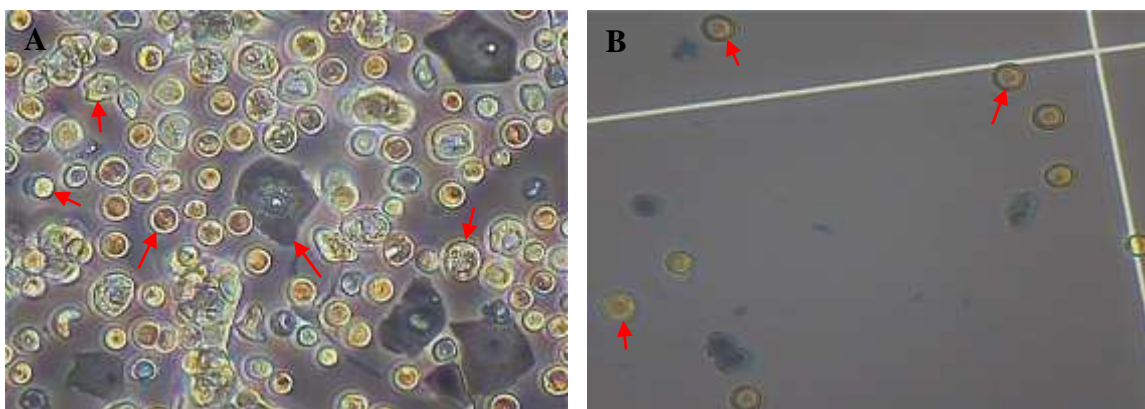


Figura 3 - Imagem das subpopulações (setas vermelhas) adquiridas pelo Protocolo 1A (Imagem A), e da população de células (setas vermelhas) adquiridas pelo Protocolo 1B (Imagem B).

Para o Protocolo 1B, obtivemos uma média de 3,52% de células viáveis nas amostras, sendo estas populações altamente homogêneas e purificadas.

A viabilidade celular foi imediatamente verificada ao final de cada gradiente de Ficoll-Paque, sendo de 94% para o doador 486 e de 88% para o doador 483, do total de células obtidas, na contagem com Azul de Tripán (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores relativos à contagem de células realizadas na etapa de obtenção de células de Langerhans – Protocolo 1A e 1B.

Doador n°	Pele (cm ²)	N° total células (x10 ⁶)	Células inviáveis (x10 ⁶)	Células viáveis (x10 ⁶)	Células viáveis/cm ² (x10 ⁶)
483 - 1A	2,20	2,60	0,05	1,26	0,57
483 - 1B	18,85	17,06	0,08	0,60	0,032
486 - 1A	4,00	7,00	0,92	3,58	1,13
486 - 1B	33,50	56,70	0,11	2,00	0,015

Para as análise de citometria de fluxo, as células foram descongeladas e avaliadas quanto a presença de marcação CD1a⁺, HLA-DR⁺ e CD14⁻, alcançando uma média de 91,6 ± 6,65% de expressão positiva para CD1a, sendo a expressão do marcador HLA-DR apenas moderada (Tabela 3). Estes resultados evidenciaram uma grande homogeneidade das amostras purificadas por Ficoll, com um baixo índice de marcações secundárias da população (Figura 4).

Tabela 3 - Porcentagens de células CD1a⁺ e HLA-DR⁺ para o Protocolo 1B.

Doador nº	Células CD1a ⁺ (%)	Células HLA-DR ⁺ (%)
483 - 1B	86,9	28,9
486 - 1B	96,3	23,8

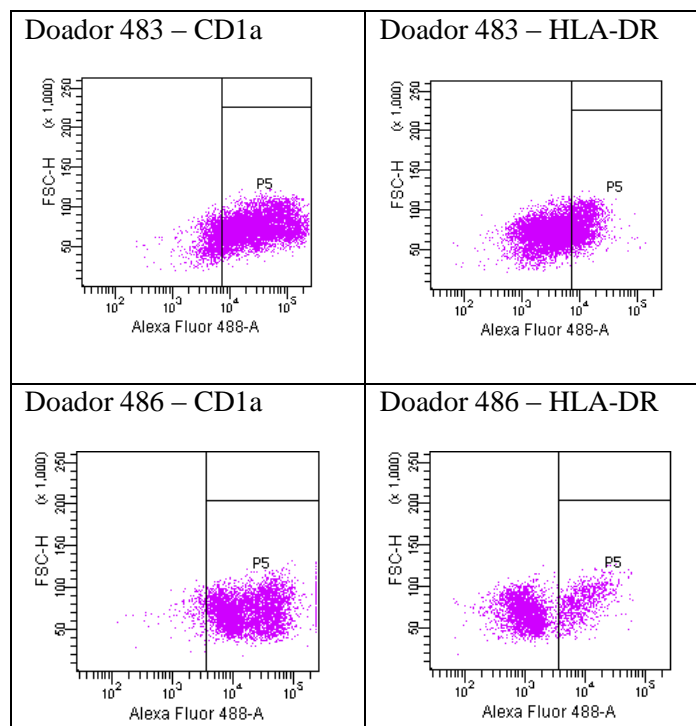


Figura 4 - Análise por citometria de fluxo do fenótipo de superfície das CLs isoladas com os marcadores CD1a e HLA-DR. Janela P5: Expressão de marcação elevada para CD1a⁺ e moderada para HLA-DR⁺.

5.3.2 Protocolo 2

Já o segundo protocolo empregado para a separação das células de Langerhans, foi realizado a partir de sete amostras de pele, sendo levemente modificado com o avançar dos experimentos, de acordo com os resultados obtidos. Essa nova metodologia teve como diferenciais a separação entre derme e epiderme, sendo levada em conta a quantidade de derme retirada da pele antes da aplicação da Dispase II[®] segundo Quadro 1 (Item 4.6.2) e o tempo e concentração necessários para separação da epiderme (Tabela 4), assim como, o emprego do fator estimulante do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e a confecção de um protótipo manual de expansor de pele. Após a realização dos experimentos foi iniciada a contagem das células em câmara hemocitométrica com Azul de Tripán, revelando que em média,

5,77 ± 3,37 × 10⁶ células foram obtidas, sendo que destas, 3,25 ± 1,94 × 10⁶ ou 56,33% são células inviáveis, restando apenas 2,52 ± 1,46 × 10⁶ ou 43,67% de células viáveis na população total (Tabela 5).

Esta nova metodologia se mostrou mais eficaz que a anterior em relação à quantidade de células viáveis por cm² e quanto ao tempo de execução do protocolo, no entanto, revelou-se menos eficaz que o primeiro protocolo na relação feita entre o número de células inviáveis e viáveis presentes na amostra, sendo o número de células inviáveis, sempre superior (exceção apenas quanto ao doador 009).

Tabela 4 – Tempo de permanência na Dispase II[®] versus concentração e derme retirada. Sendo: S = sim; RP = retirada parcial da derme; x = não avaliado.

Concentração Dispase (%)	Simbologia da derme (+, -,)	Retirada de Epiderme			
		45'	60'	90'	120'
2,5	++	S	S	S	S
0,42	++	x	S	S	S
0,42	+	x	S	S	S
0,42	-	x	RP	S	S
0,42	--	x	RP	S	S
0,35	++	x	S	S	S
0,35	+	x	S	S	S
0,35	-	x	S	S	S
0,35	--	x	S	S	S
0,25	++	x	RP	S	S
0,25	+	x	RP	S	S
0,25	-	x	RP	S	S
0,25	--	x	RP	S	S

Utilizando Dispase II[®], em concentrações variando de 2,5 a 0,25%, por no mínimo 90 minutos foi possível a retirada total da epiderme, independente da espessura da derme.

Tabela 5 - Valores relativos à contagem de células realizadas na etapa de obtenção de células de Langerhans – Protocolo 2

Doador n°	Pele (cm ²)	N° total células (x10 ⁶)	Células inviáveis (x10 ⁶)	Células viáveis (x10 ⁶)	Células viáveis/cm ² (x10 ⁶)
001	16,04	3,14	2,03	1,11	0,07
002	14,32	3,18	1,93	1,25	0,09
003	63,10	12,81	7,43	5,38	0,09
004	65,98	6,03	3,05	2,98	0,05
005	38,00	3,85	2,10	1,84	0,05
007	17,75	4,93	2,78	2,15	0,12
009	75,22	84,25	3,23	71,14	0,95

Quando avaliado o protocolo 2 por meio das análises da citometria de fluxo, quanto a presença de células CD1a⁺, esta foi constante em todas as leituras realizadas com as células de cada um dos doadores (Figura 5), sendo no entanto, apenas o enriquecimento quanto a CL do doador 009 (87,7%), comparável ao protocolo 1. No restante das leituras, a marcação positiva para CD1a foi de apenas 27,9% a 48,5%, muito inferior ao obtido anteriormente (Tabela 6).

Da mesma forma que no Protocolo 1, a expressão do marcador CD14 mostrou-se quase nula (dados não apresentados).

Tabela 6 - Porcentagens de células CD1a⁺ e HLA-DR⁺ para o Protocolo 2.

Doador n°	Células CD1a ⁺ (%)	Células HLA-DR ⁺ (%)
003	48,5	26,7
004	27,9	8,7
005	24,9	11,6
009	87,7	15,8

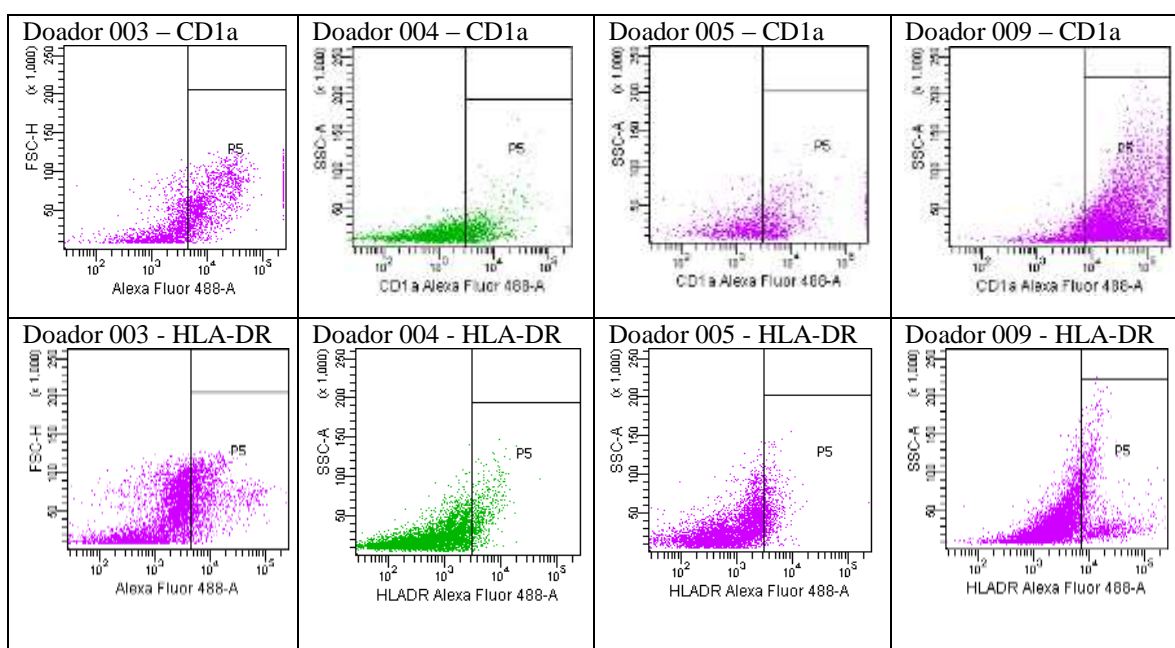


Figura 5 Análise por citometria de fluxo do fenótipo de superfície das CLs isoladas com os marcadores CD1a e HLA-DR. Janela P5: Expressão de marcação elevada para CD1a⁺ e baixa para HLA-DR⁺. As cores são aleatórias e determinadas pelo equipamento.

5.3.3 Protocolo 3

Para o terceiro protocolo de extração de células de Langerhans, numa tentativa de aprimoramento do que já havia sido alcançado até então, combinamos os protocolos 1 e 2, utilizando a separação entre derme e epiderme para conseguir uma população mais pura, o processo enzimático para obter a suspensão de células epidérmicas e o gradiente de Ficoll para separação das células mononucleadas.

Como resultado, conseguimos maior população de células viáveis em relação a suspensão de células epidérmicas, alcançando uma significativa média de $7,53 \pm 1,2\%$ de células viáveis, enquanto somente $0,42 \pm 0,17\%$ da população total foi tida como células inviáveis quando contadas com Azul de Tripan. Obtivemos uma considerável redução do tempo de manuseio das amostras, motivo que muito provavelmente, diminuiu a média de células mortas nos experimentos (Tabela 7). A viabilidade celular das amostras foi checada ao final de cada extração.

Obtivemos também, valores superiores quanto ao rendimento de células por cm^2 , conseguindo de 82.000 a 180.000 células viáveis por cm^2 nos experimentos deste protocolo.

Tabela 7 - Valores relativos à contagem de células realizadas na etapa de obtenção de CLs – Protocolo 3.

Doador n°	Pele (cm^2)	N° total células ($\times 10^6$)	Células inviáveis ($\times 10^6$)	Células viáveis ($\times 10^6$)	Células viáveis/ cm^2 ($\times 10^6$)
010	45,20	82,27	0,50	7,30	0,18
011	33,10	55,04	0,18	3,60	0,11
012	42,20	48,27	0,15	3,46	0,08

Após a etapa de criopreservação e descongelamento das células obtidas com o gradiente de Ficoll-Paque, as amostras foram avaliadas quanto a presença de células CD1a, HLA-DR e CD14 positivas por análise de citometria de fluxo. A marcação positiva para CD1a, foi constante e bastante elevada em todas as leituras realizadas com as células de cada um dos doadores (Figura 6), sendo que o enriquecimento quanto a células de Langerhans alcançou de 94,00% a 98,40% das células totais, sendo as células negativas para CD14 na sua quase totalidade. A proporção de células HLA-DR⁺ variou de 44,9% a 86,3% entre todas as células recolhidas (Tabela 8).

Tabela 8 - Porcentagens de células CD1a⁺ e HLA-DR⁺ para o Protocolo 3.

Doador n ^o	Células CD1a ⁺ (%)	Células HLA-DR ⁺ (%)
010	98,4	86,3
011	94,8	44,9
012	94,0	51,5

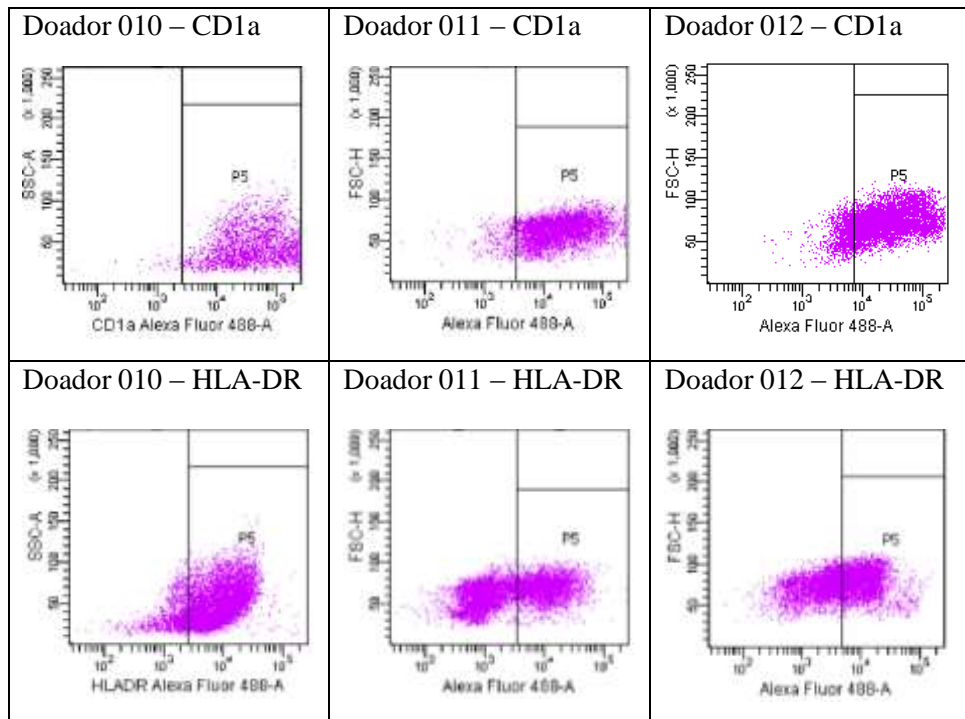


Figura 6 - Análise por citometria de fluxo do fenótipo de superfície das CLs isoladas com os marcadores CD1a e HLA-DR. Janela P5: Expressão de marcação elevada para CD1a⁺ e moderada e elevada para HLA-DR⁺.

Como esperado, nas análises por citometria de fluxo, foi constante a ausência de expressão significativa do marcador CD14 utilizado como controle negativo de especificidade de marcação das CLs (Figura 7-A). A viabilidade celular foi averiguada com o marcador 7AAD, podendo ser observado um número reduzido de células mortas nas amostras (Figura 7-B).

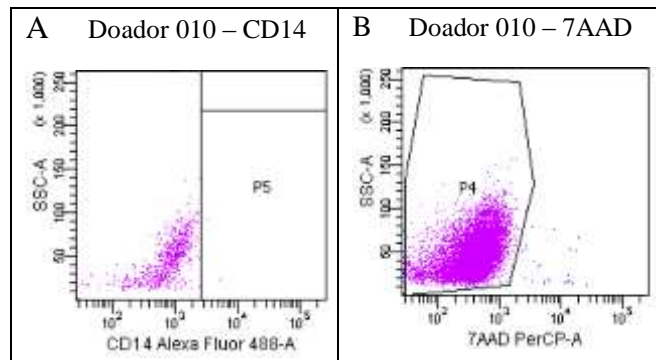


Figura 7 – Exemplo de análise, por citometria de fluxo, do fenótipo de superfície das CLs isoladas. (A) com o marcador CD14 como controle negativo de especificidade de marcação (Janela P5) e (B) com marcador 7AAD para viabilidade celular (Janela P4).

5.4 Identificação das células de Langerhans por microscopia de fluorescência

Devido a evidente marcação de HLA-DR conjugado com FITC nas amostras, pode-se observar claramente a presença de células de Langerhans nas análises efetuadas com a técnica de microscopia de fluorescência (Figura 8). No entanto, esta técnica não pode ser utilizada para quantificar o número de células viáveis da amostra, devido a grande perda celular decorrente das muitas etapas deste procedimento.

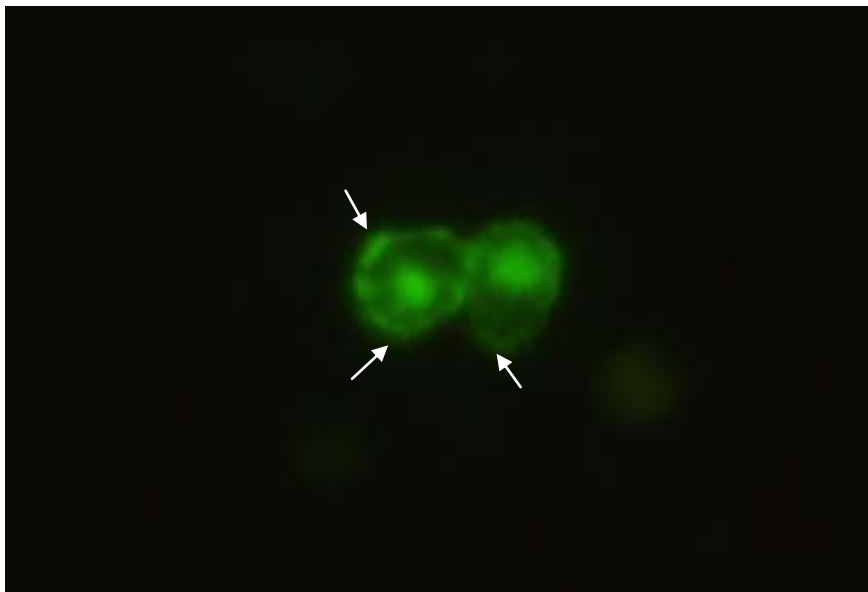


Figura 8 - Células de Langerhans marcadas com HLA-DR conjugado com FITC. (setas brancas) Morfologia típica das CLs em cultura com núcleo pequeno e aparente e pequenos dendritos abundantemente distribuídos por toda a superfície celular.

5.5 Criopreservação e descongelamento das células de Langerhans

Durante a realização dos primeiros experimentos de isolamento das CLs, utilizámos o método de congelamento e descongelamento convencionais, criopreservando as células de forma rápida, sendo seu descongelamento efetuado da mesma maneira. No entanto, os resultados quanto às células viáveis após o descongelamento obtinha uma média de apenas 38% de viabilidade nestes casos. A partir do sétimo experimento, passamos a utilizar um protocolo de criopreservação e descongelamento específico para CLs (Seo et al., 2002), obtendo uma média superior a 92% de viabilidade nas células descongeladas.

5.6 Validação do uso das células de Langerhans como teste de sensibilidade - Análise da sensibilização por citometria de fluxo

A análise da efetividade das células de Langerhans como indicador de sensibilidade cutânea a agentes sensibilizadores ou não (formaldeído e glicerina, respectivamente) foi efetuada por meio da marcação com o anticorpo CD1a, que é um marcador de células imaturas. Utilizando três tipos de controles - células descongeladas e imediatamente marcadas (Controle 1), células mantidas em cultivo pelo mesmo período de tempo das células expostas as substancias teste (Controle 2) e células mantidas em cultivo com a adição de GM-CSF (Controle 3) - obtivemos graus inferiores de marcação de CD1a tanto para as células apenas deixadas em cultivo, como para as expostas às substancias teste no experimento, em comparação com as células descongeladas e marcadas (Figura 10). O enriquecimento para células de Langerhans alcançou positividade para CD1a de 98,4% das células totais no Controle 1, e 71,9% das células totais no Controle 2, e 56,2% das células totais no Controle 3 . A proporção de células CD1a positivas variou de 21,5% a 11,5% para as células expostas a Glicerina e de 17,2% a 5,9% para as células expostas ao Formaldeído (Figura 9).

Tabela 9 - Porcentagens de células CD1a⁺ para teste de sensibilidade.

Controles	Substancias teste	Células CD1a ⁺ (%)
Controle 1	-	98,4
Controle 2	-	71,9
Controle 3	-	56,2
	Glicerina – G1	11,5
	Glicerina – G2	14,5
	Glicerina – G3	17,3
	Glicerina – G4	21,5
	Formaldeído – F1	5,9
	Formaldeído – F2	8,7
	Formaldeído – F3	12,1
	Formaldeído – F4	17,2

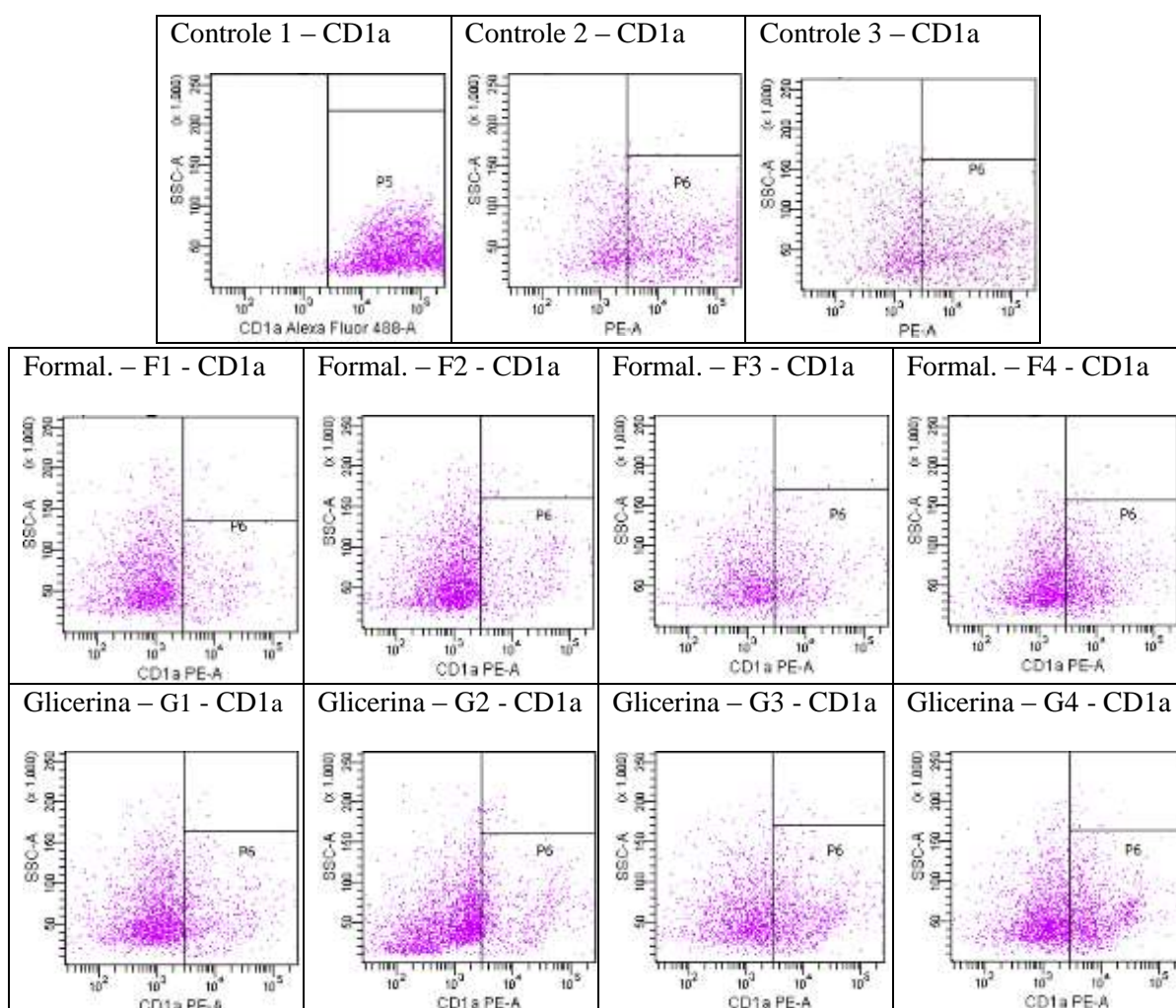


Figura 9 – Análise por citometria de fluxo do fenótipo de superfície das CLs isoladas e submetidas ao teste de sensibilidade com o marcador CD1a. Janela P6: Expressão elevada de marcação CD1a⁺ para Controle 1, moderada para Controle 2 e baixa para CLs expostas a substancia sensibilizadora (Formaldeído) e não-sensibilizadora (Glicerina).

5.7 Cultura secundária de células dérmicas e epidérmicas sobre base dérmica acelular – sistema organotípico

A semeadura das células sobre as bases dérmicas acelulares foi realizada de maneira eficiente em análise macroscópica, com raros casos de vazamento total das células semeadas para o fundo do poço da placa. Nos casos em que ocorreram os vazamentos, pode-se observar que os queratinócitos aderiram e proliferaram de forma bastante rápida no fundo da placa, sendo esta uma forma indireta de avaliação da qualidade das células isoladas. No entanto, foi frequente o escape de pequenas quantidades de queratinócitos através da derme acelular, tanto no primeiro, como no segundo dia de cultivo dos equivalentes.

Pode-se observar que ocorreu a proliferação uniforme dos queratinócitos e melanócitos tanto na situação imersa, como na interface ar-líquido, atestando a eficiência do método de obtenção de queratinócitos viáveis, sendo, no entanto, necessária a adequação da densidade proposta de semeadura das células.

Para a padronização da quantidade de células necessárias para a construção do equivalente dermoepidérmico foram utilizadas de forma comparativa, 150.000, 300.000 e 400.000 céls/cm² de queratinócitos e 200.000 céls/cm² de fibroblastos, ambas cultivadas no sistema ar-líquido conforme a descrição do item 4.13.

Utilizando apenas 150.000 céls/cm² é possível observar a formação de uma epiderme com pouquíssimas camadas sobre a base dérmica, enquanto que com 300.000 céls/cm² se obtém uma epiderme mais estruturada, com maior presença de estrato córneo. No entanto, quando empregadas 400.000 céls/cm² de queratinócitos, fica evidente a formação de uma epiderme bem estruturada, com camadas bem formadas e estrato córneo sempre presente. Estas análises puderam ser efetuadas por meio das lamínas histológicas coradas com HE de cada um dos equivalentes, após 21 dias de cultivo, sendo facilmente visualizada a diferença na formação da epiderme destes equivalentes na Figura 10, onde se encontram as imagens A1, A2 e A3 com equivalentes compostos por 400.000 QH + 200.000 FH (céls/cm²), as imagens B1, B2 e B3 com equivalentes compostos por 300.000 QH + 200.000 FH (céls/cm²) e as imagens C1, C2 e C3 com equivalentes compostos por 150.000 QH + 200.000 FH (céls/cm²).

Foram também realizados experimentos comparativos entre a derme glicerolada (não irradiada), irradiada a 25 kGy e a 50 kGy, onde pode ser observada a integração, distribuição e permanência dos fibroblastos humanos na base dérmica. Foi observado

por meio de laminas histológicas coradas com HE que a derme acelular irradiada a 50 kGy apresentou uma intensa degeneração basofílica, fazendo com que os FH não permanecessem em grande número na sua matriz colágena, acabando por povoarem o fundo da placa de cultivo e não o equivalente. As bases dérmicas não irradiadas e irradiadas a 25 kGy apresentaram uma grande similaridade quanto a seus resultados, mantendo os FH na sua estrutura de forma bastante satisfatória na grande maioria dos equivalentes de pele, como também pode ser observado na Figura 10, onde as imagens A, B e C da coluna 1 possuem os equivalentes construídos com derme acelular não irradiada, as imagens A, B e C da coluna 2 irradiada a 25 kGy e as imagens A, B e C da coluna 3 irradiada a 50 kGy

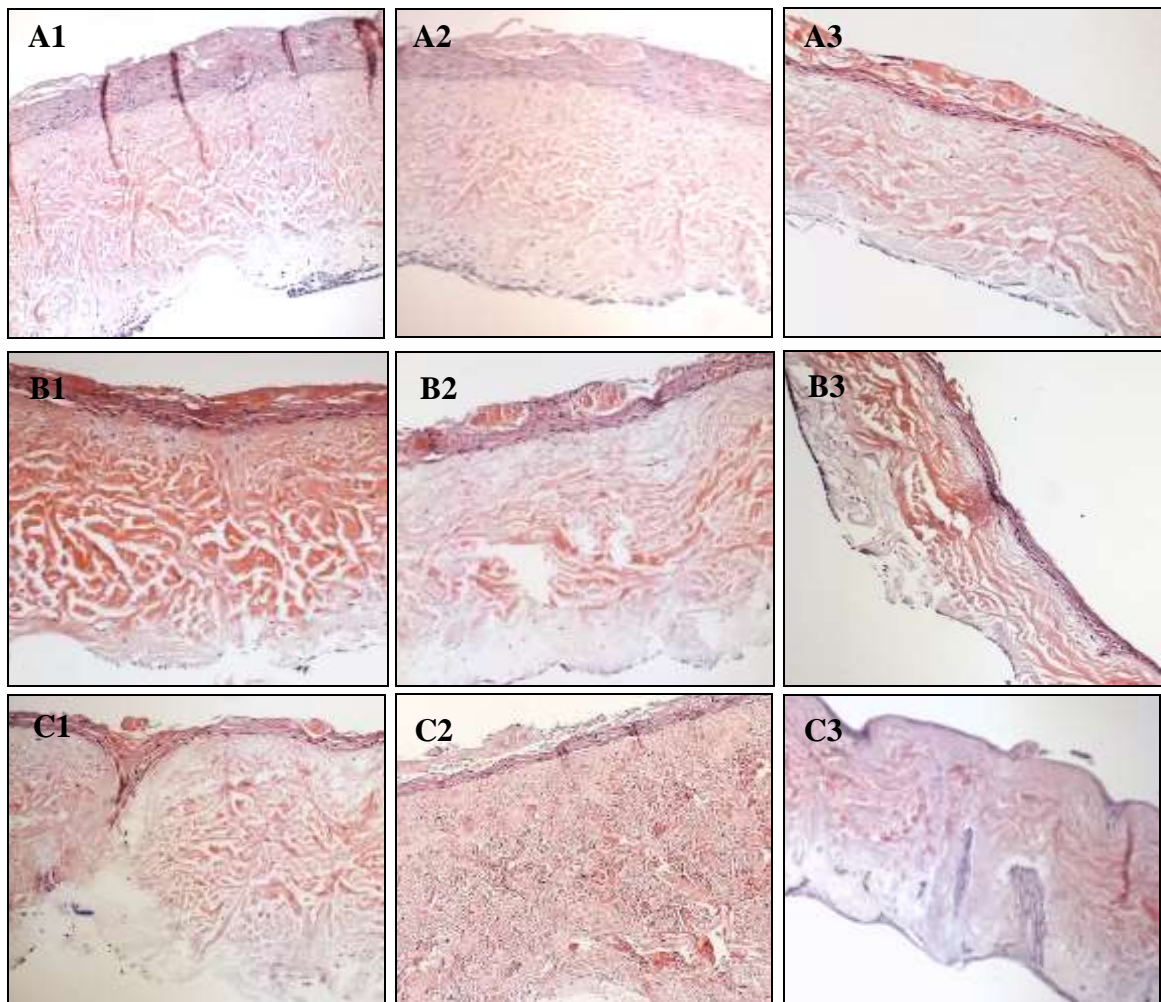


Figura 10 - Análise histológica do equivalente dermoepidérmico - Avaliação quanto à quantidade de células utilizadas para a construção do modelo versus a dose de irradiação empregada na derme humana acelular. Foram semeados 200.000 FH (células/cm²) em todos os equivalentes apresentados, 400.000 QH (células/cm²) nos equivalentes da 1ª linha (A1, A2 e A3), 300.000 QH (células/cm²) na 2ª linha (B1, B2 e B3) e 150.000 QH (células/cm²) na 3ª linha (C1, C2 e C3), onde as imagens A, B e C da 1ª coluna possuem os equivalentes construídos com derme acelular não irradiada, as imagens A, B e C da 2ª coluna irradiada a 25 kGy e as imagens A, B e C da 3ª coluna irradiada a 50 kGy. Cultivo de 21 dias. Microscopia óptica HE. Aumento original 100X.

A partir da comparação dos cortes histológicos apresentados na Figura 10, podemos observar a formação evidente da epiderme em todos os equivalentes, sendo os modelos A1 e A2 os melhores estruturados, tanto em relação ao desenvolvimento da epiderme, como na distribuição de fibroblastos na base dérmica (Figura 11).

Outro ponto bastante interessante quanto às bases dérmicas, foi à possibilidade de observar que os fibroblastos semeados sobre estas bases penetraram na mesma pela pronunciada diminuição das bases dérmicas (Figura 11), a vista desarmada, que é totalmente ligada à produção de colágeno e contração destas fibras. Também ficou evidente a queratinização dos epitélios, manifestada pela opacificação das superfícies dérmicas e também sua contração (Figura 12).

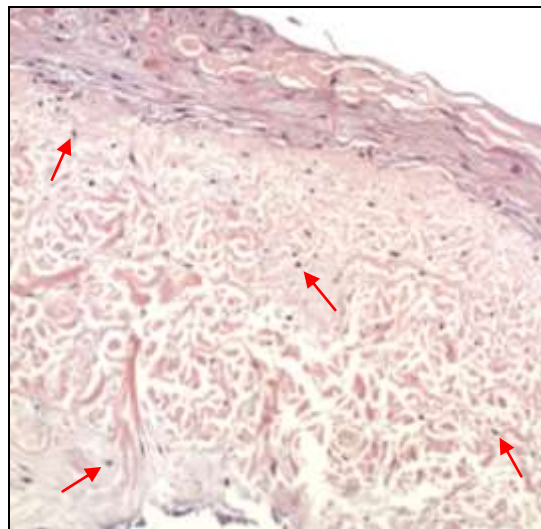


Figura 11 - Equivalente dermoepidérmico. Perfeita distribuição dos fibroblastos humanos na derme acelular irradiada a 25 kGy - flechas vermelhas. Microscopia óptica HE. Aumento original 100X.

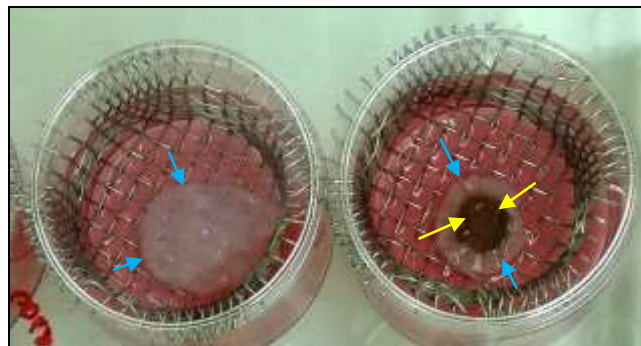


Figura 12 - Equivalente dermoepidérmico e derme acelular em sistema ar-líquido sobre grelha suspensa. Pigmentação da superfície semeada com as células epidérmicas - flechas amarelas. Notada contração da base dérmica semeada com FH e QH (equivalente da direita) em comparação com a base dérmica não semeada (equivalente da esquerda) - flechas azuis. Derme acelular irradiada a 25 kGy, após 21 dias de cultivo celular.

5.8 Avaliação das modificações induzidas pela radiação UVA em câmara de fototoxicidade - Testes de toxicidade celular em equivalentes dermoepidérmicos

Após a montagem de equivalentes dermoepidérmicos compostos apenas por queratinócitos e fibroblastos sobre derme acelular irradiada, iniciamos os testes dos protocolos de cito e fototoxicidade. Validamos a utilização deste sistema organotípico em testes de toxicidade *in vitro* com formulações acrescidas ou não de substâncias fotoprotetoras, utilizando a radiação UVA seguida de ensaio NR e leitura das placas em leitor Multiskan, onde os resultados provenientes destas leituras foram comparados e analisados em gráficos (Figura 13). Estes resultados simulam a realidade da pele humana, pois foram realizados por meio da aplicação de formulações sobre os equivalentes após o período de 21 dias de cultivo, quando os mesmos já apresentavam estrato córneo visivelmente desenvolvido, similar ao encontrado *in vivo*.

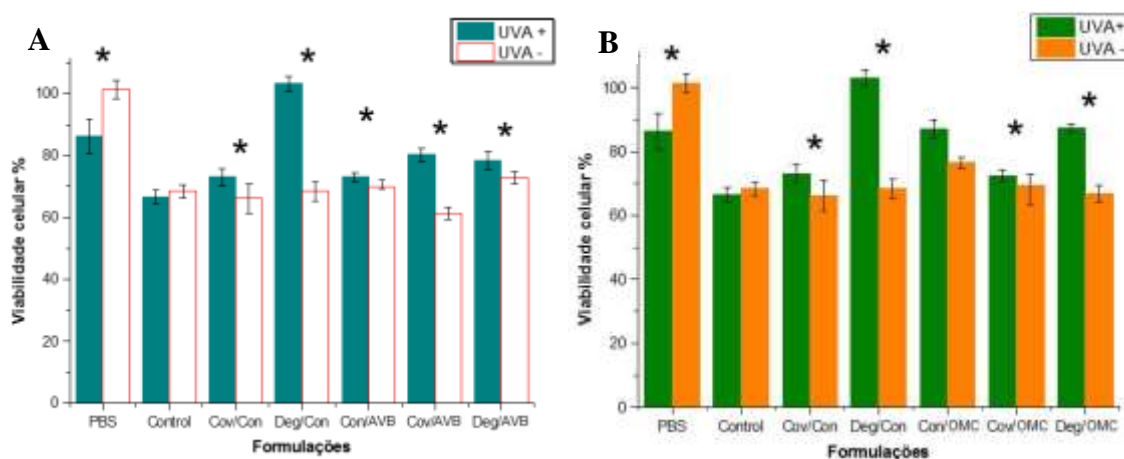


Figura 13 – Gráficos de comparação entre a viabilidade celular dos equivalentes dermoepidérmicos expostos e não expostos à radiação UVA em câmara de fototoxicidade com formulações bases e acrescidas de fotoprotetor UVA Avobenzona e UVB Metoxicinamato. **PBS** - controle sem formulação; **Control** – formulação base; **Cov** - formulação coberta por folha de alumínio; **Deg** - formulação degradada; **AVB** - formulação base acrescida de fotoprotetor UVA (gráfico A); **OMC** - formulação base acrescida de fotoprotetor UVA (gráfico B); **UVA+** formulações expostas à irradiação e **UVA-** formulações não expostas à irradiação. *Diferença estatística significativa entre as duas condições.

Pode ser observado que a viabilidade celular foi maior nos equivalentes dermoepidérmicos expostos a luz (Figura 13, UVA+) na câmara de fototoxicidade em

relação a aqueles que permaneceram nas mesmas condições de tempo e temperatura dentro da câmara, mas ao abrigo da radiação (Figura 13, UVA-).

Segundo os resultados do controle somente com PBS fica evidenciado que este modelo é capaz de detectar a influência da radiação UVA sobre a viabilidade celular. Quanto às formulações, os resultados foram compatíveis com a literatura (Chatelain & Gabard, 2001), detectando que a radiação UVA direta sobre o equivalente sem fotoprotetor é prejudicial às células que o compõem.

5.8.1 Resultados histológicos dos equivalentes dermoepidérmicos provenientes dos testes de toxicidade

Após a confecção das lâminas histológicas e sua coloração com HE, pode ser facilmente observado na Figura 14, tanto no grupo testado utilizando a formulação base (imagens B1 e B2) quanto no grupo com as formulações fotoprotetoras (imagens C1 e C2) aplicadas topicamente nos modelos de pele, que não ocorreu nenhuma ação abrasiva ou desestruturante para a epiderme, fato evidenciado pela comparação destes com os grupos controle PBS (imagens A1 e A2). Estes resultados foram similares em presença (UVA+) ou ausência de radiação (UVA-). Apenas pode ser observado que em alguns casos, houve a perda do estrato córneo dos equivalentes no processo de lavagem para retirada das formulações aplicadas nos mesmos.

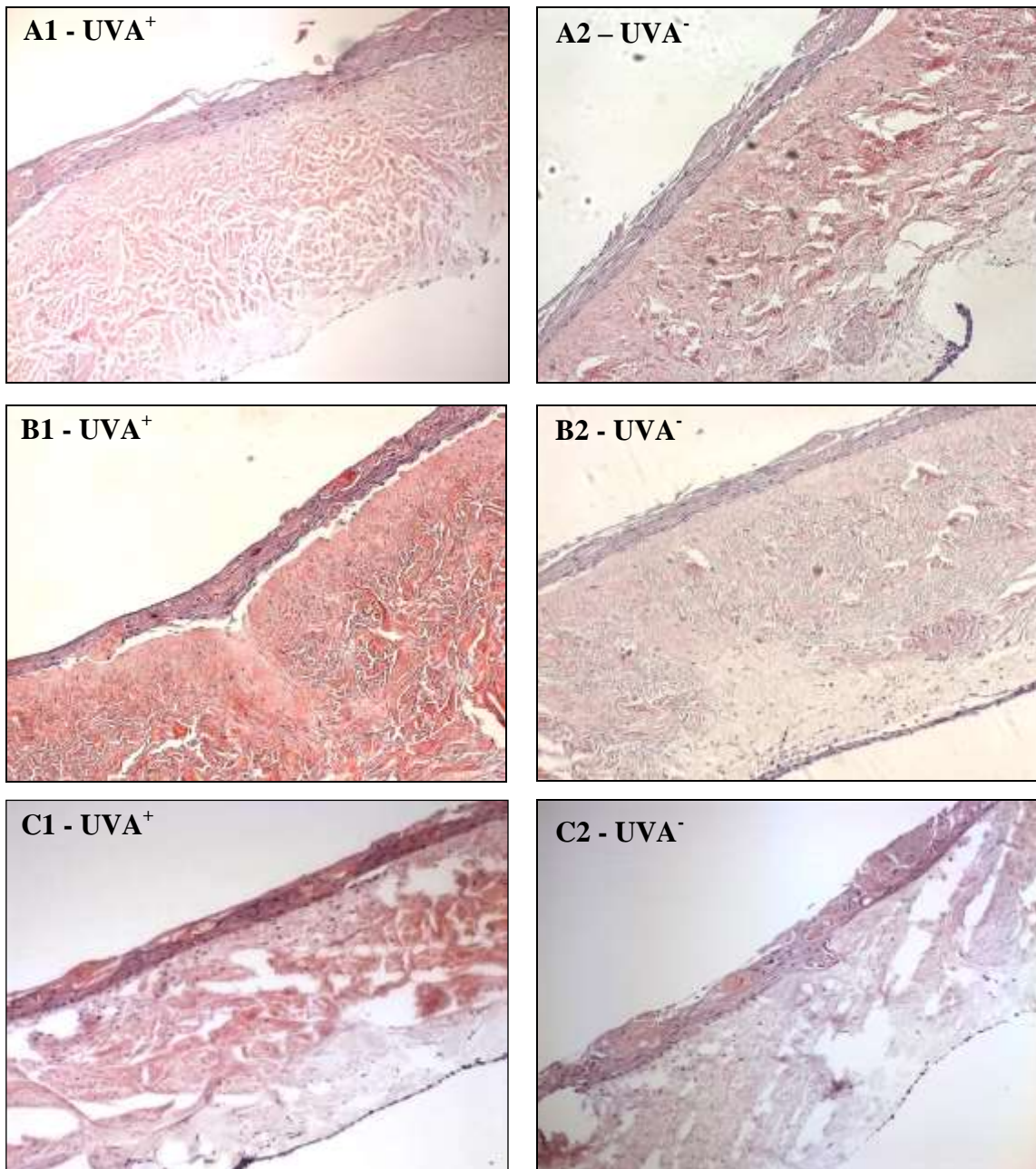


Figura 14 - Análise histológica do equivalente dermoepidérmico. Avaliação da integridade da estrutura do modelo de pele humana após os testes de cito e fototoxicidade. - Equivalente construído com 400.000 QH + 200.000 FH (células/cm²) sobre derme humana acelular irradiada. Grupo controle com PBS (imagens **A1** e **A2**), grupo onde foi aplicada a formulação base (imagens **B1** e **B2**) e grupo com as formulações fotoprotetoras (imagens **C1** e **C2**). Estes resultados foram similares em presença (UVA+ - **A1**, **B1** e **C1**) ou ausência de radiação (UVA- - **A2**, **B2** e **C2**). Cultivo de 21 dias. Microscopia óptica HE. Aumento original 100X.

5.9 Cultura secundária de células dérmicas e epidérmicas sobre base dérmica acelular – Inclusão das células de Langerhans

Uma vez padronizada a relação entre a quantidade de células a serem semeadas e a dose de irradiação aplicada na derme acelular, foi possível iniciar uma série de testes relativos à inclusão das CLs no equivalente dermoepidérmico.

Como pode ser observado nas imagens A1 e A2 (ativadas com GM-CSF) e B1 e B2 (não ativadas com GM-CSF) da Figura 15, onde as CLs foram semeadas diretamente sobre a derme acelular e mantidas por 7 dias, mas permaneceram na forma de aglomerados celulares de aparência granular quase que impedindo a integração entre a derme e a epiderme em formação. A ativação das células com GM-CSF anteriormente a sua semeadura sobre a derme acelular não apresentou diferença em relação às células não ativadas, tanto quando semeadas em derme não irradiada (A1 e B1), quanto em derme irradiada (A2 e B2).

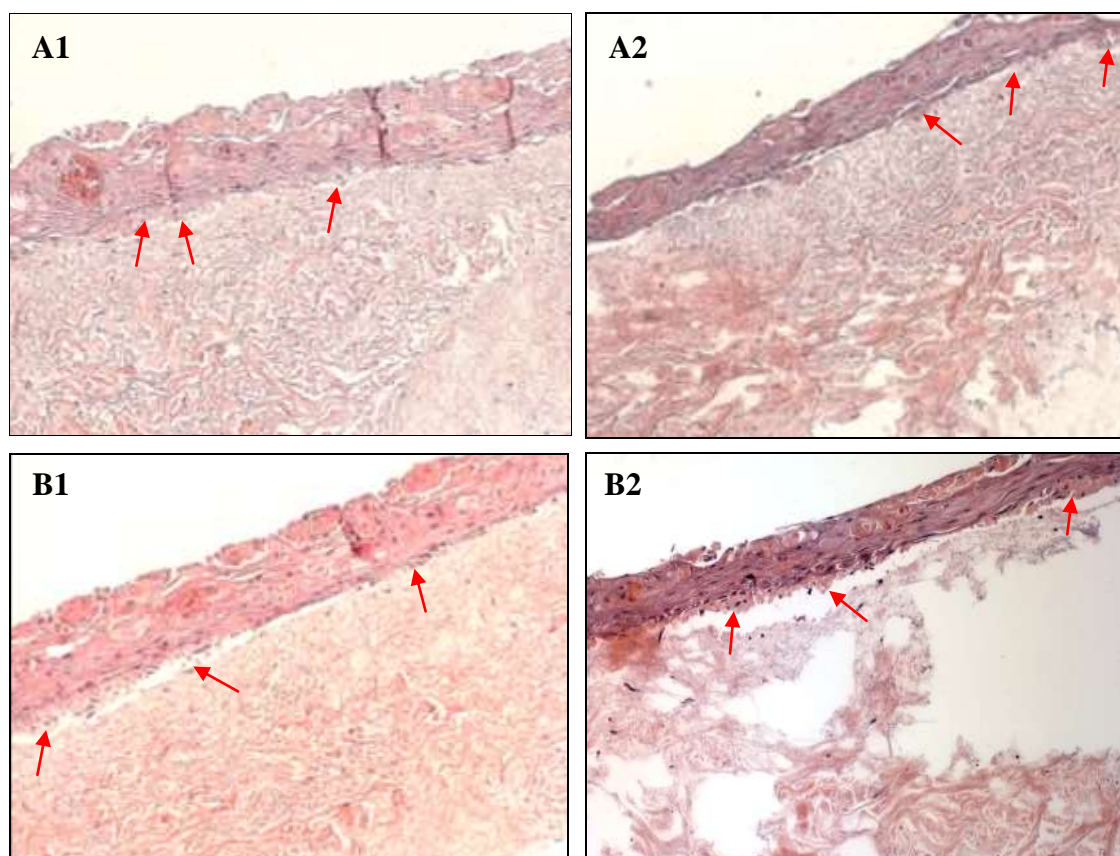


Figura 15 - Cortes histológicos do equivalente dermoepidérmico acrescido de células de Langerhans (500.000 CLs/cm^2) semeadas sobre a derme acelular 24 horas antes das demais células ($400.000 \text{ QH/cm}^2 + 200.000 \text{ FH/cm}^2$) sobre derme humana acelular não irradiada (esquerda, **A1** e **B1**) e irradiada a 25 kGy (direita, **A2** e **B2**). **A1** e **A2** CLs com fator GM-CSF. **B1** e **B2** CLs sem fator GM-CSF. Ambos equivalentes cultivados por 7 dias. Aglomerado celular com CLs de aparência granular facilmente visualizado em todas as figuras acima (**flechas vermelhas**). Microscopia óptica HE. Aumento original 100X.

Da mesma forma que na Figura 15, nas imagens da Figura 16 também se pode observar a impossibilidade de integração das CLs na epiderme reconstruída. Isto pode ser facilmente observado nas imagens A1 e A2 (derme não irradiada e derme irradiada, respectivamente), onde as CLs foram semeadas em conjunto com as demais células, mas permaneceram na forma de encapsulados celulares de aparência granular tanto entre as camadas da epiderme como também na junção da mesma com a base dérmica. Já nas imagens B1 e B2 (derme não irradiada e derme irradiada, respectivamente) onde as CLs foram semeadas diretamente sobre a epiderme em construção, 24 horas depois da semeadura dos QH e FH, observa-se que as células granulares encapsuladas se mantiveram sobre as camadas da epiderme, e em nenhum momento integradas à mesma. Os equivalentes permaneceram em cultura por 21 dias em ambos os casos

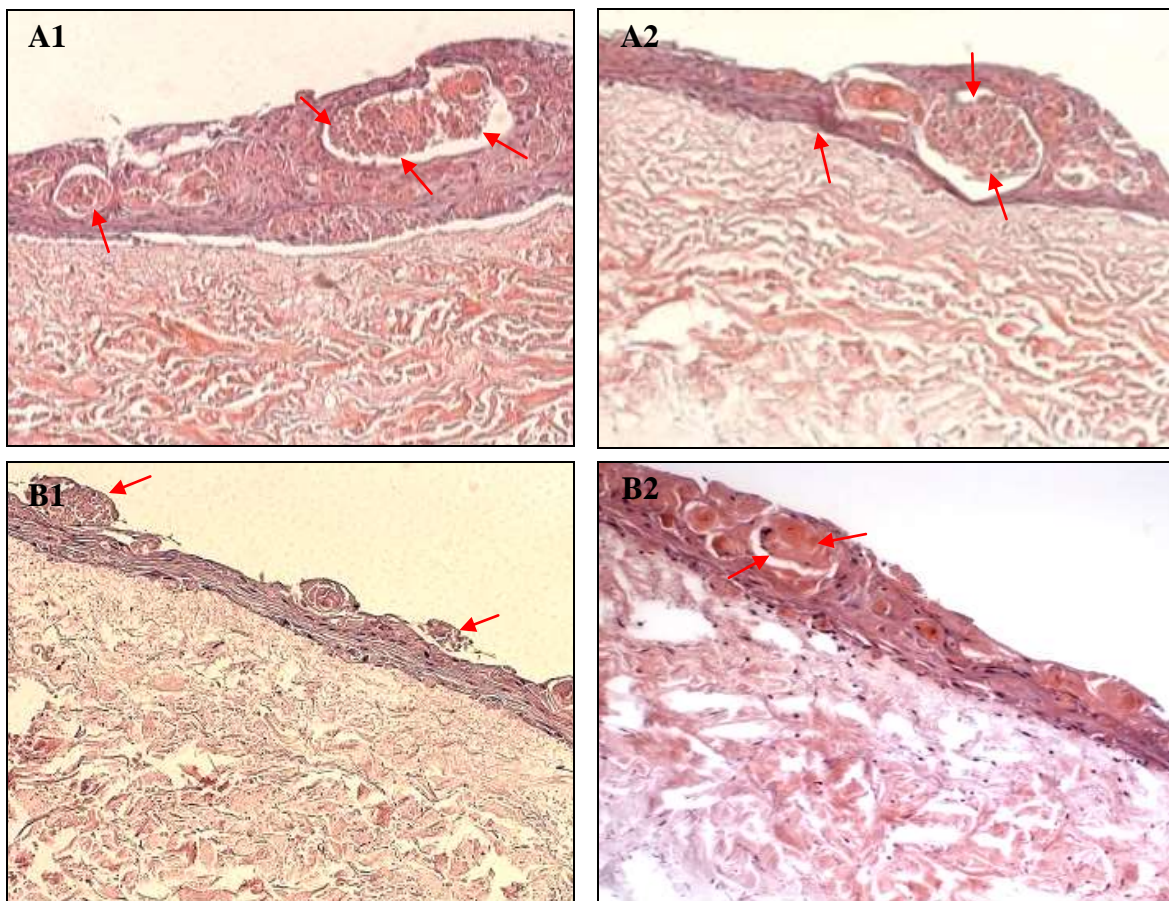


Figura 16 - Análise histológica do equivalente dermoepidérmico acrescido de CLs (400.000 QH + 200.000 FH + 500.000 CLs (cél/cm²)) sobre derme humana acelular não irradiada (esquerda, **A1** e **B1**) e irradiada a 25 kGy (direita, **A2** e **B2**). **A1** e **A2** correspondem a todas as células semeadas simultaneamente. **B1** e **B2** correspondem às CLs semeadas 24 horas após a semeadura dos QH e FH. Células cultivadas por 21 dias. Encapsulado celular com CLs de aparência granular facilmente visualizado em todas as figuras acima (**flechas vermelhas**). Microscopia óptica HE. Aumento original 100X.

Estas imagens deixam clara a impossibilidade de integração das CLs na epiderme reconstruída sobre derme humana acelular, independente do tempo e forma de semeadura das mesmas.

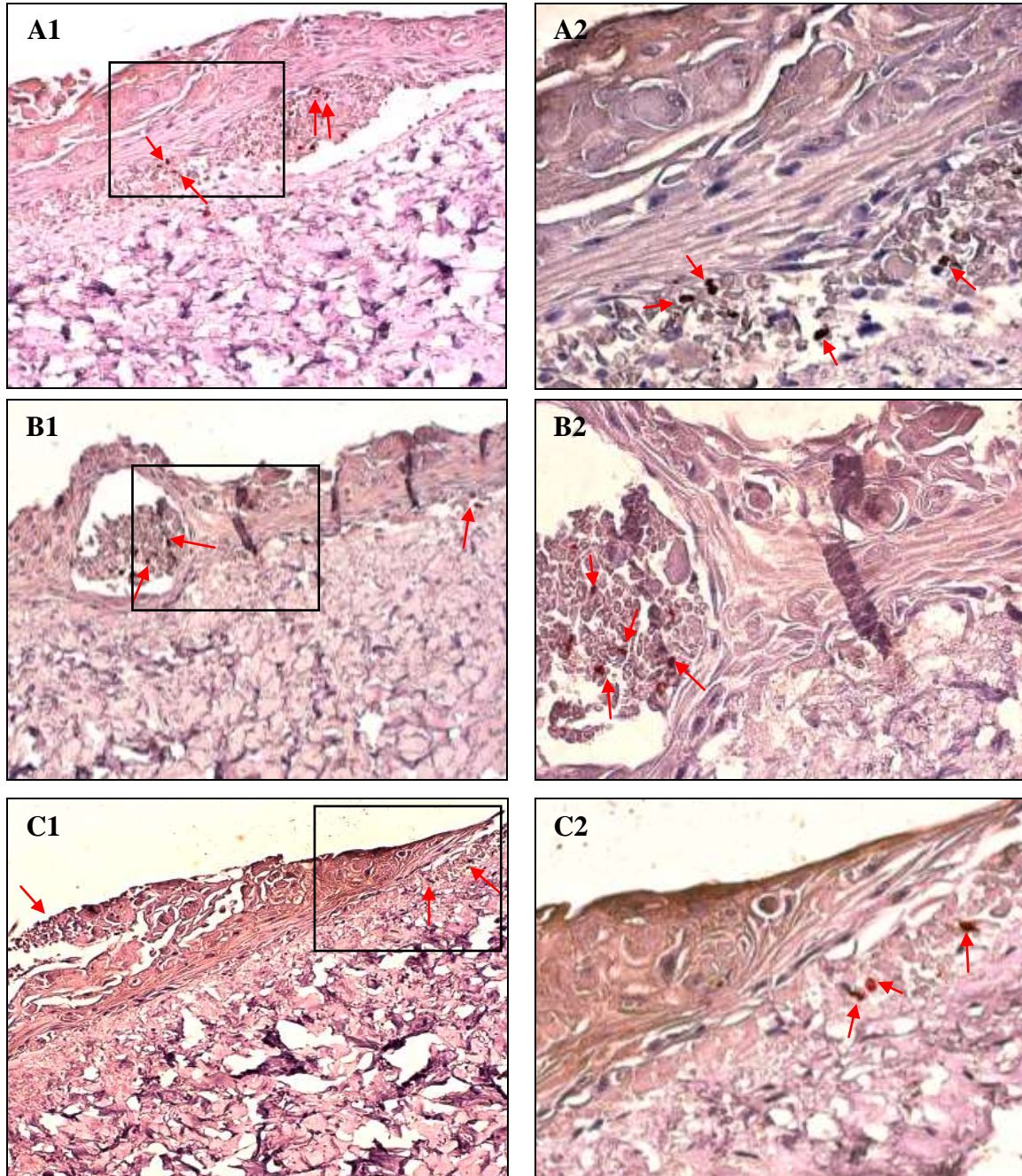


Figura 17 - Análise imunohistoquímica com o anticorpo CD1a para marcação de CLs. Equivalente dermoepidérmico acrescido de CLs (400.000 QH + 200.000 FH + 500.000 CLs (célis/cm²)). **A1** e **A2** correspondem às células com fator GM-CSF semeadas sobre a derme acelular 24 horas antes das demais células e cultivadas por 7 dias. **B1** e **B2** correspondem a todas as células semeadas simultaneamente. **C1** e **C2** correspondem às CLs semeadas 24 horas após a semeadura dos QH e FH. Ambas cultivadas por 21 dias. Encapsulamento celular com CLs de aparência granular marcadas em marrom (**flechas vermelhas**) em todas as imagens acima. Microscopia óptica HE. Aumento original 100X (esquerda, **A1** a **C1**) e 400X (direita, **A2** a **C2**).

As imunohistoquímicas (Figura 17) confirmaram os resultados da coloração com HE (Figuras 15 e 16), em que as CLs não foram integradas ao equivalente dermoepidérmico, ficando localizadas apenas nos aglomerados de células granulares mencionados anteriormente. Com o formato das CLs encontradas em nossos equivalentes, evidenciado pela marcação com o anticorpo CD1a, pode-se inferir a inviabilidade das mesmas, diferente da sua apresentação quando presentes na pele humana, na forma característica de célula arredondada e composta por inúmeros dendritos longos e finos.

6 DISCUSSÃO

Os motivos pelos quais foi concebida esta pesquisa estão intimamente ligados a grande demanda por substitutos *in vitro* para os modelos animais, assim como, uma tentativa de aprimoramento dos modelos de sensibilização *in vitro* já existentes. Para tanto, fez-se necessário o isolamento e cultivo de células dérmicas e epidérmicas, como também, a sua posterior integração em modelos tridimensionais de pele humana para averiguação de seu funcionamento.

Em paralelo ao estabelecimento dos protocolos para obtenção das células de Langerhans isoladas da pele, foi realizada a obtenção de queratinócitos, melanócitos e fibroblastos humanos, utilizados para a construção de equivalentes dermoepidérmicos visando a incorporação das CLs humanas neste modelo, para a produção de um sistema organotípico imunosensível.

Como primeiro passo para a construção dos equivalentes dermoepidérmicos, iniciamos a cultura das células dérmicas (fibroblastos humanos) e epidérmicas (queratinócitos e melanócitos humanos) a partir dos fragmentos de pele obtidos de mamoplastia redutora, seguindo o método empregado para o cultivo de células primárias proposto por Rheinwald & Green (1975). Utilizando uma média entre os resultados provenientes da cultura das células dos diferentes doadores (Tabela 1), conseguimos após 3 semanas de cultivo para células epidérmicas, e 4 para células dérmicas, um número suficiente de células tanto para a construção dos equivalentes planejados, quanto para a montagem de um banco de células de cada paciente, para que, sempre que necessário, os protocolos possam ser repetidos de forma bastante fidedigna.

De acordo com a variabilidade (graus de diferenciação das células epidérmicas) encontrada entre as células dos diferentes doadores (Watt, 2002), como também nos casos de condições desfavoráveis (contaminações) em nossos laboratórios, nem todas as células obtidas dos fragmentos de pele puderam ser utilizadas para os experimentos ou mesmo para a inclusão em nosso banco de células. Portanto, nossa média dos resultados da multiplicação celular é baseada nas culturas consideradas não diferenciadas ou de boa qualidade de acordo com nossos padrões internos.

Em relação ao crescimento das culturas celulares, foram obtidos resultados bastante expressivos quanto ao número de células, visto que, em cerca de 3 semanas

após o início do cultivo, obtemos quantidades de células epidérmicas em torno de $40,0 \times 10^6$ para cada $5,0 \times 10^6$ células semeadas no primeiro dia do cultivo. Já para células dérmicas e/ou fibroblastos, conseguimos em 4 semanas de cultivo, tanto para células provenientes de explante como para suspensões (processo enzimático), quantidades de fibroblastos pouco acima de $20,0 \times 10^6$ células por procedimento.

No entanto, o isolamento e cultivo de queratinócitos e principalmente de fibroblastos humanos não se apresentaram neste trabalho, como sendo um grande desafio, e sim como uma das partes a serem realizadas em conjunto com o isolamento e manutenção da viabilidade das CLs, que representa um dos objetivos principais deste projeto.

As células de Langerhans são células especializadas na captação de uma grande variedade de antígenos na pele, sendo uma vez ativadas por algum estímulo, estas células sofrem alterações dinâmicas, que levam a sua migração da epiderme em direção à derme, diferenciando-se em células dendríticas maduras, as quais, não se assemelham em fenótipo e em função às CLs imaturas e não estimuladas, ainda residentes na epiderme (Mellman & Steinman, 2001; Bursch, 2007). As pesquisas sobre células dendríticas provenientes da pele humana, são ainda bastante limitadas devido aos procedimentos de isolamento já conhecidos serem extremamente laboriosos, delimitando a quantidade de pele que pode ser processada em um único procedimento. No entanto, para a caracterização sistemática e abrangente deste tipo celular e seus possíveis empregos, se faz necessária a aquisição de um grande número de células, portanto, uma grande quantidade de pele. Por este motivo, a maior parte dos estudos sobre células dendríticas humanas é realizado indiretamente por meio de células derivadas de precursores das células dendríticas *in vitro*, como por exemplo, os monócitos e células estaminais $CD34^+$, ao invés de células dendríticas primárias purificadas.

Sendo assim, se faz necessário o estabelecimento de métodos confiáveis para o isolamento de CLs residentes na epiderme, para estudos destinados a análise de sua função inata e aplicações.

Visando selecionar o melhor método de obtenção de CLs imaturas da epiderme, testamos e empregamos três diferentes técnicas que permitiram isolar estas células em quantidades satisfatórias para estudos posteriores.

A primeira metodologia testada partia da premissa de que as células de Langerhans podem ser obtidas a partir da suspensão de células proveniente da pele humana, como também, do sobrenadante da semeadura da mesma suspensão celular, por se tratar de células não aderentes.

O primeiro protocolo (item 5.3.1) de isolamento foi realizado a partir da suspensão celular, adquirida por meio de processo enzimático empregado na obtenção de queratinócitos, sendo então, dividido em duas partes, iniciando pela coleta de sobrenadante das garrafas de cultura, semeadas com a suspensão celular proveniente do processo enzimático e a segunda parte utilizando gradiente de Ficoll para separação das células mononucleadas da suspensão celular.

Devido ao processo enzimático ser efetuado com uma epiderme ainda apresentando uma fina camada de derme, deixada pela retirada manual da mesma, a suspensão celular obtida continha resquícios de células dérmicas, dificultando a separação das células mononucleadas pelo gradiente de Ficoll, resultando em baixos valores de células por cm^2 (Tabela 2). No entanto, o volume obtido de células viáveis em relação ao número de células totais da suspensão celular se mostrou favorável, principalmente quando relacionado aos altos níveis de expressão positiva para o marcador CD1a (Tabela 3). Os resultados evidenciaram que este protocolo pode fornecer amostras com níveis satisfatórios de homogeneidade (Figura 3B), contendo baixos índices de marcações secundárias da população (Figura 4). Ao contrário do esperado, as células de Langerhans responderam de forma positiva aos processos enzimáticos sucessivos (de 4 a 6 tripsinizações de meia hora cada), não apresentando processos de maturação conclusivos ou altos índices de mortalidade, como pode ser verificado por meio dos resultados das citometrias de fluxo (Figura 4).

Com relação ao Protocolo 1A, onde ocorreu o recolhimento das células não aderentes provenientes das garrafas de cultura semeadas com a suspensão de células, apesar do maior rendimento de células viáveis em relação ao número total de células semeadas (Tabela 2), encontramos subpopulações de morfologia bastante distinta (Figura 3A), demonstrando uma grande impureza da amostra, inviabilizando este protocolo.

Em busca de melhores resultados quanto à quantidade de células viáveis na amostra, demos início a um novo método de obtenção de CLs (item 5.3.2). Este protocolo levou em consideração que a utilização de tiras ou faixas pode acelerar a

penetração e ação da Dispase II[®] na separação enzimática entre derme e epiderme, e os resultados de Bond et al. (2009), que aprimorou a obtenção destas tiras com a utilização de um expansor de pele de mesa.

Foi desenvolvido em nossos laboratórios um protótipo manual de um *Skin Graft Mesher* (expansor), que é um aparelho utilizado clinicamente para a expansão de enxertos de pele destinadas a transplantes, necessárias, por exemplo, em tratamento de lesões por queimadura. Esse processamento da pele lhe confere o aspecto de uma rede formada por finas faixas. Esta estrutura em forma de rede cria uma maior área de contato entre a Dispase II[®] e a pele, fazendo com que, após o tratamento enzimático, a epiderme pudesse ser facilmente desprendida da derme com a utilização de uma pinça, sendo muitas vezes retiradas grandes folhas de epiderme reticuladas. No entanto, o expansor de pele manual funcionou de forma bastante satisfatória em relação à demarcação da rede na pele, mas de forma ineficaz quanto ao corte da mesma, sendo necessário o auxílio de um bisturi para abrir grande parte das marcações que o expansor deixava na pele. Apesar deste problema, a utilização do expansor se mostrou favorável em relação à diminuição do tempo e manuseio do material, auxiliando na etapa de separação entre derme e epiderme. Esta redução no tempo de manipulação da amostra não só permitiu que maior quantidade de pele pudesse ser processada, mas também reduziu o risco de maturação espontânea das células dendríticas durante o procedimento de isolamento.

Após a separação da epiderme, a mesma foi disposta em meio contendo GM-CSF para ampliar a migração de células dendríticas no meio. Encontra-se bem documentado, que o processo de migração das células dendríticas a partir da pele começa imediata e espontaneamente assim que a pele é colocada em cultura (De Witte et al., 2007).

Desta forma, os sete procedimentos foram realizados de forma bastante similar, sendo testada apenas, a quantidade de derme a ser retirada da pele antes da aplicação da Dispase II[®] (Quadro 1), o tempo e concentração necessária utilizada para separação da epiderme (Tabela 4) e a necessidade da troca de meio de migração em dados períodos, segundo o grau de acidificação do mesmo. Como resultado, pode-se observar que não haveria necessidade de retirada excessiva de derme, reduzindo a manipulação e assim evitando sua maturação espontânea.

À medida que os procedimentos foram sendo realizados e as adequações de protocolo definidas, as coletas de células dendríticas viáveis após a migração, alcançaram valores mais significativos (Tabela 5), sendo que o procedimento realizado com a pele do doador 009 foi o mais produtivo em relação ao número de células viáveis por cm². Uma possível explicação para a grande quantidade de CLs obtidas da doadora 009 pode ser o estado alérgico da pele das mamas da doadora no momento da operação, causado pela aplicação tópica de um creme esfoliante, anteriormente a cirurgia. No entanto, o número de células mortas obtidas neste protocolo ainda foi muito grande, sendo geralmente maior que o número de células viáveis obtidas, com exceção o doador 009.

Conforme observado durante a contagem das células, a proporção dominante de contaminantes foi de células não dendríticas viáveis, células não viáveis e detritos. Apesar de não termos confirmado, pode-se presumir que as demais células contaminantes fossem provavelmente queratinócitos e melanócitos como relatado anteriormente por Flacher et al. (2006). A proporção de células de Langerhans poderia ainda ser enriquecida por uma centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Paque Plus, levando a diminuição dos contaminantes da amostra, mas em contrapartida, submetendo as células a mais um procedimento, o que poderia causar perda e maturação celular.

Nas análises das amostras por citometria de fluxo, foi constatada a presença de uma população de CLs homogênea proveniente da epiderme, definida com base em sua maior expressão do marcador CD1a e moderada de HLA-DR (Tabela 6), sendo constante a ausência de expressão significativa do marcador CD14 (dados não apresentados), indicando que estas células eram células dendríticas num estágio imaturo (Zhou & Tedder, 1995). Embora sempre presente, a expressão positiva do marcador CD1a foi baixa, sugerindo que grande parte das células obtidas neste Protocolo podem ser queratinócitos ou outros tipos celulares presentes na pele, como observado durante as contagens em câmara hemocitométrica. Novamente abre-se uma exceção para o doador 009, que apresentou altos índices de marcação CD1a⁺ (Figura 5).

Estes resultados confirmam a efetividade do Protocolo 2 quanto à obtenção de CLs imaturas e viáveis, mas em quantidades apenas suficientes para a execução de testes específicos, sendo, portanto, não recomendado para a obtenção de grandes

quantidades de células purificadas, pelo elevado grau de contaminantes e/ou células mortas.

Na tentativa de aprimorar os resultados obtidos no Protocolo 2, combinamos as técnicas que apresentaram os melhores resultados nos dois protocolos testados, eliminando de forma efetiva as etapas que se mostraram ineficientes na obtenção de CLs imaturas e viáveis.

Neste terceiro protocolo (itém 5.3.3), utilizamos novamente a Dispase II[®] para separar totalmente a derme da epiderme, eliminando possíveis vestígios de vasos sanguíneos e componentes dérmicos, assegurando que a suspensão de células epidérmicas obtida, não estivesse contaminada com células dendríticas dérmicas e/ou macrófagos (Pena-Cruz et al., 2001).

Utilizamos outro processo enzimático, desta vez com Tripsina/EDTA para obter uma suspensão de células epidérmicas, sendo necessários apenas dois ou três tempos de incubação para obter uma grande quantidade de células (Tabela 7), diminuindo desta forma, a manipulação e o tempo de preparo da amostra.

Após a contagem das células obtidas na suspensão, esta foi delicadamente disposta sobre gradiente de separação de Ficoll, tendo como resultado uma maior quantidade de células viáveis e purificadas por amostra (Tabela 7).

Quando avaliadas por citometria de fluxo, as CLs isoladas mostraram fenótipo característico de células dendríticas imaturas, que podem ser convertidas em fenótipo maturo, com os estímulos de maturação adequados. Foi observada a presença de uma população de CLs homogênea (Figura 6), com alta expressão do marcador CD1a e moderada de HLA-DR (Figura 6 e Tabela 8), sendo constante a ausência de expressão significativa do marcador CD14 (Figura 7) indicando que estas células eram células dendríticas num estágio imaturo (Zhou & Tedder, 1995).

A viabilidade celular foi também avaliada por citometria de fluxo, utilizando o marcador de viabilidade 7AAD (Figura 7), o qual apresentou ótimos resultados, mostrando que a amostra continha um número reduzido de células mortas.

Embora este terceiro protocolo ainda possa ser aprimorado, este se mostrou como um método de grande aplicabilidade e resultados favoráveis, sendo superior aos outros três protocolos (1A, 1B e 2), tanto em número de células viáveis por cm², como também em relação à baixa contaminação e número de células mortas presentes na amostra.

Os resultados obtidos com o Protocolo 3, também se mostraram superiores a muitos outros métodos de separação de CLs já padronizados, mas não testados em nossos laboratórios. Por exemplo, métodos que utilizam a marcação das células epidérmicas com anticorpos ou esferas imunomagnéticas (CD1a ou MHC de classe II) como forma de separação das CLs, se mostrando bastante favorável quanto à pureza da amostra. No entanto, podem induzir a maturação das mesmas, durante o procedimento de isolamento (Tchou et al., 2003).

Além da citometria de fluxo, utilizamos a microscopia de fluorescência para confirmar a presença de células de Langerhans nas amostras. Esta metodologia se mostrou eficiente quanto à identificação das CLs, apresentando células bem marcadas e com morfologia característica (Figura 8), permitindo a visualização “a fresco” das mesmas. No entanto, a quantidade de células (mínimo de 1×10^6) e o tempo necessário para a realização da metodologia (em média 5 horas de preparo, mais aproximadamente 2 horas para visualização microscópica e registro fotográfico) não são justificados se houver a possibilidade de padronização da análise por citometria de fluxo (Malone et al., 2002).

Outro fato bastante importante relacionado à manutenção das CLs é a necessidade de um protocolo de criopreservação diferenciado. Isto foi constatado durante a realização dos primeiros experimentos de isolamento das CLs, onde utilizamos o método de congelamento e descongelamento convencional, resfriando e criopreservando as células de forma rápida e efetuando o seu descongelamento da mesma maneira. Este procedimento resultava em baixos rendimentos de células viáveis, portanto, a partir do sétimo experimento passamos a utilizar um protocolo de criopreservação e descongelamento específico para CLs, obtendo então viabilidade celular de aproximadamente 95%, em praticamente todos os procedimentos.

Justificamos esta evolução dos resultados da criopreservação a uma taxa lenta de resfriamento empregada nas células, anteriormente ao seu congelamento, revelando indícios de que o congelamento rápido pode resultar em lesões às CLs.

De acordo com Abe et al. (1995) o congelamento rápido resulta em lesões internas nas CLs, enquanto o congelamento lento, numa ordem de ~ 1 °C/min não causa tal prejuízo as mesmas. Durante o arrefecimento lento, sob a temperatura de 5 °C, a água intra e extracelular permanece super resfriada, mas não cristaliza, sendo que

somente à temperatura de -5 a -10 °C que os cristais de gelo do meio extracelular já resfriado começam a se formar, ocorrendo o congelamento de forma externa à célula, anteriormente ao início da formação do gelo intracelular. Com a formação do gelo, a água em estado líquido vai desaparecendo do meio extracelular, causando um desequilíbrio osmótico que ocorre através da membrana celular, conduzindo a migração da água para fora da célula. O aumento na concentração de soluto no exterior da célula, assim como intracelularmente, pode ser prejudicial à sobrevivência da mesma. Se água em excesso permanece dentro da célula, danos devido a formação de cristais de gelo, neste ponto exato, a curva de resfriamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula já desidratada com o meio hiperosmótico, devido ao aumento da concentração de soro fetal bovino (90%). Para equilibrar estas trocas osmóticas e evitar a formação dos cristais de gelo intracelulares, manteve-se o agente criopreservante DMSO na concentração de 10%, para proteção das células não só durante o congelamento (Hubel, 1997; Seo et al., 2002).

A combinação destes fatos, corrobora para o emprego do congelamento lento em células não proliferativas e em estádios de evolução avançado, como é o caso das CLs, promovendo um alto índice de sobrevivência destas células pós descongelamento.

Após a padronização dos protocolos de isolamento e criopreservação das CLs, foram realizados testes a fim de avaliar a efetividade destas células como indicador de sensibilidade cutânea. Para isso, as CLs foram expostas a dois agentes: Formaldeído (substância sensibilizadora) e Glicerina (substância não sensibilizadora), para posteriormente, avaliar a sua diferenciação por citometria de fluxo, utilizando o marcador CD1a.

O CD1a é um receptor associado à membrana, pertencente à família das imunoglobulinas, especializado na apresentação de lipídios, glicolipídios e lipopeptídeos, sendo largamente expresso nas células de Langerhans imaturas da epiderme (Sloma et al., 2008).

Como vários fatores podem afetar o grau de maturidade das CLs, utilizamos três diferentes controles para este experimento. O Controle 1 foi utilizado para verificar se as células descongeladas mantiveram seu estágio de imaturidade, fato comprovado pela elevada expressão (98,4%) de CD1a (Tabela 9). Já com a permanência das células em

cultura, mesmo sem a ação de agentes externos (Figura 9; Tabela 9), observamos uma redução na marcação para CD1a (71,9%).

O GM-CSF é uma citocina relevante na manutenção do estado diferenciado das CLs na epiderme, da mesma forma que pode ser utilizado como estímulo para a maturação das CLs *in vitro* (Pieri et al., 2001). Além das citocinas endógenas, como o GM-CSF, diversos estímulos ambientais, incluindo o contato cutâneo com substâncias antigênicas, induzem também a liberação de citocinas inflamatórias e quimioatratórias pelos queratinócitos epidérmicos (Corsini & Galli, 1998). Os resultados das experiências realizadas neste trabalho demonstram que assim como os agentes sensibilizadores e não sensibilizadores, o GM-CSF diminui a expressão de CD1a, a qual é totalmente ligada ao estágio imaturo das CLs .

A análise do efeito da incubação das CLs com GM-CSF demonstrou que este fator, mesmo isoladamente, diminui a expressão de CD1a (56,2%). Porém como o GM-CSF é essencial para diferenciação das CLs imaturas quando estimuladas, este passa a ser o controle verdadeiro dos agentes estimuladores (Figuras 9).

Obtivemos resultados bastante promissores quanto à efetividade e sensibilidade das CLs em relação ao agente sensibilizador (Formaldeído), o qual diminuiu consideravelmente a expressão da molécula de superfície CD1a nas análises por citometria de fluxo (5,9; 8,7; 12,1 e 17,2), sendo esta redução dependente da concentração (14,55; 0,73; 0,036 e 0,0018 mg/mL, respectivamente). Em relação ao agente não sensibilizador (Glicerina), não foi observada elevada redução (11,5; 14,4; 17,3 e 21,5) dependente da grande variação de concentração (de 19,72 a 0,00247 mg/mL), apesar destes valores estarem abaixo do obtido para o controle 3. Este fato deve ser melhor observado com a utilização de outros agentes sensibilizadores e não sensibilizadores.

A diminuição da expressão do CD1a observado neste trabalho (Figura 9) também está de acordo com resultados obtidos por outros pesquisadores em testes relacionados ao estágio de maturação das CLs após seu isolamento (Salgado et al., 1999; Pena-Cruz et al., 2001; Bond et al. 2009).

O processo de migração e maturação das CD da pele envolve alterações profundas das moléculas que são expressas na superfície celular (Banchereau & Steinman, 1998), nomeadamente moléculas MHC de classe II (Herouet et al., 2000), moléculas co-estimuladoras (Coutant et al., 1999; Tuschl & Kovac, 2001), e em

moléculas secretadas para o meio extracelular, incluindo citocinas e metaloproteinases (Pichowski et al., 2000; De Smedt et al., 2001).

Desta forma os resultados obtidos sugerem que os antígenos empregados no teste, assim como a citocina epidérmica GM-CSF, estão envolvidos nas alterações da expressão do CD1a, marcador de superfície das CLs da pele, sendo possível concluir que com o aprofundamento deste tipo de teste, utilizando diferentes marcadores celulares que indiquem o grau de maturação das células, como o CD83 e CD86, será possível o desenvolvimento de testes de sensibilização *in vitro* visando a redução do número de animais usados na determinação do potencial alergênico de substâncias químicas como um todo.

Uma vez padronizado o protocolo de obtenção das CLs, pode-se iniciar os protocolos de confecção dos modelos de pele humana, onde após a sua avaliação em testes de toxicidade celular, as CLs poderiam ser finalmente acrescentadas na estrutura do equivalente, tornando-o um modelo de pele humana imunosensível.

Para obtenção destes equivalentes dermoepidérmicos, além do isolamento e cultivos das células dérmicas e epidérmicas (Itens 4.4 e 4.5), partiu-se da obtenção de arcabouços de colágeno acelulares, provenientes de peles humanas gliceroladas cedidas pelo Banco de Tecido do Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo. Estas peles foram então cortadas e irradiadas a 25 ou 50 kGy como forma de esterilização e afrouxamento das fibras de colágeno para facilitar a entrada dos fibroblastos humanos e seu repovoamento. Após a irradiação, a pele foi submetida a um processo enzimático para retirada da epiderme, sendo necessário muitas vezes, raspar a superfície da derme (irradiação a 50 kGy) para retirar completamente os vestígios de epiderme. A realização da desepidermização da pele já irradiada dificulta a separação dos tecidos, podendo comprometer a matriz de colágeno devido à raspagem.

Visando aprimorar esta técnica de separação que já havia demonstrado certa ineficiência, nos experimentos seguintes iniciamos o processo de reidratação das peles humanas gliceroladas, para serem desepidermizadas pelo processo enzimático, preservadas novamente em glicerol 98%, e só então irradiadas (Bringel, 2011).

Devido a observação de um afrouxamento excessivo de algumas das dermes irradiada apenas a 50 kGy, detectada nas histologias feitas nos primeiros experimentos de construção dos equivalentes dermoepidérmicos, passamos a dividir as dermes

acelulares em 3 grupos: dermes não irradiadas, irradiadas a 25 ou 50 kGy (Figura 10, 1 a 3).

Estas doses foram escolhidas levando-se em consideração que a radioesterilização dos tecidos biológicos por fonte de Cobalto-60 a 25 e 50 kGy, é uma forma de inativar bactérias e vírus, respectivamente, garantindo a esterilidade e propriedades físico-químicas da matriz, assim como, a preservação em glicerol 98% garante a descontaminação (Bourroul et al., 2002; Dziedzic-Goclawska et al., 2005).

A escolha da derme humana alógena, como base de cultivo das células, foi feita por esta possuir características físicas e químicas naturais para o crescimento de queratinócitos em sua superfície, sendo estes, melhor integrados na derme alógena que em outros leitos receptores, assim como, para a manutenção com possibilidade de migração, das CLs. A utilização deste modelo de derme humana acelular como arcabouço facilita a adesão de queratinócitos e melanócitos, por meio da preservação de constituintes da membrana basal (Ponec et al., 1995).

Neste caso também realizamos testes relacionados à quantidade de células (150.000, 300.000 e 400.000 células por cm^2 de co-cultura de queratinócitos e melanócitos) para verificação da melhor combinação de fatores para a padronização *in vitro* do equivalente dermoepidérmico (Figura 10, A a C). Juntamente com os queratinócitos foram adicionadas concentrações constantes de 200.000 fibroblastos por cm^2 , células estas, importantes para reconstituição dérmica que sustentará a neo-epiderme em formação.

Com relação ao número de células de Langerhans semeadas sobre a derme acelular, este foi fixado com base em artigos científicos internacionais, que integravam CLs de diferentes fontes, nos equivalentes de pele, sendo este número de 500.000 células por cm^2 . Todos os tipos celulares foram cultivados primeiramente no sistema imerso e então no sistema ar-liquido (Herson et al., 2001; Duval et al., 2003; Facy et al., 2005).

Foram feitas análises histológicas dos experimentos realizados (Figura 10, A2 a C2 e A3 a C3) onde foi possível observar que houve uma degeneração basofílica das dermes irradiadas tanto a 25 quanto a 50 kGy, em relação ao controle não irradiado (Figura 10, A1 a C1), porém esta degeneração foi consideravelmente mais acentuada nas matrizes de colágeno irradiadas a 50 kGy, em todos os cinco experimentos efetuados (dados não apresentados), corroborando com os achados de Bourroul et al.

(2002) nas peles gliceroladas e irradiadas. Foi também possível observar que na dose de 50 kGy, o afrouxamento demasiado da estrutura terciária dificultou ou inviabilizou a manutenção do arcabouço celular de colágeno, fazendo com que menos células permanecessem na derme, resultando num número visivelmente menor de fibroblastos aderidos a estrutura (exemplo Figura 10, C3).

Este afrouxamento das fibras colágenas da base dérmica também influenciou negativamente a formação da epiderme, pois apesar da evidente formação de um epitélio confluyente e estratificado, foi claramente observada certa desorganização celular em todos os modelos analisados (Figura 10). Acreditamos que esta desorganização possa ser explicada pela permanência de queratinócitos diferenciados (maiores) sobre a derme, e perda devido ao afrouxamento, dos queratinócitos basais e não diferenciados (menores), que não puderam permanecer sobre a base dérmica.

Ainda nesta análise, pode ser facilmente observado que com 150.000 QH/cm², ocorria a formação de uma epiderme muito delgada, apresentando apenas 1 ou 2 camadas de células (Figura 10, C1 a C3). Quando analisadas as histologias dos equivalentes compostos por 300.000 células/cm² (Figura 10, B1 a B3), o arranjo estrutural da epiderme se mostrou aprimorado, com mais camadas de células, sendo que, com 400.000 células/cm² (Figura 10, A1 a A3) obtivemos a situação mais adequada, com presença de várias camadas de células formando a epiderme e estrato córneo bastante definido e evidente, sendo também possível observar a presença de uma quantidade considerável de FH na derme (Figura 11).

Uma observação macroscópica que evidencia a resposta positiva dos equivalentes, logo em seus primeiros dias de cultivo, se dá pela pronunciada diminuição e/ou enrugamento das bases dérmicas (Figura 12), comprovando que os fibroblastos semeados penetraram na mesma, iniciando sua produção de colágeno para o reparo imediato das bases dérmicas acelulares onde estão integrados. A produção quase que imediata de colágeno pelos fibroblastos (12 horas após a semeadura) e a contração da base dérmica onde os mesmos foram semeados, foi relatada por Kamamoto et al. (2003) em experimentos utilizando fibroblastos humanos imersos em bases de colágeno tipo I.

Outro ponto bastante importante para o estabelecimento do equivalente dermoepidérmico foi a manutenção de fenômenos fisiológicos considerados normais para os queratinócitos, como a reorganização dos elementos de adesão intercelular e da junção dermoepidérmica. Podemos inferir que estes fenômenos ocorreram devido a

forte aderência dos queratinócitos à base dérmica, formando um denso e opaco filme sobre a mesma, podendo ser separado apenas com o auxílio mecânico de pinças cirúrgicas. Quanto a aderência intercelular promovida pelos desmossomos em culturas tridimensionais, esta já foi devidamente comprovada por Constable, (1972) e Herson et al. (1999), os quais relatam que, uma vez que os desmossomos são formados *de novo* em cultura, sua presença interligando os queratinócitos dos epitélios corrobora para a fisiologia celular normal, ou seja, a ocorrência da síntese de caderinas, desmogleínas e desmocollinas, da mesma forma que na pele humana *in vivo*.

Outro fator bastante importante para a formação da estrutura tridimensional da epiderme sobre uma base dérmica é a adição de íons Ca_2^+ na formulação do meio de cultivo numa concentração em torno de 1.5 mM, potencializando a formação de uma epiderme com múltiplas camadas, como demonstrado em estudos anteriores (Pruniéras et al., 1983; Régnier et al., 1992). Também muito importante para a formação de uma epiderme similar a encontrada *in vivo*, é o emprego do sistema ar-líquido no estágio final da multiplicação dos queratinócitos, o que faz com que a camada córnea se torne mais e mais espessa de acordo com o período de exposição da epiderme ao ar. As grelhas de aço inoxidável possibilitaram criar de maneira eficiente à interface ar-líquido desejada, permitindo o contato da derme com o meio de cultura e expondo ao ar as células já dispostas em camadas na superfície dérmica (Figura 12).

Os equivalentes dermoepidérmicos foram testados por meio de um protocolo de fototoxicidade que incluía a aplicação de formulações fotoprotetoras, a exposição dos equivalentes a radiação UV e a obtenção dos resultados pelo ensaio de Vermelho Neutro (NR, do inglês *Neutral Red*), como uma forma de padronização e avaliação dos mesmos. Após o processo de padronização dos equivalentes, estes modelos estariam prontos para a etapa de inclusão das CLs na sua construção, dando origem a um modelo de pele imunosensível.

Este tipo de modelo de epiderme reconstruída sobre uma base dérmica humana fornece um bom sistema para inúmeros tipos de experimentos, especialmente quando relacionados a testes *in vitro* sobre a eficiência e toxicidade de novos produtos químicos e demais substâncias de aplicação tópica (Régnier et al., 1990). Os testes de toxicidade ocupam um lugar de destaque nas aplicações destes equivalentes de pele, sendo o estudo da fototoxicidade causada por raios ultravioletas um dos testes mais realizados neste

tipo de modelo, devido a irradiação afetar diretamente as células basais da epiderme, responsáveis pela sua manutenção e posterior diferenciação para formação do estrato córneo (Gaspar et al., 2013).

Assim como os testes de fototoxicidade, vários ensaios de citotoxicidade *in vitro* foram desenvolvidos e realizados por importantes agências privadas e governamentais de todo o mundo, com destaque para o Multicentro de Avaliação de Citotoxicidade *in vitro* (MEIC) e para o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM). Estas agências recomendam a utilização de ensaios baseados na solução de NR, realizados com fibroblastos murinos 3T3 (ensaio 3T3 NRU) ou queratinócitos humanos normais (ensaio NHK NRU). Estes ensaios foram realizados com uma grande variedade de produtos químicos/farmacêuticos já comercializados e, portanto, testados também *in vivo*, sendo ainda os ensaios em cultura em monocamada muito utilizados, obtendo resultados semelhantes e facilmente reproduzíveis em diferentes laboratórios, fazendo da avaliação da citotoxicidade *in vitro* uma técnica muito aplicável e também uma fonte de resultados altamente respeitáveis e confiáveis (Strickland et al., 2005; Paris, et al., 2005; Clothier et al., 2013). O ensaio NHK NRU é considerado bastante adequado para testes de produtos químicos individuais, sendo os modelos de pele tridimensionais os mais recomendados para testes de formulações finais, uma vez que a solubilidade não é um fator limitante para este tipo de ensaio. Além disso, os produtos químicos a serem testados, podem ser aplicados topicamente, fazendo com que este ensaio se assemelhe as condições reais da aplicação de produtos pelo usuário final. Por estes motivos, os ensaios em monocamada estão sendo gradativamente substituídos por ensaios em equivalentes epidérmicos ou dermoepidérmicos, por estes, mimetizarem de forma mais confiável as reações da pele *in vivo*, assim como, possibilitarem o teste de formulações complexas, inviáveis em testes de monocamadas (Institute for *In Vitro* Sciences, 2013).

Portanto, utilizando a aplicação de fotoprotetores UVA e UVB específicos, foi possível avaliar o dano causado por cada uma destas substâncias, validando assim o modelo tridimensional. Desta forma, avaliamos os equivalentes dermoepidérmicos nos testes de toxicidade utilizando a aplicação de formulações base e acrescidas com fotoprotetores já conhecidos e comercializados (Avobenzona e Metoxicinamato de Octila, Quadro 3) diretamente sobre os equivalentes após o período de 21 dias de cultivo, quando os mesmos já apresentavam o estrato córneo visivelmente desenvolvido.

Os efeitos da radiação aplicada em parte dos equivalentes expostos à luz UVA em câmara de fototoxicidade foram medidos por meio do protocolo de NR, o qual utiliza a capacidade deste de passar através da membrana plasmática intacta e concentrar-se nos lisossomos de células viáveis. No caso da aplicação de substâncias que danifiquem a superfície celular e membranas lisossomais, ocorre a inibição da incorporação do corante, sendo a quantidade de NR absorvido pela cultura, proporcional ao número de células viáveis contidas na mesma (Triglia et al., 1991).

Após a análise dos dados, pode ser observado que a viabilidade celular foi maior nos equivalentes dermoepidérmicos expostos a luz (Figura 13, UVA⁺), na câmara de fototoxicidade em relação a aqueles que permaneceram nas mesmas condições de tempo e temperatura dentro da câmara, mas ao abrigo da radiação (Figura 13, UVA⁻). Apenas duas das amostras se comportaram de forma diferente, tendo sua viabilidade celular aumentada nos equivalentes que permaneceram na parte escura da câmara (Figura 13, PBS e Controle). Esse fato se deve provavelmente a ação da luz UVA sobre as formulações fotoprotetoras, que tem como mecanismo de ação a interação dos seus elétrons com os elétrons gerados na melanogênese, degradando as emulsões para proteger os melanócitos. Já nas formulações que sofreram duas irradiações (Figura 13, Deg/Com, Deg/AVB e Deg/OMC), sendo a primeira por degradação das mesmas e a segunda quando aplicadas sobre os equivalentes e levadas à irradiação por UVA na câmara de fototoxicidade, tiveram seus produtos intermediários de degradação eliminados. Sendo que os mesmos podem ser mais tóxicos para as células que os produtos finais de degradação (Chatelain & Gabard, 2001), é previsível que o resultado final seja uma maior viabilidade das células.

Como uma segunda forma de avaliação dos efeitos causados pela aplicação dos fotoprotetores e da radiação nos equivalentes dermoepidérmicos, assim como para a verificação da sua estrutura tridimensional, foram feitas lâminas histológicas com coloração de HE em cada um dos modelos (Figura 14). Pode ser visualizado nos cortes histológicos que tanto as formulações base como as formulações fotoprotetoras aplicadas topicamente nos modelos, não possuem ação abrasiva, fato evidenciado pela comparação entre o grupo controle PBS (imagens A1 e A2), grupo testado com as formulações base (imagens B1 e B2) e grupo testado com as formulações fotoprotetoras (imagens C1 e C2).

Desta forma, fica bastante claro que este modelo de pele humana tridimensional pode ser utilizado para a avaliação da corrosividade, da fotoproteção e da toxicidade, induzidas ou não, por filtros solares, sendo capaz de suplantiar a necessidade de modelos animais, pelo menos nas fases iniciais dos testes de filtros solares comercializados e novas formulações na área de fotoproteção. Estes resultados positivos quanto à efetividade do nosso modelo de pele tornou evidente que a formação de uma epiderme bem estruturada, composta por camadas bem formadas e estrato córneo presente, qualifica este equivalente dermoepidérmico para a etapa de inserção das CLs na estrutura tridimensional deste modelo, tornando-o desta forma, um modelo de pele imunosensível.

Uma vez avaliado e padronizado o equivalente dermoepidérmico passamos para a etapa de tentativas de inclusão, em sua estrutura, das células de Langerhans isoladas da epiderme (Item 4.13). Foram realizadas inúmeras tentativas de inclusão das CLs nos equivalentes de pele, tendo como principais diferenças entre os testes, o momento da semeadura destas células no equivalente e a sua ativação ou não com GM-CSF (Figuras 15, 16). No entanto, nenhum destes equivalentes apresentou resultados positivos quanto à incorporação das células em sua estrutura, sendo que estas permaneciam na forma de aglomerados celulares de aparência granular, muitas vezes impedindo a completa integração entre a derme e a epiderme em formação, e/ou aparecendo como encapsulados celulares entre as camadas da epiderme.

A razão pela qual obtivemos estes resultados negativos quanto à construção do equivalente imunosensível ainda não é totalmente clara para nós, mas acreditamos que o meio de cultivo utilizado para os equivalentes possa não ser adequado para a manutenção da viabilidade das CLs, sendo estas células conhecidamente sensíveis ao cultivo e aos componentes do mesmo. O GM-CSF é utilizado para a cultura e manutenção de CLs da epiderme humana e de camundongos, quando estas células são cultivadas de forma individual, para testes de detecção de antígenos e sensibilizadores. No entanto, observamos em nossos laboratórios, que a quantidade de GM-CSF utilizada para o cultivo das CLs, produz um efeito negativo nos queratinócitos, impedindo sua adesão a garrafa de cultivo e inviabilizando estas células de um modo geral. Outro ponto bastante importante levantado após a análise das lamínas provenientes das imunohistoquímicas (Figura 17), confeccionadas como forma de determinação da

presença e localização de CLs, foi a grande concentração de células mortas de aparência granular, entre as quais se encontravam as CLs imaturas, podendo ser este, um dos fatos que corroborou para a não integração destas células no equivalente.

Um fato que não pode ser deixado de lado é a possibilidade de estas células, após serem extraídas da pele, perderem a habilidade de reintegração na epiderme em formação nos equivalentes dermoepidérmicos. Sendo as células de Langerhans provenientes de células tronco hematopoiéticas e tidas como células em último estágio de diferenciação celular, podendo ser comparadas aos neurônios neste quesito, estas podem perder de fato, a habilidade de reintegração e funcionalidade que outras células epidérmicas possuem.

Neste trabalho, procuramos desenvolver um modelo dermoepidérmico contendo células de Langerhans obtidas por isolamento diretamente da epiderme humana, como uma forma de inovação para a construção de equivalentes de pele humana imunosensíveis, visto que, não foi encontrado na literatura outro modelo de pele contendo CLs provenientes desta mesma fonte.

A coloração com HE evidenciou uma epiderme totalmente diferenciada sobre uma base dérmica repovoada por fibroblastos, podendo ser observado um estrato córneo bem definido, sendo o estrato granuloso, espinhoso e basal, também presentes, mas de forma compacta, se assemelhando consideravelmente à pele humana (Figura 15 e 16). Apesar do relatado, nas nossas condições, não foi possível a reintegração das CLs epidérmicas.

Até o momento, apenas dois grupos de pesquisadores conseguiram introduzir CLs em um equivalente epidérmico (Régner et al., 1997; Facy et al., 2004; Facy et al., 2005; Schaerli et al., 2005), enquanto apenas um grupo foi capaz de introduzir células dendríticas em um equivalente dérmico (Guironnet et al., 2001), sendo estas células provenientes de monócitos CD34⁺ coletados do sangue fresco de cordão umbilical e/ou sangue periférico. No entanto, nenhum destes grupos reconstruiu um modelo de equivalente dermoepidérmico, ou seja, um modelo que contemplasse derme e epiderme associadas, tornando esses modelos inadequados para o estudo da migração das CLs da epiderme em direção a derme. Apenas um grupo conseguiu construir um modelo completo de pele humana imunosensível, funcional e adaptado para o estudo da ativação e migração de CLs. Este equivalente foi construído com base em fibroblastos embebidos em matriz de colágeno, no qual, queratinócitos, células endoteliais, células

dendríticas da derme e células de Langerhans contendo grânulos de Birbeck puderam se reorganizar na estrutura tridimensional do modelo, formando o equivalente (Dezutter-Dambuyant et al., 2006; Bechetoille et al., 2007), apesar deste modelo também utilizar células precursoras derivadas de sangue fresco como fonte de CLs.

Outro modelo de pele imunosensível foi criado em 2008, sendo o primeiro modelo de equivalente a conter uma linhagem celular humana derivada de células mielóide, como CLs, localizadas nas camadas de células suprabasais da epiderme. Esta linhagem de células foi denominada Mutz-3, sendo considerada como as células que mais se aproximam da realidade em termos de morfologia e reatividade de uma CLs da epiderme humana. Estas células, após o seu processo de diferenciação em CLs, são capazes de realizar todo o processo de maturação e migração quando expostas a um alérgeno clássico, de modo muito semelhante às CLs de uma biópsia de pele recém excisada (Ouwehand et al., 2008).

Sabe-se que as células de Langerhans são suscetíveis à acentuada variabilidade apresentada devido a cada doador, podendo alterar de forma significativa sua resposta a substâncias químicas e/ou formulações a cada lote, podendo inviabilizar este tipo de equivalente quanto a perfeita distinção entre sensibilizadores e não-sensibilizadores (Facy et al., 2004). Por outro lado, sabe-se também que para a transformação de células primárias em linhagem celular, se faz necessário que estas sofram inúmeras alterações, fato este que poderia modificar os resultados de um teste que visa distinguir um sensibilizador de um não-sensibilizador. Portanto, levando em consideração que ambas as técnicas possuem vantagens e desvantagens, optamos pela utilização de células primárias, pois estas podem ser monitoradas por meio de uma maior quantidade de controles durante os testes, enquanto que as transformações da linhagem celular são irreversíveis.

7 CONCLUSÕES

- O protocolo de obtenção de CLs mais promissor, testado em nossos laboratórios, foi aquele utilizando a suspensão de células provenientes somente da epiderme juntamente com o gradiente de Ficoll-Paque Plus;

- O congelamento rápido e convencional utilizado para a maioria das células humanas não pode ser utilizado para as CLs, devido a sua sensibilidade à formação de cristais de gelo;

- As CLs isoladas da pele humana podem ser utilizadas para detecção de alérgenos e captação de antígenos, desde que, testados diretamente, utilizando a citometria de fluxo para verificação da maturação celular;

- Para a composição do equivalente dermoepidérmico, as peles desepidermizadas não irradiadas e irradiadas a 25 kGy apresentaram melhores resultados quando comparada a irradiação de 50 kGy em análises histológicas;

- Pode ser evidenciada, na composição do equivalente dermoepidérmico, que com o uso de 400.000 células por cm^2 de QH + 200.000 células por cm^2 FH, na derme não irradiada ou irradiada a 25 kGy, ocorre uma melhor organização celular em relação a outras quantidades testadas;

- Os equivalentes dermoepidérmicos se mostraram reativos a testes de toxicidade de compostos químicos aplicados topicamente em sua estrutura, confirmando a possibilidade de sua utilização para testes *in vitro*;

- As CLs isoladas da pele humana, nas condições testadas, não são capazes de compor um equivalente dermoepidérmico, por não serem aptas ao rearranjo tridimensional imposto pelas demais células que compõem o equivalente;

- Os métodos aqui descritos podem ser reproduzidos em laboratórios de cultura celular convencionais, contribuindo para aumentar a reprodutibilidade e confiabilidade de resultados experimentais relativos às CLs.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, S.; FUJITA, T.; TAKAMI, Y. Disappearance of Langerhans cells and melanocytes after cryopreservation of skin. **J. Plastic Surgery.**, v. 48, p. 405–409, 1995.

ABDEL-NASER, M.B.; ABDALLAH, M.; DE ALMEIDA, H.L.; WOLLINA, U. Human Skin Cell Culture and its Impact on Dermatology. **Egypt. Dermatol. Online J.**, v. 1, n. 2, p. 1-8, 2005.

ABRAHAM, L.; KIERSZENBEUM, M.D. **Histology and cell biology, an introduction to Pathology.** 3.ed. New York, N.Y.: Elsevier, 2011.

ANJUERE, F.; MARTIN, P.; FERRERO, I.; FRAGA, M.L.; DEL HOYO, G.M.; WRIGHT, N.; ARDAVIN, C. Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. **Blood.**, n. 93, p. 590-598, 1999.

AUXENFANS, C.; FRADETTE, J.; LEQUEUX, C.; et al. Evolution of three dimensional skin equivalent models reconstructed in vitro by tissue engineering. **Eur. J. Dermatol.**, v. 19, p. 107-13, 2009.

AZEVEDO-FILHO, C.A.; **Construção de uma câmara de fotoestabilidade, estudo da fotodegradação da vitamina A e da ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas de nutrição parenteral.** 2008. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE.

BAKAND, S.; HAYES, A.; WINDER, C.; KHALIL, C.; MARKOVIC, B. *In vitro* cytotoxicity testing of airborne formaldehyde collected in serum-free culture media. **Toxicol. Inhal. Health.**, v. 21, p. 1-8, 2005.

BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature.**, n. 392, p. 245-252, 1998.

BECHETOILLE, N.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; DAMOUR, O.; ANDRE, V.; ORLY, I.; PERRIER, E. Effects of solar ultraviolet radiation on engineered human skin equivalent containing both Langerhans cells and dermal dendritic cells. **Tissue Eng.**, v. 13, p. 2667-2679, 2007.

BESSOU, S.; SURLÈVE-BAZEILLE, J.E.; SORBIER, E.; TAÏEB, A. *Ex vivo* reconstruction of the epidermis with melanocytes and the influence of UVB. **Pigment Cell Res.**, v. 8, n. 5, p. 2419, 1995.

BOND, E.; ADAMS, W.C.; SMED-SORENSEN, A.; et al. Techniques for time-efficient isolation of human skin dendritic cell subsets and assessment of their antigen uptake capacity. **J. Immunol. Methods.**, v. 348, p. 42–56, 2009.

BOURROUL, S.C.; HERSON, M.R.; PINO, E.S.; MATHOR, M.B. Sterilization of skin allografts by ionizing radiation. **Cell. Mol. Biol.**, v. 48, n. 7, p. 803-807, 2002.

BRINGEL, F. A. **Avaliação morfofuncional de pele humana conservada em glicerol e submetida à radiação gama: estudo em camundongos Nude (Nu/Nu)**. 2011. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

BURSCH, L.S.; WANG, L.; IGYARTO, B.; KISSENPFFENNIG, A.; MALISSEN, B.; KAPLAN, D.H.; HOGQUIST, K.A. Identification of a novel population of Langerin⁺ dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 3147-3156, 2007.

CARREL, A.; BURROWS, M.T. Cultivation of adult tissues and organs outside the body. **JAMA.**, v. 55, n. 16, p. 1379-1381, 1910.

CHATELAIN, E. & GABARD, B. Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (Avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S), a new UV broadband filter. **Photochem. Photobiol.**, v. 74, p. 401-406, 2001.

CLOTHIER, R.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; KINSNER-OVASKAINEN, A.; KOPPSCHNEIDER, A.; O'CONNOR, J.E.; PRIETO, P.; STANZEL, S. Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the ACuteTox Project. **Toxicol. In Vitro.**, v. 27, n. 4, p. 1347-1356, 2013.

CONSTABLE, H. Ultrastructure of adult epidermal cells in monolayer culture. **Brit. J. Derm.**, v. 86, p. 27-39, 1972.

CORMACK, D.H. **The integumentary system**. In: Ham's Histology, 9.ed. J.B., Philadelphia, P.A.: Lippincott Company, 1987.

CORSINI, E. & GALLI, C.L. Cytokines and irritant contact dermatitis. **Toxicol. Lett.**, v. 102, p. 277-282, 1998.

COUTANT, K.D.; DE FRAISSINETTE, A.B.; CORDIER, A.; ULRICH, P. Modulation of the activity of human monocyte-derived dendritic cells by chemical haptens, a metal allergen, and a staphylococcal superantigen. **Toxicol. Sci.**; v. 52, p. 189-198, 1999.

DE LUCA, M & CANCEDDA, R. Culture of human epithelium. **Burns.**, v. 18, n. 1, p. 5-10, 1992.

DE SMEDT, A.C.; VAN DEN HEUVEL, R.L.; ZWI BERNEMAN, N.; SCHOETERS, G.E. Modulation of phenotype, cytokine production and stimulatory function of CD34⁺ derived DC by NiCl and SDS. **Toxicol. In Vitro.**, v. 15, p. 319-325, 2001.

DE WITTE, L.; NABATOV, A.; PION, M.; FLUITSMA, D.; DE JONG, M.A.; DE GRUIJL, T.; PIGUET, V.; VANKOOYK, Y.; GEIJTENBEEK, T.B. Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. **Nat. Med.** v. 13, p. 367-374, 2007.

DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; BLACK, A.; BECHETOILLE, N.; BOUEZ, C.; MARECHAL, S.; AUXENFANS, C.; CENIZO, V.; PASCAL, P.; PERRIER, E.; DAMOUR, O. Evolutive skin reconstructions: from the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin. **Biomed. Mater. Eng.**, v. 16, p. 85-94, 2006.

DOS SANTOS, G.G.; REINDERS, J.; OUWEHAND, K.; RUSTEMEYER, T.; SCHEPER, R.J.; GIBBS, S. Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 236, n. 3, p. 372-382, 2009.

DUVAL, C.; SCHMIDT, R.; REGNIER, M.; FACY, V.; ASSELINEAU, D.; BERNERD, F. The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy. **Exp. Dermatol.**, v. 12, n. 2, p. 64-70, 2003.

DuVIVIER, A. **Atlas de Dermatologia Clínica**. 2.ed. São Paulo, Manole LTDA, 1997.

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; KAMINSKI, A.; UHRYNOWSKA-UHRYNOWSKATYSZKIEWICZ, I.; STACHOWICZ, W. Irradiation as a safety procedure in tissue banking. **Cell Tissue Bank.**, v. 6, p. 201-219, 2005.

©ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. **INVITTOX.**, n. 78, p. 5-18, 2008.

FACY, V.; FLOURET, V.; REGNIER, M.; SCHMIDT, R. Langerhans cells integrated into human reconstructed epidermis respond to known sensitizers and ultraviolet exposure. **J. Invest. Dermatol.**, v. 122, p. 552-553, 2004.

FACY, V.; FLOURET, V.; RÉGNIER, M.; SCHMIDT, R. Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation. **Toxicol. In Vitro.**, v. 19 p. 787-795, 2005.

FENTEM, J.H.; BRIGGS, D.; CHESNE, C.; ELLIOTT, G.R.; HARBELL, J.W.; HEYLINGS, J.R.; PORTES, P.; ROGUET, R.; BOTHA, P.A. A prevalidation study on in vitro tests for acute skin irritation. **Toxicol. In Vitro.**, v. 15, p. 57-93, 2001.

FITZGERALD, S.M.; CHI, D.S.; LEE, S.A.; HALL, K.; KRISHNASWAMY, G. Inhibition of GM-CSF production in fibroblast-monocyte coculture by prednisone and effects of rhGM-CSF on human lung fibroblasts. **Front. Biosci.**, v. 1, n. 9 p. 342-348, 2004.

FLACHER, V.; BOUSCHBACHER, M.; VERRONESE, E.; MASSACRIER, C.; et al. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram positive bacteria. **J. Immunol.**, v. 177, p. 59-79, 2006.

FREEMAN, A.E.; IGEL U.J.; HERMANN, B.J.; KLEINFELD, K.L. Growth and Characterization of human skin epithelial cell cultures. **In Vitro.**, v. 12, p. 352-62, 1976.

FUSENIG, N.E. **Epithelial-mesenchymal interactions regulate keratinocyte growth and differentiation *in vitro***. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, p. 71-94, 1994.

GAMONAL, A. **Dermatologia elementar: compêndio de dermatologia**. 2.ed. Juiz de Fora, M.G.: Sampaio & Rivitti, 2002.

GARLE, M.J.; FENTEM, J.H.; FRY, J.R. *In vitro* cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity in vivo. **Toxicol. In Vitro.**, v. 8, n. 6, p. 1303-1312, 1994.

GARTNER, L.P. & HIATT, J. **Tratado de histologia em cores**. 3.ed. Rio de Janeiro, R.J.: Elsevier, 2007.

GASPAR, L.R.; THARMANN, J.; CAMPOS, P.M.; LIEBSCH, M. Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV filters and vitamin A palmitate. **Toxicol. in Vitro.**, v. 27, n. 1, p. 418–425, 2013.

GIRDNER, J.H. Skin Grafting with grafts taken from the dead subject. **Med. Rec.**, v. 20, p. 119–20, 1881.

GUIRONNET, G.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; GAUDILLERE, A.; MARECHAL, S.; SCHMITT, D.; PEGUET-NAVARRO, J. Phenotypic and functional outcome of human monocytes or monocyte-derived dendritic cells in a dermal equivalent. **J.Invest. Dermatol.**, v. 116, p. 933-939, 2001.

HARRIS, M.I.N.C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3.ed. São Paulo: Senac, 2009.

HEROUET, C.; COTTIN, M.; LECLAIRE, J.; ENK, A.; ROUSSET, F. Contact sensitizers specifically increase MHC class II expression on murine immature dendritic cells. **In Vitro Mol. Toxicol.**, v. 13, p. 113-123, 2000.

HERSON, M.R.; MATHOR, M.B.; ALTRAN, S.; CAPELOZZI, V.L.; FERREIRA, M.C. *In vitro* construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. **Artif. Organs.**, v. 25, n. 11, p. 901-906, 2001.

HUANG, S. & FU, X. Tissue-engineered skin: bottleneck or breakthrough. **J. Burn Trauma.**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2011.

HUBEL, A. Parameters of cell freezing: implications for the cryopreservation of stem cells. **Transfus. Med. Rev.**, v. 11, p. 224–233, 1997.

Institute for *In Vitro* Sciences 2013, accessed 24 June 2013, <<http://archive.constantcontact.com/fs120/1102918552623/archive/1113370688879.htm>>.

JUNQUEIRA, L.C. & CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

KAMAMOTO, F.; PAGGIARO, A.O.; RODAS, A.; HERSON, M.R.; MATHOR, M.B.; FERREIRA, M.C. A wound contraction experimental model for studying keloids and wound healing modulators. **Artif. Organs.**, v. 27, p. 701–705, 2003.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur. J. Dermatol.**, v. 12, n. 4, p. 390-401, 2002.

KIERSZENBAUM, A.L. & TRES, L.L. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia**. 3.ed. São Paulo: Elsevier, 2012.

KHAN, B.A.; AKHTAR, N.; RASUL, A.; KHAN, H. MURTAZA, G.; ALI, A.; KHAN, K.A.; ZAMAN, S.; JAMEEL, A.; WASEEM, K.; MAHMOOD, T. Human skin, aging and antioxidants. **J. Med. Plants Res.**, v. 6, p. 1-6, 2012.

KIMBER, I.; DEARMAN, R.J.; CUMBERBATCH, M.; HUBY, R.J.D. Langerhans cells and chemical allergy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, p. 614–619, 1998.

KUHN, H.J.; BRASLAVSKY, S.E.; SCHIMIDT, R. Chemical actinometry. **Pure Appl. Chem.**, v. 76, n. 12, p. 2105-2146, 2004.

LOTZE, M.T. & THOMSON, A.W. **Dendritic Cells: Biology and clinical applications**. 2.ed. San Diego, L.A.: Academic Press, 2001.

MALONE, J.C.; HOOD, A.F.; CONLEY, T.; NURNBERGER, J.; BALDRIDGE, L.A.; CLENDENON, J.L.; DUNN, K.W.; PHILLIPS, C.L. Three-dimensional imaging of human skin and mucosa by two-photon laser scanning microscopy. **J. Cutan. Pathol.** v. 29, p. 453-8, 2002.

MARQUES, D.R. **Avaliação de perfil lipídico de células dendríticas imaturas e maduras**. Dissertação (mestrado). Universidade de Aveiro, Portugal. 2010.

MASSENO, A.P.B.; PORTO, C.D.; NUNES, L.C; SEQUEIRA, J.L.; ALVARENGA, M.A. Miofibroblastos: revisão da literatura. **Vet. e Zootec.**, v. 17, n. 2, p. 177-190, 2010.

MELLMAN, I. & STEINMAN, R.M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell.**, v. 106, p. 255-261, 2001.

MIDWOOD K.S.; WILLIAMS L.V.; SCHWARZBAUER J.E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n. 6, p. 1031-1037, 2004.

OECD. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. Guideline for testing of chemicals. **OECD/OCDE**, n. 432, 2004.

OUWEHAND, K.; SANTEGOETS, S.J.; BRUYNZEEL, D.P.; SCHEPER, R.J.; DE GRUIJL, T.D.; GIBBS, S. CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, p. 3050-3059, 2008.

PARIS, M.; STRICKLAND, J.; STOKES, W.; CASATI, S.; TICE, R.; RAABE, H.; CAO, C.; CLOTHIER, R.; HARBELL, J.; et al. Protocol optimization during a validation study to evaluate *in vitro* cytotoxicity assays for estimating rodent acute systemic toxicity. **ALTEX** **22.**, v. 193, 2005.

PEGUET-NAVARRO, J.; MOULON, C.; CAUX, C.; DALBIEZ-GAUTHIER, C.; BANCHEREAU, J.; SCHMITT, D. Interleukin-10 inhibits the primary allogeneic T cell response to human epidermal Langerhans cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 884-891, 1994.

PENA-CRUZ, V.; ITO, S.; OUKKA, M.; YONEDA, K.; DASCHER, C.C.; VON-LICHTENBERG, F.; SUGITA, M. Extraction of human Langerhans cells: a method for isolation of epidermis resident dendritic cells. **J. Immunol. Methods.**, v. 255, p. 83-91, 2001.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele**. 3.ed. São Paulo: Andrei, 1998.

PICHOWSKI, J.S.; CUMBERBATCH, M.; BASKETTER, D.A.; KIMBER, I. Investigation of induced changes in interleukin 1beta mRNA expression by cultured human dendritic cells as an *in vitro* approach to skin sensitization testing. **Toxicol. In Vitro.**, v. 14, p. 351-360, 2000.

PIERI, L.; DOMENICI, L.; ROMAGNOLI, P. Langerhans cells differentiation: a three-act play. **Ital. J. Anat. Embryol.**, v. 106, p. 47-69, 2001.

PIGOSSI, N.; RAIÁ, A.; LEX, A.; HABRGAMA, A.; SIMONSEN, O.; HADDAD, J.; STOLF, N.A.G.; ZERBINI, E.J.; MINITI, A.; TENUTO, R. Estudo experimental e clínico sobre o emprego, como implante, da dura-máter homogênea conservada em glicerina à temperatura ambiente. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 17, p. 263-78, 1971.

PONEC, M.; KEMPENAAR, J.; WEERHEIM, A.; DE LANNOY, L.; KALKMAN, I.; JANSEN, H. Triglyceride metabolism in human keratinocytes cultured at the air-liquid interface. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 287, p. 723-730, 1995.

PRUNIÉRAS, M.; RÉGNIER, M.; WOODLEY, D. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. **J. Invest. Dermatol.**, v. 81, p. 28-33, 1983.

RÉGNIER, M.; PRUNIÉRAS, M.; WOODLEY, D. Growth and differentiation of adult human epidermal cells on dermal substrates. **Front. Matrix Biol.**, v. 9, p. 4-35, 1981.

RÉGNIER, M.; ASSELINEAU, D.; LENOIR, M.C. Human epidermis reconstructed on dermal substrates *in vitro*: an alternative to animals in skin pharmacology. **Skin Pharmacol.**; v. 3, n. 2, p. 70-85, 1990.

RÉGNIER, M.; CARON, D.; REICHERT, U.; SCHAEFER, H. Reconstructed human epidermis: a model to study *in vitro* the barrier function of the skin. **Skin Pharmacol.**, v. 5, n. 1, p. 49-56, 1992.

RÉGNIER, M.; STAQUET, M.J.; SCHMIDT, D.; SCHMIDT, R. Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 109, p. 510-512, 1997.

RÉGNIER, M.; PATWARDHAN, A.; SCHEYNIUS, A.; SCHMIDT, R. Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells. **Med. Biol. Eng. Comput.**, v. 36, n. 6, p. 821-824, 1998.

RHEINWALD, J.G. & GREEN, H. Formation of keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from teratoma. **Cell**, v. 6, n. 3, p. 317-330, 1975.

RUSSEL, W.M.S. & BURCH, R.L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Ingleterra, U.K.: Methuen, 1959.

SALGADO, C.G.; NAKAMURA, K.; SUGAYA, M.; TADA, Y.; ASAHINA, A.; FUKUDA, S.; KOYAMA, Y.; IRIE, S.; TAMAKI K. Differential effects of cytokines and immunosuppressive drugs on CD40, B7-1, and B7-2 expression on purified epidermal Langerhans cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 113, p. 1021-1027, 1999.

SATO, E.; HANIUDA, M.; NUMANAMI, H.; USHIYAMA, T.; TSUKADAIRA, A.; TAKASHI, S.; OKUBO, Y.; KOYAMA, S. Histamine and serotonin stimulate eotaxin production by a human lung fibroblast cell line. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 128, n. 1, p. 12-17, 2002.

SCHAERLI, P.; WILLIMANN, K.; EBERT, L. M.; WALZ, A.; MOSER, B. Cutaneous CXCL14 targets blood precursors to epidermal niches for Langerhans cell differentiation. **Immunity.**, v. 23, p. 331-342, 2005.

SEO, K.I; HUH, C.H.; HAN, J.H.; YOUN, J.I; LEE, C.H.; LEE, W.J; EUN, H.C. Characterization of cryopreserved human Langerhans cells. **Cryobiology.**, v. 45, n. 2, p. 118-126, 2002.

SHUCK, J.M.; PRUITT, B.A.; JR., MONCRIEF, J.A. Homograft skin for wound coverage: A study in versatility. **Arch. Surg.**, v. 98, n. 4, p. 472-479, 1969.

SIRIANNI, F.E.; MILANINEZHAD, A.; CHU, F.S.; WALKER, D.C. Alteration of fibroblast architecture and loss of basal lamina apertures in human emphysematous lung. **J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 173 n. 6, p. 632-638, 2006.

SHORTMAN, K. & NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 19-30, 2007.

SLOMA, I.; ZILBER, M.T.; VASSELON, T.; SETTERBLAD, N.; CAVALLARI, M.; MORI, L.; DE LIBERO, G.; CHARRON, D.; MOONEY, N.; GELIN, C. Regulation of CD1a surface expression and antigen presentation by invariant chain and lipid rafts. **J. Immunol.**, v. 180, p. 980-987, 2008.

SORRELL, J.M. & CAPLAN, A.I. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 667-675, 2004.

STANDRING, S. **Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice**. 40.ed. New York, N.Y.: Churchill Livingstone , 2008.

STARK, H.J.; BAUER, M.; BREITKREUTZ, D.; MIRANCEA, N.; FUSENIG, N.E. Organotypic keratinocyte coculture in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 112, p. 681-691, 1999.

STINGL, G. Dendritic cells of the skin. **Dermatol. Clin.**, v. 8, p. 673-679, 1990.

STRICKLAND, J.; PARIS, M.; RAABE, H.; HASEMAN, J.; CASATI, S.; CLOTHIER, R.; CAO, C.; CROCKETT, P.; TICE, R.; STOKES, W. Data collection and analysis for an *in vitro* cytotoxicity validation study. **ALTEX** **22.**, v. 197, 2005.

SUFI, B.S. **Utilização de cocultura de melanócitos e queratinócitos para avaliação do potencial do Líquido da Castanha de Caju (LCC) como agente despigmentante**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

SUPP, D.M. & BOYCE, S.T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. **Clin. Dermatol.**, v. 23, n. 4, p. 403-412, 2005.

TCHOU, I.; SABIDO, O.; LAMBERT, C.; MISERY, L.; GARRAUD, O.; GENIN, C. Technique for obtaining highly enriched, quiescent immature Langerhans cells suitable for *ex vivo* assays. **Immunol. Lett.**, v. 86, p. 7-14, 2003.

TEUNISSEN, M.B.; WORMMEESTER, J.; KRIEG, SR.; PETERS, P.J.; VOGELS, I.M.; KAPSENBERG, M.L.; BOS, J.D. Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphologic and phenotypical changes during *in vitro* culture. **J. Invest. Dermatol.**, v. 94, p. 166-173, 1990.

TEUNISSEN, M.B. Dynamic, nature and function of epidermal Langerhans cells *in vivo* and *in vitro*: a review, with emphasis on human Langerhans cells. **Histochem. J.**, v. 24, p. 697-716, 1992.

TRIGLIA, D.; BRAA, S.S.; YONANA, C.; NAUGHTON, G.K. *In vitro* toxicity of various classes of test agents using the neutral red assay on a human three-dimensional physiologic skin model. **In Vitro Cell Develop. Biol.**, v. 27, p. 239-244, 1991.

TUSCHL, H. & KOVAC, R. Langerhans cells and immature dendritic cells as model systems for screening of skin sensitizers. **Toxicol. In Vitro.**, v. 15, p. 327-331, 2001.

ULLRICH, S.E. Modulation of immunity by ultraviolet radiation: key effects on antigen presentation. **J. Invest. Dermatol.**, v. 105, p. 30-36, 1995.

VALLADEAU, J.; CAUX, C.; LEBECQUE, S.; SAELAND, S. Langerin: a new lectin specific for Langerhans cells induces the formation of Birbeck granules. **Pathol Biol.**, v. 49, p. 454-455, 2001.

VALLADEAU, J.; CLAIR-MONINOT, V.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; et al. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. **J. Immunol.**, v. 168, p. 782–792, 2002.

ZAMBRUNO, G.; COSSARIZZA, A.; ZACCHI, V.; OTTANI, D.; LUPPI, A.M.; GIANNETTI, A.; GIROLOMONI, G. Functional intercellular adhesion molecule-3 is expressed by freshly isolated epidermal Langerhans cells and is not regulated during culture. **J. Invest. Dermatol.**, v. 105, p. 215-219, 1995.

WATT, F.M. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. **EMBO. J.**, v. 21, p. 3919–3926, 2002.

ZHOU, L.J. & TEDDER, T.F. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83⁺ blood dendritic cells. **Blood**. v. 86, p. 3295-3301, 1995.

YAAR, M. & GILCHREST, B.A. Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 26, p. 583-591, 2001.